

CROMATOGRAFIA APLICADA À ETNOFARMACOLOGIA PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS

Erika F. Ferrari¹, Natália M. Ribeiro², Roberta S. Carreiro da Costa¹, Rodrigo A. Lazo Osório¹, Milton Beltrame Jr.², Wellington Ribeiro¹

¹ Laboratório de Fisiologia e Farmacodinâmica, ² Laboratório de Síntese Orgânica – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, av. Shishima Hifumi, 2911, Urbanova, São José dos Campos/SP, ferrarierika@yahoo.com.br, gton@univap.br

Resumo – O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto a civilização humana. Aproximadamente 25% das drogas prescritas no mundo todo tem sua origem a partir de plantas onde os refinamentos e a introdução de novas técnicas analíticas facilitou extremamente a pesquisa de novos produtos naturais. Atualmente, existem diversas técnicas para a separação e determinação desses compostos, sendo as principais a cromatografia gasosa, a cromatografia líquida de alta eficiência, o ultravioleta, a espectroscopia de ressonância magnética e a espectrometria de massas são ferramentas poderosas para a separação e a determinação da estrutura desses compostos. Essas possibilidades analíticas permitem maior rapidez na busca de novas substâncias ativas, na obtenção de informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas, como os extratos vegetais, e o reconhecimento de moléculas já conhecidas. Neste trabalho mostramos o alcance dessas principais técnicas na pesquisa de novos fármacos, identificação e caracterização.

Palavras-chave: farmacognosia, etnofarmacologia, cromatografia, plantas

Área do Conhecimento: Ciências da Saúde (Farmácia)

Introdução

O uso de produtos naturais com propriedades terapêuticas é tão antigo quanto à civilização humana e, por muito tempo, os produtos minerais, vegetais e animais eram as principais fontes de novos fármacos (DE PASQUALE, 1984). No passado, os farmacologistas utilizavam o paladar e reações cutâneas para detectar materiais ativos, mas esses métodos não são confiáveis nem seguros (THOMAS, 2000). Mais da metade dos fármacos mais vendidos na última década possuem sua origem de produtos naturais (KINGHORN, 2002). Estes fármacos incluem o inibidores da enzima conversora de angiotensina (ECA), enalapril e captopril; os agentes antiinflamatórios não-esteroidais como o diclofenaco e naproxeno, antibióticos amoxicilina e ácido clavulânico, e o imunossupressor ciclosporina. Aproximadamente 25% das drogas prescritas no mundo todo tem sua origem a partir de plantas e das 252 drogas consideradas como básicas e essenciais pela World Health Organization (PHILLIPSON, 2007; WHO, 1992) 11% são exclusivamente da origem vegetal.

Histórico

Durante o desenvolvimento da farmacognosia uma das técnicas de maior destaque foi a cromatografia em papel, onde se levava aproximadamente 48 horas para obtenção de

resultados, sendo o único método de análise física para a identificação, enquanto que a determinação da estrutura de produtos naturais era realizada através da espectroscopia ultravioleta (UV) (BRAGA, 1995).

A determinação da estrutura química da molécula era obtida através da química degradativa e pela identificação de grupos específicos da molécula, a investigação inteira consumia a maior parte do tempo (PHILLIPSON, 2007). Atualmente existe um enorme número de técnicas, incluindo as convencionais como a cromatografia em camada delgada (CCD), a cromatografia gasosa (CG), a cromatografia líquida clássica (CLC), e as mais avançadas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), a espectroscopia de ressonância magnética (RMN) e a espectrometria de massas (EM) entre outras, que são ferramentas poderosas para a separação e a determinação da estrutura química de moléculas orgânicas. Os refinamentos e a introdução de novas técnicas analíticas auxiliaram extremamente a pesquisa dos produtos naturais. O grande avanço tecnológico dos sistemas de cromatografia contribuiu para a identificação e separação de compostos biologicamente ativos (PHILLIPSON, 1995, 2007).

Ao se considerar a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica, sendo a diversidade molecular dos produtos naturais

muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que, apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada (GUERRA; NODARI, 2002).

