

Anais

10º Workshop do Mestrado Profissional

Universidade de São Paulo
Instituto de Química

10
Anos
2012 – 2022

WORKSHOP

MESTRADO PROFISSIONAL
TECNOLOGIA EM QUÍMICA
E BIOQUÍMICA



Workshop do programa de mestrado profissional tecnologia em química e bioquímica da USP-AMPT (10.:2022: São Paulo) – anais: vol.3

© 2022 Paulo Roberto H. Moreno, Maurício da Silva Baptista, Denise Freitas Siqueira Petri.
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedroso Alvarenga, 1245, 4º andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel.: 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 6. ed.
do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*,
Academia Brasileira de Letras, março de 2021.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios sem autorização escrita da editora.

Todos os direitos reservados pela Editora
Edgard Blücher Ltda.

Dados internacionais de catalogação na publicação (CIP)
Angêlica Ilacqua CRB-8/7057

Workshop do programa de mestrado profissional do
instituto de química da USP (10.:2022: Brasil)
3º Programa de Mestrado Profissional do Instituto de
Química da USP: Anais / Paulo R. H. Moreno, Denise
F. S. Petri. - São Paulo: Blucher, 2022.
61 p.

Bibliografia
ISBN 978-65-5550-208-4 (eletrônico)

1. Química I. Moreno, Paulo R. H. II. Petri, Denise
F. S. Petri

22-6936

CDD 540.63

Índices para catálogo sistemático:

1. Química

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor: Prof. Dr. Carlos Gilberto Carlotti Júnior

Vice-Reitora: Profa. Dra. Maria Arminda do Nascimento Arruda

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Prof. Dr. Marcio de Castro Silva Filho

INSTITUTO DE QUÍMICA

Diretor: Prof. Dr. Pedro Vitoriano de Oliveira

Vice-Diretor: Prof. Dr. Shaker Chuck Farah

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filhos

Vice-Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Liane Marcia Rossi

Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

Vice-Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Mauricio da Silva Baptista

COMISSÃO EXECUTIVA

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (IQ-USP)

Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista (IQ-USP)

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP)

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos (IQ-USP)

Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP)

Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP)

EQUIPE DE APOIO

Bel. Bruna Larotonda Telezynski Lopes

Aldrey Olegario

Daniel Kniss

Lara Ribeiro Gianini

CAPA

Daniel Kniss

Lara Ribeiro Gianini

REVISÃO CIENTÍFICA

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos (IQ-USP); Prof. Dr. Alexander Henning Ulrich (IQ-USP); Profa. Dra. Daisy de Brito Rezende (IQ-USP); Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP); Prof. Dr. Fabio Luis Forti (IQ-USP); Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP); Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP); Prof. Dr. Lucas Colucci Ducati (IQ-USP); Dra. Maria Tereza Grombone-Guaratini (IPA-SMA); Profa. Dra. Vera Regina Leopoldo Constantino (IQ-USP).

PATROCÍNIO

3M Do Brasil LTDA
ABL Antibióticos Do Brasil
ACHÉ Laboratórios Farmacêuticos S.A.
Agilent Technologies Brasil Ltda.
Analytics Soluções Administrativas Ltda.
Archroma
ASTRO34 - Advanced Scientific Technologies
Biolab Sanus Farmaceutica
Brainfarma
Buntech
CH5 Comércio e Serviços em Análise Instrumental Ltda.
Chromatox Laboratórios
Cia. Nitro Química Brasileira
Clariant S/A
Clínica Médica Spazio S/C Ltda.
Compass Minerals (Antiga Produquímica)
Criar Pesquisas E Projetos Laboratoriais Ltda.
Diversey Brasil Indústria Química
Dow Brasil Ind. e Com. de Produtos Químicos Ltda.
Dynatech
EMS
ETEC Cidade Tiradentes - Centro Paula Souza
Eurofarma Laboratórios S/A
Farma Service Bioextract
ICL América do Sul S.A.
IFF Essências e Fragrâncias Ltda
Instituto Butantan
Intercientífica
Kluber Lubrications
LDR Industria e Comercio de Produtos Cosméticos Ltda.
LIBBS
Lorene
Metrohm Brasil
Nova Analítica Importação e Exportação Ltda.
Oxiten S/A Indústria E Comércio
Petrobras
PMESP - Corpo De Bombeiros
Produquímica Indústria e Comércio
Reichold do Brasil
Rhodia Solvay Group
Servmar Serviços Técnicos Ambientais Ltda.
Siegwerk
SM Consultoria em Poliuretanos Ltda
Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein
United States Farmacopeia Brasil Ltda.
Volkswagen Do Brasil
Waterflows
Waters Technologies do Brasil Ltda.

Editorial

O Programa **Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica** foi aprovado pela CAPES no início de 2012 e em agosto de 2012, tivemos a primeira turma de alunos matriculados. Essa turma contava com 7 alunos que trouxeram o apoio do mesmo número de empresas parceiras. Este ano o Programa completa 10 anos de existência e sucesso graças à excelência dos alunos, docentes e gestores das empresas parceiras, aos quais o Programa é muito grato.

O Programa nasceu com a missão principal de prover um ambiente acadêmico para o aperfeiçoamento de profissionais Químicos, Bioquímicos, Farmacêuticos, Biólogos e de áreas afins, atuantes no mercado de trabalho. É uma grande satisfação constatar que ao longo destes 10 anos o Programa capacitou profissionais, elevando a qualidade de suas habilidades profissionais, e estimulou a interação entre a Universidade e o setor empresarial. Os alunos do Programa vêm desenvolvendo projetos diretamente ligados as suas atividades profissionais, sob orientação simultânea de um docente da Universidade e de sua gerência na empresa. Essa atividade combinada como “mestrando” e “colaborador” demanda um grande esforço, dedicação e persistência, que são recompensados pelo crescimento profissional.

Atualmente, o Programa conta com a parceria de mais de 40 empresas, que têm apoiado o desenvolvimento profissional de seus colaboradores através do Mestrado Profissional, o qual é um título equivalente àqueles concedidos nos programas acadêmicos desta Universidade. Nesses 10 anos de existência, o Programa já formou 32 Mestres e agora conta com um corpo discente de 20 alunos. A qualidade da formação acadêmica oferecida é reconhecida pela CAPES, a qual concedeu a nota 5 para o Programa em duas avaliações quadrienais consecutivas, a última em 2022, sendo a nota máxima concedida para programas exclusivamente de mestrado. Considerando somente os Mestrados Profissionais avaliados na área de Química no país, somos um dos dois programas que possuem a nota máxima. Além do reconhecimento acadêmico, a satisfação obtida com as parcerias pode ser evidenciada pelo ingresso consecutivo de alunos ligados a uma mesma empresa e sua promoção na carreira profissional, bem como no desenvolvimento e/ou aperfeiçoamento de processos e produtos nas empresas com a aproximação com a Universidade. .

O workshop anual do Programa é uma atividade importante, a qual se iniciou com seu nascimento, com o objetivo de promover a integração entre os alunos e professores. Este encontro é uma oportunidade para a apresentação e discussão dos projetos desenvolvidos pelos alunos, encontro com outros mestrandos e a divulgação do Programa para novas empresas parceiras. Desde 2020, os Anais do Workshop são gentilmente publicados pela editora Blücher, como uma forma de divulgar e valorizar os resultados dos trabalhos desenvolvidos dentro do Programa. Os artigos publicados passaram por um rigoroso processo de avaliação por pares, escolhidos de maneira imparcial, com emissão de pareceres circunstanciados. Devido ao grande êxito do formato, como indicado pelo elevado número de acessos atingidos nos trabalhos, abrimos esse canal de divulgação técnico-científico para todas as produções do Instituto de Química.

Nesta 3ª edição dos Anais do Workshop contamos com a contribuição de resumos expandidos de alunos dos Programas de Pós-graduação Acadêmicos e do Profissional e de alunos de Iniciação Científica dentro de várias temáticas das áreas da química e bioquímica. Assim, gostaríamos de agradecer as contribuições recebidas para compor esta obra certos de que esta edição despertará o mesmo interesse das edições anteriores nos profissionais da química e áreas afins, aproximando ainda mais a investigação acadêmica do setor produtivo.

Paulo R. H. Moreno

Denise F.S. Petri

ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS COM ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTI-TIROSINASE EM EXTRATOS DE *Merostachys pluriflora* MUNRO EX E.G. CAMUS (Poaceae: Bambusoideae)

Matheus M. Sobrinho¹, Paulo R. H. Moreno²

1 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

mmsobrinho@usp.br

Resumo: Bambus são largamente utilizados em diversas áreas, como construção civil e na medicina, mas não existem estudos aprofundados sobre a composição química e atividade biológica das espécies americanas. A espécie *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus já demonstrou atividade antioxidante e fotoprotetora. Este trabalho teve como objetivo determinar as substâncias responsáveis por essas atividades e da atividade anti-tirosinase. Foram preparados extratos hidro-etanólicos (60%) dos colmos em Soxhlet. O extrato bruto seco foi dissolvido em metanol:água (9:1) e particionado em frações hexânica, clorofórmica e de acetato de etila. A fração clorofórmica apresentou a maior atividade antioxidante e anti-tirosinase, mas continha uma grande quantidade de clorofila, que foi removida por filtração em Celite[®]. A fração filtrada foi submetida a cromatografia em coluna, originando 5 subfrações. O perfil da composição dessas subfrações foi analisado por CCD e, após, agrupadas por semelhança. As subfrações foram analisadas por HPLC com detector por arranjo de diodo e sua composição determinada pela análise de absorção UV/Vis e tempos de retenção frente a um conjunto de padrões. A atividade antioxidante mais intensa foi encontrada nas subfrações 2, 3 e 4. O ácido *p*-cumárico foi o composto majoritário nas subfrações 2 e 3, e pode ser um dos principais responsáveis pela atividade antioxidante. A subfração 4 foi a única que apresentou atividade anti-tirosinase, onde foram detectados como componentes principais flavonoides e fenilpropanóides, de acordo com o espectro de absorção, que podem ser os responsáveis pela atividade anti-tirosinase. Estes resultados demonstram o potencial deste bambu como um agente antioxidante, indicando a necessidade de aprofundamento nos estudos fitoquímicos e biológicos dos bambus americanos.

Palavras-chave: Bambu, fenólicos, Atividade antioxidante, Atividade anti-tirosinase, *Merostachys pluriflora*

Isolation and identification of antioxidants and antityrosinase compounds from Merostachys pluriflora Munro ex E.G. Camus (Poaceae: Bambusoideae) extracts

Abstract: Bamboos are widely used for many purposes, such as construction, food, and medicine, however there is almost no knowledge about the chemical and biological properties of American species. Previously, one of those species, *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus showed antioxidant and photoprotective activities. For this reason, the main goal of this work was to identify the substances responsible for the antioxidant activity of *M. pluriflora*, and to evaluate their antioxidant and anti-tyrosinase activity. The bamboo culms were extracted with a hydro-ethanolic (60%) solution in a Soxhlet apparatus. The crude extract was dissolved in methanol:water (9:1) and partitioned into hexanic, chloroform and ethyl acetate fractions. The chloroform fraction had the highest antioxidant and anti-tyrosinase activity, but with large amounts of chlorophyll, which was eliminated by filtration through Celite[®]. After that, this fraction was submitted to column chromatography affording 5 subfractions. Subfractions 2, 3 and 4 presented the highest antioxidant activity, but only subfraction 4 showed anti-tyrosinase activity. Those subfractions were analyzed by HPLC-DAD, and its composition was determined by comparing the retention times and UV/Vis absorption with a series of standard compounds. *p*-Coumaric acid was the major compound found in subfractions 2 and 3, indicating that it can be the main responsible for antioxidant activity. The major compounds from subfraction 4 were flavonoids and phenylpropanoids which can be responsible for the antityrosinase activity. These results demonstrate the potential of this bamboo, offering the possibility of deepening phytochemical and biological studies.

Keywords: Bamboo, Phenolics, Antioxidant activity, Antityrosinase activity, *Merostachys pluriflora*.

