

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA  
FACULDADE DE FARMÁCIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS  
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ALAN FRANCYSWAGNER CANEVARI MOREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC-MS/MS PARA  
DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO EM EXTRATOS, TINTURAS E  
XAROPES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *Mikania glomerata* (GUACO)**

**Juiz de Fora**

**2017**

**ALAN FRANCYSWAGNER CANEVARI MOREIRA**

**DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC-MS/MS PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO EM EXTRATOS, TINTURAS E XAROPES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *Mikania glomerata* (GUACO)**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Controle de Qualidade de Plantas Medicinais e Fitomedicamentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Co-orientador: Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke

**Juiz de Fora**

**2017**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Moreira, Alan Francyswagner Canevari Moreira.

Desenvolvimento de método por HPLC-MS/MS para determinação do ácido caurenóico em extratos, tinturas e xaropes obtidos a partir das folhas de Mikania glomerata (guaco) / Alan Francyswagner Canevari Moreira Moreira. -- 2017.

86 f.

Orientador: Marcone Augusto Leal de Oliveira de Oliveira

Coorientador: Gustavo Amadeu Micke Micke

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Ácido caurenóico. 2. Cromatografia líquida. 3. Espectrometria de massas. 4. Quadrupolo. 5. Tempo de voo. I. de Oliveira, Marcone Augusto Leal de Oliveira, orient. II. Micke, Gustavo Amadeu Micke, coorient. III. Título.

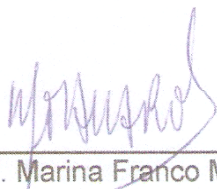
DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DE MÉTODO POR HPLC-MS/MS  
PARA DETERMINAÇÃO DO ÁCIDO CAURENOICO EM EXTRATOS,  
TINTURAS E XAROPES OBTIDOS A PARTIR DAS FOLHAS DE *Mikania  
glomerata* (GUACO)

ALAN FRANCYSWAGNER CANEVARI MOREIRA

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

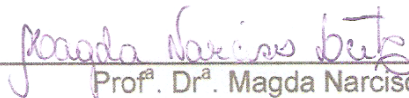
Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF,  
como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em  
Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 27/10/2017



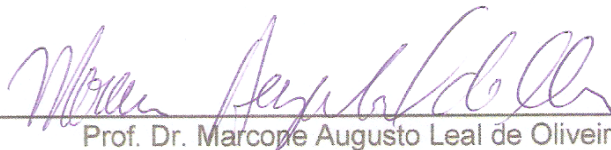
---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Marina Franco Maggi Tavares



---

Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Magda Narciso Leite



---

Prof. Dr. Marcone Augusto Leal de Oliveira

Dedico este trabalho ao meu pai, José Valentim  
Moreira, por ter sido, em vida, o principal mentor  
e incentivador de meu constante aprimoramento  
do conhecimento.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha mãe, Elzira Canevari Moreira, pelo amor incondicional e por ter sido o grande exemplo de força, resiliência e determinação.

Agradeço à minha família pelo apoio, amor e compreensão.

Aos meus amigos que, direta ou indiretamente, tornaram bastante amenas, as dificuldades para realização deste trabalho.

Ao meu orientador, Professor Marcone Augusto Leal de Oliveira, por ter me ajudado no direcionamento deste trabalho e pela participação sempre consciente e ativa.

Ao Grupo de Química Analítica e Quimiometria do Departamento de Química da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), em especial ao Lucas, Fernando, Rafael, Tatiane e Renata que sentiram mais de perto as emoções deste Mestrado.

Ao Professor Gustavo Amadeu Micke pela co-orientação deste trabalho e por ter oferecido as estruturas do Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) em momento crucial da execução deste trabalho.

Agradeço a todos os integrantes do LabEC, principalmente ao Víctor pela ajuda com as análises quantitativas em HPLC-QqQ-MS/MS e aos colegas Daniel e Diogo.

Ao Professor Ademar Alves da Silva Filho por sua intensa colaboração.

À Central Analítica da Faculdade de Farmácia (CENTRALBIO/UFJF/CT INFRA/Pro-Equipamentos-CAPES), onde foram realizadas as análises em UHPLC-QTOF-MS/MS e à Carolina Miranda Gasparetto por ter me auxiliado com tais análises.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pela confiança e oportunidade desta conquista.

À CAPES pelo incentivo financeiro.

Aos que não tiveram seus nomes citados, mas que, de alguma forma, colaboraram para a realização deste trabalho.

*“Os milagres acontecem às vezes, mas é preciso trabalhar  
tremendamente para que aconteçam.”*

Peter Drucker

## RESUMO

Produtos naturais são usados há muitos anos para fins medicinais. O ácido caurenóico (AC) é um metabólito secundário, um diterpeno da classe dos cauranos que está bastante difundido entre as plantas medicinais e é encontrado nas espécies *Sphagneticola trilobata*, *Copaifera langsdorffii*, *Annona glabra*, *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata*, *Smallanthus sonchifolius* e *Xylopia frutescens*. O AC é antioxidante, anti-inflamatório, leishmanicida, possui atividade contra malária e pode apresentar atividade citotóxica. Por se tratar de uma substância que contribui sinergicamente para a atividade farmacológica de um novo medicamento ou um importante marcador para os medicamentos já existentes, foi desenvolvido um método por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de massas do tipo triplo quadrupolo com recursos em tandem (HPLC-QqQ-MS/MS) para detecção e quantificação do AC em matrizes de diferentes complexidades. Outro método, com finalidade qualitativa e comprobatória, foi desenvolvido utilizando a técnica de cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada ao sistema de massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS/MS). O método por HPLC-QqQ-MS/MS detectou e quantificou o AC nas amostras obtidas a partir de extratos de *Mikania glomerata* (guaco), sendo estas, um extrato comercial usado como matéria prima pela indústria farmacêutica, uma tintura preparada com as folhas da planta e dois produtos adquiridos no mercado (xarope NL e xarope BT). A quantificação foi realizada por meio de construção de curvas de calibração pelo método de adição de padrão. As concentrações do AC foram 0,191 mg/mL no extrato comercial, 0,930 mg/mL na tintura, 0,003 mg/mL no xarope NL e menor que o limite de detecção do método no xarope BT. O método por UHPLC-QTOF-MS/MS confirma os resultados obtidos e ainda possibilita a quantificação do AC no xarope BT. Os métodos desenvolvidos são excelentes alternativas para análise ágil e eficiente do AC em matrizes complexas a partir de simples diluição e injeção nos equipamentos.

Palavras-chave: Ácido Caurenóico. Ácido ent-caur-16-en-19-óico. HPLC. Cromatografia líquida. Espectrometria de massas. Quadrupolo. Tempo de voo.



## ABSTRACT

Natural products have been used for many years for medicinal purposes. The kaurenoic acid (KA) is a secondary metabolite, a diterpene of the cauran class that is widespread among medicinal plants and it is found in *Sphagneticola trilobata*, *Copaifera langsdorffii*, *Annona glabra*, *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata*, *Smallanthus sonchifolius* and *Xylopia frutescen*. The KA is an antioxidant, anti-inflammatory, leishmanicide, has activity against malaria and may present cytotoxic activity. Because it is a substance that contributes synergistically to the pharmacological activity of a new medicine or an important marker for existing medicines, a high performance liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass detector with tandem capabilities (HPLC-QqQ-MS/MS) was developed for the detection and quantification of KA in complex matrices. Another method, with a qualitative and verifiable purpose, was developed using the ultra-efficient liquid chromatography technique coupled to a high resolution mass spectrometer of the simple quadrupole type and time of flight (UHPLC-QTOF-MS/MS). The HPLC-QqQ-MS/MS method detected and quantified KA in the samples obtained from extracts of *Mikania glomerata* (guaco) - a commercial extract used as raw material by the pharmaceutical industry, a tincture prepared with the leaves of the plant and two products purchased in the market (NL syrup and a BT syrup). Quantification was performed by the construction of calibration curves by the standard addition method. Concentrations of KA were 0.191 mg / mL in the commercial extract, 0.930 mg/mL in the tincture, 0.003 mg / mL in the NL syrup and less than the detection limit of the method in the BT syrup. The UHPLC-QTOF-MS/MS method confirms the results obtained and still allows the quantification of the BT syrup. The methods developed are excellent alternatives for agile and efficient analysis of the KA in complex matrices from simple dilution and injection in the equipments.

Keywords: Kaurenoic acid. Ent-kaur-16-en-19-oic acid. HPLC. Liquid chromatography. Mass spectrometry. Quadruple. Time of flight (TOF).

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Gráfico da distribuição dos diferentes metabólitos secundários das plantas	23
Figura 2 – Estrutura química do Ácido Caurenico – AC	26
Figura 3 – Esquema de um equipamento de HPLC	29
Figura 4 – Diagrama de blocos de um sistema HPLC-QqQ-MS/MS	31
Figura 5 – Principais elementos de um espectrômetro de massas Q-TOF	33
Figura 6 – Foto da planta coletada no horto da Faculdade de Farmácia	36
Figura 7 – Cromatogramas TIC com monitoramento de $m/z$ do AC e do padrão interno	51
Figura 8 – Cromatogramas XIC com monitoramento de $m/z$ do AC e do padrão interno	52
Figura 9 – Espectros de massas dos picos com tempos de retenção 8,68 e 8,84	53
Figura 10 – Comparativo do recurso de suavização sobre os Cromatogramas – auto smoth	54
Figura 11 – Gráfico da extrapolação linear por adição de padrão	57
Figura 12 – Gráfico da curva de calibração por adição de padrão no extrato comercial	60
Figura 13 – Gráfico da curva de calibração por adição de padrão na tintura hidroalcoólica	61
Figura 14 – Gráfico da curva de calibração por adição de padrão no xarope de guaco NL	62
Figura 15 – Cromatograma TIC do ácido caurenico por UHPLC-QTOF-MS/MS	64
Figura 16 – Espectro de massas referente ao pico com $t_R$ 5,01 minutos em UHPLC-QTOF-MS/MS	65
Figura 17 – Cromatogramas dos testes da condição 1. Padrão de AC (superior), tintura (intermediário), xarope NL (inferior)	66
Figura 18 – Cromatogramas da tintura hidroalcoólica testada nas condições 2 (superior), 3 (intermediário) e 4 (inferior)	68
Figura 19 – Cromatogramas do extrato comercial na condição 5 (superior) e na condição 6 (inferior)	69
Figura 20 – Cromatogramas do extrato comercial na condição 7 (superior) e 8 (inferior)	70

Figura 21 – Cromatogramas do extrato comercial na condição 9 (superior) e 10 (inferior)	71
Figura 22 – Cromatograma do padrão de ácido caurenico na condição 9	72
Figura 23 – Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do extrato comercial	73
Figura 24 – Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) da tintura hidroalcoólica	74
Figura 25 – Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do produto fitoterápico xarope NL	75
Figura 26 – Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do produto fitoterápico xarope BT	76

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Teores de ácido caurenico em diferentes espécies de plantas	25
Tabela 2 – Composição da tintura de guaco	37
Tabela 3 – Condições ideais do método cromatográfico desenvolvido	42
Tabela 4 – Parâmetros de cada transição monitorada - infusão direta do AC e do AB no equipamento de MS	43
Tabela 5 – Parâmetros gerais de ionização do método espectrométrico	44
Tabela 6 – Condições testadas para desenvolvimento do método cromatográfico	46
Tabela 7 – Precisão instrumental e avaliação do impacto da suavização	55
Tabela 8 – Triagem da concentração ideal dos padrões	58
Tabela 9 – Triagem para obtenção da diluição ideal de cada amostra antes da quantificação	59
Tabela 10 – Relação entre as concentrações de AC por HPLC-QqQ-MS/MS e os valores de áreas integradas dos picos obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB	Ácido betulínico
AC	Ácido caurenóico
ACN	Acetonitrila
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização Química à Pressão Atmosférica
CE	Energia de Colisão (do Inglês, <i>Collision Energy</i> )
CEP	Potencial na Entrada da Célula de Colisão (do Inglês, <i>Collision Cell Entrance Potential</i> )
CV	Coefficiente de Variação
CXP	Potencial na Saída da Célula de colisão (do Inglês, <i>Collision Cell Exit Potential</i> )
DAD	Arranjos de Fotodiodo (do Inglês, <i>Diode Array Detections</i> )
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do Inglês, <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
DP	Potencia de Desaglomeração (do Inglês, <i>Declustering Potential</i> )
EP	Potencial de Entrada (do Inglês, <i>Entrance Potential</i> )
ESI	Ionização por Eletrospray (do Inglês, <i>Eletrospray Ionization</i> )
EtOH	Etanol ou álcool etílico
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (do Inglês, <i>High Performance Liquid Chromatography</i> )
HPLC-QqQ-MS/MS	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo em tandem
IC50	Metade da concentração inibitória máxima
IL-1 $\beta$	Interleucina 1 $\beta$
LC	Cromatografia Líquida (do Inglês, <i>Liquid Chromatography</i> )
LC-MS	Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MeOH	Metanol
MEP	Via 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato

MRM	Monitoramento de Reações Múltiplas
MS	Epectrometria de Massas (do Inglês, <i>Mass Spectrometry</i> )
MVA	Via do Ácido Mevalônico
NACE	Eletroforese Capilar Não Aquosa (do inglês, <i>Non-Aqueous Capillary Electrophoresis</i> )
NLRP12	Gene NLRP12
OMS	Organização Mundial da Saúde
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
Q	Quadrupolo
qsp	Quantidade suficiente para
Q-TOF	Espectrômetro de Massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e Tempo de Voo em tandem
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotação por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
TOF	Tempo de Voo (do inglês, <i>Time of Flight</i> )
TIC	Cromatograma Total dos Íons (do inglês, <i>Total Ion Chromatogram</i> )
UHPLC-QTOF-MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas de alta resolução do tipo quadrupolo simples e Tempo de Voo em tandem
UV	Ultravioleta
vis	Visível
XIC	Cromatograma do Íon Selecionado (do inglês, <i>Extracted Ion Chromatogram</i> )

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Grau Celsius
eV	Electonvolt
g	Gramas
h	Hora
kV	Quilovolt
L/h	Litro por hora
min	Minuto
mL	Mililitro
mL/min	Mililitro por minuto
ms	Milisegundo
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
µg/mL	Micrograma por mililitro
µL/min	Microlitro por minuto
µm	Micrômetros
µmol/L	Micromol por litro
nm	Nanômetro
m/m	Massa por massa
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi	Padrão interno
t	Tempo
t <sub>R</sub>	Tempo de retenção

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>18</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	<b>22</b>
2.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS PLANTAS MEDICINAIS, TERPENOS E SUA IMPORTÂNCIA.	22
2.2	ÁCIDO CAURENOICO	23
2.3	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC	27
2.4	ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SELEÇÃO DO PRINCÍPIO DE DETECÇÃO ADEQUADO	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
3.1	OBJETIVO GERAL	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	36
4.2	TINTURA DE GUACO	37
<b>4.2.1</b>	<b>Preparo da tintura</b>	<b>37</b>
4.3	PADRÕES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA	38
<b>4.3.1</b>	<b>Ácido caurenoico</b>	<b>38</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ácido betulínico</b>	<b>38</b>
4.4	SOLVENTES UTILIZADOS	39
4.5	PRODUTOS FITOTERÁPICOS ADQUIRIDOS NO MERCADO	39
4.6	SOLUÇÕES ESTOQUE	40
<b>4.6.1</b>	<b>Ácido caurenoico 1,06 mg/mL</b>	<b>40</b>
<b>4.6.2</b>	<b>Ácido betulínico 0,104 mg/mL</b>	<b>40</b>
4.7	INSTRUMENTAÇÃO	40
<b>4.7.1</b>	<b>Desenvolvimento do método quantitativo por Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo em tandem (HPLC-QqQ-MS/MS)</b>	<b>40</b>
4.7.1.1	<i>Preparo das amostras – Diluição</i>	41
4.7.1.2	<i>Otimização dos parâmetros cromatográficos</i>	42



4.7.1.3	<i>Otimização dos parâmetros referentes ao método espectrométrico para cada transição monitorada (infusão direta no MS)</i>	43
4.7.1.4	<i>Otimização dos parâmetros gerais do método espectrométrico</i>	44
4.7.1.5	<i>Suavização dos picos cromatográficos – Auto Smooth</i>	44
4.7.1.6	<i>Precisão instrumental</i>	45
<b>4.7.2</b>	<b>Desenvolvimento do método qualitativo por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas de quadrupolo único e tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS/MS)</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
5.1	ELETROFORESE CAPILAR E DETECÇÃO POR UV-Vis E ARRANJOS DE FOTODIODO (DAD)	49
5.2	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO QUANTITATIVO POR HPLC-QqQ-MS/MS	50
5.2.1	<b>Cromatogramas e espectros de massas obtidos por HPLC-QqQ-MS/MS</b>	<b>50</b>
5.2.2	<b>Precisão instrumental e avaliação do impacto da suavização de picos (auto smooth)</b>	<b>53</b>
5.2.3	<b>Quantificação do ácido caurenico nas amostras</b>	<b>56</b>
5.3	DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR UHPLC-QTOF-MS/MS	63
5.3.1	<b>Checagem do sinal analítico do padrão de ácido caurenico por UHPLC-QTOF-MS/MS</b>	<b>64</b>
5.3.2	<b>Desenvolvimento do método qualitativo por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência</b>	<b>65</b>
5.3.3	<b>Confirmação da presença do ácido caurenico nas amostras quantificadas por HPLC-QqQ-MS/MS</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais, especialmente aqueles oriundos de plantas, usados para o tratamento e cura de doenças, é tão antigo e universal quanto a própria origem do medicamento. O uso terapêutico das plantas certamente remonta à civilização Suméria e 400 anos antes da Era Comum. Registra-se que Hipócrates usava aproximadamente 400 diferentes espécies de plantas para fins medicinais. Os produtos naturais desempenharam um papel proeminente nos antigos sistemas de medicina tradicional, como Chinês, Ayurveda e Egípcio. Os produtos naturais ainda são de uso comum nos dias de hoje. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), 75% das pessoas ainda dependem de medicamentos tradicionais e baseados em plantas para cuidados primários de saúde ao redor do planeta. A natureza tem sido uma fonte de agentes terapêuticos há milhares de anos e um número impressionante de drogas modernas foi derivado de fontes, muitas baseadas em seu uso na medicina tradicional (SARKER; LATIF; GRAY, 2006).

A Fitoterapia vem sendo praticada há muitos anos por todas as sociedades humanas. Ao longo de séculos, vem sendo utilizada e documentada por seu valioso conhecimento tradicional e popular decorrente de sua rica diversidade étnica e cultural. Esses conhecimentos são fontes estratégicas de informações preliminares de eficácia ou toxicidade das plantas medicinais, inspirando muitos estudos científicos sobre essas propriedades terapêuticas. A tradicionalidade de uso contribui enormemente com o surgimento de medicamentos inovadores, hoje comercializados em todo o mundo, para o tratamento de inúmeras enfermidades, inclusive para o câncer. Com o intuito de promover o desenvolvimento sócio e econômico na área de plantas medicinais e fitoterápicos e proporcionar melhorias na qualidade de vida da população brasileira, foi instituída, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006)

De acordo com a legislação brasileira, são considerados medicamentos fitoterápicos, aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e eficácia sejam baseadas em evidências clínicas e que sejam caracterizados pela constância de sua qualidade. Ainda existem os medicamentos classificados como produtos tradicionais fitoterápicos. Estes são obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais cuja segurança e efetividade sejam baseadas em dados de uso seguro e efetivo publicados na literatura técnico-científica e que sejam concebidos para serem utilizados sem a

vigilância de um médico para fins de diagnóstico, de prescrição ou de monitorização (ANVISA, 2014).

Neste contexto, enquadram-se as espécies *Mikania glomerata* Spreng e *M. laevigata* Schultz Bip. ex Baker, conhecidas popularmente no Brasil como guaco e são espécies de plantas medicinais muito empregadas no tratamento de resfriados e problemas respiratórios como asma, dos quais esperam-se suas ações broncodilatadora, anti-inflamatória e antiespasmódica (MELO; SAWAYA, 2015 e BRASÍLIA, 2011).

No Brasil, estas espécies fazem parte de um contexto de grande interesse para a saúde pública já que se encontram presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS). Em 2006 foi publicada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), que ressalta a utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. A PNPIC foi elaborada com o objetivo de oferecer à população serviços e produtos de origem vegetal como os medicamentos fitoterápicos, no Sistema Único de Saúde (SUS), garantindo a integralidade na atenção à saúde (BRASIL 2006).

Estudos relatados por Corrêa *et al.* (2008) confirmaram a indicação de produtos de *M. glomerata* para o tratamento de doenças respiratórias ocasionadas pela broncoconstrição.

O extrato etanólico de *Mikania glomerata* também pode ser utilizado como um agente antialérgico e anti-inflamatório (FIERRO *et al.*, 1999).

Na medicina tradicional, ambas as espécies têm uma longa história de uso. Atualmente, o uso medicinal dessas plantas é frequente e estudos pré-clínicos já demonstraram as propriedades antialérgica, antiasmática e antiulcerogênica. Nas últimas décadas, numerosos estudos têm sido realizados com o objetivo de isolar e identificar os metabólitos de guaco a partir de extratos distintos (GASPARETTO *et al.*, 2010).

A maioria dos trabalhos disponíveis na literatura atribuem os efeitos benéficos do guaco à cumarina (1,2-benzopirona), a qual é definida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Brasil (ANVISA) como o marcador químico do guaco (BRASIL, 2008).

Embora não sejam marcadores dos produtos a base de extrato de guaco, outros metabólitos despertam grande interesse por parte dos pesquisadores, em função de efeitos terapêuticos. Como alguns dos principais metabólitos, pode-se citar o ácido *o*-cumárico, que associado à cumarina, demonstrou efeito antialérgico no tecido pulmonar de camundongos com pneumonite alérgica induzida. Esse resultado levou a conclusão de que a associação de

ambos os compostos, cumarina e ácido *o*-cumárico geram o fitocomplexo responsável pelas atividades terapêuticas do guaco (SANTOS *et al.*, 2006).

Outro metabólito do guaco, o ácido caurenóico, tem apresentado interesse por parte da sociedade científica por ser responsável por efeitos farmacológicos, como promover relaxamento na aorta de ratos pré-contraída com fenilefrina e cloreto de potássio (TIRAPELLI *et al.*, 2002, 2004) e atividade anti-inflamatória. A atividade anti-inflamatória pôde ser demonstrada com a redução da atividade de macrófagos RAW264.7 através da inibição da síntese do óxido nítrico (IC<sub>50</sub> = 51,7 µM), liberação da prostaglandina E<sub>2</sub> (IC<sub>50</sub> = 106,0 µM) e expressão da atividade enzima inflamatória, ciclooxigenase 2 (COX-2) (IC<sub>50</sub> = 3,5 µg/mL) (CHOI *et al.*, 2011).

O ácido caurenóico é um metabólito relacionado com os efeitos benéficos do guaco, porém, além dos benefícios, alguns estudos apontam que ele pode ser tóxico em condições bastante específicas. Em um estudo *in vitro*, o ácido caurenóico promoveu a hemólise de eritrócitos humanos e de camundongos (COSTA-LOTUFO *et al.*, 2002). O ácido caurenóico também induziu quebra de DNA e causou genotoxicidade em fibroblastos de pulmão de hamster, além de promover anomalia citogenética em leucócitos humanos e efeito genotóxico no fígado, rim e baço de camundongos (CAVALCANTI *et al.*, 2006 e 2010).