Os processos de fracionamento de extratos vegetais com vistas ao isolamento de substâncias ativas podem ser monitorados por ensaios direcionados para a avaliação da atividade biológica (DEY; HARBONE, 1991). Mais recentemente também vem sendo utilizado o monitoramento das frações por CLAE acoplada a espectrofotômetro de ultravioleta (UV) e MS (CLAE/UV/EM) ou de RMN (CLAE/RMN). Essa combinação possibilita direcionar as operações de fracionamento para o isolamento daqueles compostos considerados de maior interesse em função dos dados espectrais obtidos (HOSTETTMANN; WOLFENDER; RODRIGUEZ, 1997).

MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Os métodos cromatográficos são os procedimentos de separação e isolamento mais amplamente utilizados atualmente (cromatografia preparativa); servem também para fins de identificação e análise de misturas e de substâncias isoladas (cromatografia analítica) (AQUINO NETO; NUNES, 2003).

A CCD é uma técnica amplamente utilizada para fins de análise, tanto de extratos vegetais brutos quanto para avaliar o resultado de um processo de separação. Consiste na separação dos componentes através da migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente retido sobre uma superfície plana (LOPES, 2006). A CCD é especialmente útil para se avaliar o perfil cromatográfico de um determinado extrato bruto obtido a partir de uma determinada espécie vegetal ou de extratos medicinais para substâncias farmacologicamente ativas antes da análise detalhada por técnicas instrumentais tais como CLAE-UV e porque muitas amostras podem ser analisadas simultaneamente (RIJKE, 2006).

Outra técnica ainda muito utilizada para a separação ou isolamento de constituintes de extratos vegetais é a CLC em coluna, que consiste na utilização de uma coluna preenchida por uma fase estacionária sólida e uma fase móvel líquida (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2002). É tecnicamente mais simples que a CLAE e facilmente aplicada, devendo ser constantemente monitorada, principalmente em CCD (VICHENWSKI, 2006).

Martin e James em 1952 inventaram um método de CG moderno que tem se tornado uma das técnicas mais importantes e extensamente utilizada na química analítica moderna (JAMES, MARTIN, 1952). Os métodos baseados em CG fornecem alta resolução e baixos limites de detecção, serve para separar componentes a partir de mistura de compostos voláteis. Nas aplicações

analíticas é possível o acoplamento com um sistema de espectrometria de massas (CG/EM), que é extremamente útil na separação e identificação de estruturas (RIJKE, 2006).

As separações são conseguidas por CG por uma série das partições entre uma fase móvel gasosa e uma fase líquida estacionária retida em um tubo de pequeno diâmetro (a coluna) depois uma mistura é injetada para detecção. Um detector monitora então a composição do fluxo de gás enquanto emerge da coluna que carrega componentes separados, e os sinais resultantes fornecem a entrada para a aquisição de dados (BARTLE; MYERS, 2002).

A idéia de combinação da técnica de CG com as informações e a seletividade estrutural disponibilizadas pelo EM fizeram desta combinação uma técnica mais eficaz para a análise de misturas complexas (BARTLE; MYERS, 2002).

Já os primeiros experimentos empregando a utilização de um campo elétrico para a geração de um fluxo eletro-osmótico em cromatografia líquida foi realizado em 1939 por Strain e em 1944 por Lecoq. A eletrocromatografia Capilar consiste no uso de um campo elétrico para gerar um fluxo eletro-osmótico para aplicação em cromatografia líquida (ALTRIA; SMITH; TURNBULL, 1997).

Em 1952 Moulde e Syngne aplicaram um campo elétrico para conseguir separações em cromatografia em camada delgada, mas a primeira aplicação de um campo elétrico à cromatografia em coluna foi realizada em 1974 por Pretorius e colaboradores (MOULDE; SYNGE, 1952; PRETORIOUS, 1974).

As aplicações atuais da eletrocromatografia capilar (ECC) também incluem a ECC com fluorescência induzida por laser (ECC-FIL) e ionização eletrospray (ES-EM) (LORD et al., 1995.).