Introdução

Há muito tempo que bambus são usados no sudeste da Ásia como material de construção, móveis, encanamentos e de embalagem de alimentos para evitar a deterioração. Nessa região, a medicina tradicional emprega também as folhas de bambu em tratamentos de hipertensão, arteriosclerose, doença cardiovascular, e certas formas de câncer. Essas propriedades terapêuticas foram relacionadas com a atividade antioxidante dos bambus. Na China, um preparado das folhas de bambu foi permitido pelo Ministério da Saúde local para ser usado como aditivo em alimentos devido a sua função antioxidante. Os extratos de bambu são compostos por flavonoides, lactonas e ácidos fenólicos, onde as flavonas C-glicosiladas costumam ser os compostos mais abundantes, tais como: orientina, homo-orientina, vitexina e isovitexina¹.

Diversos estudos relacionados à atividade biológica de extratos de diversos bambus já foram realizados. O bambu *Sasa senanensis* (Franch. & Sav.) Rehder, originário do Japão, comprovou ser capaz de sequestrar radicais aniônicos de superóxido². O extrato da droga vegetal *Caulis bambusae*, obtido das aparas dos colmos de algumas espécies de bambu, apresentou uma função antitumoral frente a quatro tipos diferentes de tumores graças à grande quantidade de triterpenos presentes nesse extrato³.

Existem poucos estudos sobre os compostos e a atividade bioquímica das espécies de bambu nativas do território brasileiro. Em comparação com a exploração de bambus asiáticos, o Brasil não desenvolveu grande interesse nessa subfamília das gramíneas (Bambusoideae), principalmente para aplicação na indústria alimentícia e farmacêutica, apesar de possuir uma grande diversidade de espécies. Observa-se que há aproximadamente 32,5% das espécies latino-americanas no território nacional, o que mostra o contraste entre a disponibilidade de matéria-prima e sua aplicação⁴.

O potencial antioxidante de *Merostachys pluriflora* Munro ex E.G. Camus foi demonstrado anteriormente, apresentando um IC₅₀ de 174 µg/mg, isto é, a concentração necessária do extrato de colmos para reduzir em 50% a concentração do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)⁵. Em um estudo com outras espécies de bambu foi demonstrado que a quantidade de compostos fenólicos é consideravelmente maior que a de flavonoides nos colmos, sendo até 25 vezes maior em massa. Esses compostos foram encontrados majoritariamente em partições do extrato bruto utilizando clorofórmio e acetato de etila⁶.

Em virtude desses estudos, o objetivo deste trabalho é identificar os principais compostos responsáveis pelas atividades antioxidante e anti-tirosinase em frações e subfrações de *M. pluriflora*.

Experimental

Coleta e extração

Os colmos de *M. pluriflora* foram coletados no Parque Estadual das Fontes do Ipiranga (PEFI), em São Paulo-SP (05/2018) e identificados pelo Dr. Tarcísio Filgueiras do Instituto de Botânica de São Paulo.

O método escolhido para a extração de compostos do colmo da espécie *M. pluriflora* foi de extração contínua em aparelho de Soxhlet utilizando etanol 60%, que demonstrou ser o mais eficiente⁵. Após o processo, o extrato obtido foi filtrado e o solvente eliminado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, armazenados em freezer e posteriormente liofilizados.

Fracionamento do extrato

Após a pesagem, todo o extrato bruto foi solubilizado em água e metanol (9:1) e particionado com uma série de solventes de polaridade crescente, hexano, clorofórmio e acetato de etila até a exaustão. Após as extrações, as fases orgânicas foram secadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e os solventes eliminados sob pressão reduzida.

Isolamento e Identificação dos Compostos Ativos

Para a cromatografia em coluna, 500 mg da fração clorofórmica foram aplicadas em uma coluna, com volume 150 mL, contendo 30 g de sílica gel 60 (Merck) como fase estacionária. Como eluentes foram utilizados três porções de 50 mL de hexano:clorofórmio (1:1 v/v); clorofórmio; clorofórmio:metanol (95:5 v/v); clorofórmio:metanol (9:1 v/v); clorofórmio:metanol (8:2 v/v); clorofórmio:metanol (7:3 v/v); clorofórmio:metanol (1:1 v/v); metanol (100%). As subfrações geradas a partir desta etapa foram numeradas de 1 a 8 de acordo com a ordem dos efluentes utilizados.

Para as análises em HPLC, foi utilizado um cromatógrafo Agilent 1260 com detector de espectro ultravioleta por fotodiodos com células de fluxo de 60 mm. A fase estacionária foi uma coluna Zorbax Eclipse plus de fase reversa C18 (4,6 x 150 mm x 3,5 µm), e um fluxo de 1,0 mL/min. Os solventes utilizados foram ácido acético 0,1% e acetonitrila em modo gradiente, começando com 10% acetonitrila por 6 minutos, 10-15% de acetonitrila de 6-7 minutos, 15% acetonitrila de 7-22 minutos, 15-50% de acetonitrila de 22-32 minutos, 50-100% de acetonitrila de 32-42 minutos, 100% de acetonitrila de 42-50 minutos.

Determinação da atividade antioxidante

Para este teste foi usado o método de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)⁷. A leitura foi realizada em leitor de microplacas, com comprimento de onda 515 nm.

Determinação de atividade anti-tirosinase

Para a avaliação da atividade inibidora da enzima tirosinase foi empregado um método enzimático utilizando *L*-Dopa como substrato^{8,9}. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro em $\lambda = 475$ nm.

Resultados e Discussões

As frações 2 e 3 apresentaram padrões de eluição na CCD muito parecidos, portanto foram reunidas. No teste de DPPH, as frações 2/3, 4 e 5 foram as que tiveram melhor resultado de inibição, sendo a subfração 4 com 86% de inibição, as subfrações 2/3 com 85% e a subfração 5 com 79%. O aumento do percentual de inibição das subfrações 2/3 e 4 em relação à fração clorofórmica deve-se ao aumento da concentração de compostos com potencial antioxidante.

As porcentagens de inibição do radical DPPH podem ser vistos na tabela 2, para cada subfração.

Tabela 2: Resultados da avaliação do potencial antioxidante pelo método da inibição do radical de DPPH com as subfrações obtidas a partir da fração clorofórmica dos colmos de *Merostachys pluriflora*.

	Inibição DPPH (%)
Subfração 2/3	85,12 ± 3,87
Subfração 4	86,53 ± 1,97
Subfração 5	79,56 ± 0,85
Subfração 6	53,60 ± 1,22
Subfração 7	52,43 ± 5,16

Na subfração 2/3 só foi possível relacionar um composto com os padrões injetados, o ácido *p*-cumárico, com tempo de retenção similar (10,029 min na amostra e 10,428 min no padrão). A Figura 1 apresenta o perfil de eluição da subfração 2 da fração clorofórmio. As Figuras 2A e 2B apresentam os espectros UV do padrão de ácido *p*-cumárico e o espectro do ácido *p*-cumárico identificado na amostra, respectivamente.

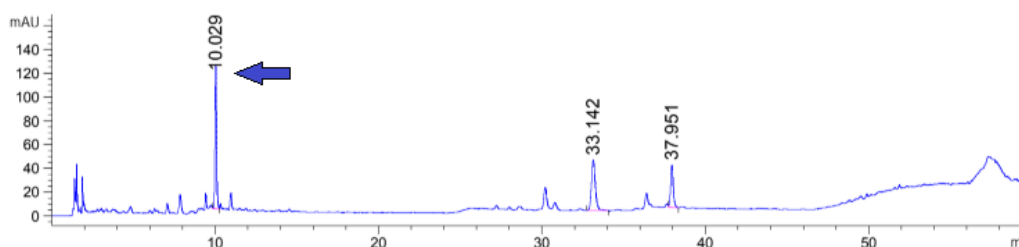


Figura 1: Cromatograma obtido para a subfração 2 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18. Eluição no HPLC da amostra, mostrando o pico do ácido *p*-cumárico no tempo 10,029. Leitura em 280 nm.

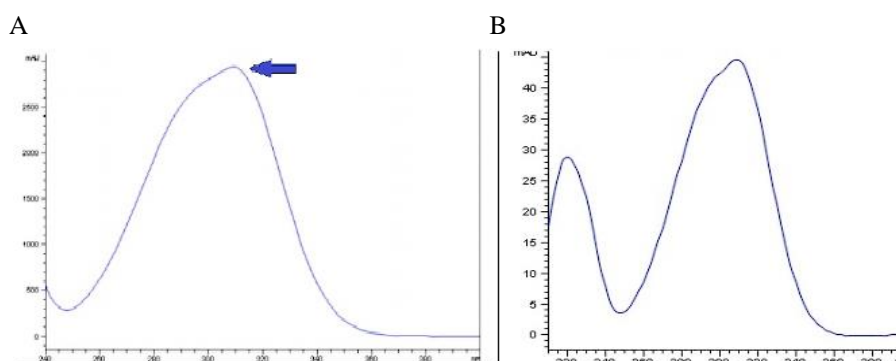


Figura 2: Comparação dos espectros de absorção no UV/VIS do composto majoritário da subfração 2 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora*. (A) Espectro de absorção do padrão de ácido *p*-cumárico. A seta indica o comprimento de onda de maior absorção do ácido *p*-cumárico (aproximadamente 310 nm). (B) Espectro de absorção obtido para a subfração 2/3, mostrando o mesmo padrão de absorção em relação ao ácido *p*-cumárico.

Na subfração 4 também foi possível detectar dois compostos majoritários (Fig. 3), sendo o primeiro (RT=20,701 min) com espectro de absorção semelhante a derivados de ácido cinâmico (Fig. 4A) e o segundo (RT=49,794) com espectro compatível com derivados de flavonóis (Fig. 4B), como quercetina ou canferol, mas os tempos de retenção não corresponderam a nenhum dos padrões disponíveis.

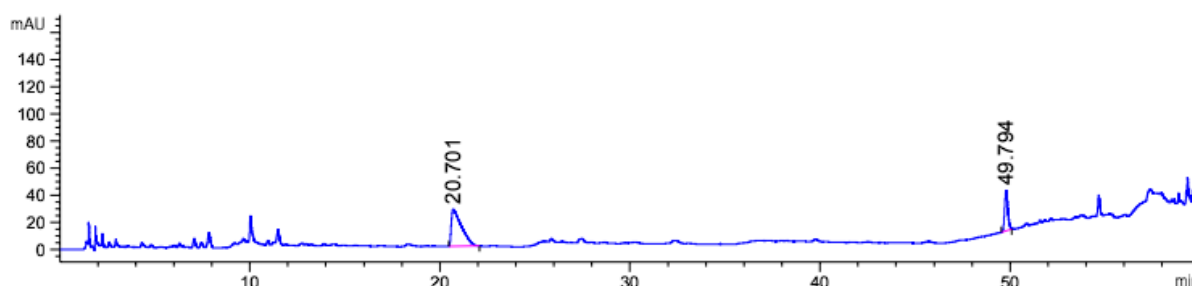
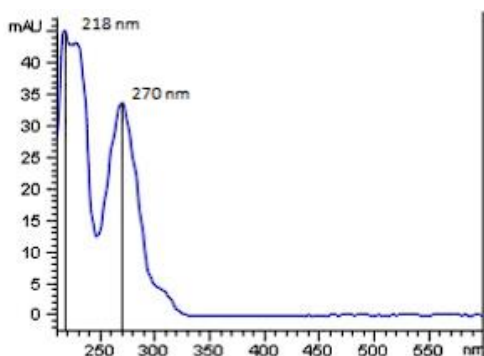


Figura 3: Cromatograma obtido para a subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora* através de cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa C18 em 2808. Eluição no HPLC da amostra, mostrando os picos nos tempos 20,701 e 49,794 minutos. Leitura em 280 nm.

A



B

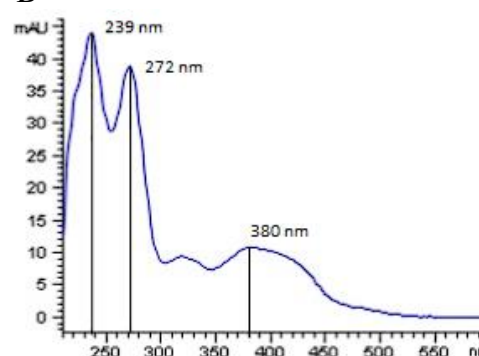


Figura 4: Espectros de absorção no UV/VIS dos compostos majoritários na subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora*. (A) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 20,701 min da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 218 nm e 270 nm. (B) Espectro de absorção obtido para o pico eluído em 49,794 min da subfração 4, mostrando os máximos de absorção em 239 nm e 272 nm.