Matos (2016) faz um levantamento dos métodos descritos na literatura para análise do ácido caurenóico e aponta, da mesma forma que Gasparetto *et al.* (2011), dificuldades na detecção em função da baixa absorvidade molar da molécula.

Dado o conhecimento de potenciais efeitos tóxicos e dos conhecidos e comprovados efeitos terapêuticos do ácido caurenóico, apresentados anteriormente, faz-se necessário o desenvolvimento de novos métodos de análise para esta substância, seja para avaliação dos produtos farmacêuticos disponíveis no mercado, seja para a investigação dos efeitos do ácido caurenóico em seres humanos como, por exemplo, determinação da sua farmacocinética e perfil toxicológico, ou ainda, para a obtenção de métodos eficientes, para o desenvolvimento ágil de novos produtos farmacêuticos, que explorem as propriedades do ácido caurenóico como marcador ativo na composição destes produtos.

Desta forma, este trabalho visou o desenvolvimento de um método analítico para determinação e quantificação do ácido caurenóico em matrizes complexas. Inicialmente, optou-se pela técnica de eletroforese capilar com recursos de detecção por UV-vis com arranjos de fotodiodo (DAD), no entanto, em função de características intrínsecas da molécula do AC e da dificuldade na detecção, foi necessária a utilização de um sistema de detecção por

massas. Desenvolveu-se então, um método por meio da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas e Recursos *Tandem*.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

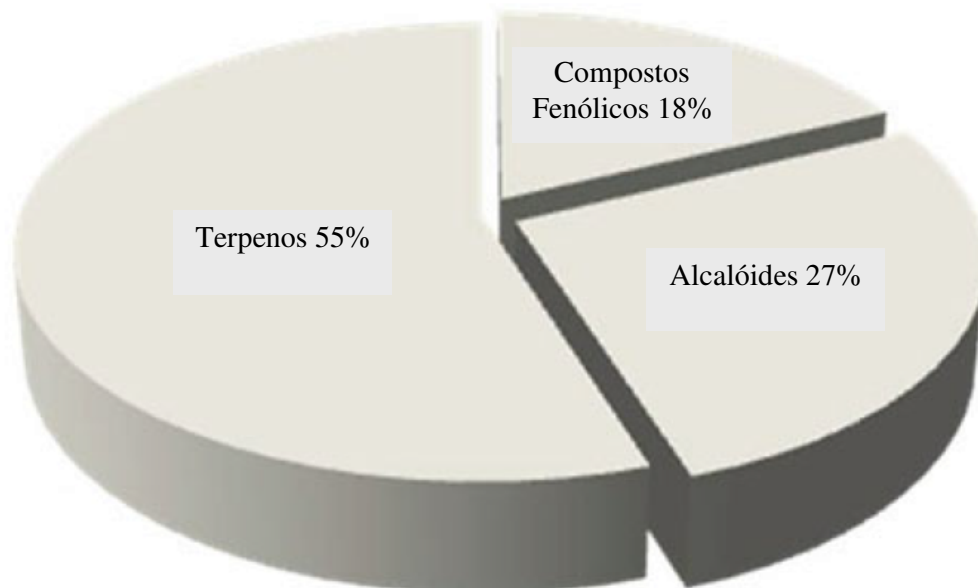
### 2.1. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DAS PLANTAS MEDICINAIS, TERPENOS E SUA IMPORTÂNCIA.

De acordo com Simões *et al.* (1999), além dos metabólitos primários (aminoácidos, nucleotídeos, açúcares e lipídeos), que são as substâncias essenciais para a vida da planta, existem os metabólitos secundários, que são substâncias cuja produção e acumulação estão restritas a um número limitado de organismos e se caracterizam como elementos de diferenciação e especialização.

Os terpenos são hidrocarbonetos naturais produzidos por uma grande variedade de plantas. Eles são classificados com base em unidades de cinco carbonos (isopreno) como seus blocos de construção, que totalizaram mais de 55 mil moléculas descobertas até o momento. Diferentes terpenos incluem os hemiterpenos (com 5 carbonos), monoterpenos (10 carbonos), sesquiterpenos (15 carbonos), diterpenos (20 carbonos), sesterterpenos (25 carbonos), triterpenos (30 carbonos) e politerpenos (acima de 30 carbonos). Biossinteticamente, os terpenos são formados através de duas principais vias: a via do ácido mevalônico (MVA) e a via do 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP). Os terpenos biologicamente ativos apresentam diferentes ordens de grandeza e em um estudo mais abrangente sobre os efeitos dos terpenos, destacam-se os efeitos na prevenção e no tratamento de vários tipos de câncer. Ilustrativamente, derivados do taxol (paclitaxel e docetaxel) estão entre os medicamentos mais amplamente utilizados em tratamentos de quimioterapia. Outros importantes usos terapêuticos dos terpenos incluem as suas atividades antimicrobiana, antifúngica, antiviral, anti-hiperglicemiante, anti-inflamatória, antioxidante, antiparasitária, imunomoduladora e potencializadora da permeação cutânea. Além disso, podem ser utilizados como aditivos de sabor natural, para alimentos ou fragrâncias em perfumaria e em medicamentos tradicionais ou alternativos como aromaterapia (BRAHMKSHATRIYA; BRAHMKSHATRIYA, 2013).

Os terpenos são os metabólitos secundários mais numerosos e que apresentam a maior diversidade de estruturas dentre os produtos naturais (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

**Figura 1.** Gráfico da distribuição dos diferentes metabólitos secundários das plantas



Fonte: Adaptado de Croteau; Kutchan e Lewis (2000)

## 2.2. ÁCIDO CAURENOICO

O ácido caurenoico (ácido ent-caur-16-en-19-óico) representado na Figura 2 é um diterpeno da classe dos cauranos, assim chamados, os diterpenos que apresentam esqueleto tetracíclico e rígido. O ácido caurenoico é intermediário da biogênese das giberelinas. Este diterpeno está bastante difundido entre as plantas medicinais e é encontrado na *Sphagneticola trilobata*, *Copaifera langsdorffii*, *Annona glabra*, *Mikania laevigata*, *Mikania glomerata*, *Smallanthus sonchifolius* e *Xylopia frutescen* (ARÁOZ *et al.*, 2010; CAVALCANTI *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2002).

Estudos recentes demonstraram que variações genéticas e ambientais tem um efeito direto na quantidade de metabólitos secundários produzidos pelas plantas e isso pode ter implicações para os seus efeitos biológicos. Três tipos diferentes de plantas produtoras do ácido caurenoico, a *M. laevigata* cultivada em quatro locais distintos, localizados entre a Linha Equador e o Trópico de Capricórnio no Brasil, foram avaliados com o objetivo de apresentar e discutir essas variações genéticas e ambientais e a influência sobre os compostos bioativos. Os resultados revelaram efeitos decorrentes de fatores ambientais e genéticos. O estudo mostra que fatores genéticos das plantas, aliados ao clima, influenciaram na produção

de ácido caurenico pela planta. O estudo ainda indica que o clima de regiões mais frias estimula a produção do ácido caurenico pela planta (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2016). Uma correlação entre a produção de AC e de cumarina pela planta, só pode ser estabelecida ao se considerar a complexa rede de condições ambientais, que regem a composição destes metabólitos secundários (XAVIER, 2015).

Em um trabalho recente Carvalho (2015) descreve que o ácido caurenico é encontrado em várias espécies de plantas medicinais, dentre elas *Mikania glomerata* Sprengel e *M. laevigata* Schultz Bip (Asteraceae). Outros trabalhos também descrevem seu isolamento dos frutos verdes de *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae), *X. brasiliensis*, *X. aromática* e das folhas e cascas de *Annona glabra* (Annonaceae), além das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (Asteraceae). O ácido caurenico também foi isolado dos óleos de copaíbas (*Copaifera* sp., família Fabaceae) e ainda existem relatos do isolamento desta substância a partir de quatro espécies de *Smallanthus* conforme foi compilado pelo autor. A Tabela 1 apresenta a ocorrência do ácido caurenico em diferentes espécies e a sua concentração nas partes da planta.



**Tabela 1.** Teores de ácido caurenico em diferentes espécies de plantas

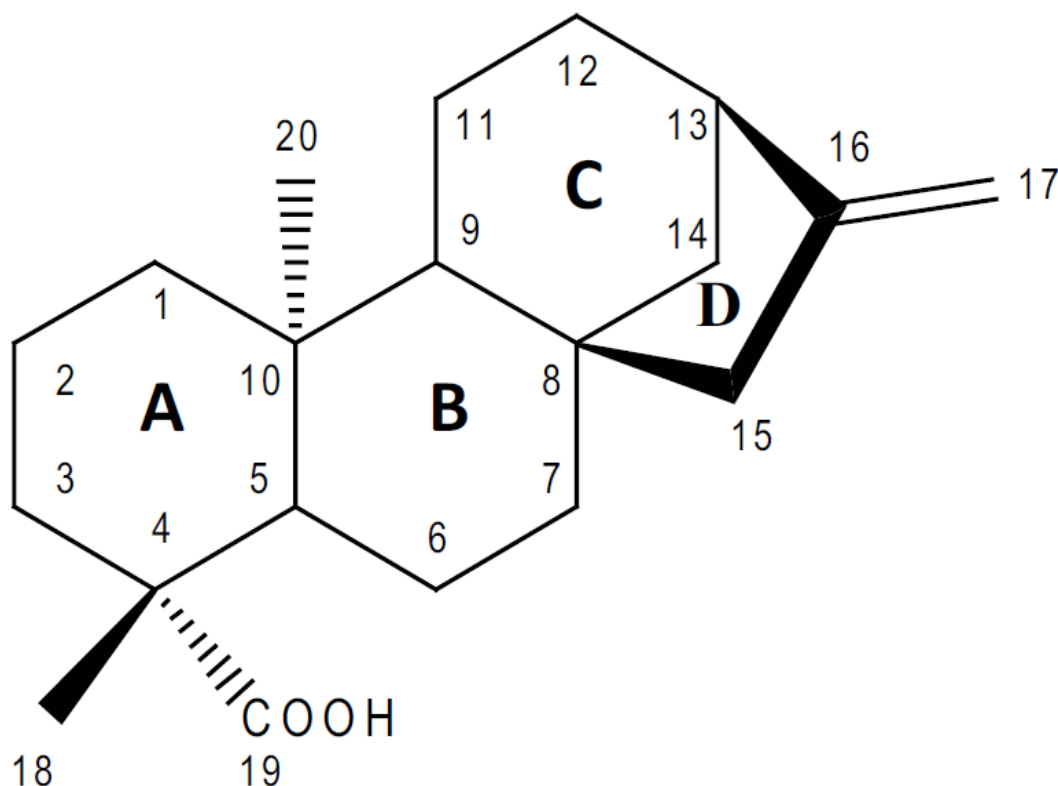
<i>Espécie vegetal</i>	<i>Parte da planta</i>	<i>Teor (%)</i>
<i>Mikania glomerata</i>	Partes aéreas	0,20
	Flores	0,10
	Folhas	0,11
<i>Wedelia paludosa</i>	Caule	0,50
	Partes aéreas	0,85
<i>Annoma glabra</i>	Cascas	0,53
	Folhas	0,27
<i>Xylopiá brasiliensis</i>	Folhas	0,01
<i>Xylopiá aromática</i>	Folhas	0,02
<i>Xylopiá frutescens</i>	Folhas	0,01
<i>Smallantus sonchifolius</i>	Raízes tuberosas	0,74
<i>Smallantus siegesbeckius</i>	Raízes tuberosas	0,51
<i>Smallantus connatus</i>	Raízes tuberosas	0,71
<i>Smallantus macrocyphus</i>	Raízes tuberosas	0,73

Fonte: Adaptado de Carvalho (2015)

O ácido caurenico é conhecido por ter potentes propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias. Ele pode atenuar o estresse oxidativo e a inflamação, reduzindo o dano tecidual induzido por isquemia / reperfusão em ratos submetidos a retalhos de pele dorsal (SILVA *et al.*, 2015).

Em um estudo recente, um efeito leishmanicida direto sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foi atribuído ao ácido caurenico. Observou-se ainda, uma redução do número intracelular de amastigota e a percentagem de macrófagos peritoneais de ratos da raça BALB/c infectados com o protozoário. Além disso, a substância induziu o aumento da produção de IL-1 $\beta$  e expressão do NLRP12, um componente de ativação do complexo proteico inflamassoma. Estes resultados demonstram a capacidade leishmanicida do ácido caurenico contra *L. amazonensis* em cultura de macrófagos (MIRANDA *et al.*, 2015).

**Figura 2.** Estrutura química do Ácido Caurenico – AC



Fonte: SIEBRA *et al.* (2009)

Na área da odontologia, foi estudada a ação que o Ácido Caurenico possui em inibir o crescimento de patógenos orais ou aderência a superfícies e, por conseguinte, reduzir a formação de cárie dentária. Um extrato de *Mikania glomerata* com elevado teor de ácido caurenico foi eficaz para inibir a formação do biofilme de *Streptococcus mutans*. Dessa

forma o autor sugere que tal extrato, rico em ácido caurenóico, é um produto natural a ser considerado como ingrediente ativo em produtos de cuidados orais (MOREIRA *et al.*, 2016).

Recentemente, pesquisadores demonstraram que o ácido caurenóico tem atividade *in vitro* contra malária, inclusive contra o *Plasmodium falciparum* resistente à cloroquina. Esta característica tem motivado modificações químicas na estrutura do Ácido Caurenóico e resultado em pedido de depósito de novas patentes (SANTOS *et al.*, 2016).

Além das várias atividades farmacológicas desejáveis atribuídas ao ácido caurenóico, os trabalhos de publicados por Mongelli *et al.* (2002) e Garcia, Oliveira e Batista (2007) evidenciam uma potencial citotoxicidade do ácido caurenóico em ensaios *in vitro* realizados por eles.

### 2.3. CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – HPLC

A cromatografia é um método empregado de forma ampla e que permite a separação, identificação e determinação de componentes químicos em misturas complexas. Nenhum outro método de separação é tão poderoso e de aplicação tão generalizada como a cromatografia. O termo cromatografia é difícil de ser definido rigorosamente porque o nome tem sido aplicado a diversos sistemas e técnicas. Todos esses métodos, contudo, apresentam em comum o uso de uma fase estacionária e de uma fase móvel. Os componentes de uma mistura são transportados através da fase estacionária pelo fluxo da fase móvel e as separações ocorrem com base nas diferenças de velocidade de migração entre os componentes da fase móvel. A fase estacionária em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - HPLC é imobilizada em uma coluna e a fase móvel se movimenta através da fase estacionária transportando a mistura dos analitos. Uma eluição com um único solvente ou com uma mistura de solventes de composição constante é isocrática. Na eluição por gradiente, dois (e às vezes mais) sistemas solventes que diferem significativamente em polaridade são empregados. A razão entre os dois solventes varia em uma forma pré-programada durante a separação, algumas vezes de forma contínua e por vezes em etapas. A eluição por gradiente geralmente melhora a eficiência da separação. Os instrumentos modernos de HPLC são equipados com válvulas que introduzem líquidos a partir de dois ou mais reservatórios em proporções que podem ser variadas continuamente (SKOOG *et al.*, 2006).

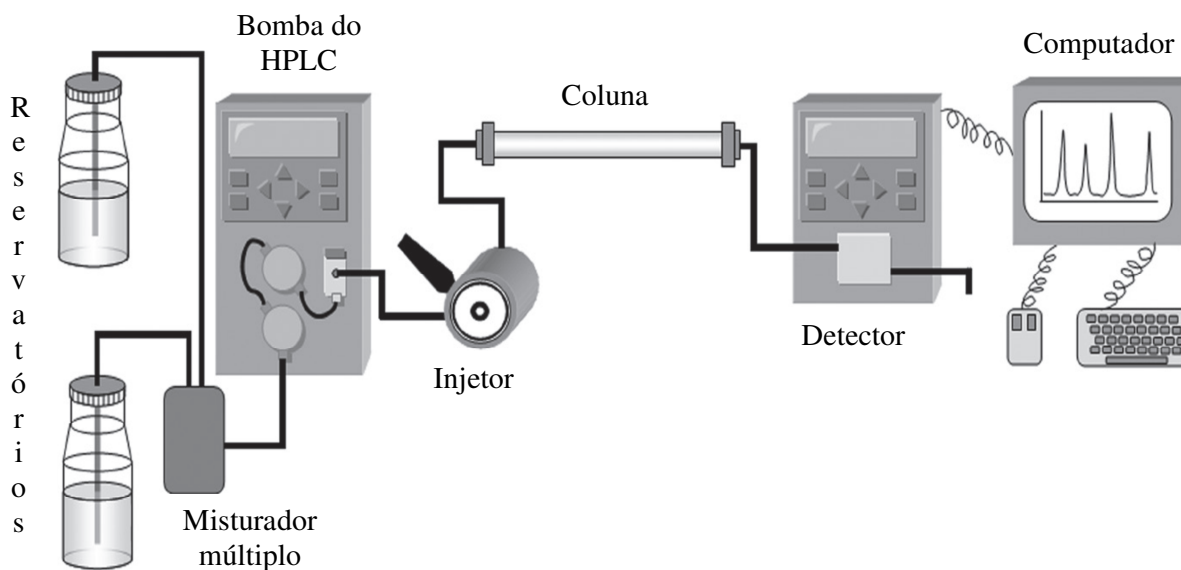
O HPLC representa o ponto mais moderno do desenvolvimento da cromatografia líquida, onde as amostras são distribuídas em uma bandeja para injeção automática, o solvente é continuamente bombeado através da coluna e os compostos separados são detectados continuamente por um detector à medida que deixam a coluna. O sinal resultante do detector é plotado em um gráfico em função do tempo, denominado cromatograma. Um computador controla toda a operação do equipamento por meio de *software* e o computador também pode gerar um relatório final de análise para cada amostra. Além dessa automação de todo o processo, esta técnica de separação é caracterizada pelo uso de bombas de alta pressão para uma separação mais rápida. Colunas reutilizáveis e mais efetivas para o processo de separação podem ser usadas para garantir melhor controle geral do processo, além de resultados mais precisos e reprodutíveis (SNYDER; KIRKLAND; DOLAN, 2010).

Etapa essencial em HPLC é a detecção. Um detector mede um parâmetro físico do analito eluído pela coluna e transforma este parâmetro em um sinal elétrico. Detectores universais medem uma propriedade intrínseca desse analito, por exemplo, o índice de refração, enquanto que, em um detector específico, apenas compostos com particularidades específicas contribuem para o sinal gerado por pelo detector dessa classe. Os detectores mais amplamente empregados em cromatografia líquida são baseados na absorção da radiação ultravioleta ou visível, no entanto, o uso de uma combinação de HPLC com detector de espectrometria de massas está, atualmente, tornando-se bastante popular. A combinação de HPLC e espectrometria de massas proporciona uma alta seletividade, uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados monitorando-se somente um valor de massa selecionado. A técnica de acoplamento do HPLC com detecção por espectrometria de massas pode fornecer uma impressão digital de um analito em particular em vez de recorrer apenas ao tempo de eluição, como na HPLC convencional. A combinação também pode fornecer a massa molar e informação estrutural e uma análise quantitativa exata (WILLOUGHBY; SHEEHAN; MITROVICH, 2002 e NIESSEN, 2006).

A Figura 3 apresenta um esquema da instrumentação usada hoje em cromatografia líquida. Esta instrumentação é muito confiável, compõe-se de materiais tecnologicamente avançados e conhecimento adquirido ao longo dos anos. É geralmente composto de peças modulares que podem ser montadas de acordo com requisitos operacionais e contendo o sistema de bombeamento que faz a diluição programada dos solventes da FM. O injetor é por onde entra a amostra a ser analisada. A coluna que tem a FE e onde ocorre a eluição ou separação cromatográfica. Um sistema de detecção, responsável pela

transformação do sinal gerado pelo analito e transformação em corrente elétrica para, finalmente, ser interpretado pelo software durante o tratamento dos dados.

**Figura 3.** Esquema de um equipamento de HPLC



Fonte: Adaptado de Nollet e Toldrá (2013)

Em seu recente trabalho de mestrado sobre o perfil farmacocinético e biodisponibilidade do AC em ratos, Matos (2016) compilou os trabalhos descritos na literatura que utilizaram a técnica de cromatografia líquida para análise do ácido caurenico. Este trabalho corrobora o de Gasparetto *et al.* (2011) no que diz respeito à baixa absorvidade molar do AC e dificuldade de detecção por meio dos detectores UV-vis, por consequência da ausência de grupamentos cromofóricos na estrutura molecular do ácido caurenico.

#### 2.4. ESPECTROMETRIA DE MASSAS E SELEÇÃO DO PRINCÍPIO DE DETECÇÃO ADEQUADO

Sabe-se que nos analitos separados pela técnica de cromatografia líquida, podem ser determinados, qualitativa e quantitativamente com base nos dados cromatográficos, como o tempo de retenção, o fator de retenção, os espectros UV, o uso de compostos padrão e assim

por diante. No entanto, muitas vezes esses dados são insuficientes para fornecer informações completas sobre a identidade dos analitos (NOLLET e TOLDRÁ, 2013).