Mais eficiente que a CLC, a CLAE possibilita a utilização de diferentes colunas, pressão e fluxo, porém apresenta um custo maior (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2002). Umás séries de colunas para CLC, com parâmetros específicos de operação, encontram-se disponíveis comercialmente, permitindo configurar apropriadamente o sistema de operação, segundo as características físicas e químicas dos compostos a serem analisados, obtendo alta seletividade. O sistema mais freqüentemente utilizado para a identificação e isolamento de metabólitos é a fase reversa, o qual separa por partição e adsorção (MARASCHIN; VERPOORTE, 2001).

Embora essas quatro técnicas sejam consideradas eficientes (CCD, CLC, CG e ECC) são usadas menos freqüentemente do que a CLAE. Mais recentemente, a detecção UV transformou-se na ferramenta preferida em

análises baseadas em CLAE, mesmo hoje, em detectores múltiplos de comprimentos de onda ou diodo a detecção UV é uma ferramenta inteiramente satisfatória em estudos de grupos metabólicos (RIJKE, 2006).

MÉTODOS DE DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL

Atualmente uma variedade de detectores tem sido empregada com a finalidade de determinar as estruturas das moléculas analisadas. Em cromatografia utiliza-se mais comumente a detecção UV e EM (ALTRIA; SMITH; TURNBULL, 1997).

Entre os métodos físicos de análise empregados atualmente na determinação estrutural das substâncias, a EM, a espectroscopia UV, no visível e no infravermelho (IV) e a RMN de próton e carbono 13 constituem os mais amplamente empregados. Afim desenvolver estratégias inovadoras para determinar os perfis dos metabólitos de extratos brutos das plantas, desenvolveram técnicas hifenadas onde, particularmente, as técnicas de CLAE/EM e de CLAE/RMN são de extraordinária vantagem para estudar a identificação de produtos naturais (WOLFENDER; NDJOKO; HOSTETTMANN, 2003).

Na determinação por UV as medidas da absorção envolvem a determinação da quebra de energia que sofre um feixe de radiação quando atravessa o meio absorvente. O comprimento de onda para o qual se observa um máximo de absorção depende da quantidade de energia associada à determinada transição eletrônica (WILLARD; MERRITT JR; DEAN, 1974). Na determinação estrutural, os espectros de absorção de uma substância no UV indicam a presença de certos grupos funcionais e a posição dos substituintes da molécula (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2002).

Já para a detecção por IV o espectro infravermelho de uma substância corresponde ao conjunto de bandas de absorção apresentadas pela amostra submetidas à radiação infravermelha, sendo possível a identificação da presença de insaturações, sistemas aromáticos e grupos funcionais específicos através da presença de bandas características (CIRELLI; DELUCA, 1995).

A determinação por EM relaciona o espectro de massas resultante de uma amostra ao peso molecular e à estrutura do analíto, e permite a identificação através da comparação com uma biblioteca, ou com a interpretação *a-priori* (BARTLE; MYERS, 2002). O espectro de massas de uma substância pode fornecer informações relacionadas com sua estrutura, como a massa molecular e padrões de fragmentação, permitindo estabelecer a fórmula molecular da substância e a caracterização da presença e localização de

grupos funcionais e cadeias laterais. Também permite o acoplamento com outras técnicas de cromatografia, como a líquida e a gasosa, permitindo a identificação e quantificação de componentes de baixo peso molecular, mesmo em misturas complexas (BARTLE; MYERS, 2002).

Na espectroscopia RMN a amostra é submetida a um campo magnético externo, de forma que determinados núcleos podem entrar em ressonância com a radifreqüência aplicada, absorvendo energia eletromagnética em freqüências características para cada núcleo. A interpretação desses dados permite caracterizar o número e o tipo de átomos de H e C, em função da localização, proximidade espacial ou mesmo a conectividade de alguns átomos na molécula (MONACHE, 2001).

Considerações Finais

Essas novas técnicas analíticas permitem maior rapidez, exatidão e especificidade na busca de novas substâncias ativas, possibilitando desta forma a obtenção de informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas, como os extratos vegetais e a elucidação estrutural de novas moléculas. Tornam possível a utilização de diferentes técnicas para direcionar a seleção de extratos, frações e substâncias a serem isoladas e mesmo a combinação de bioensaios com técnicas cromatográficas como a CLAE.