Os flavonoides majoritários encontrados em espécies asiáticas são flavonas *C*-glicosiladas, vitexina, isovitexina, orientina e iso-orientina¹⁰. Nas subfrações analisadas de *M. pluriflora* não foi detectada a presença desses flavonoides encontrados nas espécies asiáticas. Os outros espectros de compostos minoritários foram analisados mesmo sem correspondência com os padrões, e os picos de absorção se encontravam nas regiões de 320 nm e 235 nm, como mostra o espectro a seguir (Fig. 5). Devido ao seu espectro de absorção no UV/Vis, estes compostos podem ser fenólicos simples ou derivados do ácido cinâmico, como o próprio ácido *p*-cumárico.

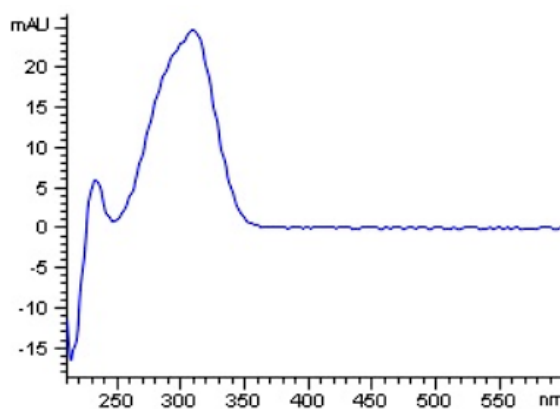


Figura 5: Exemplo de espectro de um dos compostos minoritários encontrado na subfração 4 da fração clorofórmio dos colmos de *M. pluriflora*, com máximos de absorção em 320 nm e 235 nm. Tempo de retenção de aproximadamente 9 min.

A fração clorofórmica e sua subfração 4 apresentaram uma atividade inibitória para a enzima tirosinase. As amostras testadas foram as que demonstraram maior atividade antioxidante, ou seja, a fração clorofórmica sem clorofila e as subfrações 2, 3 e 4. A tabela a seguir mostra as porcentagens de inibição de cada amostra.

Tabela 3: Porcentagem de inibição da enzima tirosinase pela fração clorofórmica de e suas subfrações. A concentração de amostra em cada poço foi de 0,5 mg/mL.

Fração clorofórmica	14%
Subfração 2	0%
Subfração 3	0%
Subfração 4	19%

Embora as subfrações 2 e 3 tenham apresentado as maiores atividades antioxidantes, elas não demonstraram inibição dessa enzima. Apesar de em estudos anteriores o ácido *p*-cumárico ter demonstrado inibitória da enzima tirosinase¹¹, em nosso experimento as subfrações mais ricas nesse composto não apresentaram essa atividade (2 e 3).

A subfração 4 concentrou toda a atividade detectada para a fração clorofórmica total, cujos compostos majoritários eram um derivado de ácido cinâmico e um flavonol ainda não elucidados. Um estudo anterior mostra quatro flavonas com atividade inibitória da tirosinase, evidenciando o potencial inibitório dos compostos desta classe¹².

Conclusões

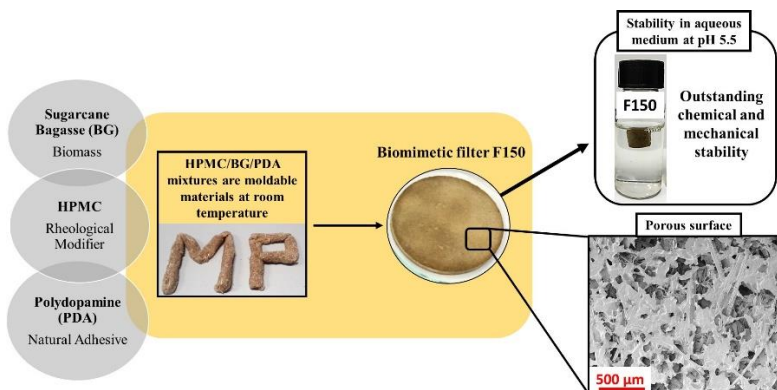
A fração clorofórmica desta espécie possui alta atividade antioxidante, sendo possível relacionar com a presença de ácido *p*-cumárico. Como mostrado em outros estudos sobre ácidos fenólicos¹³, essa substância possui boa capacidade antioxidante, principalmente quando em conjunto com outra substância (sinergismo). A atividade inibitória de enzima tirosinase mostrou-se relevante na

subfração 4 considerando a concentração de amostra utilizada. Essa atividade pode ser atribuída ao derivado de ácido cinâmico ou ao flavonol presentes na subfração, porém mais estudos sobre esses compostos são necessários. Também foram verificadas diferenças entre as espécies de bambu brasileiras e asiáticas quanto aos tipos de flavonoides, demonstrando a necessidade de conhecer ainda mais as espécies brasileiras.

Referências

1. Zhang, Y.; Yao, X.; Bao, B.; *Phytother. Res.* **2005**, *20*, 872. [<https://doi.org/10.1002/ptr.1965>]
2. Kurokawa, T.; Itagaki, S.; Yamagi, T.; Nakata, C.; Noda, T.; Hirano, T.; Iseki, K.; *Biol. Pharm. Bull.* **2010**, *29*, 2301. [<https://doi.org/10.1248/bpb.29.2301>]
3. Lu, B.; Liu, L.; Zhen, X.; Wu, X.; Zhang, Y.; *Afr. J. Biotechnol.* **2006**, *9*, 6430. [<https://www.ajol.info/index.php/ajb/article/view/92284/81737>]
4. International Bamboo and Rattan Organization, https://www.inbar.int/resources/inbar_publications/evaluation-of-bamboo-resources-in-latin-america/, acessado em novembro de 2022.
5. Wróblewska, K. B.; Baby, A. R.; Grombone, M. T.; Moreno, P. R. H.; *Ind. Crops. Prod.* **2019**, *130*, 208. [<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.081>]
6. Gagliano, J.: *Análise do potencial farmacológico de Merostachys pluriflora Munro ex. E.G. Camus, uma espécie de bamboo nativa da mata Atlântica*; Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2016. [<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/41/41132/tde-30112016-112013/en.php>]
7. Brand-Williams, W.; Cuvelier, M. E.; Berset, C.; *Lebensm. Wiss. Technol.* **1995**, *28*, 25. [[https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)]
8. Masuda, T.; Yamashita, D.; Takeda, Y.; Yonemori, S.; *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, *69*, 197. [<https://doi.org/10.1271/bbb.69.197>]
9. Hubert, J.; *Planta Med.* **2016**, *82*, 1351. [<https://doi.org/10.1055/s-0042-110180>]
10. Grombone-Guaratini, M. T.; Furlan, C. M.; Lopes, P. S.; Barsalobra, K.P.; Leite e Silva, V. R.; Moreno, P. R. H. In: *Plant Antioxidants and Health. Reference Series in Phytochemistry*; Ekiert, H.M., Ramawat, K. G., Arora, J., eds; Springer: Cham, Switzerland, 2021, p. 231, [https://doi.org/10.1007/978-3-030-78160-6_33]
11. Mohd Ilham, A.; Vimala, S.; Abdull Rashih, A.; Rohana, S.; Jamaluddin, M.; Juliza, M.; *J. Trop. For. Sci.* **2008**, *20*, 123. [<https://www.jstor.org/stable/23616548>]
12. Freitas, M. M. *Obtenção de extratos padronizados em ácido clorogênico, rutina e isoquercitrina a partir das folhas de Morus nigra L.: inibição de tirosinase e citotoxicidade*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Brasília, Brasília, 2015. [<https://dx.doi.org/10.26512/2015.12.D.19700>].
13. Soares, S. E.; *Rev. de Nutr.* **2002**, *71*. [<https://doi.org/10.1590/S1415-52732002000100008>].

Graphical Abstract



Schematic representation of moldable HPMC/BG/PDA mixtures and F150 biomimetic filter composition with SEM image of F150 filter and photographs of F150 filter in MilliQ water at pH 5.5, after 24 h under stirring.

BIOMIMETIC FILTER FOR REMOVAL OF ORGANIC POLLUTANTS AND OIL/WATER SEPARATION

Laíse M. Furtado^{a*}, Stephanie D. Novaes^a, Denise F. S. Petri^a

^aInstitute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

*email: laise_furtado@usp.br

Abstract: Oil spill and water contamination resulting from human activities are potentially harmful to human health and aquatic organisms. Adsorbents based on sustainable materials, with low cost and high efficiency might mitigate the contamination problem. In this study, a biomimetic filter was obtained by combining sugarcane bagasse (BG) microparticles with hydroxypropyl methylcellulose (HPMC), and polydopamine (PDA), which conferred adherence between the components, chemical and mechanical stability for the adsorbents. The adsorbents were prepared from mixtures of HPMC (30 g/L), PDA (6 g/L) and BG at 100 g/L (F100), 150 g/L (F150) or 200 g/L (F200). SEM images showed that the filters have a porous and cohesive structure. The F150 biomimetic filter was stable for 24 h in aqueous medium at pH 5.5 and 25 ± 1 °C, without loss of material or shape. In the absence of PDA the filters dissolved after 30 min in water. The F150 filter showed 70% and 100% removal efficiency towards bisphenol-A (BPA) and methylene blue (MB), respectively, and oil retention of 100% from a mixture of 1:4, sunflower oil : water.

Keywords: sugarcane bagasse; polydopamine; hydroxypropyl methylcellulose; oil and water separation; adsorption

INTRODUCTION

The control of substances released into the environment through industrial effluents, agricultural activities, domestic sewage, and wastewater from Sewage Treatment Plants has become a matter of great environmental concern in recent decades. Oil spills and water contamination by molecules resulting from human activities, such as endocrine disruptors, compounds potentially harmful to human health and aquatic organisms, demands new adsorbents based on sustainable materials, with low cost and high efficiency. Materials developed for pollutants adsorption from water must be

mechanically stable, insoluble in water and recyclable. According to the National Supply Company (Conab), Brazil is the world's largest producer of sugarcane, having great importance for Brazilian agribusiness. The estimate for the harvest in 2020/21 was 630.7 million tons.¹ Sugarcane bagasse (BG) is the residue obtained after sugarcane processing, representing 30% of the initial biomass, corresponding to approximately 200 million tons in 2020/21.² The contents of holocellulose, lignin, and ash in the BG amounted to 79.0%, 20.5% and 0.2%.³ BG has great potential for removing heavy metals from effluents.⁴ Hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) is a cellulose ether; the degree of substitution (DS) is related to substitution of hydroxyl groups by methyl groups, and the molar substitution (MS) is related to the insertion of hydroxypropyl groups.⁵ HPMC has been applied as rheological modifier, food additive, emulsion stabilizer and excipient in controlled release of drugs.⁶ Polydopamine (PDA) is a mussel-inspired adhesive, which has attracted the attention of researchers due to its simplicity, low cost and interesting coating properties. PDA coatings occur due to the autooxidation of dopamine under alkaline medium.⁷ Favorable interactions between PDA and cellulose esters allowed the development of adsorbents to remove caffeine.⁸ Therefore, in this work, the optimized combination of aqueous dispersions of BG microparticles, HPMC, and PDA led to a moldable material at room temperature. After water evaporation by heating, the material presented a highly cohesive porous structure with outstanding mechanical and chemical stability in water. Biomimetic filters showed high efficiency to separate oil from oil/water mixtures and to remove organic contaminants in water.