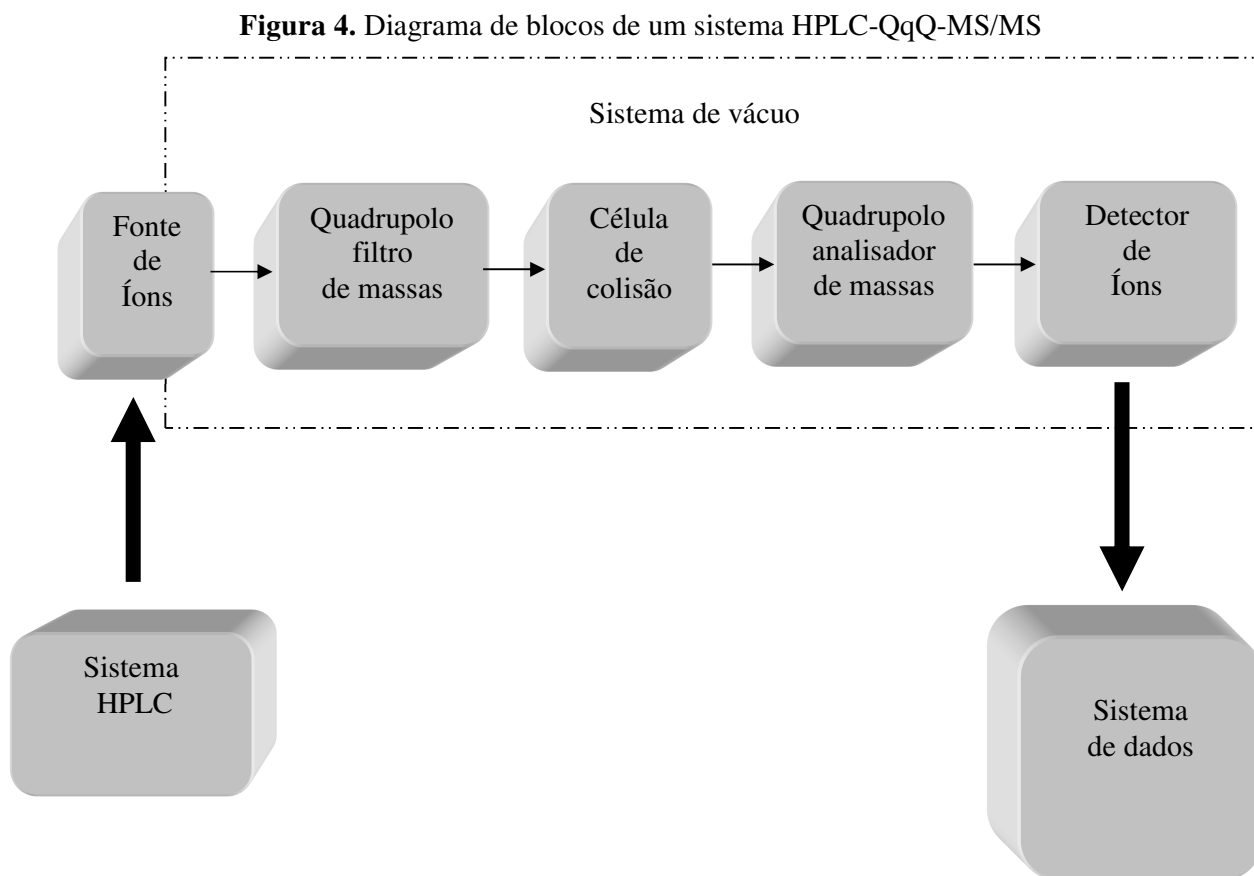
Ao longo dos últimos anos, as aplicações de cromatografia líquida associada à espectrometria de massas na análise de produtos naturais têm crescido drasticamente devido às capacidades, cada vez mais aprimoradas, de separação e detecção dos instrumentos desta associação. Em particular, os novos instrumentos híbridos de alta resolução ligados ao cromatógrafo e as hifenizações dos cromatógrafo líquidos aos diferentes espectrômetros de massas e com outras técnicas de separação analítica, ajudam muito a identificação inequívoca e na quantificação altamente sensível de produtos naturais em concentrações de rastreamento em matrizes complexas (WU *et al.*, 2013). A espectrometria de massas geralmente desempenha um papel fundamental quando é necessária alta sensibilidade e alta especificidade. Os espectrômetros de massas de acoplamento com cromatografia revolucionaram a farmacocinética e se tornaram a tecnologia considerada, atualmente, a espinha dorsal na pesquisa farmacêutica moderna (TÖKÉS, 2016).

O princípio básico da espectrometria de massas é a formação de íons a partir dos compostos, inorgânicos ou orgânicos, por algum método adequado para separar esses íons, por meio de sua relação massa-carga ( $m/z$ ) e para detectá-los qualitativa e quantitativamente por seus respectivos  $m/z$  e abundância. O analito pode ser ionizado termicamente, por campos elétricos ou por impacto de elétrons, íons ou fótons. Os íons podem ser átomos ionizados isolados ou aglomerados, moléculas ou seus fragmentos ou associações. A separação dos íons formados é efetuada por campos elétricos ou magnéticos estáticos ou dinâmicos e ainda pelo tempo de voo do íon, desde que os íons possuam uma energia cinética bem definida na entrada da rota de voo (GROSS, 2011).

Um espectrômetro de massas é composto de três principais componentes, a saber: a fonte de ionização, o analisador e o detector. A diferença entre esses componentes distingue os tipos de técnicas as quais independentemente da escolha, exige primeiramente, que a amostra seja ionizada em uma fonte de ionização (SNYDER *et al.*, 2010 e GLISH; VACHET, 2003).

Diversos dispositivos têm sido desenvolvidos para volatilizar as amostras que saem do cromatógrafo e gerar os íons para serem analisados no espectrofotômetro. Existem vários tipos de fontes de ionização que podem ser empregados como interface entre o eluente de HPLC e o espectrômetro de massas. As duas fontes mais comuns são a ionização por

*electrospray* (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI) (KORFMACHER, 2005).



Fonte: Modificado de Skoog *et al.* (2006)

A Figura 4 ilustra um sistema de espectrometria de massas *tandem* do tipo triplo quadrupolo, usado para o desenvolvimento deste trabalho. Neste tipo de equipamento, os íons produzidos na fonte são filtrados no primeiro quadrupolo de forma que somente o íon selecionado passe para a célula de colisão. Na célula de colisão, utiliza-se um gás de colisão para promover a fragmentação dos íons da relação  $m/z$  selecionada. Os fragmentos são selecionados pelo quadrupolo analisador de massas e encaminhados para o detector de massas propriamente dito. Geralmente, a célula de colisão também é um quadrupolo operado

de forma que os fragmentos de íons sejam dirigidos para o analisador de massas (SKOOG *et al.*, 2006).

A combinação de cromatografia líquida e espectrometria de massas proporciona uma alta seletividade, uma vez que picos não resolvidos podem ser isolados monitorando-se somente um valor de massa selecionado. A técnica de LC-MS pode fornecer uma impressão digital de um eluato em particular em vez de recorrer ao tempo de eluição, como em HPLC convencional. A combinação também pode fornecer a massa molar e informação estrutural além de uma análise quantitativa exata. Para algumas misturas complexas, é necessário o acoplamento de dois ou mais analisadores de massas em conjunto em uma técnica conhecida como espectrometria de massas tandem. Quando se combina a LC com a espectrometria de massas tandem, o instrumento recebe o nome de LC-MS-MS (SKOOG *et al.*, 2006 e (VIDOVA; SPACIL, 2017).

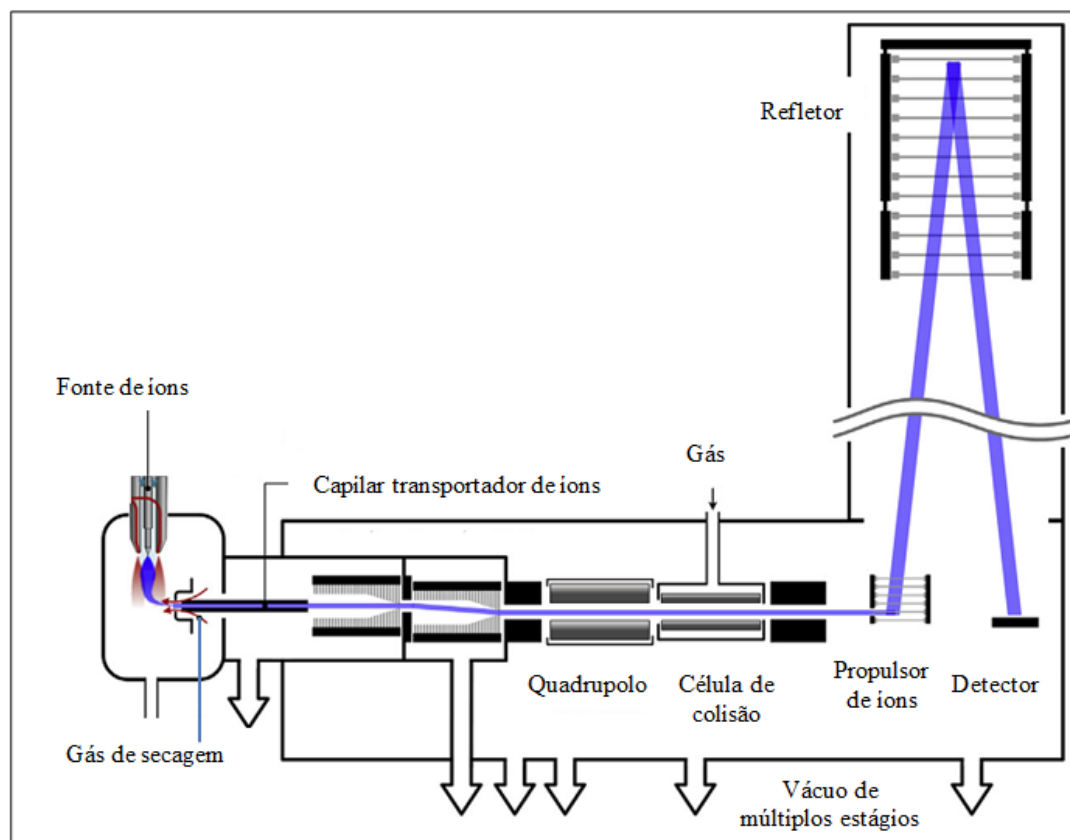
A cromatografia analítica permite que misturas complexas sejam separadas em componentes individuais. Os métodos típicos de HPLC / UV requerem que cada analito componente da mistura se separe durante a eluição cromatográfica. Os analitos são separados com base na interação química com a fase estacionária e a fase móvel. Normalmente, é necessário um tempo de retenção único intrínseco de cada analito, que fornece a base para a identificação e comparação entre os resultados. Em combinação com a espectrometria de massas, o objetivo da técnica de HPLC muda significativamente quando comparado com métodos baseados em detecção de UV. Esta alteração deve-se ao fato de que o espectrômetro de massas também é usado como um dispositivo de separação. Portanto, os métodos cromatográficos que são desenvolvidos para aplicações HPLC-MS tendem a ter exigências significativamente menos rigorosas e a separação basal não é necessária. O resultado é uma corrida cromatográfica mais rápida. A coeluição de picos não é uma questão tão significativa como acontece com a HPLC / UV. Esses picos às vezes podem ser resolvidos com base no espectro de massas. Tanto o tempo de retenção como a massa molecular são utilizados para identificação (KORFMACHER, 2009).

Ao longo dos últimos anos, alguns dos ganhos mais significativos foi o aumento de sensibilidade. Essa melhoria foi a chave para tornar a técnica de detecção por tempo de voo (TOF) uma das principais a beneficiar significativamente o desenvolvimento de novos métodos, particularmente nas análises de matrizes complexas. Uma das vantagens da técnica de análise de massas TOF é que a medição de alta resolução de analitos em concentrações muito baixas – ao nível de traço (FJELDSTED, 2016).



Um dos detectores MS mais populares é o de tempo de voo (TOF), conforme ilustrado na Figura 5. No TOF, os íons são gerados na interface pela fonte ionizante, selecionados num quadrupolo e fragmentados na célula de colisão. Os fragmentos são acelerados com uma energia específica e dirigidos através de um tubo para o detector. A velocidade de um íon que viaja através do tubo relaciona à quantidade de energia aplicada, portanto, para a mesma energia aplicada, os íons de menores massas viajarão mais rapidamente para o detector do que os íons maiores. O tempo de trânsito do tubo é então correlacionado com a relação  $m/z$  do íon. A resolução de massa está relacionada ao comprimento do tubo. As limitações espaciais limitam o comprimento do tubo, de modo que uma configuração popular usa um espelho eletrostático (refletor) para aumentar o comprimento efetivo do tubo, e assim, melhorar a resolução  $m/z$ . Com comprimento do percurso suficiente, o TOF pode fornecer uma resolução de massa maior do que o quadrupolo, por isso é útil para o trabalho estrutural (SKOOG *et al.*, 2006).

**Figura 5.** Principais elementos de um espectrômetro de massas Q-TOF



Fonte: Modificado de Fjeldsted (2016)

Embora a associação da cromatografia com a espectrometria de massas venha sendo empregada com muito sucesso pela ciência Farmacêutica, no estudo de substâncias de origem vegetal (KOJIMA *et al.*, 2009), existem poucos métodos quantitativos desenvolvidos exclusivamente para análise do ácido caurenóico (COSTA *et al.*, 2015; MIYAZAKI *et al.*, 2015 e GASPARETTO, 2011). Motivado pela dificuldade na detecção do ácido caurenóico nas regiões mais específicas do ultravioleta (MATOS, 2016 e GASPARETTO, 2010), este trabalho propõe a utilização da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com recursos em *tandem* para desenvolvimento de um método quantitativo focado na investigação do ácido caurenóico.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem o objetivo de desenvolver um método em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas, do tipo triplo quadrupolo em tandem, para identificação e quantificação do ácido caurenoico em matrizes de diferentes complexidades.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Estabelecer as condições cromatográficas ideais para identificação e quantificação do ácido caurenoico em extratos, tinturas e xaropes obtidos a partir do guaco.
- ✓ Definir as melhores condições de ionização da molécula de ácido caurenoico para análise pelo MS.
- ✓ Definir os parâmetros ideais do MS para monitoramento do íon pseudomolecular formado.
- ✓ Testar o método desenvolvido em produtos fitoterápicos (extratos, tinturas e xaropes obtidos a partir do Guaco) contendo o ácido caurenoico.
- ✓ Utilizar o equipamento de cromatografia líquida acoplado à espectrômetro de massas de alta resolução para confirmação qualitativa dos resultados.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Mikania glomerata* (guaco) foram coletadas em 18 de abril de 2017, as 9:00 da manhã, no horto da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de fora – UFJF. A planta já era identificada pela exsicata do vegetal preparada em 11/10/2006 e depositada no Herbário Leopoldo Krieger – CESJ, da UFJF, sob número de tombo CESJ 49202.

**Figura 6.** Foto da planta coletada no horto da Faculdade de Farmácia



Fonte: Do autor

## 4.2. TINTURA DE GUACO

### 4.2.1. Preparo da tintura

A tintura de guaco foi preparada de acordo com as instruções do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2011) e foram utilizados os equipamentos do Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora listados abaixo:

- Estufa com circulação de ar, modelo 002 CB do fabricante Fanem LTDA (São Paulo, Brasil).
- Moinho de facas modelo SL 30 do fabricante Solab Equipamentos para Laboratórios (Piracicaba, Brasil).
- Funil de separação com capacidade nominal de 250 mL
- Bastão de vidro
- Esferas de vidro
- Algodão
- Funil de vidro
- Papel de filtro
- Frasco de vidro âmbar
- Batoque bolha de plástico transparente
- Tampa plástica de polipropileno

O material vegetal (folhas) foi estabilizado, submetendo-se à secagem em estufa a 40 °C por 48 horas (ROCHA *et al.*, 2008). Após a secagem o material vegetal foi triturado em moinho de facas para obtenção do pó. O preparo da tintura foi de acordo com a seguinte fórmula:

**Tabela 2.** Composição da tintura de guaco

<i>Componentes</i>	<i>Quantidade</i>
folhas secas moídas	20 g
EtOH 70 % q.s.p.	100 mL

Fonte: Dados da pesquisa

O pó das folhas foi umedecido com quantidade suficiente de álcool etílico 70% m/m e ficou em repouso por duas horas em recipiente fechado. Um funil de separação de vidro foi utilizado como percolador. A saída do funil de separação foi preparada com algodão. Manteve-se a torneira fechada. A droga umedecida foi transferida para o funil de separação, aplicou-se leve e uniforme pressão sobre a camada da droga umedecida com o auxílio de um bastão de vidro. A superfície foi forrada com camada de algodão sobre a qual foram espalhadas pérolas de vidro. O restante do etanol 70% p/p foi adicionado lentamente até que fosse eliminado o ar entre as partículas da droga e permanecesse uma camada sobre a droga. Após montagem do aparato, ficou em repouso por 24 h. Durante a percolação, a velocidade foi controlada. Ao término da percolação com os 100 mL do solvente, toda a tintura foi filtrada em papel de filtro para frasco de vidro âmbar, fechado hermeticamente e armazenado sempre em geladeira.

### 4.3. PADRÕES E SUBSTÂNCIAS DE REFERÊNCIA

#### 4.3.1. Ácido caurenico

O ácido caurenico foi isolado a partir de um extrato clorofórmico das raízes tuberosas de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl.). A substância isolada foi caracterizada estruturalmente por meio de espectros RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$  e também pela comparação com a literatura por Carvalho (2015). Esta substância foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Ademar Alves da Silva Filho da Universidade Federal de Juiz de Fora (Juiz de Fora, Brasil) para a realização deste trabalho.

#### 4.3.2. Ácido betulínico

O ácido betulínico – ácido 3 $\beta$ -Hidroxi-20(29)-lupaeno-28-óico, com teor acima de 97% por HPLC, marca Sigma e usado como padrão interno, foi adquirido da empresa Sigma-Aldrich.

#### 4.4. SOLVENTES UTILIZADOS

- Água ultrapura obtida de sistema de purificação Mili-Q®.
- Acetonitrila ultra filtrado grau HPLC da marca J. T. Baker/Avantor, Xalostoc, México
- Álcool etílico absoluto da marca Dinâmica, Diadema – SP, Brasil.
- Álcool metílico ultra filtrado grau HPLC da marca J. T. Baker/Avantor, Xalostoc, México.
- Ácido fórmico da marca Merck, Darmstadt, Alemanha.

#### 4.5. PRODUTOS FITOTERÁPICOS ADQUIRIDOS NO MERCADO

Para o desenvolvimento e teste da metodologia, foram comprados produtos fitoterápicos em drogarias locais da cidade de Juiz de Fora – MG, preparados a base de *Mikania glomerata*. Os nomes dos produtos e seus respectivos fabricantes não serão revelados e códigos serão atribuídos para fins de identificação das amostras avaliadas.

➤ Xarope de guaco BT – Xarope de *Mikania glomerata* padronizado em cumarina (0,036 mg/mL). Indicado como expectorante e broncodilatador. Composto de 60 mg/mL de extrato fluido de folhas de *M. glomerata* e veículo (sorbitol, água purificada, sacarina sódica, hietelose, metilparabeno, propilparabeno e aroma de hortelã.

➤ Xarope de guaco NL – Xarope de *Mikania glomerata* padronizado em cumarina (0,0882 mg/mL). Indicado como expectorante e broncodilatador. Composto de 117,6 mg/mL de extrato fluido de folhas de *M. glomerata* e excipientes (carmelose sódica, metilparabeno, propilparabeno, sucralose, sorbitol, aroma de menta, aroma de mel e água purificada

➤ Extrato comercial de guaco, de composição não declarada, usado como matéria prima na produção de medicamentos fitoterápicos, produzido por empresa do estado de São Paulo e gentilmente fornecido por empresa de Juiz de Fora – MG para fins exclusivos de pesquisas e que prefere ficar anônima.

## 4.6. SOLUÇÕES ESTOQUE

### 4.6.1. Ácido caurenico 1,06 mg/mL

Pesaram-se 10,6 mg de ácido caurenico, que foram dissolvidos em 10 mL de metanol utilizando-se um balão volumétrico para acerto do volume. Dessa forma a solução estoque foi obtida na concentração 106 mg/mL, a qual foi deixada no banho de ultrassom por 15 minutos e, posteriormente, armazenada em frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechado e sob refrigeração.

### 4.6.2. Ácido betulínico 0,104 mg/mL

Pesaram-se 1,04 mg de ácido betulínico, que foram dissolvidos em 10 mL de metanol utilizando-se um balão volumétrico para acerto do volume. Dessa forma a solução estoque foi obtida na concentração 0,104 mg/mL, a qual foi deixada no banho de ultrassom por 15 minutos e, posteriormente, armazenada em frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechado e sob refrigeração.

## 4.7. INSTRUMENTAÇÃO

### 4.7.1. Desenvolvimento do método quantitativo por Cromatografia Líquida de Alta eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas triplo quadrupolo em tandem (HPLC-QqQ-MS/MS)

Para desenvolvimento do método e avaliação quantitativa do ácido caurenico, o Laboratório de Eletroforese Capilar (LabEC) da Universidade Federal de Santa Catarina disponibilizou os seguintes equipamentos:



➤ HPLC Agilent Technologies (Waldboon, Alemanha). Modelo 1.200 series, equipado com bomba quaternária (G1311A), degaseificador online (G1322A), compartimento de colunas termostaticado (G1316A) e autoamostrador (G1367B).

➤ Coluna Synergi 4 µm Polar-RP 80 A do fabricante Phenomenex e dimensões: 150 mm x 2,00 mm, contendo partículas de tamanho 4 µm.

➤ Espectrômetro de Massas do fabricante Applied Biosystems (Absciex) – Toronto, Canada. Modelo 3.200 Q Trap (triplo quadrupolo) equipado com fonte de ionização do tipo ESI (*TurboIon Spray*) que usa nitrogênio como gás de secagem, nebulização e colisão. Resolução em Unit.

➤ Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup>; Millipore do Brasil.

➤ Agitador tipo Vortex QL-901 Biomixer.

➤ Balança analítica Shimadzu modelo AUY220.

➤ Microcentrífuga, modelo MiniSpin plus; Eppendorf.

➤ Micropipeta automática de 100 a 1.000 µL

➤ Micropipeta automática de 10 a 100 µL

➤ Ponteiras descartáveis de capacidade 100 µL

➤ Ponteiras descartáveis de capacidade 1.000 µL

➤ Microtubos descartáveis do tipo eppendorf de capacidade de 2,0 mL

O tratamento dos dados foi realizado pelo software: Analyst 1.6.2. A integração dos picos foi realizada pelo algoritmo do software (integração automática).

#### 4.7.1.1. Preparo das amostras – Diluição

Todas as amostras foram diluídas em acetonitrila para verificação da intensidade do sinal analítico. Foram testadas as amostras diluídas em três diluições diferentes:

- Amostra diluída 10 vezes – 1 parte de amostra para 9 partes de acetonitrila.
- Amostra diluída 100 vezes – 1 parte de amostra para 99 partes de acetonitrila.
- Amostra diluída 1.000 vezes – 1 parte de amostra para 999 partes de acetonitrila.

As amostras foram diluídas diretamente nos microtubos descartáveis do tipo eppendorf. Após a diluição volumétrica com auxílio das micropipetas automáticas, as amostras foram homogeneizadas no agitador tipo vórtex durante 1 minuto e centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. As porção superior do líquido resultante em cada microtubo foi coletada e analisada.

A partir dos sinais analíticos obtidos, os produtos adquiridos no mercado, comercializados nas formas de xarope foram analisados diluídos 10 vezes. O extrato e a tintura foram analisados diluídos 1.000 vezes.

#### 4.7.1.2. Otimização dos parâmetros cromatográficos

A otimização dos parâmetros com a coluna cromatográfica foi realizada testando diferentes combinações de acetonitrila e água para compor a fase móvel. A definição do melhor sistema cromatográfico foi baseada no melhor perfil dos picos cromatográficos das diferentes amostras analisadas. Foram considerados como fatores de escolha, a intensidade do sinal analítico, a resolução entre os picos eluídos e o tempo da eluição do pico referente ao ácido caurenico. O método cromatográfico que melhor atendeu aos critérios estipulados são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Condições ideais do método cromatográfico desenvolvido

Tempo total (min)	Vazão ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	Água (%)	ACN (%)
5*	250	50	50
2	250	50	50
4	250	5	95
11	250	5	95

\*tempo de condicionamento prévio da coluna

Fonte: Dados da pesquisa

O método desenvolvido utilizou a modalidade de eluição do tipo fase reversa. A fase móvel utilizada é composta dos solventes, água e Acetonitrila. O modo de eluição empregado foi o modo gradiente, com volume de injeção de 5 µL e vazão constante de 0,250 mL/min. O tempo de 5 minutos para condicionamento prévio da coluna e tempo de 11 minutos referente ao tempo de análise propriamente dito.