Referências

- ALTRIA, K.D.; SMITH, N.W.; TURNBULL, C.H. A Review of the Current Status of Capillary Electrochromatography Technology and Applications. **Chromatogr.**, v. 46, n. 11-12, p 664-674, 1997.
- AQUINO NETO, F.R. NUNES, D.S.S. **Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins**. Rio de Janeiro: Interciência, 2003.
- BARTLE, K.D.; MYERS, P. History of gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, n 9-10, p. 547-557, 2002.
- BRAGA, G.L. Cromatografia em papel. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. Introdução a métodos cromatográficos. Campinas: Ed. Unicamp, 6ª ed. 1995.
- CIRELLI, A.F.; DELUCA, M.E. **Aprendiendo Química Orgánica: estructura y reactividad**. Buenos Aires: Eudeba, 1995.
- DE PASQUALE, A. Pharmacognosy: the oldest modern science. **J. Ethnopharmacol.**, v. 11, p. 1-16, 1984.

DEY, P.M.; HARBONE, J.B. **Methods in plant biochemistry**. 6 ed. San Diego: Academic Press, 1991.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2002.

GUERRA, M.P.; NODARI, R.O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 4 ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS, 2002.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L.; RODRIGUEZ, S. Rapid detection and subsequent isolation of bioactive constituents of crude plant extracts. **Planta Med**, v. 63, n. 1, p. 2-10, 1997.

JAMES, A.T.; MARTIN, A.J.P. Gas-liquid partition chromatography; the separation and micro-estimation of volatile fatty acids from formic acid to dodecanoic acid. **Biochem. J.**, v. 50, n. 5, p. 679-690, 1952.

KINGHORN, A.D. The role of pharmacognosy in modern medicine. **Expert Opin. Pharmacother.**, v. 3, p. 77-79, 2002.

LOPES, J.L.C. Cromatografia em camada delgada. In: COLLINS CH; BRAGA GL; BONATO PS. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp. 2006

LORD, G.A.; GORDON, D.B.; TETLER, L.W.; CARR, C.M. Electrochromatography-electrospray mass spectrometry of textile dyes. **J. Chromatogr. A**, v. 700, p. 27-33, 1995.

MARASCHIN, M.; VERPOORTE, R. Aplicações da Cromatografia líquida e espectrometria de massas na análise de metabólitos secundários vegetais e em biomedicina. In: YUNES R.A.; CALIXTO J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

MONACHE, F.D. Determinação estrutural de produtos naturais através da técnica de ressonância magnética nuclear. In: YUNES R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas Medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Argos, 2001.

MOULD, D.L.; SYNGE, R. L.M. Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large

molecules. **Analyst**, v. 77, n. 964, p. 964 – 969, 1952.

PHILLIPSON, J.D. A matter of some sensitivity. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1319-1343, 1995.

PHILLIPSON, J.D. Phytochemistry and pharmacognosy. **Phytochemistry**, v. 68, p. 2960-2972, 2007.

PRETORIOUS, V.; HOPKINS, B.J.; SCHIEKE, J.D. new concept of high-speed liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 99, p. 23-30, 1974.

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

THOMAS, G. **Medicinal Chemistry: an introduction**. Chinchester: John Wiley & Sons, 2000.

VICHENWSKI, W. Cromatografia por adsorção. In: COLLINS, CH; BRAGA, GL; BONATO, PS. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas: Ed. Unicamp. 2006

WHO — World Health Organization. **Quality control methods for medicinal plant materials**, Geneva. 1992.

WILLARD, H.; MERRITT JR, L.; DEAN, J. **Análise instrumental**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1974.

WOLFENDER, J.L., NDJOKO, K., HOSTETTMANN, K. Liquid chromatography with ultraviolet absorbance-mass spectrometric detection and with nuclear magnetic resonance spectroscopy: a powerful combination for the on-line structural investigation of plant metabolites. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 437-455, 2003.