EXPERIMENTAL

Preparation of biomimetic filter

HPMC E4M (DS = 1.9 and MS = 0.25, $M_w = 2.5 \times 10^5$, g/mol), kindly supplied by Dow Chemical Company was dissolved in MilliQ® water at 30 g/L, volume (V) of 20 mL. Then, BG (supplied by local market) microparticles were incorporated under vigorous stirring into the polymer matrix at 100 g/L, 150 g/L or 200 g/L; the systems were coded as F100, F150 and F200, respectively. Then 10 mL of a dopamine (Sigma-Aldrich H60255, 189.64 g/mol) solution at 6.0 g/L, prepared in Tris-HCl buffer (10 mM, pH 8.5), was added to the HPMC/BG mixtures. The oxidation reaction of dopamine into polydopamine took 4 h. **Figure 1a** shows the darker color of the mixtures evidencing the formation of PDA. For contaminant removal tests, the HPMC/BG/PDA mixtures were molded into a plastic Petri dish (diameter = 5.7 cm and thickness = 3 mm), as shown in **Figure 1b**. For sunflower oil separation from water/oil mixtures, HPMC/BG/PDA mixtures were molded in acrylic mold, with diameter = 10 mm and thickness = 6 mm. After this step, the materials were placed in oven at 60 °C for drying, during 4 h. Afterwards, the materials were placed in a glass Petri dish for pre-crosslinking on a heating plate at ~ 90 °C and slowly bathed with a crosslinking solution containing 10 g/L citric acid (crosslinker, Labsynth, Brazil), 6.2 g/L succinic acid (crosslinker, Sigma-Aldrich) and 5.5 g/L sodium hypophosphite (catalyst, Labsynth, Brazil). For the crosslinking bath, it was fixed a ratio of 0.077 between the mass of the material being crosslinked and the volume of crosslinking solution incorporated ($m_{\text{filter}} \text{ (g)} / V_{\text{solution}} \text{ (mL)}$). The dried filters were taken to oven at 172 °C for 10 min for crosslinking (esterification reaction) (**Figure 1c**). Finally, the materials were washed to remove unreacted molecules, after drying the F100, F150 and F200 biomimetic filters were characterized. F150 filter was chosen for the adsorption of organic pollutants and oil retention.

Characterization of biomimetic filters

Scanning electron microscopy (SEM) analyses were performed for F100, F150 and F200 coated with gold (~ 10 nm) in Jeol Neoscope JCM-5000 microscope operating at 10 kV. The chemical stability of the F100, F150 and F200 filters were evaluated at pH 5.5 (MilliQ water) for 24 h.

Removal capacity of methylene blue (MB) and bisphenol A (BPA)

Adsorption of methylene blue (MB, M9140 Sigma Aldrich, 319.85 g/mol) and bisphenol A (BPA, 133027 Sigma, 228.29 g/mol) was performed with F150 filter. The experiment was carried out in reduced pressure filtration system (~ 600 mbar), which the filter was placed directly into a Büchner funnel. The solutions of MB (V = 45 ml) and BPA (V = 25 ml) were prepared at initial concentration (C₀) 5 mg/L and 388 mg/L, respectively. Separately, the solutions were pumped through the filter and the samples were quantified by spectrophotometer in the UV-Vis region (Beckman-Coulter DU640) for MB (λ_{max} = 662 nm) and BPA (λ_{max} = 276 nm). The removal capacity (%) of MB and BPA by F150 biomimetic filter was determined by:

$$\text{Removal (\%)} = \frac{C_0 - C_t}{C_0} \times 100 \quad (1)$$

where C₀ is initial concentration and C_t is concentration after a given contact time.

Oil and water separation

Sunflower oil and water mixture was prepared at a ratio of 1:4, sunflower oil: water (V = 5 mL), this mixture was poured over the filter in a static column system and the volume of water after oil retention was measured by graduated cylinder.

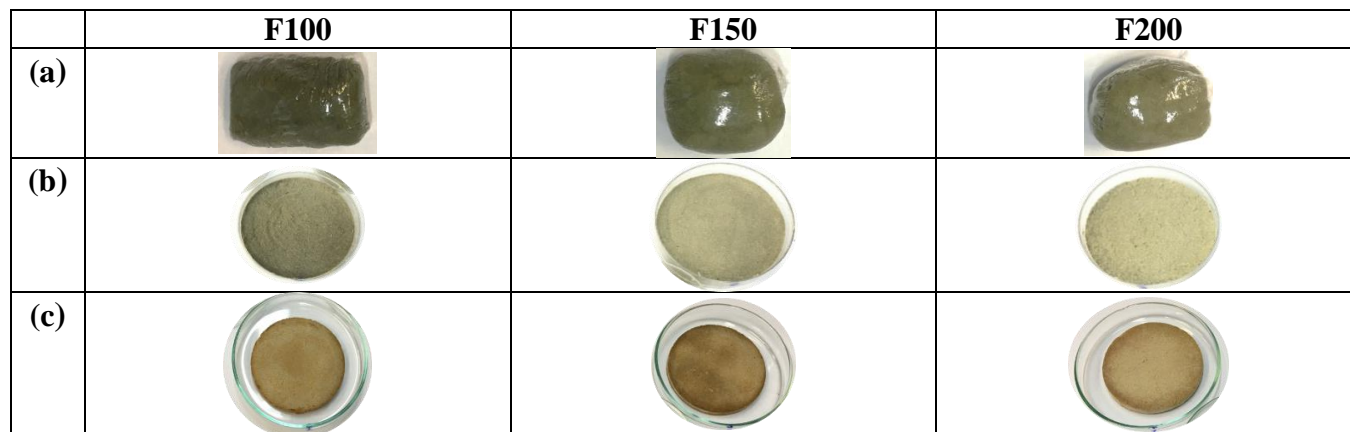


Figure 1. (a) HPMC/BG/PDA mixtures of F100 (left), F150 (center) and F200 (right) after 4 h of DOPA oxidation packaged and stored in a refrigerator for later use/molding. (b) Mixtures of F100, F150 and F200 molded in cylindrical shape (c) Biomimetic filters after the steps of pre-crosslinking and crosslinking

RESULTS AND DISCUSSION

SEM images in **Figures 2a, 2b** and **2c** shows the porous and cohesive structure of filters F100, F150 and F200, respectively; the presence of PDA did not affect the filters morphology. BG microparticles dominate the surface structure, because BG is the main component of these materials.

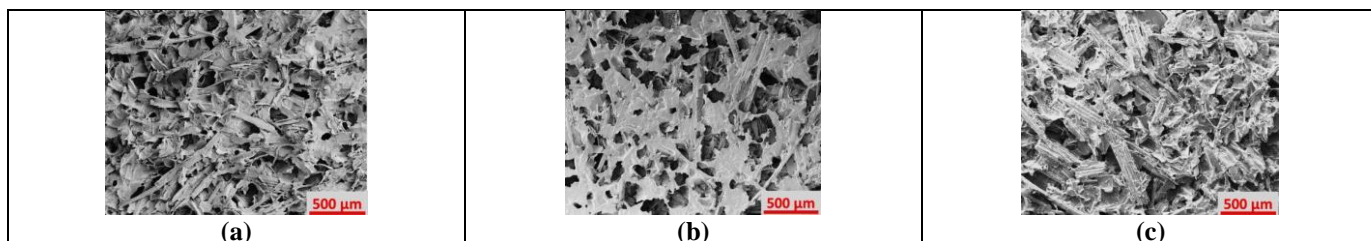


Figure 2. SEM images of biomimetic filter (a) F100, (b) F150 and (c) F200

Figure 3a demonstrates the stability of F100, F150 and F200 filters at pH 5.5 after 24 h under stirring. The F100 filter was not chemically stable, the medium became yellowish because PDA was released to the aqueous medium, and F200 filter had loss of material after 24 h. On the other hand, F150 filter showed excellent chemical and mechanical stability at pH 5.5. Meanwhile, the material without PDA dissolved completely after 30 min under stirring in water. Confirming that for materials with high content of BG, the esterification reaction (**Figure 3b**) was not efficient. Probably, the hydroxyl groups on BG particles were not available for crosslinking with citric acid molecules due to the strong intermolecular H bonds. Therefore, the combination of PDA and citric acid favored the adhesive properties of PDA in the system with high amount of BG, providing chemical stability for biomimetic filter F150 at pH 5.5.

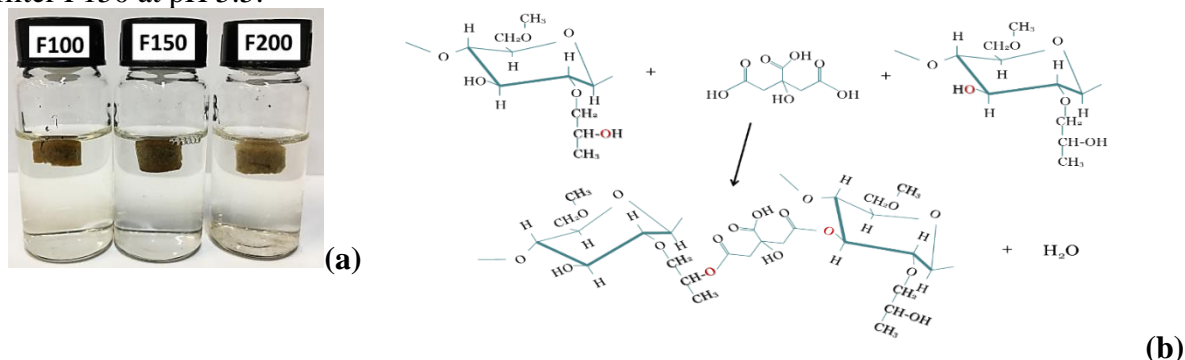


Figure 3. (a) Photographs of F100, F150 and F200 filters in MilliQ water at pH 5.5 after 24 h under stirring. (b) Schematic representation of the esterification reaction between citric acid and HPMC hydroxyl groups

MB and BPA adsorption was performed with F150 filter in a reduced pressure filtration system. After pumping 45 mL of MB solution ($C_0 = 5.0$ mg/L) through F150, the removal capacity yielded 100% (**Figure 4a**). The time required to treat 45 mL of solution was 30 seconds. This result indicated that this material has a high affinity for MB. The interactions between MB and the adsorbent might be driven by MB methyl groups and methyl groups on the polymer surface, and ion-dipole interactions with hydroxyl groups in BG. After adsorption, the filter was placed under sunlight for one week to promote the filter recovery by photooxidation of MB molecules.⁹ **Figure 4b** shows that the adsorbent could be recovered for a next filtration process. The same filtration system was used for adsorption of BPA, after pumping 25 mL of BPA solution ($C_0 = 388$ mg/L) the removal capacity was 70%. Probably, the adsorption of BPA occurred through the interactions of the methyl and aromatic groups of BPA and HPMC methyl groups, and H bonds between BPA and HPMC hydroxyl groups. The time required for filtering 25 mL was 15 seconds. Another potential application for the F150 filter was

presented with the 100% oil retention from a 1:4 mixture of sunflower oil: water ($V = 5$ mL). The time required to collect 4 mL of water was 10 min, in a static column.

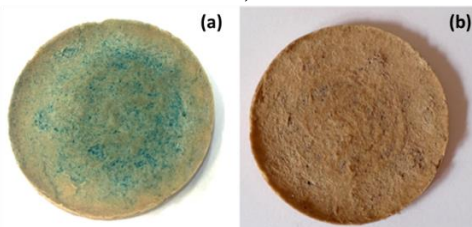


Figure 4. Photographs of F150 filter (a) after MB adsorption and (b) after filter recovery through photooxidation with sunlight

CONCLUSIONS

The HPMC/BG/PDA mixtures are moldable into filters that presented dimensional and chemical stability. The combination of PDA and crosslinking reaction with citric acid provided chemical and mechanical stability in aqueous media at pH 5.5 for the F150 filter. This filter showed great potential for adsorption of organic pollutants achieving removal of 100 % and 70 % for MB and BPA, respectively, and oil retention. Not less important, the cost to produce HPMC/BG/PDA filters at lab scale was estimated as US\$ 0.025/g, considering the local prices for HPMC, citric acid, DOPA, water, and energy.

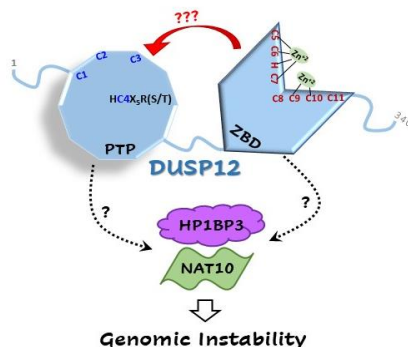
ACKNOWLEDGMENT

We acknowledge the financial support of CNPq (304017/21, 421014/2018-0 and 171250/2017-6) and FAPESP (2018/13492- 2).