#### 4.7.1.3. Otimização dos parâmetros referentes ao método espectrométrico para cada transição monitorada (infusão direta no MS)

Para avaliação inicial do ácido caurenico e do ácido betulínico (usado como padrão interno), o ponto de partida foi a infusão direta do padrão para verificação do sinal analítico e definição da melhor energia de colisão. A infusão da substância foi realizada em detector de espectrometria de massas com fonte de íons do tipo ESI e analisador triplo quadrupolo com recursos em tandem. A amostra do padrão foi previamente solubilizada em MeOH de graduação HPLC. O modo de aquisição dos dados utilizado foi o modo negativo. Para otimização dos parâmetros de *declustering potencial* (DP), *entrance potencial* (EP), *collision cell entrance potencial* (CEP), *collision energy* (CE) e *cell exit potencial* (CXP), a concentração dos analitos foi variada a fim de atender as especificações do equipamento para otimização automática através de MRM e estão resumidos na tabela 4.

**Tabela 4.** Parâmetros de cada transição monitorada - infusão direta do AC e do AB no equipamento de MS

<i>Substância</i>	<i>Q1</i> (Da)	<i>Q3</i> (Da)	<i>t*</i> (ms)	<i>DP</i> (V)	<i>EP</i> (V)	<i>CEP</i> (V)	<i>CE</i> (V)	<i>CXP</i> (V)
<b>Ácido caurenico</b>	301,0	301,0	150,0	- 55,0	- 4,5	- 16,0	- 8,0	- 4,0
<b>Ácido betulínico</b>	455,0	455,0	150,0	- 55,0	- 4,5	- 16,0	- 8,0	- 4,0

\* Tempo para aquisição dos dados (*dwell time*)

Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.7.1.4. Otimização dos parâmetros gerais do método espectrométrico

A otimização dos parâmetros dos gases da fonte de ionização, *curtain gas* (CUR), *collision gas* (CAD), *nebulizer gas* (GS1), *turbo gas* (GS2), *ion spray voltage* (IS) e temperatura da fonte, foi realizada em conformidade com as recomendações do fabricante, baseados no fluxo da fase móvel, e estão resumidos na tabela 5.

**Tabela 5.** Parâmetros gerais de ionização do método espectrométrico

<i>FONTE / GÁS</i>	
<b>Fonte de íons</b>	ESI (Turbospray)
<b>Curtain Gas (CUR)</b>	10,0 psi
<b>Colision Gas (CAD)</b>	Média intensidade
<b>IonSpray (IS)</b>	- 4.500,0 V
<b>Temperatura</b>	450,0 °C
<b>Fonte do gás 1 (GS1)</b>	45,0 psi
<b>Fonte do gás 2 (GS2)</b>	45,0 psi
<b>Aquecedor da interface</b>	Ligado

Fonte: Dados da pesquisa

#### 4.7.1.5. Suavização dos picos cromatográficos – *Auto Smooth*

A amostra do xarope BT se mostrou bastante complexa e apresentou ruído na linha base. Um recurso de suavização do traçado do pico cromatográfico disponível no software do equipamento foi utilizado com a finalidade de melhorar a relação sinal ruído. De acordo com o manual, o algoritmo do *software*, para suavizar dados define os valores de três pontos de dados; O ponto atual, o ponto anterior e o ponto subsequente. Os valores são multiplicados pela soma dos valores ponderados, soma esses valores e, em seguida, divide o total pela soma dos valores de massa do analito avaliado.

As áreas integradas dos picos suavizados com o recurso *auto Smooth* foram comparadas com as áreas sem a utilização do recurso

#### 4.7.1.6. *Precisão instrumental*

Para avaliação do erro relacionado com a instrumentação, áreas dos picos do ácido caurenóico e do padrão interno foram analisadas sequencialmente, nas mesmas condições e comparadas entre si. Foi realizada comparação do pico suavizado (recurso auto Smooth) e do pico sem suavização.

#### **4.7.2. Desenvolvimento do método qualitativo por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada ao Espectrômetro de Massas de quadrupolo único e tempo de voo (UHPLC-QTOF-MS/MS).**

A confirmação qualitativa foi realizada no Núcleo de Identificação e Pesquisa em Princípios Ativos Naturais (NIPPAN) / CENTRALBIO da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora e foram utilizados os equipamentos, listados a seguir, para o desenvolvimento deste trabalho.

➤ UHPLC Waters Corporation (Milford, Estados Unidos da América) com gerenciador quaternário de solventes (QSM), organizador e gerenciador de amostras FTN (SM-FTN), aquecedor de coluna e controladores de pressão.

➤ Espectrômetro de Massas modelo Xevo G2-XS QToF, equipado com analisador quadrupolo (MS1) de alta resolução, analisador de massas Tof (MS2) de alto desempenho, cela de colisão (XS) e fonte de ionização ESI/APCI integrada.

➤ Coluna de UHPLC Waters Acquity BEH<sup>®</sup> C<sub>18</sub>, dimensões 100 mm x 2,1 mm e partículas de 1,7 µm de diâmetro;

➤ Sistema de purificação de água Milli-Q<sup>®</sup>; Millipore do Brasil.

➤ Agitador tipo Vortex QL-901 Biomixer.

➤ Balança analítica Shimadzu modelo AUY220.

➤ Microcentrífuga, modelo MiniSpin plus do fabricante Eppendorf.

➤ Micropipeta automática de 100 a 1.000 µL

➤ Micropipeta automática de 10 a 100 µL

➤ Ponteiras descartáveis de capacidade 100 µL

➤ Ponteiras descartáveis de capacidade 1.000 µL

➤ Microtubos descartáveis do tipo eppendorf de capacidade de 2,0 mL

O tratamento dos dados foi realizado pelo *software* MassLynx® V4.1. A integração dos picos foi realizada pelo algoritmo do software (integração automática).

Para avaliação inicial do ácido caurenóico, o ponto de partida foi a infusão direta do padrão para verificação do sinal analítico e definição da melhor energia de colisão. A infusão da substância foi realizada em detector de espectrometria de massas com fonte de íons do tipo ESI e analisador Q-TOF. A amostra do padrão estava previamente solubilizada em MeOH de graduação HPLC. O modo de aquisição dos dados utilizado foi o modo negativo, capilar de 3.3 kV, com 20 V de tensão no cone, temperatura de 150 °C na fonte, com temperatura de dessolvatação de 500 °C e vazão do gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) de 50 L/h. Para colisão dos íons formados foi utilizado o gás nobre argônio (Ar). Energias de ionização crescentes de 0 até 60 eV foram utilizadas.

Após definição dos parâmetros ideais do equipamento com a utilização do padrão de ácido caurenóico, as amostras dos produtos de mercado, da matéria prima e da tintura produzida foram preparadas. Cada amostra teve uma alíquota de 1,0 mL transferida para um microtubo do tipo eppendorf. Em cada tubo foi adicionado 1,0 mL de MeOH de grau HPLC, homogeneizados em agitador do tipo vórtex e centrifugados a 10.000 rpm durante 5 min.

Após definição das melhores condições de ionização e seleção do íon para detecção por massas, as amostras preparadas foram analisadas para desenvolvimento de condições cromatográficas ideais para análise do ácido caurenóico nas diferentes amostras, de acordo com o apresentado na Tabela 6.

**Tabela 6.** Condições testadas para desenvolvimento do método cromatográfico

<b>Condição</b>	<b>Tipo de Eluição</b>	<b>Condição Cromatográfica</b>
<b>1</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 10 min: gradiente linear 5 a 98 % de ACN em água*</li> <li>• 10 – 11 min: 98 % de ACN em água*</li> <li>• 11 – 15 min: 2 % de ACN em água*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>2</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 7 min: gradiente linear 30 a 100 % de ACN*</li> <li>• 7 – 8 min: 100 % de ACN*</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• 8 – 12 min: 30 % de ACN em água*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>3</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN*</li> <li>• 5 – 7 min: 100 % de ACN*</li> <li>• 7 – 10 min: 50 % de ACN em água*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>4</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 3 min: gradiente linear 30 a 70 % de ACN em água*</li> <li>• 3 – 4 min: 100 % de ACN*</li> <li>• 4 – 7 min: 70 % de ACN em água*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>5</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de MeOH*</li> <li>• 5 – 7 min: 100 % de MeOH*</li> <li>• 7 – 10 min: 50 % de MeOH em água*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>6</b>	Gradiente	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN**</li> <li>• 5 – 7 min: 100 % de ACN**</li> <li>• 10 – 11 min: 50 % de ACN em água**</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>7</b>	Isocrática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 10 min: 70 % de ACN em água*</li> <li>• 10 – 11 min: 70 a 100 % de ACN*</li> <li>• 11 – 12 min: 100 % de ACN*</li> <li>• Vazão: 0,2 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>8</b>	Isocrática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 10 min: 80 % de ACN em água*</li> <li>• 10 – 11 min: 80 a 100 % de ACN*</li> <li>• 11 – 12 min: 100 % de ACN*</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vazão: 0,2 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>9</b>	Isocrática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 10 min: 65 % de ACN em água*</li> <li>• 10 – 11 min: 65 a 100 % de ACN*</li> <li>• 11 – 12 min: 100 % de ACN*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>
<b>10</b>	Isocrática	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0 – 10 min: 60 % de ACN em água*</li> <li>• 10 – 11 min: 60 a 100 % de ACN*</li> <li>• 11 – 12 min: 100 % de ACN*</li> <li>• Vazão: 0,4 mL/min</li> <li>• Temperatura da coluna: 45 °C</li> </ul>

\*Acidificados com 0,01 % de ácido fórmico; \*\* Acidificados com 1,00 % de ácido fórmico

Fonte: Dados da pesquisa

Após análise das amostras e avaliação dos cromatogramas, notou-se que a melhor condição cromatográfica para análise confirmatória do ácido caurenóico foi a condição 3.

Em resumo, o método desenvolvido utiliza a fonte de ionização ESI, no modo de aquisição de íons negativo, capilar de 3,3 kV, 20 V de tensão no cone, temperatura de 150 °C na fonte, com temperatura de dessolvatação de 500 °C e fluxo do gás nitrogênio (N<sub>2</sub>) de 50 L/h. Para colisão dos íons formados foi utilizado o gás nobre argônio (Ar) e foi utilizada energia de colisão de 30 eV, definida por ser uma energia intermediária, visto que na infusão direta não houve formação de fragmentos. Foi selecionado como alvo o valor de *m/z* de 301,24, referente à massa molecular com a perda de um próton e todo o monitoramento foi voltado para este íon pseudomolecular formado. O *Software* MassLynx<sup>®</sup> foi usado para fazer a integração automática dos picos a partir de análises dos cromatogramas e dos espectros de massas dos picos obtidos.



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Conforme mencionado anteriormente, o ácido caurenico não é o marcador químico nos fitoterápicos produzidos a partir da *M. glomerata*, no entanto, os produtos à base de guaco foram escolhidos, principalmente em função da presença do AC nesta planta, conforme apresentado pela literatura e também, pela importância socioeconômica destes produtos, já que, esta espécie faz parte de um contexto de grande interesse para a saúde pública e se encontra presente na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) nas políticas de promoção da saúde no Brasil.

### 5.1. ELETROFORESE CAPILAR E DETECÇÃO POR UV-Vis E ARRANJOS DE FOTODIODO (DAD)

Conforme apresentado na Introdução, a proposta inicial deste trabalho foi o desenvolvimento de um método para análise do ácido caurenico em matrizes complexas por eletroforese capilar, como técnica de separação, acoplada a detector ultravioleta com arranjos de diodos.

Testes foram realizados empregando os recursos da técnica de separação por eletroforese capilar em zona. Foram empregados os recursos da detecção direta e detecção indireta com emprego de tipos diferentes de eletrólitos, no entanto, a baixíssima solubilidade do padrão em água, mesmo em diferentes pH's, inviabilizou a escolha da eletroforese capilar aquosa clássica.

Como alternativa, tentou-se empregar a eletroforese não aquosa (NACE), já que a literatura reporta casos de sucesso no emprego deste tipo de separação para análise de terpenos bioativos, como o ácido ursólico e ácido oleanólico (QI *et al.*, 2006).

Nas análises realizadas que empregaram os recursos da eletroforese não aquosa, a solubilização do padrão de ácido caurenico foi eficiente, entretanto, o detector com arranjos de diodo não promoveu detecção eficiente, inviabilizando, desta forma, a utilização deste detector neste tipo de análise do ácido caurenico. Estes resultados corroboram estudos anteriores realizados por Matos (2016) e Gasparetto *et al.* (2011) sobre a baixa absorvidade molar da molécula.

A literatura reporta que nos comprimentos de onda de 200 nm à 220 nm ocorre a melhor detecção do ácido caurenico, no entanto, nas análises realizadas não foram observados picos relacionados ao ácido caurenico. Análises posteriores demonstraram que, em comprimentos de onda nessa região, os solventes álcool etílico e álcool metílico, utilizados na solubilização do padrão, também sofrem absorção da luz ultravioleta e interferem no resultado.

Após esta abordagem por eletroforese capilar e detecção por UV-Vis, optou-se pelo método de separação cromatográfica com detecção por espectrometria de massas para dar continuidade ao desenvolvimento de um método para análise do ácido caurenico em matrizes complexas.

## 5.2. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO QUANTITATIVO POR HPLC-QqQ-MS/MS.

### 5.2.1. Cromatogramas e espectros de massas obtidos por HPLC-QqQ-MS/MS.

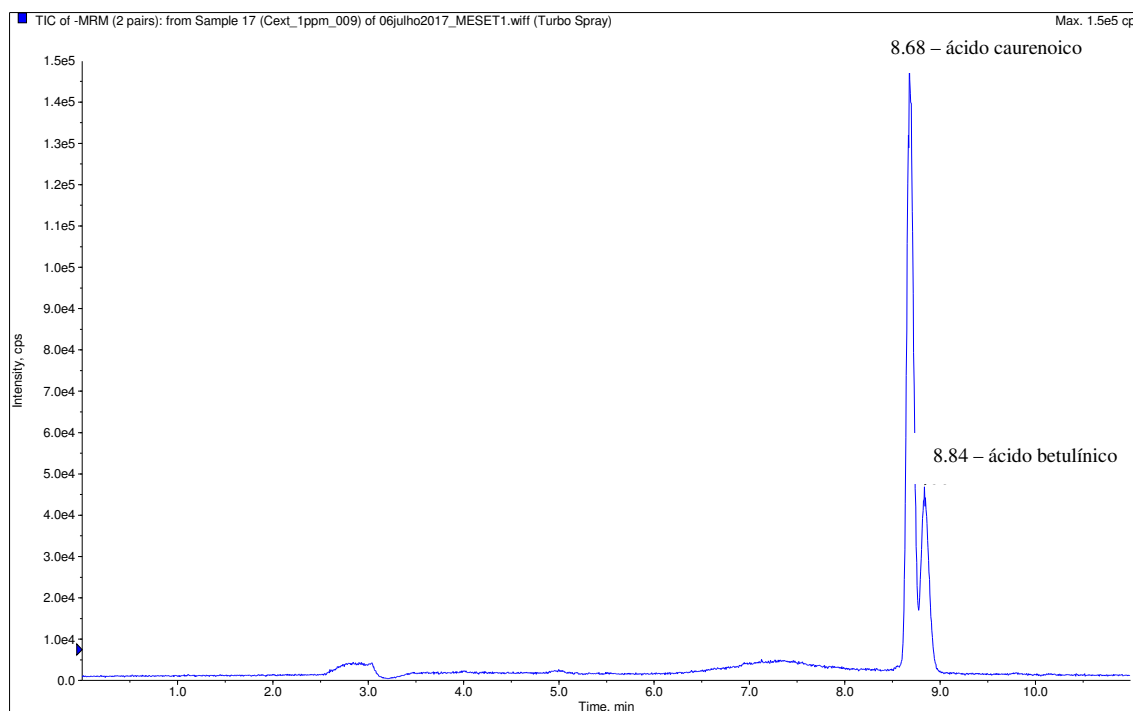
A primeira etapa foi a escolha do modo de ionização a ser utilizado: positivo ou negativo. No modo positivo, procura-se pela massa do analito acrescida de um próton ( $H^+$ ), já em modo negativo, busca-se pela massa do analito desprotonado. Substâncias ácidas apresentam sinais de maior intensidade quando analisadas com polaridade negativa, em função da facilidade se perder o próton ( $H^+$ ), favorecida pela aplicação de polaridade negativa ao capilar da fonte ionizante. Trabalhos anteriores confirmam que o AC tem este comportamento (MIYAZAKI, 2015; GASPARETTO, 2011). Por este motivo foi escolhido o modo de ionização negativo para detecção do composto alvo.

Inicialmente foi realizada infusão direta do padrão para avaliar os íons formados, no entanto, não foi observada fragmentação do ácido caurenico. A ausência de fragmentação já era esperada de acordo com recentes estudos reportados na literatura (MIYAZAKI, 2015; GASPARETTO, 2011).

O modo MRM foi escolhido para monitoramento da relação massa / carga ( $m/z$ ). Este monitoramento é feito pelos produtos de razão  $m/z$  específicas após a fragmentação do íon precursor. Como não houve fragmentação, a razão  $m/z$  monitorada foi a mesma no primeiro e no último quadrupolo.

A Figura 7 mostra o cromatogramas TIC (do inglês *total ion chromatogram*) que representa o cromatograma das intensidades somadas dos íons selecionados, de relação  $m/z$  igual a 301,000 e 455,000, referentes ao analito e ao padrão interno.

**Figura 7.** Cromatogramas TIC com monitoramento de  $m/z$  do AC e do padrão interno.

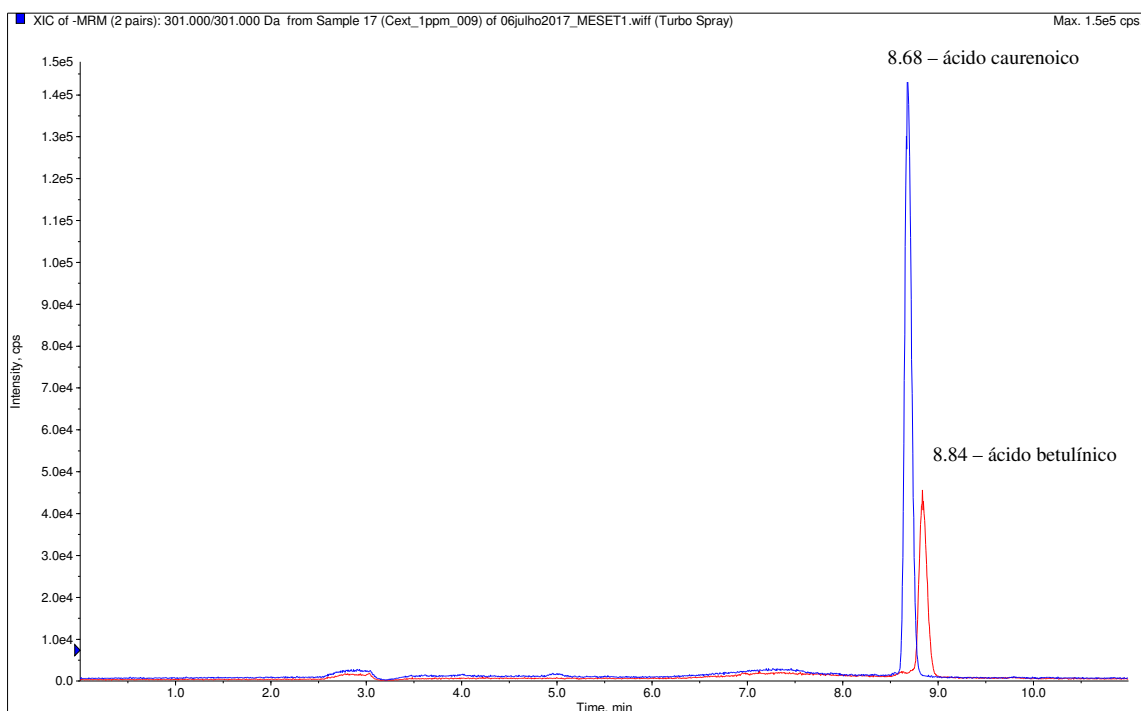


Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O (95:5); Temperatura 40 °C; injeção 5 µL; MRM em 301,000 e 455,000

Fonte: Dados da pesquisa

Conforme descrito no item 2.4 deste trabalho, os recursos do espectrômetro de massas possibilitou a resolução dos picos com tempos de retenção 8,68 e 8,84, traçando curvas diferentes para cada relação  $m/z$ . A Figura 8 mostra o cromatogramas XIC (do inglês *Extracted Ion Chromatogram*) que representa um cromatograma de íons extraídos. Ele mostra o comportamento das relações  $m/z$  455,000 e 301,000 de forma individualizada.

**Figura 8.** Cromatogramas XIC com monitoramento de  $m/z$  do AC e do padrão interno.

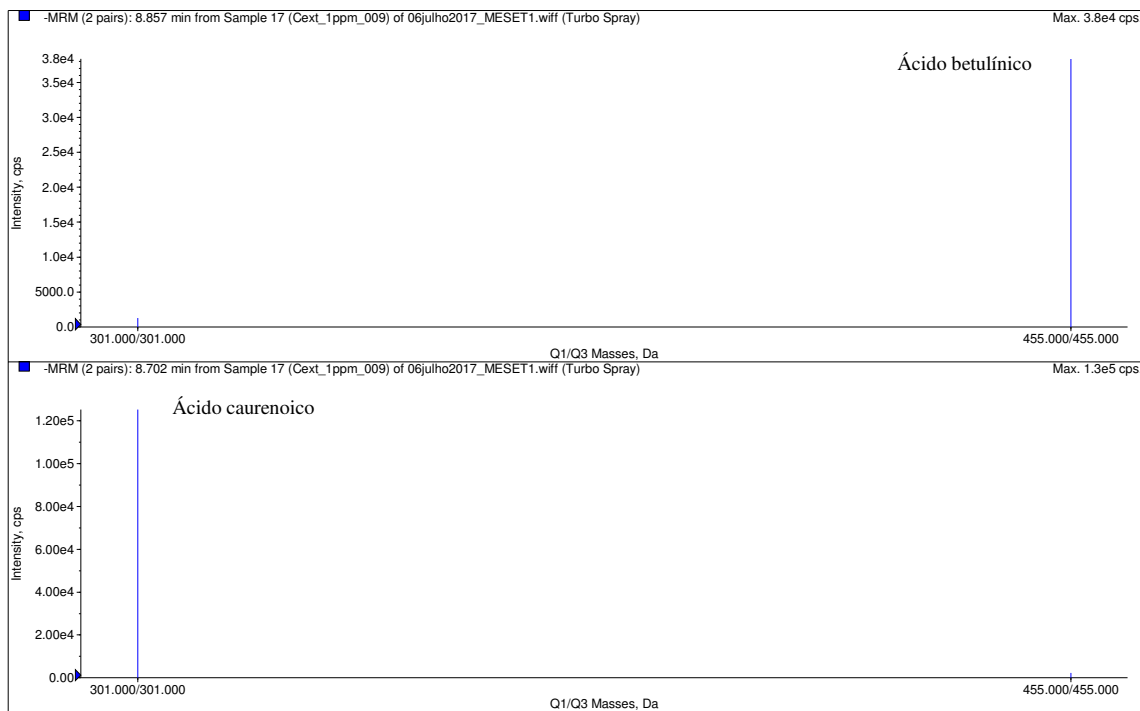


Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O (95:5); Temperatura 40 °C; injeção 5 µL; MRM em 301,000 e 455,000. Azul – AC; Vermelho – padrão interno

Fonte: Dados da pesquisa

Por meio do equipamento de espectroscopia de massas, ainda foi possível a confirmação da relação  $m/z$  referente a cada um dos picos, tanto nos cromatogramas TIC quanto nos cromatogramas XIC. A Figura 9 mostra os espectros de massas dos picos do cromatograma com tempos de retenção 8,68 em e 8,84.

**Figura 9.** Espectros de massas dos picos com tempos de retenção 8,68 e 8,84.



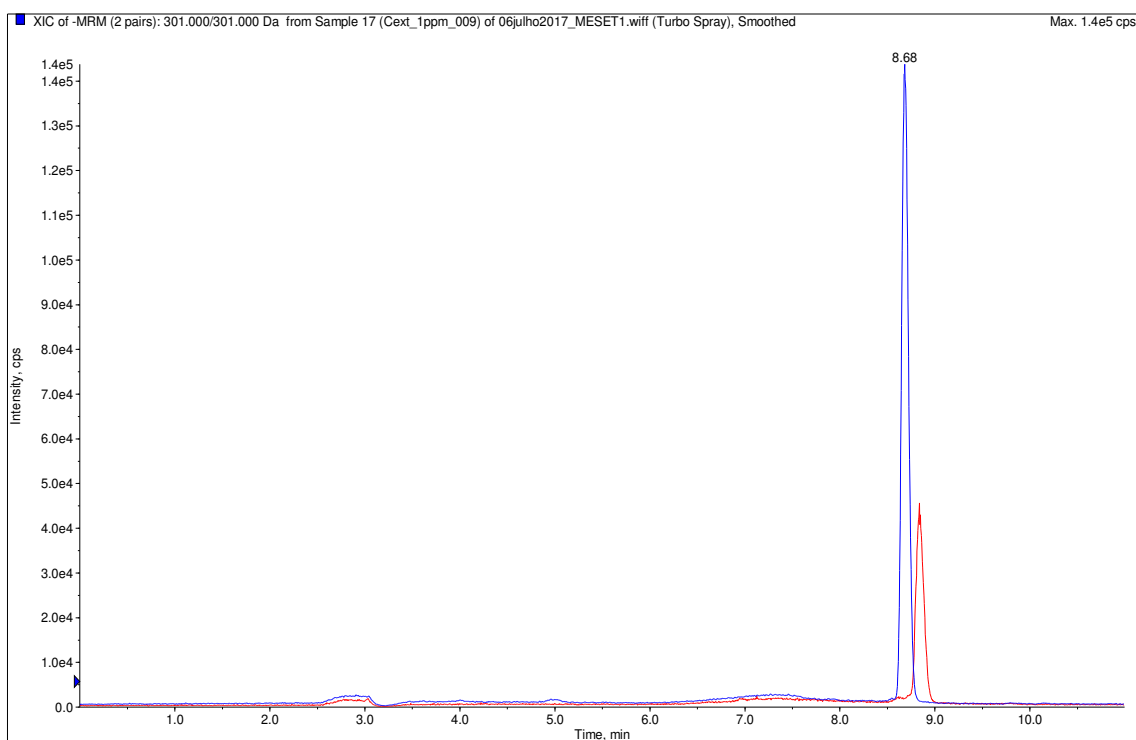
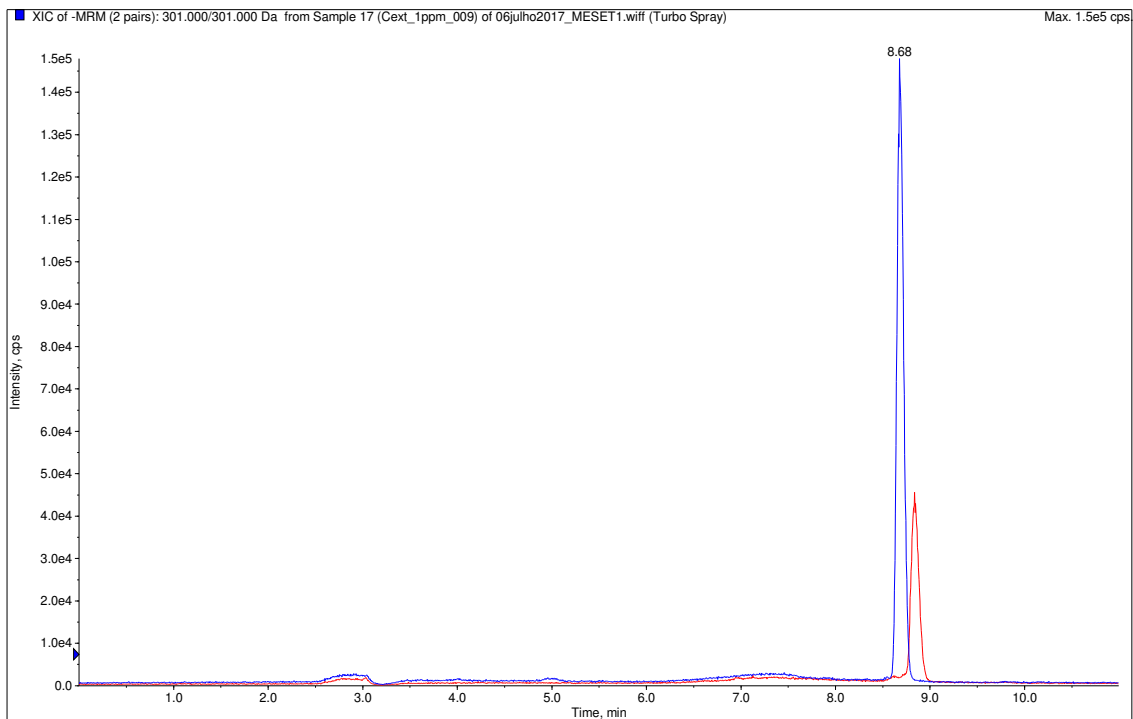
Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O (95:5); Temperatura 40 °C; injeção 5 µL; MRM em 301,000 e 455,000.

Fonte: Dados da pesquisa

A partir dos resultados observados, pôde-se encontrar um detector eficiente para continuar os estudos com o ácido caurenoico. Somando-se as informações da literatura como, a massa do íon desprotonado, a ausência de fragmentação da substância quando submetida a ionização ESI e o tempo de retenção do padrão, iniciou-se a etapa de investigação do analito nas amostras.

### 5.2.2. Precisão instrumental e avaliação do impacto da suavização de picos (auto smooth)

Com o objetivo de melhorar a relação entre sinal e ruído, o recurso de suavização foi empregado. O efeito suavizante foi bastante brando e o impacto pode ser observado na Figura 10.

**Figura 10.** Comparativo do recurso de suavização sobre os Cromatogramas – auto smoth

Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O (95:5); Temperatura 40 °C; injeção 5 µL; MRM em 301,000 e 455,000; Superior – sem suavização; Inferior – suavizado.

Fonte: Dados da pesquisa

Para suportar a tese de que a suavização não impacta na qualidade das análises, fez-se uma medida da precisão instrumental, onde razão entre as áreas dos picos de seis amostras sequenciais foram comparadas quanto a utilização ou não do recurso de suavização. Estes resultados foram sumarizados na Tabela 7.

**Tabela 7.** Precisão instrumental e avaliação do impacto da suavização

COM SUAVIZAÇÃO			
Amostra	Área do AC	Área do padrão interno	Razão entre as áreas (AC/AB)
1	ERRO	ERRO	-
2	$7,62 \times 10^5$	$4,83 \times 10^5$	1,58
3	$8,51 \times 10^5$	$5,49 \times 10^5$	1,55
4	$8,26 \times 10^5$	$5,26 \times 10^5$	1,57
5	$6,71 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	1,53
6	$6,59 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	1,57
<b>Média</b>	$7,54 \times 10^5$	$4,84 \times 10^5$	1,56
<b>Desvio Padrão</b>	$8,74 \times 10^4$	$5,48 \times 10^4$	0,02
<b>CV (%)</b>	11,60	11,34	<b>1,37</b>
SEM SUAVIZAÇÃO			
Amostra	Área do AC	Área do padrão interno	Razão entre as áreas (AC/AB)
1	$9,32 \times 10^5$	$3,52 \times 10^5$	1,59
2	$7,68 \times 10^5$	$4,83 \times 10^5$	1,56
3	$8,55 \times 10^5$	$5,49 \times 10^5$	1,58
4	$8,33 \times 10^5$	$5,26 \times 10^5$	1,53
5	$6,73 \times 10^5$	$4,40 \times 10^5$	1,58
6	$6,63 \times 10^5$	$4,20 \times 10^5$	1,57
<b>Média</b>	$7,87 \times 10^5$	$4,6 \times 10^5$	1,57
<b>Desvio Padrão</b>	$1,06 \times 10^5$	$5,48 \times 10^4$	0,02
<b>CV (%)</b>	13,50	13,73	<b>1,57</b>

Fonte: Dados da pesquisa

A Tabela 7 demonstra que a diferença de precisão, baseada na comparação entre as razões das áreas do padrão interno e do padrão de ácido caurenóico é mínima (1,57 – 1,37). Desta forma, pode-se inferir que a variação relacionada ao equipamento, empregando o recurso de suavização, ou não empregando tal recurso, pode ser desconsiderada, ou seja, o equipamento se mostrou preciso nas condições de análise desenvolvidas.

### 5.2.3. Quantificação do ácido caurenóico nas amostras

Para que seja possível a análise química quantitativa, ou seja, a determinação da quantidade de um determinado composto presente em uma amostra, é imprescindível a etapa de calibração. O termo calibração é definido como um conjunto de operações que estabelecem, sob condições especificadas, a relação entre os valores indicados por um instrumento de medida, sistema, ou valores apresentados por um material de medida, comparados àqueles obtidos com um padrão de referência correspondente (BRASIL, 2001).

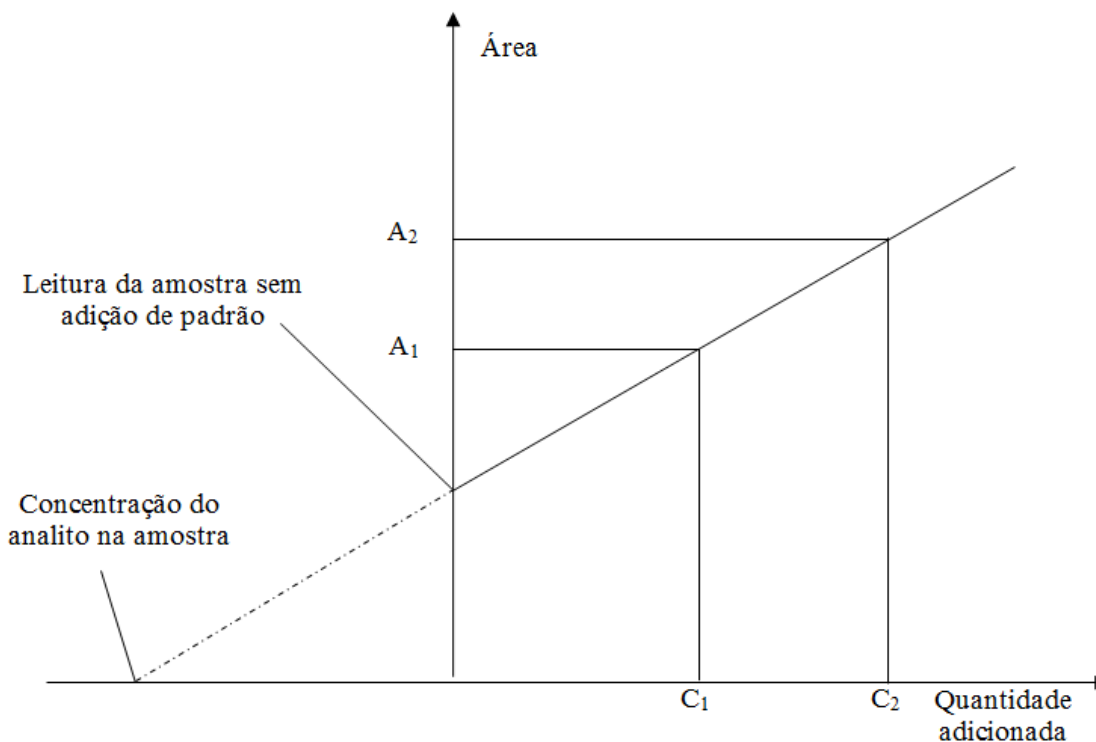
A construção de curva de calibração pode se dar por diferentes métodos, tais como o método da adição de padrão, o método de superposição de matriz ou por padronização externa. O método da adição de padrão foi escolhido para quantificação do ácido caurenóico nas amostras. O método de adição de padrão consistiu na adição de quantidades conhecidas do padrão de ácido caurenóico à quantidades conhecidas das amostras, antes do seu preparo. Estas amostras com o padrão incorporado foram utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Curvas analíticas foram construídas relacionando as quantidades da substância adicionada à amostra com as respectivas áreas obtidas. O ponto onde a reta encontra o eixo das ordenadas corresponde à área do pico do ácido caurenóico sem adição do padrão. A extrapolação da curva para o eixo das abscissas resultou na concentração do analito na amostra analisada (HARRIS, 2009; HARVEY, 2000; PIMENTEL; BARROS NETO, 1995; BERG, 1988).

Independentemente do método de calibração empregado, para que uma curva de calibração seja considerada confiável é imprescindível que seja avaliada sua linearidade, ou seja, sua capacidade em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito (ICH, 1995). Para tal, utiliza-se o coeficiente de correlação  $r$  (CHUI, 2001); quanto mais próximo de 1,0 o valor de  $r$ , menor a dispersão do conjunto de pontos e menores os erros associados aos coeficientes linear e angular, calculados a partir da regressão linear da



reta. O INMETRO (2007) recomenda um coeficiente de correlação com valor superior a 0,90 e a ANVISA (2003) aceita o coeficiente de correlação ( $r$ ) igual a 0,99. A Figura 11 ilustra o método de quantificação por adição de padrão.

**Figura 11.** Gráfico da extrapolação linear por adição de padrão.



Fonte: Adaptado de Berg (1988)

O método de adição padrão é trabalhoso, no entanto, foi o método empregado pelo fato de as amostras analisadas neste trabalho serem complexas e também em função da impossibilidade de se preparar uma matriz isenta de ácido caurenico, visto que, a composição quantitativa e qualitativa de todas as amostras é desconhecida (SNYDER, 2010).

Após otimização e definição das melhores condições cromatográficas e dos parâmetros do espectrômetro de massas, apresentados nas tabelas 3, 4 e 5, foi realizada uma triagem, com a finalidade de se definir as melhores concentrações do padrão de ácido caurenico e do padrão interno, para a construção das curvas de calibração. Foram avaliadas as respostas do equipamento nas concentrações do ácido caurenico de 0,100 mg/L, 0,500

mg/L e 1,000 mg/L, todas na presença de padrão interno com a finalidade de se eliminar as variações dos equipamentos. A partir da análise dos resultados destas tabelas, as curvas de calibração foram construídas a partir das análises com adição das concentrações de 0,212 mg/L, 0,636 mg/L e 1,06 mg/L do padrão de ácido caurenico e da concentração intermediária de 0,5 mg/L do padrão interno. A triagem das concentrações com as áreas observadas são sumarizadas na Tabela 8.

**Tabela 8.** Triagem da concentração ideal dos padrões

<i>Concentração (mg/L)</i>	<i>Área do padrão de AC</i>	<i>Área do padrão interno</i>
0,1	$2,19 \times 10^5$	-
0,5	$8,63 \times 10^5$	$7,32 \times 10^5$
1,0	$1,42 \times 10^6$	-
<b>Concentração adicionada* (mg/L)</b>		
0,212	$1,90 \times 10^5$	
0,636	$5,67 \times 10^5$	
1,060	$9,48 \times 10^5$	

\*concentrações corrigidas conforme a massa do padrão pesada

Fonte: Dados da pesquisa

Após a realização da triagem da concentração dos padrões, foi empregada a mesma ideia para avaliação das diluições ideais para análise das amostras. Após preparo conforme item 4.7.1.1 as amostras foram analisadas de acordo com os sinais analíticos obtidos. Os produtos fitoterápicos xarope NL e de xarope BT, adquiridos no mercado, foram analisados após a diluição de 10 vezes. O extrato comercial e a tintura foram analisados diluídos 1.000 vezes. As áreas obtidas estão sumarizadas na Tabela 9.

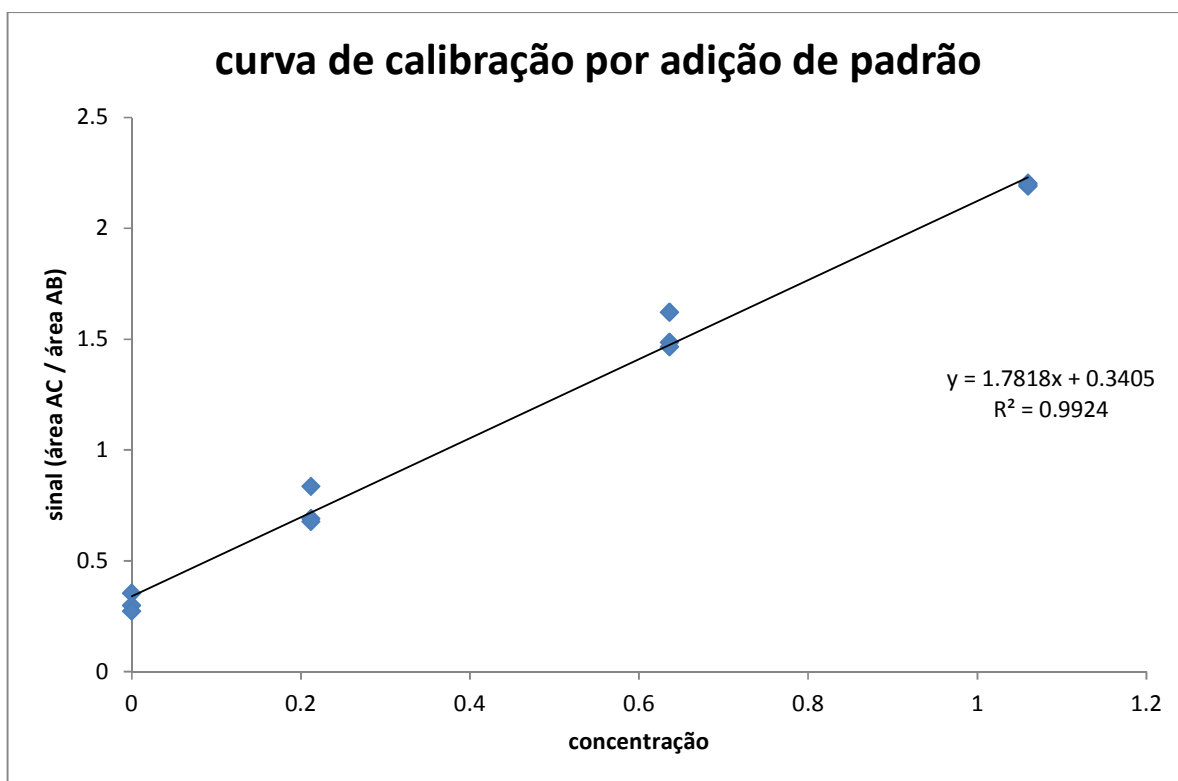
**Tabela 9.** Triagem para obtenção da diluição ideal de cada amostra antes da quantificação.

<i>Amostra</i>	<i>Área do pico do analito</i>	<i>Diluição</i>
<b>Extrato comercial</b>	$1,45 \times 10^5$	1 : 1.000
<b>Xarope NL</b>	$4,72 \times 10^5$	1 : 10
<b>Xarope BT</b>	< LD	1 : 10
<b>Tintura</b>	$1,09 \times 10^6$	1 : 1.000

Fonte: Dados da pesquisa

Definidas as diluições ideais de análise, foram construídas curvas de calibração com adição de padrão e com análise em triplicata em cada ponto, para cada um dos produtos. A Figura 12 apresenta o gráfico de adição de padrão, com a equação da reta obtida e o valor de  $R^2$  do extrato comercial.

**Figura 12.** Gráfico da curva por calibração por adição de padrão no extrato comercial



Fonte: Dados da pesquisa

Para a análise de cada produto, foram realizadas as estimativas dos limites, de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em conformidade com o estabelecido pela legislação brasileira, que leva em consideração a inclinação da curva de calibração e o desvio padrão (ANVISA, 2017). Desta maneira o LD para o extrato comercial foi estimado em  $1,000 \times 10^{-4}$  mg/mL e o LQ em  $1,000 \times 10^{-3}$  mg/mL.

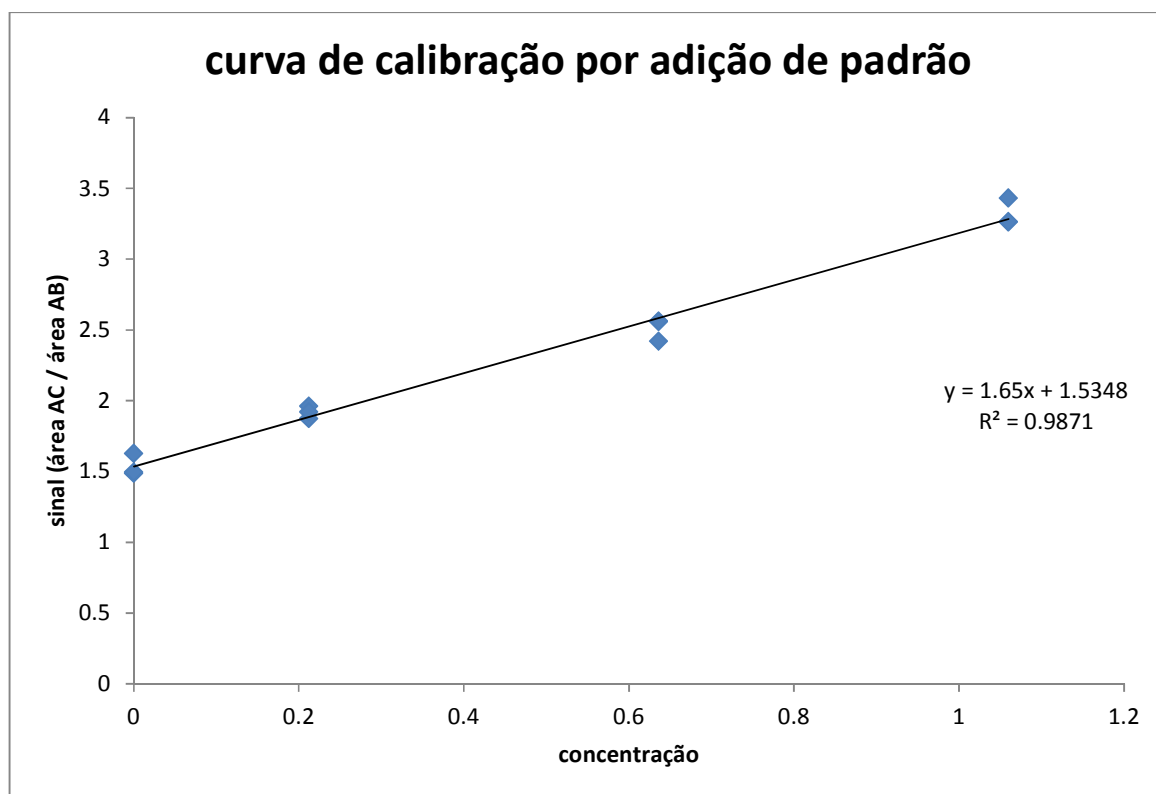
A equação da reta foi ajustada utilizando a análise da regressão de acordo com o método do ajuste por mínimos quadrados (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001) e a seguinte equação foi obtida:

$$y(\pm 0,0694) = 1,7818(\pm 0,0492)x + 0,3405(\pm 0,0309)$$

A partir da extrapolação da curva para o eixo das abcissas e empregando a fórmula da reta ajustada, foi possível calcular a concentração de 0,191 mg/mL de ácido caurenóico no extrato comercial.