REFERENCES

1. <https://www.conab.gov.br/infoagro/safras/cana/boletim-da-safra-de-cana-de-acucar>, access in March 2020.
2. Bassam, N. E. *Handbook of Bioenergy Crops: A Complete Reference to Species, Development and Applications*. 1st ed. [S.l.]: Earthscan, 2010. ISBN 978-1-138-97571-2.
3. Novaes, S. D.; Oliveira, P. V.; Petri, D. F. S.; *Environ. Sci. Pollut. Res.* **2022**, 29, 63936–63952.
4. Ewulonu, C. M.; Liu, X.; Wu, M.; Yong, H.; *J. Bioresour. Bioprod.* **2019**, 4, 3-10, DOI: 10.21967/jbb.v4i1.186.
5. Thielking, H.; Schmidt, M.; *Cellulose Ethers, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*; Elvers B., eds, Wiley : VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2012, vol. 7, pp 381-397.
6. Marani, P. L.; Bloisi, G.D.; Petri, D. F. S.; *Cellulose* **2015**, 22, 3907-3918.
7. Lee, H.; Dellatore, S. M.; Mille, W. M.; Messersmith, P. B.; *Science* **2007**, 318, 426–430.
8. Furtado L. M.; Ando, R. A.; Petri, D. F. S.; *J. Mater. Sci.* **2020**, 55, 3243–3258.
9. Martins, B. F; Toledo, P. V. O., Petri, D. F. S.; *Carbohydr. Polym.* **2017**, 155, 173-181.

Graphical Abstract



Proteomics evidence pointed to dual specificity phosphatase DUSP12 can interact with proteins HP1BP3 and NAT10 proteins in cellular responses to genotoxic stress. However, how the PTP and/or ZBD domains of this phosphatase can influence its activity towards these targets have not yet been investigated.

PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE FORMAS RECOMBINANTES DA TIROSINA FOSFATASE DUAL 12 PARA INVESTIGAÇÃO DA INTERAÇÃO COM PARCEIROS PROTÉICOS

Ana Laura Chaves Ferreira, Diana Reis Della Corte G. Pacheco, Donna Joe Farfan Hilares e Fábio Luis Forti
Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP
laurachaves.alcfl@usp.br

Resumo: Evidências experimentais de anos de pesquisa mostram que algumas proteínas tirosina fosfatases (PTPs) possuem expressão aumentada em tumores e que elas podem estar relacionadas com a regulação da estabilidade genômica, atuando em diferentes pontos do ciclo celular e interferindo na expressão gênica e resistência tumoral. O objetivo deste trabalho é expressar, purificar e caracterizar *in vitro* a tirosina fosfatase dual DUSP12 (e diferentes construções truncadas) para estudos posteriores de interação com as proteínas HP1BP3 e NAT10, as quais tem funções relacionadas a modificações e remodelamento da cromatina, e verificar se há indícios de que estas interações podem afetar mecanismos de estabilidade genômica, resistência e progressão tumoral. O melhor entendimento estrutural e funcional de DUSP12 possibilitará entender melhor processos biológicos relevantes para células tumorais específicas.

Palavras-chave: DUSP12, atividade fosfatásica, HP1BP3, NAT10, interação proteína-proteína

PRODUCTION AND CHARACTERIZATION OF RECOMBINANT FORMS OF DUAL TYROSINE PHOSPHATASE 12 FOR INVESTIGATION OF INTERACTION WITH PROTEIN PARTNERS

Abstract: Experimental evidence from years of research shows that some protein tyrosine phosphatases (PTPs) have increased expression in tumors and that they may be related to the regulation of genomic stability, acting at different points of the cell cycle and interfering with gene expression and tumor resistance. The objective of this work is to express, purify and characterize dual-specificity tyrosine phosphatase DUSP12 (and different truncated constructs) *in vitro* for further studies of interaction with HP1BP3 and NAT10 proteins, which have functions related to chromatin modifications and remodeling, and to verify if there is evidence that these interactions can affect mechanisms of genomic stability, resistance and tumor progression. A better structural and functional understanding of DUSP12 will favor a better understanding of biological processes relevant to specific tumor cells.

Keywords: DUSP12, phosphatase activity, HP1BP3, NAT10, protein-protein interactions

Introdução

O genoma humano expressa 107 genes codificando enzimas tirosina fosfatases (PTP) que desfosforilam preferencialmente resíduos de tirosina, mas também os pares tirosina/serina ou tirosina/treonina. O desequilíbrio entre a ação destas fosfatases e das tirosina quinases (PTK) está diretamente relacionado a diversas patologias^[1], sendo que no caso dos eucariotos multicelulares a ação de PTP e PTK parece estar fortemente ligada com a comunicação e sinalização celular, mas também com processos de replicação, transcrição e reparo de DNA, bem como processamento de RNAm, além de influenciar no transporte intracelular de moléculas e sua motilidade^{[2][3]}. Assim, a ação de tirosina quinases e fosfatases sobre alvos específicos tem forte relação com tumorigênese, influenciando as taxas de proliferação e diferenciação das células^{[4][5]}. DUSP12, também conhecida como hYVH1, é uma fosfatase dual (tirosina/serina, tirosina/treonina) de 340 aminoácidos, sítio ativo dependente da cisteína 115 e tendo íons zinco como cofator - o domínio de ligação a Zn^{2+} presente em sua porção C-terminal está correlacionado à interação com algumas biomoléculas, como RNAr e DNA, podendo até mesmo ser considerado um regulador do domínio de fosfatase presente na porção N-terminal^{[6][3]}. Ela é uma proteína ubíqua que possui relação com retinoblastomas e neuroblastomas (correlação da expressão da proteína com tumorigênese)^[7], e também com hepatocarcinomas (pacientes com alta expressão da proteína possuem pior prognóstico)^[6]. A proteção contra a apoptose e o aumento da proliferação celular em tumores também podem estar correlacionados com as ações da DUSP12^[6]. Nosso grupo trabalhou previamente na identificação proteômica de parceiros protéicos da DUSP12 em linhagens celulares de adenocarcinomas de mama e pulmão submetidas a diferentes tipos de estresse oxidativo e genotóxico, e identificou alvos nucleares importantes de DUSP12, como as proteínas HP1BP3 e NAT10, que tem funções relacionadas com modificação e remodelamento da cromatina^[8]. Uma maior compreensão dos mecanismos biológicos de ação da DUSP12, e a contribuição de seus domínios isolados, pode identificar potenciais relações com distúrbios celulares de diferentes células tumorais, levar ao melhor entendimento das interações subjacentes ao processo patológico, e sugerir terapias que interfiram na atividade desta fosfatase cujo potencial como marcador e alvo clínico de drogas ainda é uma janela aberta para oportunidades terapêuticas^{[6][9]}.

Experimental

Produção de plasmídeos

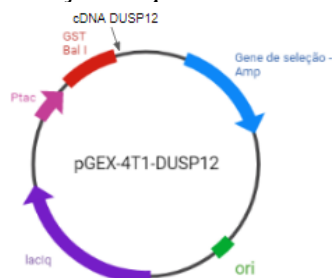


Figura 1– Estrutura esquemática do plasmídeo pGEX-4T1 usado para clonagem de construções DUSP12. O cDNA clonado mostrado é da proteína selvagem, mas as outras construções seguem o mesmo padrão de clonagem (Figura feita no Bio Render).

Construções plasmidiais de DUSP12 (selvagem ou WT, região C-terminal ou CT, região N-terminal ou NT, e mutada em C115S ou MUT) e do tag de GST sozinha (controle negativo dos experimentos) foram produzidas pelo nosso laboratório e também cedidas pelo grupo do Prof. Panayiotis Vacratis, da University of Windsor Ontario-Canada, foram usadas para transformar bactérias competentes *E.*

coli TOP10 para a amplificação de plasmídeos pGEX-4T1-DUSP12 (Figura 1) contendo gene de resistência a Ampicilina e tag de GST inserido no N-terminal. A extração e purificação dos plasmídeos foi realizada com o kit *Miniprep* (Promega).

Produção de formas recombinantes de DUSP12

Para a produção das proteínas recombinantes de DUSP12, bactérias *E. coli* BL21-DE3 foram transformadas por choque térmico com os plasmídeos de interesse, incubadas em meio LB suplementado com Ampicilina (100 µg/mL) e Cloreto de Zinco (10 µM) e induzidas com IPTG (1 mM) por 3h após atingirem a $OD_{600}=0,6$. A seguir, a cultura passava por centrifugação por 10 minutos (8.000rpm, 4°C), descarte do sobrenadante e homogeneização do pellet com tampão de lise, seguida de outra centrifugação de 30 minutos (14.000rpm, 4°C). Ao final, o sobrenadante era coletado e purificado utilizando beads de Sepharose-Glutathione (Invitrogen). A quantificação das proteínas purificadas foi feita através de SDS-PAGE comparando suas bandas com as de uma curva padrão de albumina e finalizada com análise das bandas do gel com o uso do software ImageJ.

Ensaio de atividade de tirosina fosfatase

Para avaliar a atividade catalítica fosfatásica das diferentes porções de DUSP12, foram feitos ensaios de atividade usando diferentes substratos específicos como OMFP, DiFMUP ou pNPP (Sigma-Aldrich), avaliando quantitativamente os sinais cromogênicos ou fluorescentes emitidos pela desfosforilação dos substratos e usando outra fosfatase (DUSP3/VHR) como controle positivo.

Resultados e Discussão

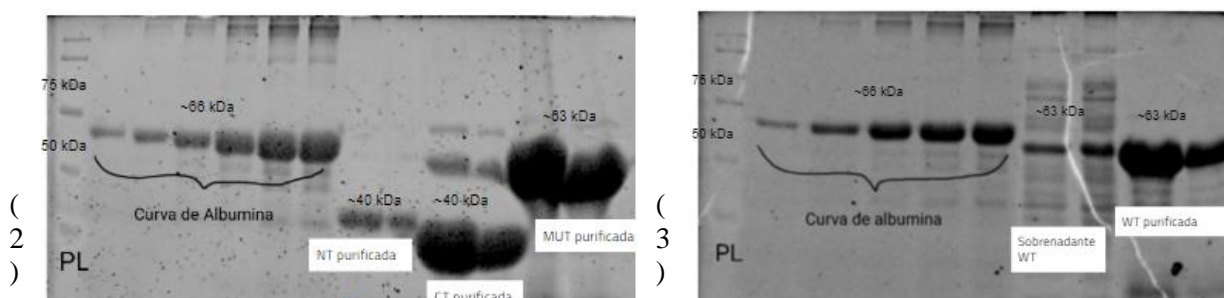
Os resultados da produção das construções plasmidiais estão mostrados na Tabela 1 e de suas correspondentes proteínas recombinantes na Tabela 2. A concentração plasmidial média obtida foi de 116,6 ng/µL, enquanto que os plasmídeos da construção selvagem apresentaram um rendimento mais alto (220,7 ng/µL) comparados àqueles da construção N-terminal, de rendimento muito mais baixo (69 ng/µL), diferenças muito recorrentes em todos os experimentos de produção plasmidial.

Construção plasmidial		Rendimento	Construção proteica		Rendimento
(1)	Wild-type	220.7 ng/µL	(2)	Wild-type	1.8 µg/µL
	Mutant	164.1 ng/µL		Mutant	3.8 µg/µL
	C-terminal	110.6 ng/µL		C-terminal	3.2 µg/µL
	N-terminal	69 ng/µL		N-terminal	0.8 µg/µL
	GST	72,6 ng/µL		GST	2 µg/µL

Tabelas 1 e 2 – Rendimento plasmidial (1) e de proteínas recombinantes (2) das diferentes construções.

Na Tabela 2 vemos que todas as construções apresentaram um rendimento protéico muito superior à N-terminal: a selvagem chegou a render mais de 1,4 µg/µL, enquanto NT não chegou a 0,8 µg/µL. Outro ponto importante explorado na produção e purificação das proteínas recombinantes foi a presença e ausência de Zinco e DTT (Figuras 2 e 3): o resultado observado foi um rendimento superior na presença de Zinco e de DTT ao final destes processos. No caso da N-terminal, a ausência do DTT até mesmo impossibilitou sua purificação, levando a não detecção da proteína no gel. Essas interferências podem estar relacionadas com a presença do domínio ligante de zinco (*Zinc-binding domain* ou *ZBD*) da DUSP12, no caso da diferença com a suplementação dos meios e tampões com

Zinco e da necessidade de um ambiente redutor para a formação e dobramento adequados da proteína, no caso do DTT. As Figuras 3 e 4 mostram imagens de SDS-PAGE utilizados para quantificação das construções (ImageJ) usando curva padrão de albumina.



Figuras 2 e 3 – SDS-PAGE corado com Coomassie Blue e quantificado usando o leitor Chemidoc e o software ImageJ. Na Figura 2 vê-se uma forte expressão e purificação das formas purificadas CT e MUT de DUSP12 em contraste à forma NT, de expressão baixa. Na Figura 4 uma forte expressão da proteína WT purificada e ainda no sobrenadante após-purificação. Em ambas figuras vê-se o marcador de peso molecular ou Protein Ladder (PL) como referência.

A fim de complementar a caracterização das formas recombinantes de DUSP12, experimentos de atividade enzimática foram realizados através de ensaios de tirosina fosfatase (Figuras 6 e 7).

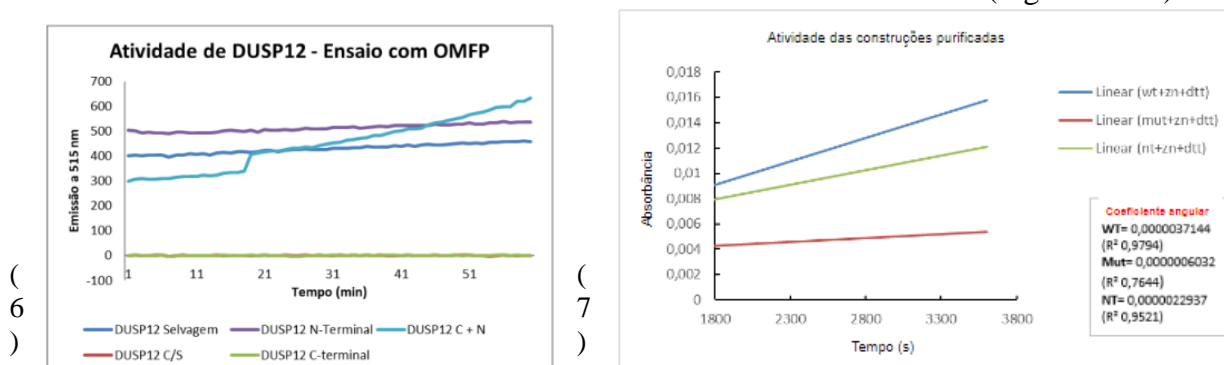


Figura 6 e 7 – Ensaios de atividade enzimática quantificando fluorescência ou absorvância emitida por substratos que mimetizam tirosinas fosforiladas, potenciais alvos da DUSP12. A Figura 6 utiliza OMFP, uma molécula que ao sofrer desfosforilação emite fluorescência no comprimento de onda de 515 nm. A Figura 7 utiliza pNPP, que ao sofrer desfosforilação gera uma molécula que absorve na faixa de 405 nm. Estes ensaios confirmam que as construções estão funcionais após a purificação e com atividades fosfatásicas esperadas.

Como esperado, as construções MUT e CT de DUSP12 não apresentaram atividade fosfatásica, diferentemente da proteína WT e o NT (Figuras 6 e 7). Entretanto, a porção NT contendo o domínio PTP por si só apresentou atividade enzimática maior que a DUSP12 WT e, ainda mais intrigante foi o fato de mistura CT e NT apresentar um aumento de atividade fosfatásica diferenciado e não-linear com o tempo. Por usarmos a mesma quantidade em massa das construções nestes ensaios, e não condições equimolares, pondera-se assim a maior atividade de NT em relação a WT, embora a influência da CT sobre o domínio catalítico é sugestivo de uma possível regulação alostérica na DUSP12. Essas informações das condições de produção e purificação, rendimento, atividade

enzimática e funções da DUSP12 *in vitro* podem ser correlacionadas *in vivo* nas células ao padrão de interação dos domínios entre si e/ou com outras proteínas parceiras, como HP1BP3 e NAT10.

Conclusões

As diferenças no rendimento das construções de DUSP12 são relevantes e funcionalmente relacionadas à sua estabilidade estrutural e a uma possível dependência do domínio PTP ao ZBD. Também é possível concluir que os efeitos redutores do DTT no dobramento e atividade destas construções influenciam seus rendimentos. Considerando a atividade fosfatásica e funções celulares relacionadas ao domínio ZBD, como na resposta a danos oxidativos, há um grande interesse em entender melhor as funções da DUSP12, bem como seus domínios, na interação com outras proteínas, algo que é reiterado em recentes publicações que demonstram o papel protetivo da DUSP12 durante o estresse oxidativo ocasionado pela cardiomiopatia diabética^[10]. Embora ainda em andamento, este trabalho ainda trará resultados interessantes para o significado biológico das interações das proteínas DUSP12-HP1BP3/NAT10 em células tumorais diversas a serem estudadas.

Agradecimentos

Agradecemos o apoio financeiro da FAPESP (Auxílios: 2022/00348-6 e 2022/04243-4).

Referências

1. CORDEIRO, Marília Henriques; SMITH, Richard John; SAURIN, Adrian Thomas. A fine balancing act: A delicate kinase-phosphatase equilibrium that protects against chromosomal instability and cancer. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 96, p. 148-156, 2018.
2. KOST, Gina Chun et al. Protein tyrosine phosphatase (PTP) inhibition enhances chromosomal stability after genotoxic stress: Decreased chromosomal instability (CIN) at the expense of enhanced genomic instability (GIN)?. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 735, n. 1-2, p. 51-55, 2012.
3. KOZAROVA, A; HUDSON, J. W; VACRATIS, P. O. The dual-specificity phosphatase hYVH1 (DUSP12) is a novel modulator of cellular DNA content. **Cell Cycle**, v. 10, n. 10, p. 1669-1678, 2011.
4. SHI, Yigong. Serine/threonine phosphatases: mechanism through structure. **Cell**, v. 139, n. 3, p. 468-484, 2009.
5. ALONSO, Andres et al. Protein tyrosine phosphatases in the human genome. **Cell**, v. 117, n. 6, p. 699-711, 2004.
6. JU, G et al. DUSP12 regulates the tumorigenesis and prognosis of hepatocellular carcinoma. **PeerJ**, v. 9, p. e11929, 2021.
7. UNIPROT. Q9UNI6 (DUS12_HUMAN) - Dual specificity phosphatase 12.
8. MONTEIRO, L F; FORTI, F L. Network analysis of DUSP12 partners in the nucleus under genotoxic stress. **Journal of Proteomics**, v. 197, p. 42-52, 2019.
9. DE VRIENDT, Veerle et al. DUSP 4 expression identifies a subset of colorectal cancer tumors that differ in MAPK activation, regardless of the genotype. **Biomarkers**, v. 18, n. 6, p. 516-524, 2013.
10. Li H, Yang Q, Huang Z, Liang C, Zhang DH, Shi HT, Du JQ, Du BB, Zhang YZ. Dual-specificity phosphatase 12 attenuates oxidative stress injury and apoptosis in diabetic cardiomyopathy via the ASK1-JNK/p38 signaling pathway. **Free Radic Biol Med**. 2022 Nov 1;192:13-24. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2022.09.004. Epub 2022 Sep 13. PMID: 36108935.

Desenvolvimento e Validação de Método para Determinação de Elementos em Fluidos Biológicos por ICP-MS

Isabeli Cristina Cezarino*, Pedro Vitoriano Oliveira

Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

isabelicezarino@usp.br

Resumo: As técnicas analíticas mais utilizadas para o biomonitoramento e avaliação de exposição a elementos potencialmente tóxicos ou para avaliação de deficiências de elementos essenciais é a espectrometria de absorção atômica com atomização por chama (FAAS) ou com atomização por forno de grafite (GF AAS). Entretanto, a espectrometria de absorção atômica tem uma grande deficiência, é monoelementar, o que aumenta em tempo e custo as suas aplicações. Sendo assim, cada vez mais os laboratórios de pesquisa da área clínica estão mudando seus métodos de análise para a espectrometria de massas com plasma acoplado indutivamente (ICP-MS). Esta técnica permite determinações elementares em diversas matrizes, numa ampla faixa de concentração (ng L^{-1} a mg L^{-1}), possibilita rapidez de análise, devido a sua capacidade de análise multielementar e proporciona limites de detecção menores que outras técnicas analíticas, sem utilizar recursos de pré-concentração. Todavia, ainda é limitado o número de métodos que propõem análise direta de fluidos biológicos por ICP-MS. Assim, o presente trabalho tem como objetivo o desenvolvimento de método de análise direta em fluidos biológicos (sangue, plasma e urina) por ICP-MS para determinações de Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn.

Palavras-chave: impurezas elementares, contaminantes, fluidos biológicos, espectrômetro de massa, ICP-MS.

Development and Validation of Method for Elements Determination in Biological Fluids by ICP-MS

Abstract: The most widely used analytical techniques for biomonitoring and evaluating exposure to potentially toxic elements or for assessing deficiencies of essential elements is flame atomic absorption spectrometry (FAAS) or graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF AAS). However, atomic absorption spectrometry has one of major deficiency, it is monoelementary, which increases its applications in time and cost. Therefore, more and more clinical research laboratories are changing their analytical methods for inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). This technique allows elements determination in several matrices and in a wide concentration range (ng L^{-1} to mg L^{-1}), allows rapid analysis due to its multielements analysis capability and provides lower detection limits than other analytical techniques, without using pre-concentration step. However, the number of methods that propose direct analysis of biological fluids by ICP-MS is still limited. Thus, the present work aims at developing a method for direct analysis in biological fluids (blood, plasma and urine) by ICP-MS for the determination of Ag, Al, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl and Zn.

Keywords: elemental impurities, contaminants, biological fluids, mass spectrometry, ICP-MS.

Introdução

A carência de elementos químicos essenciais para o ser humano pode causar sérios problemas de saúde, assim como a absorção em excesso.¹ O intervalo de concentrações que caracteriza a essencialidade e toxicidade para alguns elementos é relativamente curto, sendo necessário, para o controle nutricional e a compreensão de certas enfermidades, o monitoramento de muitos em fluidos e tecidos biológicos.² Os métodos mais utilizados no monitoramento e avaliação de exposição a elementos essenciais e potencialmente tóxicos é a espectrometria de absorção atômica com atomização em chama (FAAS) ou com atomização em forno de grafite (GF AAS). Entretanto, a espectrometria de absorção atômica tem algumas limitações, tais como a característica monoelementar e, portanto, a frequência analítica que pode ser limitada, sobretudo para a GF AAS, o que aumenta em tempo e custo as suas aplicações, especialmente quando se deseja analisar muitas

amostras ou determinar muitos elementos. Para superar essas limitações e atender a demandas específicas, os métodos mais amplamente recomendados são aqueles que têm características multielementares e detecção simultânea como a espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e a espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS). A técnica de ICP-MS é atualmente a mais indicada para as determinações de baixíssimas concentrações em amostras de diferentes naturezas. As principais vantagens do ICP-MS são a capacidade de análise de uma grande variedade de matrizes, ser multielementar, apresentar alta sensibilidade com capacidade de detecção em nível de ultra traço, espectro simples, ampla faixa de concentração e capacidade de fornecer informações isotópicas, quando necessário.³ Esta técnica possibilita a determinação dos elementos de interesse nutricional-toxicológico no plasma e sangue, em intervalos que variam de 0,1 a 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$. Muitos desafios devem ser superados para se alcançar o sucesso em análises de amostras biológicas por ICP-MS. O preparo da amostra é uma etapa determinante e crítica, devendo obedecer aos mais cuidadosos procedimentos para evitar, principalmente, contaminações e perdas dos elementos de interesse.^{4,5} Segundo a literatura, os fluidos biológicos mais utilizados para avaliar o estado de saúde de pacientes são sangue, soro, plasma e urina⁶, o que, em princípio, possibilita a análise direta da amostra após diluição com solvente adequado. Este tipo de análise tornou-se preferida nos últimos anos, pelo fato da manipulação da amostra ser mínima, preparo simples e rápido, minimizando riscos de contaminação das amostras.⁷ Nessa abordagem, as amostras são geralmente diluídas em ácidos ou bases diluídas e introduzidas no equipamento. No Brasil, o monitoramento de elementos em fluidos e tecidos biológicos é uma prática relativamente nova, nesse sentido, existe grande necessidade de desenvolver ou adaptar métodos analíticos rápidos e simples que permitam operações em rotinas nos laboratórios clínicos e de pesquisa. A maioria dos métodos descritos para introdução direta de fluidos biológicos em ICP-MS está validado para determinação de poucos elementos ou tem baixa aplicação em rotina. Assim, a busca por métodos para determinações de diversos elementos de interesse nutricional ou toxicológico em fluidos biológicos com um preparo de amostras simples e rápido é assunto relevante para o laboratório clínico do futuro.