Em paralelo foram realizadas análises da tintura seguindo o mesmo procedimento e a Figura 13 apresenta o gráfico por adição de padrão, com a equação da reta obtida e o valor de  $R^2$ .

**Figura 13.** Gráfico da curva de calibração por adição de padrão na tintura hidroalcoólica



Fonte: Dados da pesquisa

Seguindo o mesmo procedimento para a tintura hidroalcoólica, realizaram-se as estimativas dos limites, de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em conformidade com o estabelecido pela legislação brasileira e desta maneira o LD para a tintura hidroalcoólica foi estimado em  $5,687 \times 10^{-5}$  mg/mL e o LQ em  $5,687 \times 10^{-4}$  mg/mL.

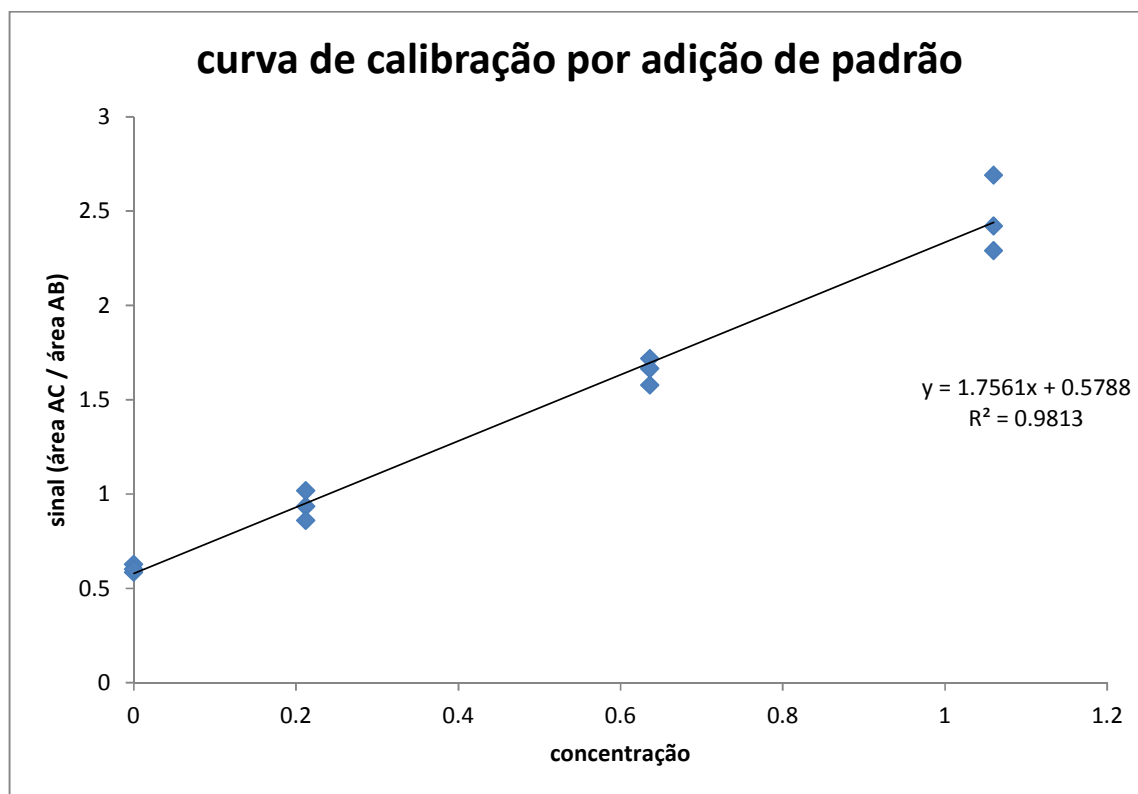
A equação da reta foi ajustada utilizando a análise da regressão de acordo com o método do ajuste por mínimos quadrados e a seguinte equação foi obtida:

$$y(\pm 0,0841) = 1,65(\pm 0,0596)x + 1,5348(\pm 0,0374)$$

A partir da extrapolação da curva para o eixo das abcissas e empregando a fórmula da reta ajustada, foi possível calcular a concentração de 0,930 mg/mL de ácido caurenóico na tintura hidroalcoólica.

Em paralelo foram realizadas análises no xarope de guaco NL seguindo o mesmo procedimento e a Figura 14 apresenta o gráfico por adição de padrão, com a equação da reta obtida e o valor de  $R^2$ .

**Figura 14.** Gráfico da curva de calibração por adição de padrão no xarope de guaco NL.



Fonte: Dados da pesquisa

Seguindo o mesmo procedimento para o xarope de guaco NL, realizaram-se as estimativas dos limites, de detecção (LD) e de quantificação (LQ) em conformidade com o estabelecido pela legislação brasileira e desta maneira, o LD para o xarope de guaco NL foi estimado em  $1,522 \times 10^{-4}$  mg/mL e o LQ em  $1,522 \times 10^{-3}$  mg/mL.

Da mesma forma que nos casos anteriores, partiu-se da extrapolação da curva para o eixo das abcissas. A equação da reta foi ajustada utilizando a análise da regressão, de acordo com o método do ajuste por mínimos quadrados e a seguinte equação foi obtida:

$$y(\pm 0,1081) = 1,7561(\pm 0,0767)x + 0,5788(\pm 0,0481)$$

A partir da extrapolação da curva para o eixo das abcissas e empregando a fórmula da reta ajustada, foi possível calcular a concentração de 0,003 mg/mL de ácido caurenico no xarope de guaco NL.

Não foi realizada a construção da curva analítica com o produto fitoterápico xarope BT porque, de acordo com a triagem para obtenção da diluição ideal de cada amostra antes da quantificação, a concentração do ácido caurenico neste produto é inferior ao limite de detecção do método desenvolvido, de acordo com os resultados obtidos e reportados na Tabela 9.

### 5.3. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR UHPLC-QTOF-MS/MS.

Conforme descrito no item 4.7.2, um método com objetivos qualitativos e comprobatórios, foi desenvolvido em equipamento de cromatografia líquida de ultra eficiência, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução.

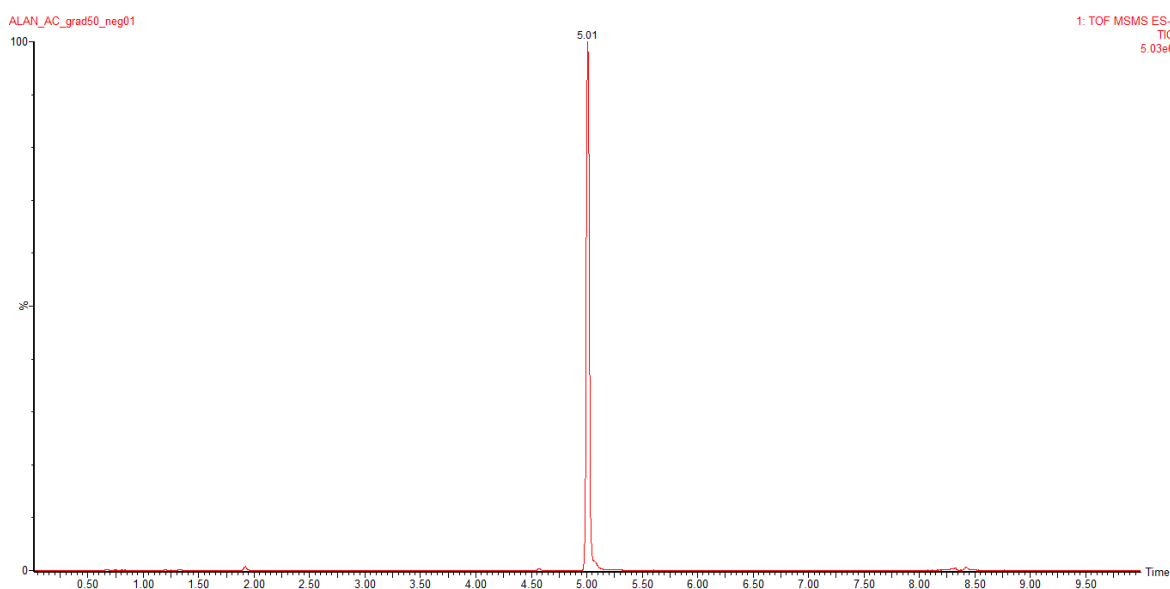
Tanto em HPLC quanto em UHPLC existem dois tipos de modos de eluição: gradiente e isocrático. Em sua configuração clássica, a eluição em gradiente utiliza duas ou mais bombas de fase móvel para permitir que a proporção entre solventes seja modificada em função do tempo. Na eluição em modo isocrático, o solvente, ou mistura de solventes, adotado como fase móvel, é mantido em proporção constante ao longo de toda a corrida cromatográfica. Testes envolvendo as condições cromatográficas foram realizados como utilização de proporções variadas de solventes (água, ACN e MeOH), alteração de pH de fase móvel e alteração de modo de eluição foram realizados com a finalidade de se atingir o

melhor tempo de análise e com bons sinais analíticos. As condições testadas já foram sumarizadas na tabela 6.

### 5.3.1. Checagem do sinal analítico do padrão de ácido caurenico por UHPLC-QTOF-MS/MS.

Corroborando as informações da literatura e os resultados obtidos nas análises por HPLC-QqQ-MS/MS, a infusão direta do padrão de ácido caurenico não produziu íons fragmentos. Desta forma, nas análises por UHPLC-QTOF-MS/MS, foram monitoradas as moléculas desprotonado de relação  $m/z$  301,24 em modo negativo de aquisição de íons. Na Figura 15 pode ser observado o cromatograma do padrão de ácido caurenico nas condições ideais desenvolvidas e descritas no item 4.7.2. O analito teve o tempo de retenção em 5,01 minutos, tempo este que, em associação com o espectro de massas, foi considerado para a identificação do ácido caurenico nas amostras analisadas.

**Figura 15 .** Cromatograma TIC do ácido caurenico por UHPLC-QTOF-MS/MS



Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico; 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN; 5 – 7 min: 100 % de ACN; 7 – 10 min: 50 % de ACN em água; 45 °C; 4 µL/min;

Fonte: Dados da pesquisa



A partir do cromatogramas do padrão foi possível verificar o espectro de massas do íon desprotonado formado e de seus isótopos conforme pode ser observado na Figura 16.

**Figura 16.** Espectro de massas referente ao pico com  $t_R$  5,01 minutos em UHPLC-QTOF-MS/MS



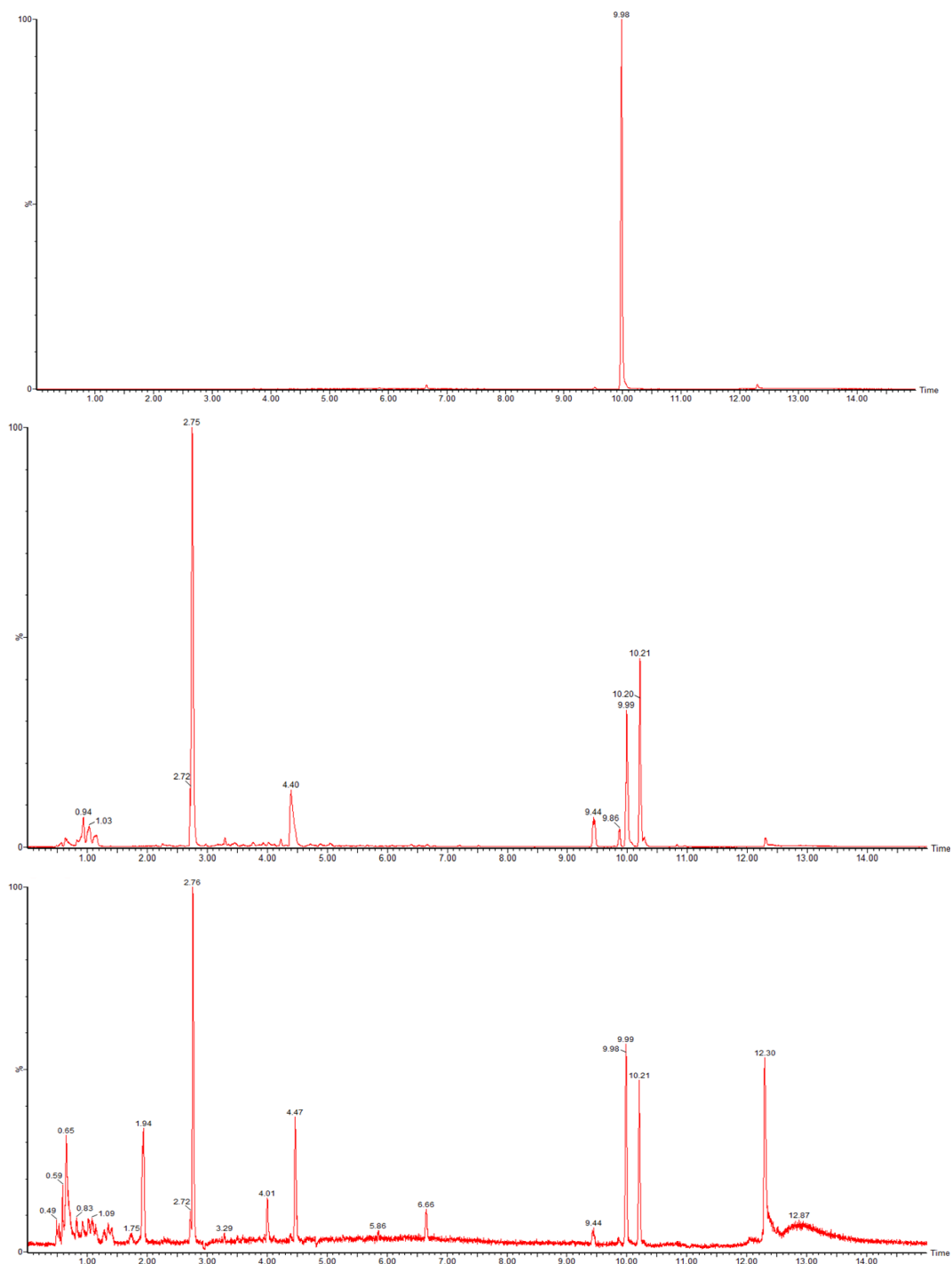
Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico; 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN; 5 – 7 min: 100 % de ACN; 7 – 10 min: 50 % de ACN em água; 45 °C; 4 µL/min;  
Fonte: Dados da pesquisa

No espectro de massas, pode-se observar claramente a relação  $m/z$  301,24 referente ao analito de interesse. No mesmo espectro de massas, ainda é possível observar as relações  $m/z$  302,24 e 303,24 que fazem referência aos isótopos do analito.

### 5.3.2. Desenvolvimento do método qualitativo por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

As amostras preparadas de acordo com o item 4.7.2 foram analisadas com a finalidade de desenvolvimento do método e otimização das condições cromatográficas, para análise do ácido caurenico nas diferentes amostras. Os testes já foram sumarizados na Tabela 6 e os cromatogramas obtidos nas análises estão reportados nas Figuras 17 a 22.

**Figura 17.** Cromatogramas dos testes da condição 1. Padrão de AC (superior), tintura (intermediário), xarope NL (inferior)



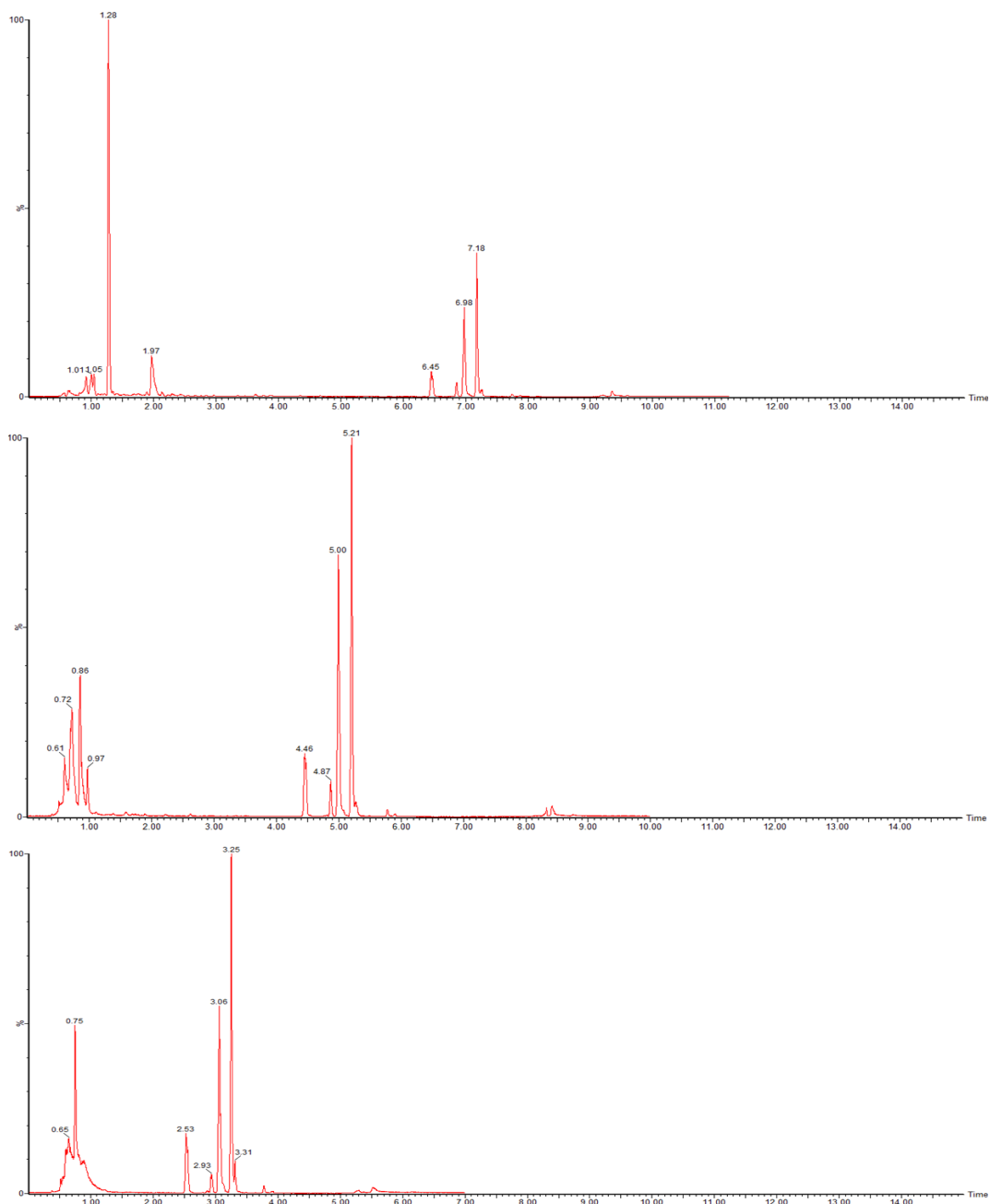
Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico; 0 – 10 min: gradiente linear 5 a 98 % de ACN em água; 10 – 11 min: 98 % de ACN em água; 11 – 15 min: 2 % de ACN em água; 45 °C; 4 µL/min;

Fonte: Dados da pesquisa

Com o objetivo de se diminuir o tempo da eluição dos picos, a proporção dos solventes ACN : H<sub>2</sub>O foi alterada. A tintura foi escolhida para avaliar o impacto desta alteração conforme pode ser observado na Figura 18.

Nota-se que, com o incremento na concentração de Acetonitrila na proporção, as alterações realizadas nas condições 2, 3 e 4 tiveram impacto positivo, com observável redução no tempo de eluição dos picos. Observa-se ainda que, o cromatograma da condição 4 apresentou o menor tempo de eluição dos picos, no entanto, também resultou em significativa coeluição dos primeiros picos do cromatograma quando comparado com as demais condições.

**Figura 18.** Cromatogramas da tintura hidroalcoólica testada nas condições 2 (superior), 3 (intermediário) e 4 (inferior).

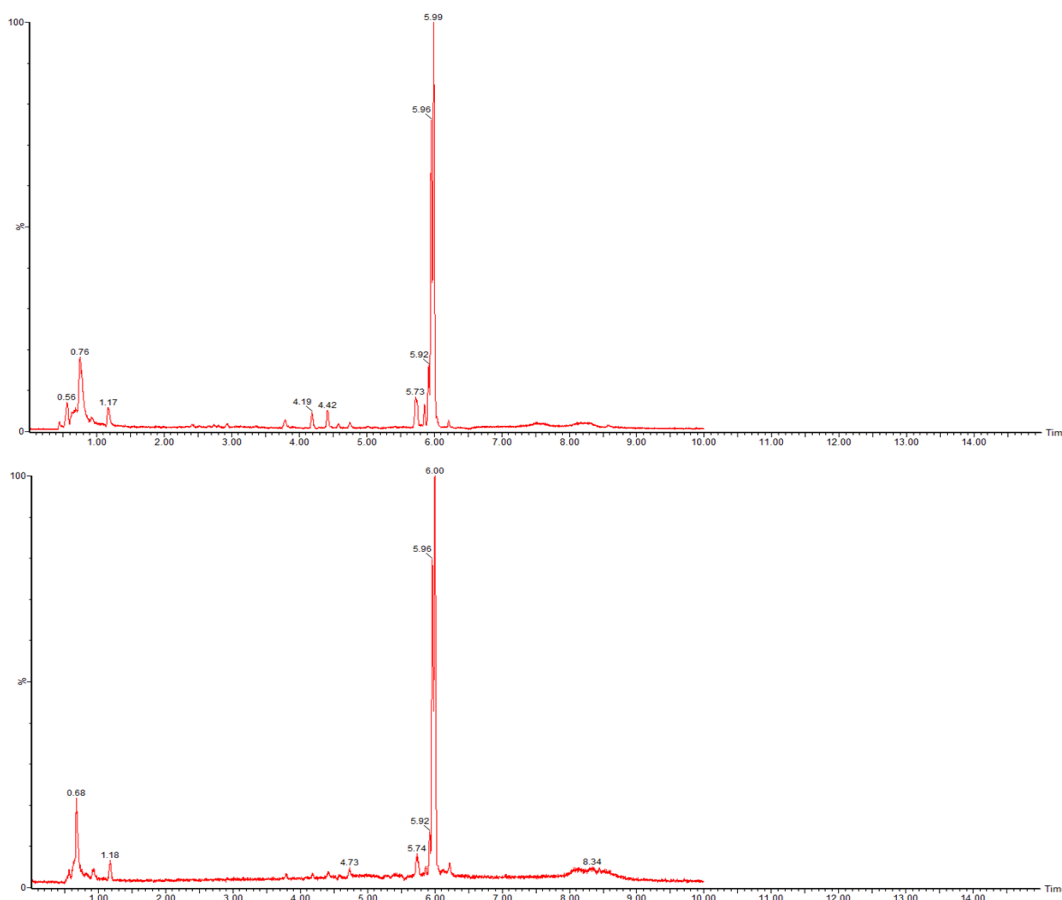


Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; Superior: 0 – 7 min: gradiente linear 30 a 100 % de ACN, 7 – 8 min: 100 % de ACN, 8 – 12 min: 30 % de ACN em água; Intermediário: 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 7 – 10 min: 50 % de ACN em água; Inferior: 0 – 3 min: gradiente linear 30 a 70 % de ACN em água, 3 – 4 min: 100 % de ACN, 4 – 7 min: 70 % de ACN em água

Fonte: Dados da pesquisa

O resultado da análise do extrato comercial na condição 3 (Figura 23) mostra que se trata de uma amostra bastante complexa. Com a finalidade de se melhorar a resolução dos picos com  $t_R$  5,00 e 5,08 minutos, apresentados na Figura 23 (superior), foram testadas as condições cromatográficas 5 a 10, compiladas anteriormente na Tabela 5. Na condição 5, o solvente ACN foi substituído pelo solvente MeOH. O pH da FM foi alterado na condição 6. Os cromatogramas destas condições estão apresentados na Figura 19.