Experimental

As amostras de sangue, plasma e urina e os elementos de interesse fazem parte do portfólio de exames realizados por laboratórios parceiros do Hospital Israelita Albert Einstein, como apresentado na Tabela 1. Foram avaliadas as melhores condições de preparo de amostra, baseados em simples diluições, que permitiu o desenvolvimento de método multielementar para o maior número de elementos. Com o intuito de validar os métodos analíticos desenvolvidos, foram utilizados materiais de referência, tais como o Recipe® Clincheck Control for Trace Elements (CC) no plasma (8885, Level I e II), urina (8849 Level I e II) e sangue total (8843, Level I, II e III). Todas as análises foram realizadas em um espectrômetro de massas com fonte de plasma indutivamente acoplado, modelo Agilent 7850 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), instalado em sala limpa no laboratório clínico do Hospital Israelita Albert Einstein. O instrumento possui amostrador automático Agilent SPS 4 (Santa Clara, EUA), é equipado com um gerador de RF de 27 MHz de estado sólido e um sistema ORS4® (Agilent Technologies, Tóquio, Japão) para remover interferências isobáricas por discriminação cinética (DEC/DIC), usando He de alta pureza (99,999% v v⁻¹) como gás de colisão. Soluções multielementares de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Ce, Co, Li, Tl e Y (Stock Tuning Solution)

foram utilizadas para otimização das condições operacionais do ICP-MS. Foram feitos experimentos de preparo utilizando diluições em soluções ácidas, neutras e alcalinas. Para todas as abordagens, as curvas analíticas de calibração foram preparadas com 12 pontos nos respectivos meios diluentes como brancos ($0,1 \text{ ug L}^{-1}$; $0,25 \text{ ug L}^{-1}$; $0,5 \text{ ug L}^{-1}$; 1 ug L^{-1} ; 5 ug L^{-1} ; 10 ug L^{-1} ; 50 ug L^{-1} ; 100 ug L^{-1} ; 250 ug L^{-1} ; 500 ug L^{-1} e 1000 ug L^{-1}) para Ag, Al, As, B, Cd, Co, Cr, Cu, I, Mn, Ni, Pb, Se, Tl, V e Zn e com 8 pontos nos respectivos meios diluentes como brancos ($0,1 \text{ ug L}^{-1}$; $0,25 \text{ ug L}^{-1}$; $0,5 \text{ ug L}^{-1}$; 1 ug L^{-1} ; 5 ug L^{-1} ; 10 ug L^{-1} ; 50 ug L^{-1} e 100 ug L^{-1}) para Hg, preparadas por diluições sucessivas das solução em estoque. Soluções multielementares de $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$, $25 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ e $50 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ dos elementos Bi, Ge, In, Li, Sc, Tb e Te foram utilizadas como padrão interno. Essa solução foi diluída em soluções ácidas, neutras e alcalinas.

Tabela 1. Matrizes e elementos a serem determinados

Matriz biológica	Elementos
Sangue	Ag, As, Co, Cd, Cr, Hg, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn
Plasma	Al, Cu, Zn
Urina	Al, Cd, Cr, Cu, I, Hg, Mn, Pb, Tl, Zn

Diluição em meio básico

As amostras foram diluídas 1:10 (v v^{-1}) em solução 4% (m v^{-1}) de 1-butanol, 0,01% (m v^{-1}) de EDTA (m/v), 0,01% (m v^{-1}) de Triton X-100 e 1% (m v^{-1}) de NH_4OH . Foram utilizados 300 μL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em diluente básico e 1,2 mL do diluente básico.

Diluente básico mais água

As amostras foram diluídas 1:10 (v v^{-1}) em solução 4% (m v^{-1}) de 1-butanol, 0,01% (m v^{-1}) de EDTA (m/v), 0,01% (m v^{-1}) de Triton X-100 e 1% (m v^{-1}) de NH_4OH . Foram utilizados 300 μL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em diluente básico e 1,2 mL de água.

Diluição neutra (utilizada apenas para alumínio)

As amostras foram diluídas 1:10 (v v^{-1}) em água. Foram utilizados 300 μL dos Clinchecks de sangue total, plasma e urina e diluídos em 1,5 mL do padrão interno em água e 1,2 mL de água.

Diluição em meio ácido

Foi preparada uma solução diluente ácida, contendo 0,5 % (v v^{-1}) de HNO_3 e 0,005% (v v^{-1}) de Triton X-100®, em que as amostras foram diluídas 1:10 (v v^{-1}) e 1:20 (v v^{-1}). Foram tomados 300 μL de Clincheck de urina e plasma (matrizes pretendidas para alumínio), 1,5 mL padrão interno em água e 1,2 mL do diluente ácido na diluição 1:10 e 300 μL de Clincheck, 3,0 mL padrão interno em água e 2,7 mL de diluente ácido. O padrão interno utilizado nesta abordagem foi o mesmo utilizado nos outros preparos, com a diferença que essa diluição aconteceu apenas em água.

Resultados e Discussão

O método que apresentou a melhor exatidão para todos os elementos, com exceção do alumínio, foi aquele cujo volume final foi completado com água. Os resultados das exatidões para esse preparo podem ser vistos na Tabela 2.

Tabela 2. Exatidão das análises de Clinchecks com preparo em diluente básico (Recipe Clincheck Plasma Control, Recipe Clincheck Urine Control e Recipe Clincheck Whole Blood Control).

Elementos	Clincheck Control	Valor Teórico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intervalo de aceitação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)
Cr (m/z=52)	Urine I	4,1	3,26 - 4,9	3,7	91
	Urine II	10,0	8,01 - 12	9,6	96
	Whole Blood I	2,2	1,67 - 2,78	2,1	92
	Whole Blood I	6,0	4,47 - 7,44	5,8	97
	Whole Blood I	11,1	8,88 - 13,3	10,9	98
Mn (m/z=55)	Urine I	4,1	3 - 5	3,8	93
	Urine II	10,0	8 - 12	9,9	99
	Whole Blood I	7,9	6,32 - 9 48	7,2	91
	Whole Blood II	14,6	11,7 - 17,6	13,9	95
	Whole Blood III	21,8	17,4 - 26,1	21,0	96
Co (m/z=59)	Whole Blood I	1,6	1,31 - 1,97	1,5	89
	Whole Blood II	7,3	5,81 - 8,72	6,6	91
	Whole Blood III	13,3	10,7 - 16	11,9	90
Ni (m/z=60)	Whole Blood I	2,1	1,64 - 2,63	1,9	91
	Whole Blood II	4,6	3,64 - 5,43	4,2	92
	Whole Blood III	12,7	7,06 - 15,2	11,9	94
Cu (m/z=63)	Plasma I	730,0	621 - 840	722,6	99
	Plasma II	1260,0	1070 - 1450	1288,1	102
	Urine I	58,2	47 - 70	59,5	102
	Urine II	115,0	92 - 138	112,3	98

continuação da Tabela 2

Zn (m/z=66)	Plasma I	1580,0	1350 - 1820	1543,0	98
	Plasma II	1960,0	1660 - 2250	1858,0	95
As (m/z=75)	Whole Blood I	3,0	2,24 - 3,62	2,4	81
	Whole Blood II	9,6	7,66 - 11,5	10,0	104
	Whole Blood III	19,2	15,4 - 23	19,5	102
Se (m/z=78)	Whole Blood I	83,1	66,5 - 99,7	83,0	99
	Whole Blood II	159,0	127 - 191	159,0	100
	Whole Blood III	202,0	161 - 242	199,0	98
Mo (m/z=92)	Whole Blood I	2,1	1,64 - 2,46	2,1	100
	Whole Blood II	4,6	3,64 - 5,47	4,2	91
	Whole Blood III	8,8	7,06 - 10,60	8,0	91
Ag (m/z=107)	Whole Blood I	1,9	1,39 - 2,32	1,9	102
	Whole Blood II	4,3	3,42 - 5,12	3,9	91
	Whole Blood III	8,5	6,80 - 10,20	7,5	88
Cd (m/z=111)	Urine I	2,6	2,0 - 3,0	2,3	91
	Urine II	14,7	12,0 - 17,7	13,6	93
	Whole Blood I	1,6	1,18 - 1,97	1,6	98
	Whole Blood II	3,5	2,83 - 4,24	3,5	98
	Whole Blood III	7,0	5,63 - 8,44	6,2	88
I (m/z=127)	Urine I	115,0	92 - 138	116,5	101
	Urine II	516,0	413 - 619	526,2	102
Hg (m/z=201)	Urine I	1,9	1,15 - 2,68	1,7	88
	Urine II	13,9	9,05 - 18,80	11,3	81
	Whole Blood I	2,9	2,03 - 3,78	2,4	82
	Whole Blood II	5,6	4,18 - 6,96	5,9	105
	Whole Blood III	13,2	10,6 - 15,9	14,2	107

continuação da Tabela 2

Tl (m/z=205)	Urine I	7,4	5,90 - 8,85	7,6	104
	Urine II	19,4	15,5 - 23,30	21,1	109
	Whole Blood I	0,9	0,72 - 1,08	1,0	114
	Whole Blood II	4,3	3,44 - 5,17	4,6	107
	Whole Blood III	8,6	6,9 - 10,3	9,1	106
Pb (m/z=208)	Urine I	26,4	21 - 32	25,7	98
	Urine II	51,7	41 - 62	60,3	117
	Whole Blood I	37,6	30,1 - 45,2	39,4	105
	Whole Blood II	95,6	76,5 - 115,0	106,2	111
	Whole Blood III	260,0	208,0 - 312,0	294,1	113

Uma vez que foi observada contaminação por alumínio pelos reagentes utilizados, foi avaliado o preparo, em meio aquoso. Os resultados obtidos com esse modo de preparo estão descritos na Tabela 3. Os preparos em diluente ácido e diluente básico sem adição de água não apresentaram boas exatidões para os elementos de interesse.

Tabela 3: Exatidão das análises de Clincheck Control para alumínio com preparo em meio aquoso (Recipe Clincheck Plasma Control, Recipe Clincheck Urine Control)

Elemento	Clincheck Control	Valor Teórico ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Intervalo de aceitação ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Valor encontrado ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Exatidão (%)
Al (m/z=27)	Plasma I	10,9	8 - 14,1	8,3	76
	Plasma II	48,7	37 - 60,9	46,1	95
	Urina I	33,4	27 - 40	27,3	82
	Urina II	82,2	66 - 98,7	75,8	92

Conclusões

As boas exatidões obtidas nas determinações de Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, I, Mn, Mo, Ni, Pb, Se, Tl e Zn nos materiais de referência de sangue, plasma e urina com apenas diluições das amostras em solvente básico diluído mostrou que o método de ICP-MS pode ser recomendado para o monitoramento desses elementos nestas amostras. A determinação de Al mostrou ser bastante crítica devido a possíveis contaminações. Os resultados obtidos para o Al demonstraram que a diluição das amostras com água é suficiente para as determinações deste elemento em plasma e urina, com moderada exatidão. No geral, os resultados para os materiais de referência apresentaram boas precisão e exatidão para o monitoramento dos elementos de interesse nos fluídos biológicos.