**Figura 19.** Cromatogramas do extrato comercial na condição 5 (superior) e na condição 6 (inferior).

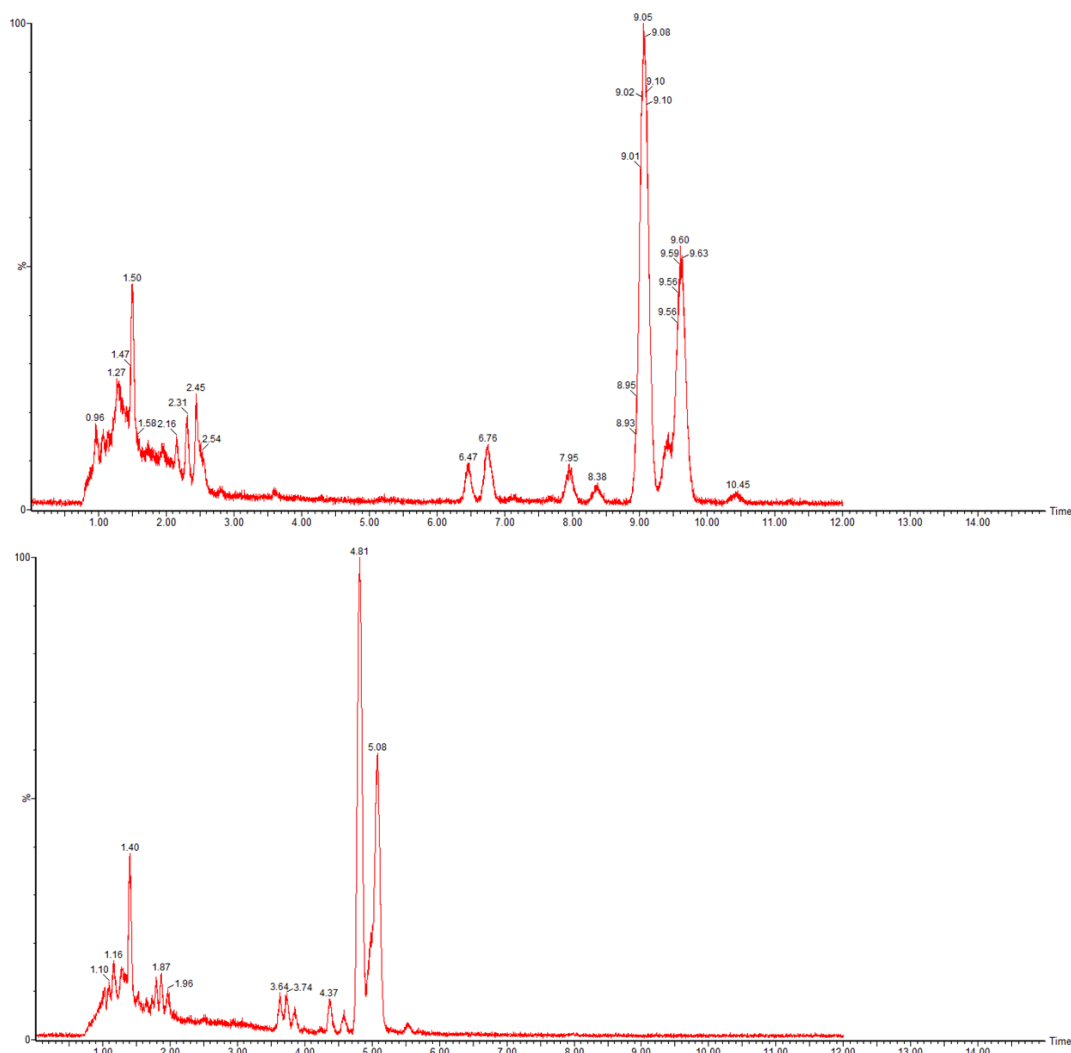


Nota: Superior: FM – MeOH:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C, 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de MeOH, 5 – 7 min: 100 % de MeOH, 7 – 10 min: 50 % de MeOH em água; Inferior: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 1 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C, 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 10 – 11 min: 50 % de ACN em água

Fonte: Dados da pesquisa

O modo de eluição isocrático foi uma alternativa empregada nos testes das condições 7, 8, 9 e 10. Os cromatogramas destas condições são apresentados nas Figuras 20 e 21.

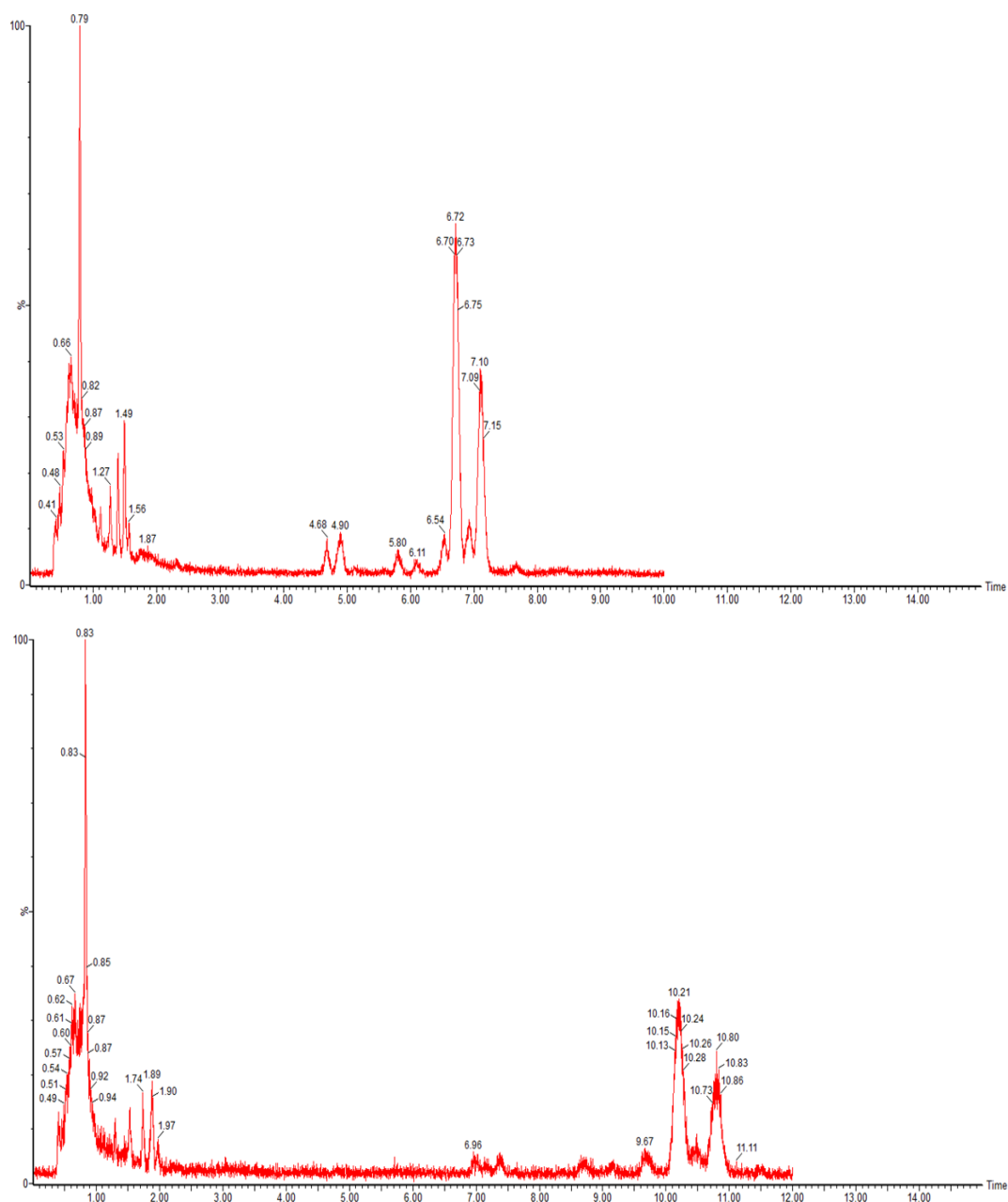
**Figura 20.** Cromatogramas do extrato comercial na condição 7 (superior) e 8 (inferior).



Nota: Eluição isocrática. FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,2 mL/min, 45 °C;  
Superior: 0 – 10 min: 70 % de ACN em água, 10 – 11 min: 70 a 100 % de ACN. Inferior:  
0 – 10 min: 80 % de ACN em água, 10 – 11 min: 80 a 100 % de ACN, 11 – 12 min: 100%  
de ACN.

Fonte: Dados da pesquisa

**Figura 21.** Cromatogramas do extrato comercial na condição 9 (superior) e 10 (inferior).

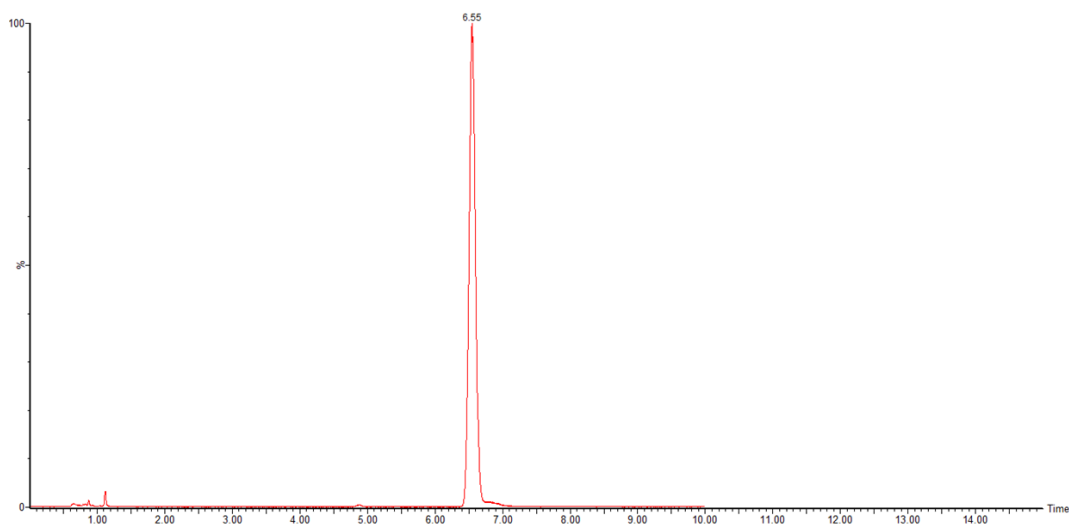


Nota: Eluição isocrática. FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C;  
 Superior: 0 – 10 min: 65 % de ACN em água, 10 – 11 min: 65 a 100 % de ACN, 11 – 12 min: 100 % de ACN. Inferior: 0 – 10 min: 60 % de ACN em água, 10 – 11 min: 60 a 100 % de ACN, 11 – 12 min: 100 % de ACN.

Fonte: Dados da pesquisa

A condição 9 mostrou melhor resolução do pico referente ao ácido caurenico, com  $t_R$  confirmado na Figura 22, entretanto, o modo de eluição gradiente da condição 3 foi escolhido para análise das amostras, já que apresentou menor tempo de retenção, quando comparado com as condições isocráticas. A confirmação do pico pôde ser feita com os recursos do espectro de massas, conforme será apresentado na Figura 23 (inferior).

**Figura 22.** Cromatograma do padrão de ácido caurenico na condição 9.



Nota: Eluição isocrática. FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; 0 – 10 min: 65 % de ACN em água, 10 – 11 min: 65 a 100 % de ACN, 11 – 12 min: 100 % de ACN.

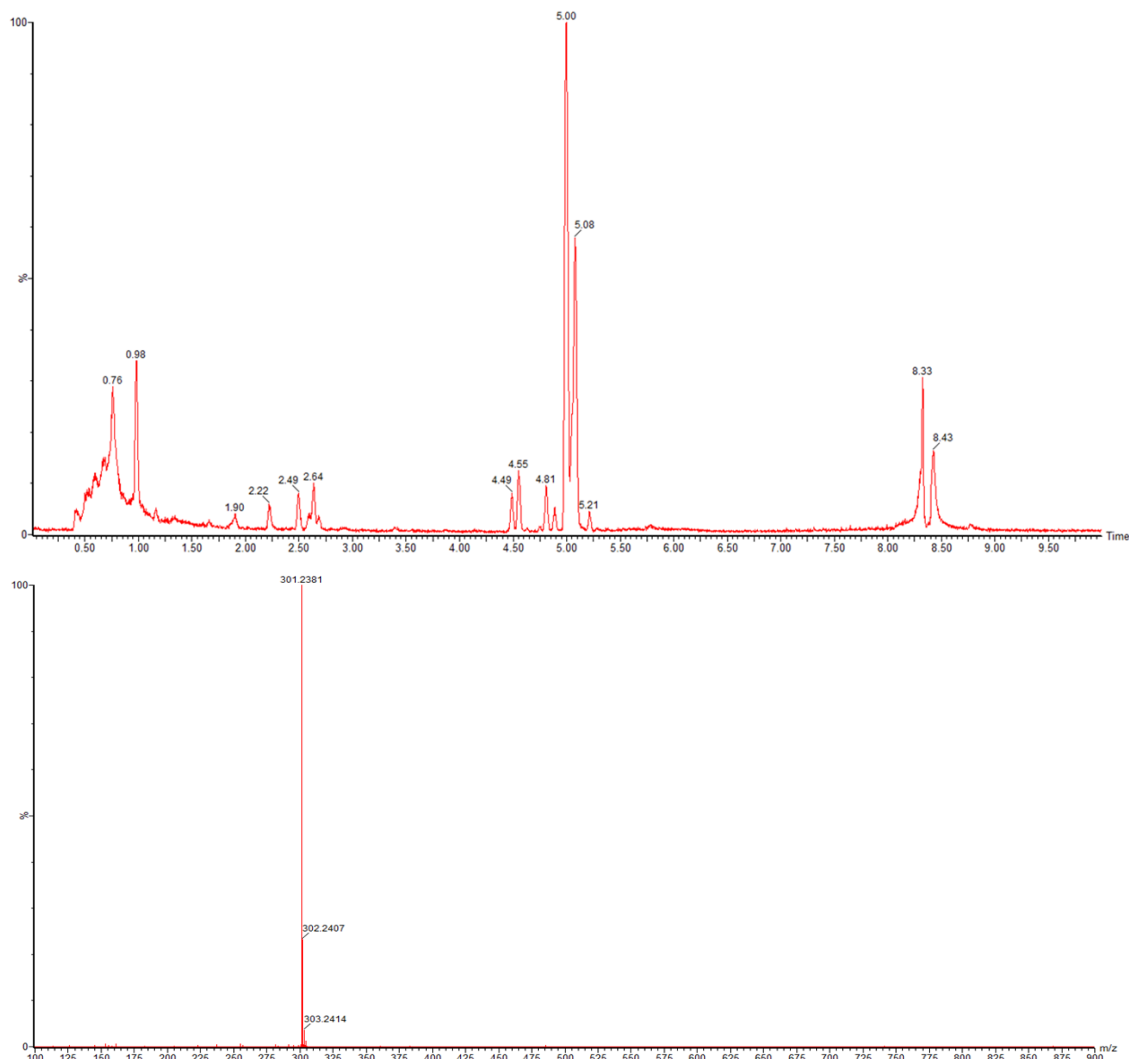
Fonte: Dados da pesquisa

### 5.3.3. Confirmação da presença do ácido caurenico nas amostras quantificadas por HPLC-QqQ-MS/MS

Após definição das condições cromatográfica, de ionização e espectrométrica ideais e checagem do sinal do padrão, o método desenvolvido foi utilizado na investigação da presença do AC nas amostras do extrato comercial, da tintura hidroalcoólica e dos produtos fitoterápicos do mercado, anteriormente quantificados por HPLC-QqQ-MS/MS.



**Figura 23.** Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do extrato comercial.

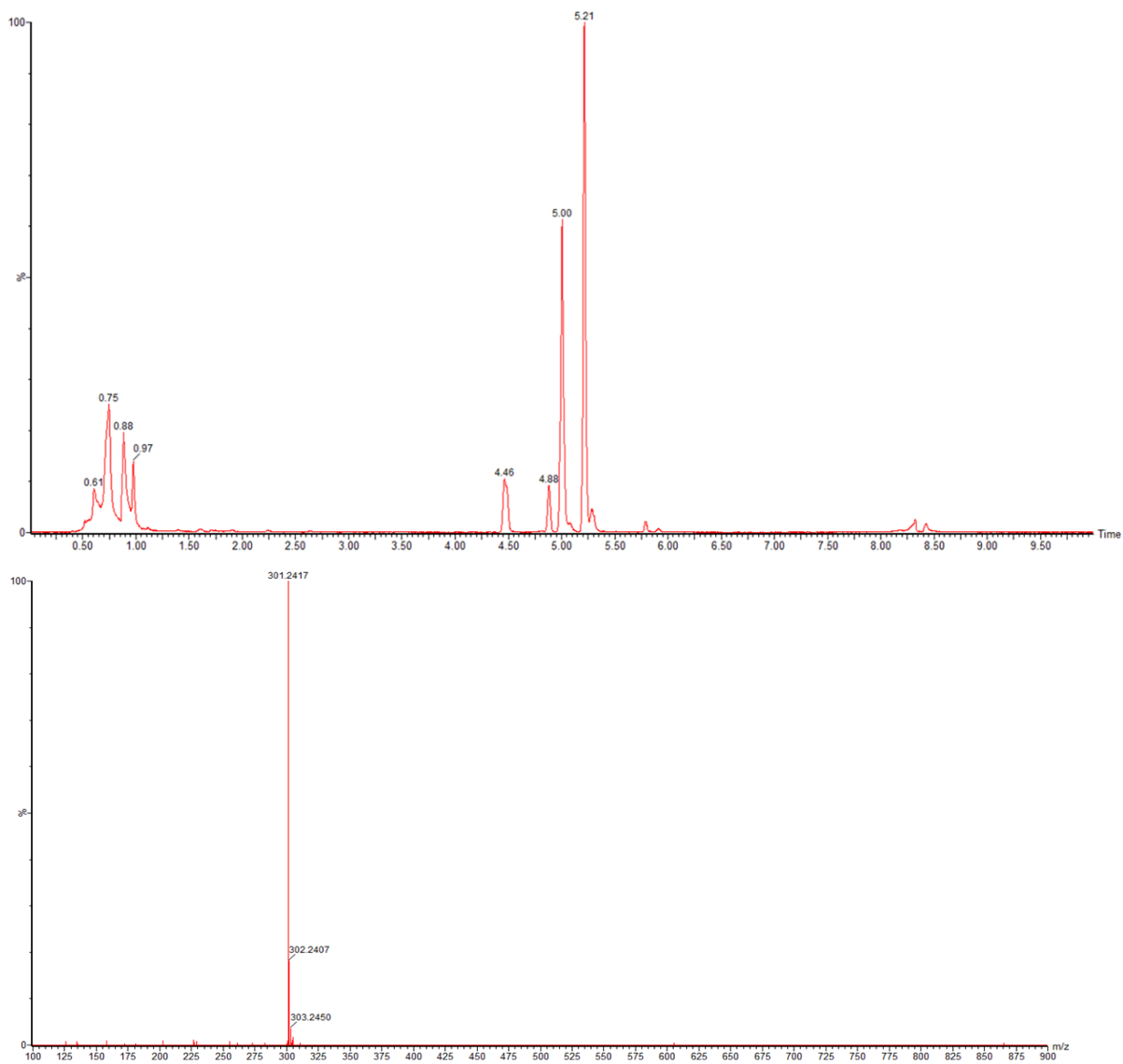


Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 7 – 10 min: 50 % de ACN em água;

Fonte: Dados da pesquisa

O tempo de retenção reportado pelo equipamento no cromatograma é 5,00 minutos é sutilmente diferente do tempo de retenção do padrão (de 5,01 minutos), entretanto, no espectro de massas, pode-se observar claramente a relação  $m/z$  301,24 referente ao analito de interesse. No mesmo espectro de massas, ainda é possível observar as relações  $m/z$  302,24 e 303,24 que fazem referência aos isótopos do analito.

**Figura 24.** Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) da tintura hidroalcoólica.



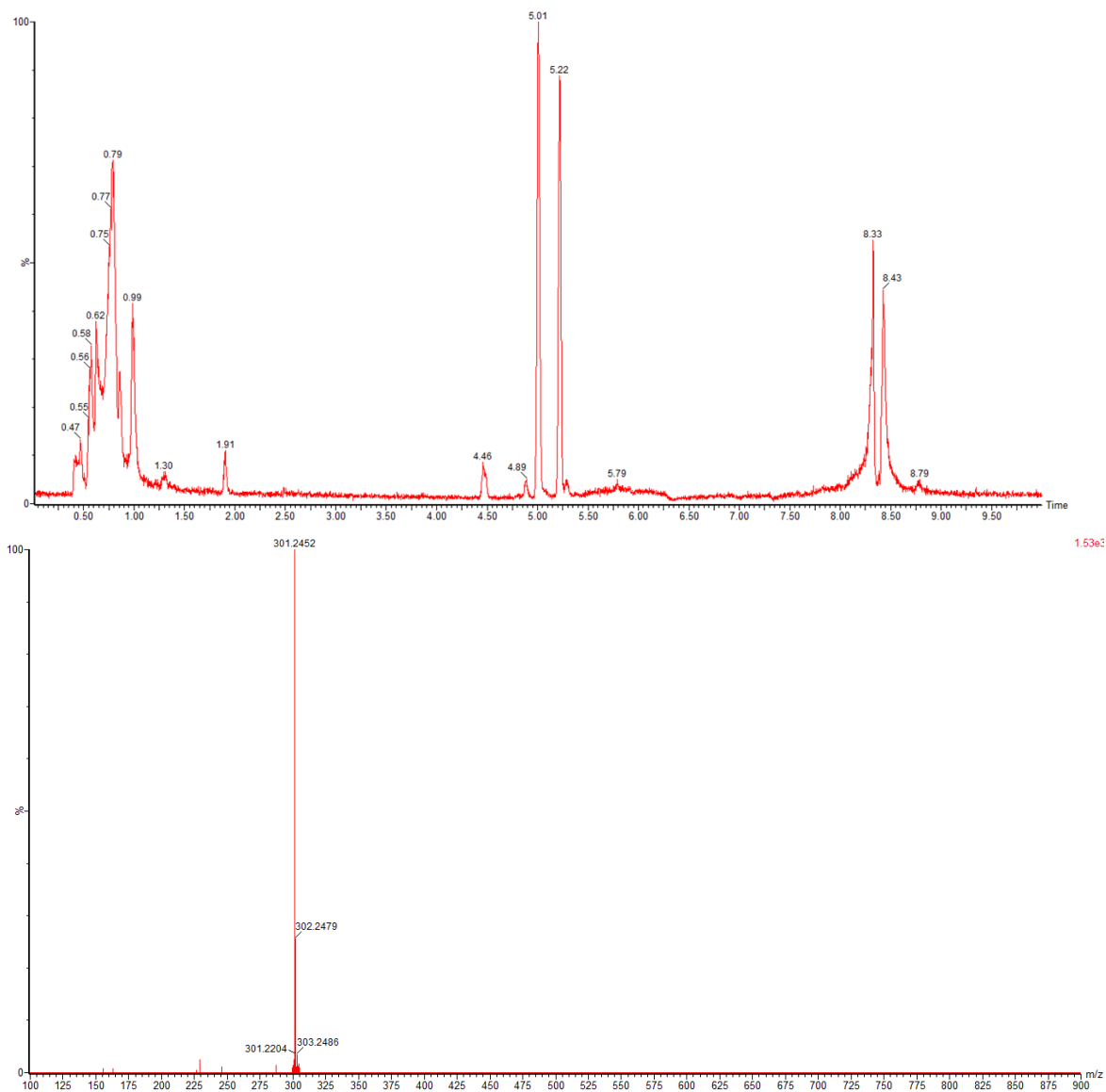
Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 7 – 10 min: 50 % de ACN em água;

Fonte: Dados da pesquisa

O tempo de retenção reportado pelo equipamento no cromatograma é 5,00 minutos é sutilmente diferente do tempo de retenção do padrão (de 5,01 minutos), entretanto, no espectro de massas, pode-se observar claramente a relação  $m/z$  301,24 referente ao analito

de interesse. No mesmo espectro de massas, ainda é possível observar as relações  $m/z$  302,24 e 303,24 que fazem referência aos isótopos do analito.

**Figura 25.** Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do produto fitoterápico xarope NL.

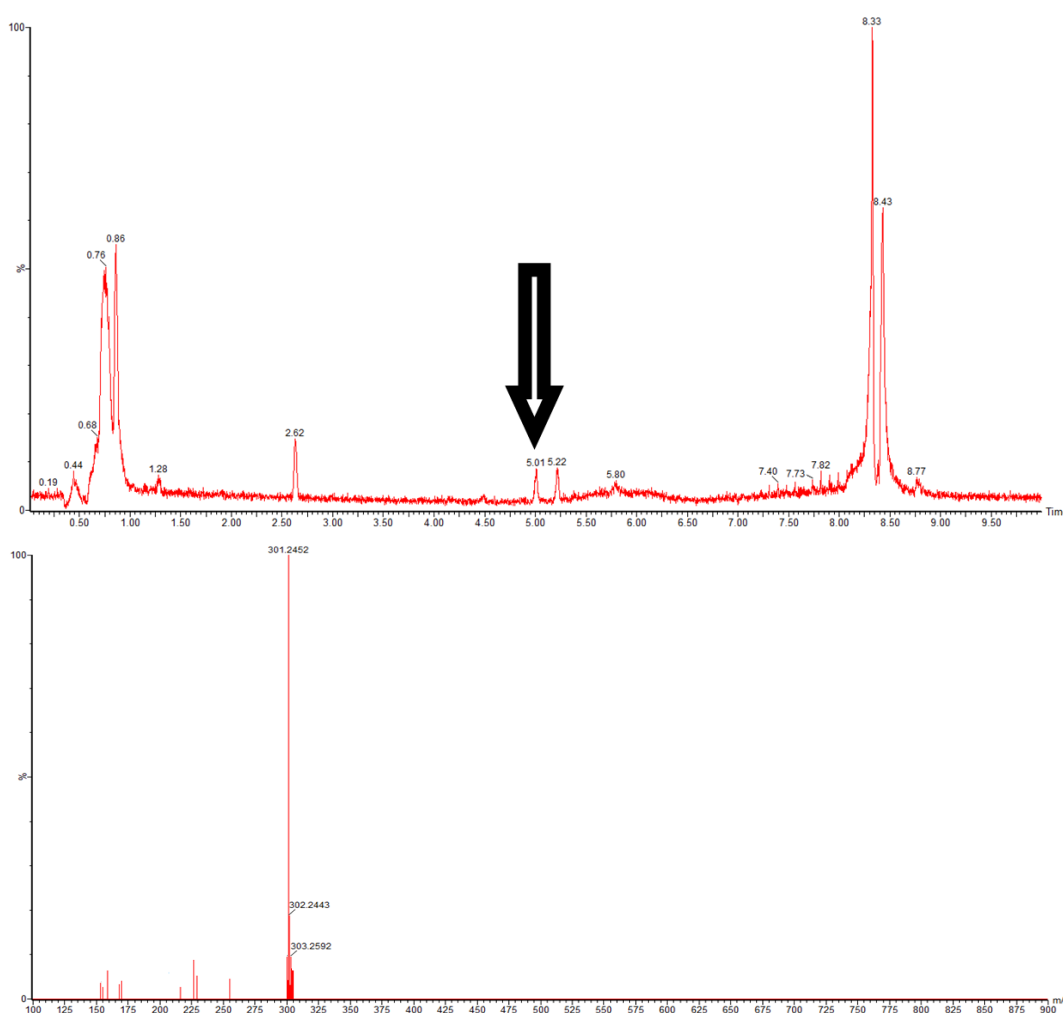


Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; 0 – 5 min: gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 7 – 10 min: 50 % de ACN em água;

Fonte: Dados da pesquisa

O tempo de retenção reportado pelo equipamento no cromatograma é idêntico ao tempo de retenção do padrão (de 5,01 minutos). Observa-se claramente a relação  $m/z$  301,24 referente ao analito de interesse. No mesmo espectro de massas, ainda é possível observar as relações  $m/z$  302,24 e 303,24 que fazem referência aos isótopos do analito.

**Figura 26.** Cromatograma TIC (superior) e espectro de massas (inferior) do produto fitoterápico xarope BT



Nota: FM – ACN:H<sub>2</sub>O + 0,01 % de ácido fórmico, 0,4 mL/min, 45 °C; 0 – 5 min:  
gradiente linear 50 a 100 % de ACN, 5 – 7 min: 100 % de ACN, 7 – 10 min: 50 % de  
ACN em água;

Fonte: Dados da pesquisa

O tempo de retenção reportado pelo equipamento no cromatograma é idêntico ao tempo de retenção do padrão (de 5,01 minutos). Observa-se claramente a relação  $m/z$  301,24 referente ao analito de interesse. No mesmo espectro de massas, ainda é possível observar a relação  $m/z$  302,24 que faz referência ao isótopo do analito. Em função da baixíssima concentração do analito na amostra, a relação  $m/z$  de 303,24 não foi apresentada claramente neste espectro de massas.

Adicionalmente, a Figura 26 mostra que a análise por UHPLC-QTOF-MS/MS foi eficiente na detecção do ácido caurenico em matrizes complexas, mesmo em baixíssimas concentrações. O produto, xarope BT, havia sido analisado por HPLC-QqQ-MS/MS e a quantidade ficou abaixo do limite de detecção do equipamento, de acordo com o método desenvolvido.

A Tabela 10 sumariza uma relação entre as concentrações do ácido caurenico de cada amostra, analisadas por HPLC-QqQ-MS/MS e os valores de áreas integradas dos picos obtidos das análises por UHPLC-QTOF-MS/MS.

**Tabela 10.** Relação entre as concentrações de AC por HPLC-QqQ-MS/MS e os valores de áreas integradas dos picos obtidos por UHPLC-QTOF-MS/MS

<i>Amostra</i>	<i>Concentração em mg/mL (HPLC-QqQ-MS/MS)</i>	<i>Intensidade do sinal (UHPLC-QTOF-MS/MS)</i>
<b>Extrato comercial</b>	0,191	+ + +
<b>Tintura hidroalcoólica</b>	0.930	+ + + +
<b>Xarope NL</b>	0.003	+ +
<b>Xarope BT</b>	< LD	+

Nota: Quanto maior a quantidade de “+”, maior foi o valor encontrado

Fonte: Dados da pesquisa

Embora a quantificação do ácido caurenico por UHPLC-QTOF-MS/MS não faça parte do escopo deste trabalho, as áreas dos picos com o  $t_R$  do analito foram integradas e

os resultados corroboram os valores das concentrações do analito encontrados nas análises por HPLC-QqQ-MS/MS.

## 6. CONCLUSÃO

Este trabalho comprovou as informações da literatura no que diz respeito à dificuldade de detecção do ácido caurenico por métodos espectrofotométricos, logo, os métodos desenvolvidos representam alternativas valiosas para os estudos envolvendo esta substância em matrizes complexas, sem necessidade de preparo complexo das amostras, o que garante grande agilidade ao processo analítico.

O método desenvolvido por HPLC-QqQ-MS/MS foi adequado para detecção e quantificação do ácido caurenico. O método desenvolvido por UHPLC-QTOF-MS/MS foi adequado para comprovação qualitativa e detectou o ácido caurenico em concentrações inferiores ao limite de detecção do método por HPLC-QqQ-MS/MS.

A partir da integração das áreas dos picos encontrados por meio do método por UHPLC-QTOF-MS/MS, curvas analíticas, também podem ser construídas para a obtenção dos valores das concentrações nas amostras.

No mercado brasileiro não existe qualquer medicamento, registrado na ANVISA, que explore as bem caracterizadas propriedades terapêuticas do ácido caurenico, apresentadas neste trabalho. Nesse contexto, a utilização dos métodos desenvolvidos se mostram alternativas robustas para o ágil desenvolvimento de novos medicamentos que empreguem o ácido caurenico como insumo farmacêutico ativo.

## REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. *et al.* Effect of Accessions and Environment Conditions on Coumarin, O-Coumaric and Kaurenoic Acids Levels of *Mikania laevigata*. **Planta Medica**, [s.l.], v. 82, n. 16, p.1431-1437, 23 jun. 2016.
- ARÁOZ, M. V. C. *et al.* Ent-kaurane derivatives from the root cortex of yacon and other three *Smallanthus* species (Heliantheae, Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1042–1048, 2010.
- BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E.. **COMO FAZER EXPERIMENTOS PESQUISA E DESENVOLVIMENTO NA CIÊNCIA E NA INDÚSTRIA**. 2. ed. Campinas: Unicamp, 2001. 401 p.
- BERG, R. G.; MURTA, A. L. M.; KUGLER, W. O Método das Adições Padrão Aplicado à Análise Cromatográfica Quantitativa de Fenóis em Águas Residuais. **Química Nova**. 11, 288. 1988.
- BRAHMKSHATRIYA, P. P.; BRAHMKSHATRIYA, P. S.. Terpenes: Chemistry, Biological Role, and Therapeutic Applications. **Natural Products**, [s.l.], p.2665-2691, 2013.
- BRASIL. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26 de 13 de maio de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2014.
- BRASIL. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 166 de 24 de julho de 2017. Dispõe sobre a validação de métodos analíticos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2017.
- BRASIL. ANVISA. Resolução - RE nº 899 de 29 de maio de 2003. Determina a publicação do "Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos". **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2003.
- BRASIL. ANVISA. Instrução normativa n. 5 de 11 de dezembro de 2008 - Determina a lista de registro simplificado de fitoterápicos no Brasil - Revoga o disposto da Resolução RE n. 89 de 16 de março de 2004. **Diário Oficial da União**. Brasília - DF, 2008.
- BRASIL. ANVISA. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 134 de 14 de julho de 2001. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 2001.



BRASIL. Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006. **Aprova A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde.** Brasília, DF,

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira** / Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2011. 126p. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario\\_de\\_Fitoterapicos\\_da\\_Farmacopeia\\_Brasileira.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf)>. Acesso em: 05 jun. 2017.

BRESCIANI, L. F. V *et al.* Seasonal variation of kaurenoic acid, a hypoglycemic diterpene present in *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). **Z. Naturforsch.**, v. 59, p. 229-232, 2004.

CARLI, R. B. G.; **Desenvolvimento de Formas Farmacêuticas semissólidas Contendo Ácido Caurenoico e Avaliação da Atividade Antiinflamatória in vivo.** Itajaí: UNIVALI, 2007. Dissertação (Mestrado). Universidade Vale do Itajaí, Programa de Mestrado Acadêmico em Ciências Farmacêuticas. Itajaí, 2007.

CARVALHO, L. S. A.. **AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DO ÁCIDO CAURENOICO E DO PARTENOLIDO SOBRE A PRODUÇÃO DE CITOCINAS E ÓXIDO NÍTRICO EM CÉLULAS DE CAMUNDONGOS C57BI/6 APÓS INDUÇÃO DA EAE.** 2015. 116 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2015.

CAVALCANTI, B. C *et al.* Genotoxicity evaluation of kaurenoic acid, a bioactive diterpenoid present in *Copaiba* oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 3, p. 388-92, 2006.

CAVALCANTI, B. C *et al.* Structure–mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopia sericeae* (Annonaceae) **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 701, n. 2, p. 154-163, 2010.

CHOI, R. J. *et al.* Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 5, p. 677-682, 2011.

CHUI, Q. S. H.; ZUCCHINI, R. R.; LICHTIG, J. **Química Nova.** 24, 374. 2001.

CORRÊA M. F. P., MELO G. O., COSTA S. S. 2008. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da Asma. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 18, p. 785-797.

COSTA, A. R. M. *et al.* Copaifera langsdorffii supercritical fluid extraction: Chemical and functional characterization by LC/MS and in vitro assays. **The Journal Of Supercritical Fluids**, [s.l.], v. 100, p.86-96, maio 2015.

COSTA-LOTUFO, L. V.; *et al.* The cytotoxic and embryotoxic effects of kaurenoic acid, a diterpene isolated from *Copaifera langsdorffii* oleo-resin. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1231-234, 2002.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G.. **Natural products (secondary metabolites):** Biochemistry and molecular biology of plants. Rockville: American Society Of Plant Physiologists, 2000. 1318 p.

FIERRO, I. M. *et al.* Studies on the anti-allergic activity of Mikania glomerata. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 66, n. 1, p.19-24, jul. 1999.

FJELDSTED, J.c.. Advances in Time-of-Flight Mass Spectrometry. **Applications Of Time-of-flight And Orbitrap Mass Spectrometry In Environmental, Food, Doping, And Forensic Analysis**, [s.l.], p.19-49, 2016.

GARCIA, P. A.; OLIVEIRA, A. B. de; BATISTA, R.. Occurrence, Biological Activities and Synthesis of Kaurane Diterpenes and their Glycosides. **Molecules**, [s.l.], v. 12, n. 3, p.455-483, 13 mar. 2007.

GASPARETTO, J.. **DETERMINAÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DO GUACO NAS ESPECIALIDADES FARMACÊUTICAS XAROPE E SOLUÇÃO ORAL VIA CLAE-DAD E CLAE-EM/EM.** 2010. 235 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GASPARETTO, J. C. *et al.* Development and validation of two methods based on high-performance liquid chromatography- tandem mass spectrometry for determining 1,2-benzopyrone, dihydrocoumarin, o-coumaric acid, syringaldehyde and kaurenoic acid in guaco extracts and pharmaceutical preparations. **Journal Of Separation Science**, Curitiba, v. 34, n. 7, p.740-748, jan. 2011.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, n. 2, p.140-150, 2003.

GROSS, J. H.. **Mass Spectrometry: A Textbook.** 2. ed. Berlim: Springer-verlag, 2011. 753 p.

HARRIS, D., C.. **Exploring Chemical analysis**. 4. ed. Nova York: W. H. Freeman And Company, 2009. 571 p.

HARVEY, D. **MODERN ANALYTICAL CHEMISTRY**. [s.l.]: Mcgraw-hill, 2000. 816 p.

Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial (INMETRO); Orientações sobre Validação de Métodos de Ensaios Químicos. DOQ-CGCRE-008. 2007.

International Conference on Harmonisation (ICH). Validation of Analytical Procedures: Methodology. Q2B (CPMP/ICH/281/95). 1995.

KOJIMA, M. *et al.* Highly Sensitive and High-Throughput Analysis of Plant Hormones Using MS-Probe Modification and Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: An Application for Hormone Profiling in *Oryza sativa*. **Plant And Cell Physiology**, [s.l.], v. 50, n. 7, p.1201-1214, 15 abr. 2009.

KORFMACHER, W.. A. Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 20, p.1357-67, 2005.

KORFMACHER, W. A.. **Using mass spectrometry for drug metabolism studies**. 2. ed. Nova York: Crc Press, 2009. 429 p.

KRUBE, A.; LEITO, I.; HERODES, K. Combating matrix effects in LC/ESI/MS: The extrapolative dilution approach. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 651, n. 1, p.75-80, set. 2009.

LANZOTTI, V. Diterpenes for Therapeutic Use. **Natural Products**, [s.l.], p.3173-3191, 2013. Springer Berlin Heidelberg.

MATOS, D. M. de. **DETERMINAÇÃO DO PERFIL FARMACOCINÉTICO E DA BIODISPONIBILIDADE SISTÊMICA DO ÁCIDO CAURENOICO EM RATOS**. 2016. 82 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2016.

MELO, L. V. de; SAWAYA, A. C. H. F.. UHPLC–MS quantification of coumarin and chlorogenic acid in extracts of the medicinal plants known as guaco (*Mikania glomerata* and *Mikania laevigata*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Campinas, v. 25, n. 2, p.105-110, mar. 2015.

MENGUE, S. S; MENTZ, L.A.; SHENKEL, E.P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira Farmacognosia**. v.11, p. 21-35, 2001.

MIRANDA, M. M. *et al.* Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1 $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators Of Inflammation**, [s.l.], v. 2015, p.1-10, 2015.

MIYAZAKI, S. *et al.* Analysis of ent-kaurenoic acid by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Biochemistry And Biophysics Reports**, [s.l.], v. 2, p.103-107, jul. 2015.

MONGELLI, E. *et al.* Ent-Kaur-16-en-19-oic acid, a KB cells cytotoxic diterpenoid from *Elaeoselinum foetidum*. **Phytotherapy Research**, [s.l.], v. 16, n. 4, p.387-388, jun. 2002.

MORE: Mecanismo online para referências, versão 2.0. Florianópolis: UFSC Rexlab, 2013. Disponível em: < <http://www.more.ufsc.br/> >

MOREIRA, M. R. *et al.* Ent -Kaurenoic acid-rich extract from *Mikania glomerata*: In vitro activity against bacteria responsible for dental caries. **Fitoterapia**, [s.l.], v. 112, p.211-216, jul. 2016.

NAVARRO MOLL, M. C . Uso racional de las plantas medicinales. **Pharmaceutical Care Espana**. v.2, p.9-19, 2000.

NIESSEN, W. M .A.. **Liquid Chromatography– Mass Spectrometry**. 3. ed. New York: Crc Press, 2006. 600 p.

NOLLET, L. M. L.; TOLDRÁ, F. (Ed.). **Food Analysis by HPLC**. 3. ed. New York: Crc Press, 2013. 1062 p.

PIMENTEL, M. F.; BARROS NETO, B. de. Calibração: Uma revisão para químicos analíticos. **Química Nova**, [s.l.], v. 3, n. 19, p.268-277, 28 set. 1995.

QI, S. *et al.* Novel and simple nonaqueous capillary electrophoresis separation and determination bioactive triterpenes in Chinese herbs. **Journal Of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 40, n. 1, p.35-41, jan. 2006.

ROCHA, L. *et al.* *Mikania glomerata* Spreng: desenvolvimento de um produto fitoterápico. **Rev. Bras. Farmacogn.** 18(suppl), 744-747. 2008.

RIBANI, M. *et al.* Validação de métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, [s.i.], v. 27, n. 5, p.771-780, 17 jun. 2004.

SANTOS, S. C. *et al.* A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Medica**, v. 72, n. 8, p. 679-684, 2006.

SANTOS, J. O. *et al.* Synthesis, *in vitro* Antimalarial Activity and *in silico* Studies of Hybrid Kauranoid 1,2,3-Triazoles Derived from Naturally Occurring Diterpenes. **Journal Of The Brazilian Chemical Society**, [s.i.], p.551-565, 2015. Sociedade Brasileira de Química (SBQ).

SARKER, S. D.; LATIF, Z.; GRAY, A. I. (Ed.). **Natural Products Isolation**. 2. ed. Totowa: Humana Press, 2006. 515 p.

SIEBRA, C. A. *et al.* Potencial anti-inflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1, p. 82-88, 2009.

SILVA, J. J. L. *et al.*. Effects of Kaurenoic Acid and Arginine on Random Skin Flap Oxidative Stress, Inflammation, and Cytokines in Rats. **Aesthetic Plastic Surgery**, v. 39, n. 6, p 971-977, 2015

SILVELLO, C. L. C. **O uso de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS: uma revisão**. 2010. 39 f. TCC (Graduação) - Curso de Enfermagem, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SKOOG, D. A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. Tradução da 8ª Edição norte-americana. São Paulo: Editora Thomson, 2006.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. Third Edition. New Jersey: John Wiley & Sons, 2010. 912 p.

TAVARES, M. F. M.; Eletroforese Capilar: conceitos básicos. **Química Nova** 1996; 19(2):173

TIRAPELLI, C. R. *et al.* Inhibitory action of kaurenoic acid from *Viguiera robusta* (Asteraceae) on phenylephrine-induced rat carotid contraction. **Fitoterapia**, v. 73, n. 1, p. 56-62, 2002.

TIRAPELLI, C. R. *et al.* Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, n. 2-3, p. 233-241, 2004.

TÓKÉS, L.. The allure of mass spectrometry: From an earlyday chemist's perspective. **Mass Spectrometry Reviews**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.520-542, 21 mar. 2016.

VESSECCHI, R. *et al.* Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, [s.l.], v. 34, n. 10, p.1875-1887, 2011

VIDOVA, V.; SPACIL, Z.. A review on mass spectrometry-based quantitative proteomics: Targeted and data independent acquisition. **Analytica Chimica Acta**, [s.l.], v. 964, p.7-23, abr. 2017.

WILLOUGHBY, R. C.; SHEEHAN, E. W.; MITROVICH, S.. **A Global View of LC/MS: How to Solve Your Most Challenging Analytical Problems**. 2. ed. Pittsburgh: Global View Publ, 2002. 518 p.

WU, H. *et al.* Recent developments in qualitative and quantitative analysis of phytochemical constituents and their metabolites using liquid chromatography–mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, [s.l.], v. 72, p.267-291, jan. 2013.

XAVIER, R. M. **VARIAÇÕES MENSIS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE DUAS ESPÉCIES DE PLANTAS MEDICINAIS CONHECIDAS COMO GUACO: MIKANIA GLOMERATA SPRENGUEL E MIKANIA LAEVIGATA SCHULTZ, AO LONGO DE UM ANO**. 2015. 78 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia, Unicamp, Campinas, 2015.