Referências

1. Cozzolino, S.M.F.; Cominetti, C., Bases Bioquímica e Fisiológicas da Nutrição nas Diferentes Fases da Vida, na Saúde e na Doença. 1ª Ed., 2013, Editora Manole, pp. 354 a 412.
2. Mohammed, N.A.; Chin, S.F.; Jamal R., Simultaneous analysis of 25 trace elements in micro volume of human serum by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). *Practical Laboratory Medicine*, **18** (2020) e00142.
3. Becker, J. S., Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
4. Krug, F.J.; Rocha, F.R.P., Métodos de Preparo de Amostras para Análise Elementar, 2ª Ed., EditSBQ, 2017.
5. St'astna, M.; I.Nemcová, I.; and J.Zýka, J. ICP-MS for the determination of trace elements in clinical samples. *Analytical Letters* **32** (1999) 2531-2543.
6. Heitland, P.; Koster, H.D., Human biomonitoring of 73 elements in blood, serum, erythrocytes and urine. *Journal Trace Elements in Medicine and Biology*, **64** (2021) 126706.
7. Abduljabbar, T.N.; Sharp, B.L.; Reid, H.J.; Barzegar-Befroeid, N.; Peto, T.; Lenguel, I., Determination of Zn, Cu and Fe in human patients' serum using micro- sampling ICP-MS and sample dilution. *Talanta*, **204** (2019) 663-669.

DESENVOLVIMENTO DE MICROEMULSÕES UTILIZANDO COPOLÍMEROS EO/PO PARA LIBERAÇÃO CONTROLADA DE FUNGICIDA

Samarah Novaes de Souza^{1*}, Luiz Henrique Catalani^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

novaessamarah@gmail.com

Resumo: Copolímeros EO/PO (polióxido de etileno/ polióxido de propileno) têm sido utilizados para preparação de microemulsões óleo em água que atuam como sistemas nanocarreadores ideais para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos. Neste estudo, microemulsões foram preparadas com copolímeros de blocos EO/PO e sorbitol EO/PO para encapsulamento do fungicida Protiocanazol, que é utilizado na agricultura para tratamento de doenças tais como a ferrugem asiática. As microemulsões foram caracterizadas através do Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS), apresentando raio hidrodinâmico entre $7,84 \pm 0,02$ nm e $24,01 \pm 0,44$ nm. Através dos resultados de DLS e Potencial Zeta, as microemulsões mais promissoras foram selecionadas e foi verificada a liberação sustentada de Protiocanazol, através de testes *in vitro*. Nas primeiras 50 horas, as formulações chamadas neste estudo de SR-10 e SR-14, liberaram cerca de 40% do fungicida e a formulação SR-12 liberou 60% do mesmo, enquanto o protiocanazol “livre” (fungicida solubilizado) foi liberado totalmente, durante o mesmo período. As formulações, portanto, se mostraram promissoras para serem submetidas a testes *in vivo* para verificação da bioeficácia contra doenças fúngicas que acometem culturas de soja.

Palavras-chave: *microemulsões, copolímeros EO/PO, liberação de fungicida, protiocanazol, agricultura*

DEVELOPMENT OF MICROEMULSIONS BASED ON EO/PO COPOLYMERS FOR SUSTAINED RELEASE OF FUNGICIDE

Abstract: EO/PO copolymers have been used to prepare oil-in-water microemulsions that act as nanocarrier systems for hydrophobic drugs. In this study, microemulsions were prepared with EO/PO block copolymer and EO/PO sorbitol copolymer for encapsulation of the fungicide Prothioconazole, which is used in agriculture to treat diseases such as Soybean rust. The microemulsions were characterized by DLS, presenting a hydrodynamic radius between 7.84 and 24.01. DLS and Zeta Potential results led to the most promising prototypes. For those, it was verified the sustained release of Prothioconazole. In the first 50 hours, the SR-10 and SR-14 formulations released about 40% of the fungicide and the SR-12 formulation released 60% of it, while the “free prothioconazole” (solubilized fungicide) was completely released during the same period. Therefore, the formulations showed promising results to be submitted to *in vivo* tests, to verify the bioefficacy against fungal diseases that affect soybean crops.

Keywords: *microemulsions, EO/PO copolymers, fungicide release, prothioconazole, agriculture.*

Introdução

Microemulsões óleo em água são amplamente conhecidas como sistemas nanocarreadores ideais para o encapsulamento de fármacos hidrofóbicos, conferindo proteção contra a degradação e controle da liberação à uma taxa ideal.

Tipicamente, as microemulsões carreadoras são compostas por óleo/solvente, surfactante, co-surfactante, fármaco/ingrediente ativo e água, sendo a incorporação do fármaco/ingrediente ativo dentro da microemulsão afetada pelo óleo escolhido, e pelos tipos de surfactante e co-surfactante utilizados (RAHDAR et al, 2019).

Para aplicações farmacêuticas os copolímeros EO/PO têm sido amplamente estudados, devido a sua disponibilidade comercial em uma ampla gama de composições, boa capacidade de

solubilização, biocompatibilidade e ao fato de serem aprovados por agências regulatórias para utilização em formulações farmacêuticas e dispositivos médicos (HEYDARI et al, 2021).

Os copolímeros podem ser constituídos de blocos de poli-óxido de etileno (PEO) hidrofílicos e blocos de poli-óxido de propileno (PPO) hidrofóbicos, dispostos em uma estrutura tri-bloco (EOx-POy-EOx) ou apresentar estrutura distinta em que um álcool ou sorbitol passa pelo processo de etoxilação e propoxilação, fazendo com que a molécula final apresente uma estrutura sorbitol-EOx-POy-EOx. Os blocos hidrofílicos e hidrofóbicos fazem com que os copolímeros sejam classificados como surfactantes, sendo adequados para estabilização de fases oleosas em soluções aquosas.

Neste projeto, os copolímeros EO/PO foram utilizados no desenvolvimento de uma microemulsão óleo em água para o encapsulamento do fungicida Protiocanazol.

O Protiocanazol, 2-[(2RS)-2-(1-chlorocyclopropyl)-3-(2-chlorophenyl)-2-hydroxypropyl]-2H-1,2,4-triazole-3(4H)-thione (FAO, 2021) é um fungicida de amplo espectro eficaz no controle de doenças como ferrugem asiática, manchas foliares, oídio entre outras em culturas como soja e cereais. Protiocanazol atua inibindo a enzima C-14-alfa-desmetilase, que está envolvida na biossíntese de esteróis em fungos (JIMENEZ et al, 2021).

Desde a sua primeira aparição no mercado em 2004, o protiocanazol tornou-se rapidamente um produto popular entre os fungicidas com ação protetora, curativa e erradicadora sendo comercializado em formulações como Emulsionáveis Concentrados e Suspensões Concentradas, devido à hidrofobicidade da molécula (Xu et al, 2021).

Até o momento, ao melhor de nosso conhecimento, microemulsões de Protiocanazol não estão disponíveis comercialmente e se mostram sistemas promissores para formulação deste fungicida.

As microemulsões (ME) são formulações à base de água contendo gotículas emulsionadas cujo tamanho varia entre 0,01 e 0,05 μm , o que as tornam termodinamicamente estáveis em uma vasta gama de temperatura, apresentando maior vida útil. Além disso, a menor utilização de solvente nas microemulsões é outra vantagem apresentada por esta formulação, que possui menor impacto no meio ambiente quando comparada a Concentrados Emulsionáveis.

Dessa forma, este projeto objetiva a preparação de uma microemulsão utilizando copolímero EO/PO para encapsulamento do Protiocanazol, como uma nova abordagem que garantiria não somente a solubilização do ingrediente ativo nas microgotas, mas também o aumento da sua biodisponibilidade através da liberação controlada, que será estudada em testes in vitro. A melhora na biodisponibilidade do ingrediente ativo, poderá resultar em maior bioeficácia contra doenças fúngicas e viabilizar uma menor utilização do fungicida em campo.

Experimental

Preparação das Microemulsões

As microemulsões foram preparadas com variação no solvente e no copolímero EO/PO utilizado, conforme Tabela 1.

Para tal, ULTRARIC PE 127 (copolímero de bloco EO/PO, Oxiteno) e SURFOM 9127 (sorbitol EO/PO, Oxiteno) foram solubilizados separadamente em água destilada a 10,5% m/m, constituindo a fase aquosa da microemulsão.

Protioconazol (HangZouh Co.) foi solubilizado a 20,0% m/m em Citrato de isopentila (SURFOM 8115, Oxiten) e em Dihydrolevoglucosenone (Oxiten), constituindo a fase oleosa da microemulsão.

Para as formulações SR-9 e SR-10, a fase oleosa foi diretamente adicionada à fase aquosa, sob agitação magnética a temperatura ambiente, e mantida sob agitação (800 rpm) durante uma hora para preparação de 100g de formulação final.

Para as formulações SR-11, SR-12 e SR-14, um surfactante aniônico SURFOM SC 8155 (éster fosfatado, Oxiten) foi adicionado à fase aquosa sob agitação, e após homogeneização, a fase oleosa foi adicionada à mistura.

Outras proporções de cada fase foram testadas, porém, as concentrações reportadas abaixo levaram a microemulsões estáveis em uma ampla faixa de temperatura (5°C a 45°C).

Componentes	SR-9	SR-10	SR-11	SR-12	SR-14
ULTRARIC PE 127/ Agua 10,5% m/m	97,50		95,00		
SURFOM 9127/ Agua 10,5% m/m		97,50		95,00	92,50
Protioconazole/ Citrato de isopentila 20,0% m/m					2,50
Protioconazole/ Dihydrolevoglucosenone 20,0% m/m	2,50	2,50	2,50	2,50	
SURFOM 8155			2,50	2,50	5,00
Total	100,00	100,00	100,00	100,00	100,00

Tabela 1 - Composição das microemulsões

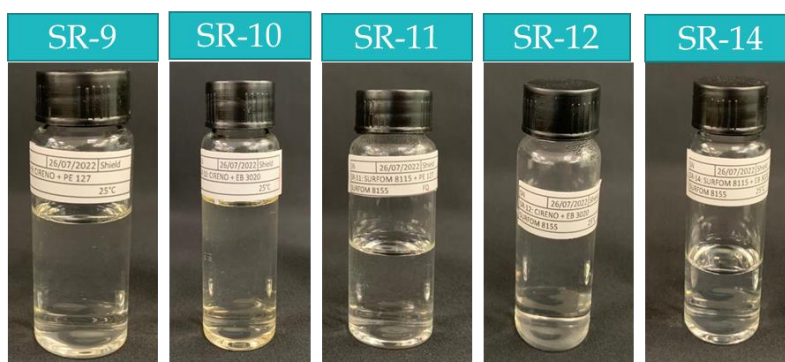


Figura 1 – Fotografias das microemulsões.

Resultados e Discussão

DLS – Espalhamento Dinâmico de Luz

Uma vez obtidas as microemulsões, essas foram submetidas a caracterização através de Espalhamento Dinâmico de Luz (*DLS- Dynamic Light Scattering*), no equipamento Zetasizer Nano ZS da Malvern Panalytical, no qual o raio hidrodinâmico das gotículas foi determinado, conforme tabela abaixo. As medidas foram realizadas em triplicata.

Gráficos de Intensidade e Índice de correlação estão disponíveis no Material Suplementar.

Amostra	Tamanho de partículas (nm)	Índice de Polidispersidade médio
SR-9	24,01	0,479
SR-10	12,20	0,225
SR-11	10,23	0,404
SR-12	7,30	0,189
SR-14	7,84	0,291

Tabela 2 – Resultados Tamanho de partícula DLS.

Potencial zeta

As microemulsões foram submetidas a medida de Potencial zeta para verificação da magnitude da repulsão ou atração eletrostática entre partículas, visto que essa análise oferece uma importante visão sobre a estabilidade das formulações. As medidas foram realizadas em triplicata.

Amostra	Potencial Zeta (mV)	Desvio padrão médio (mV)
SR-9	-4,9	65,9
SR-10	-26,8	6,1
SR-11	-9,1	46,6
SR-12	-28,9	5,4
SR-14	-17,1	10,7

Tabela 3 – Resultados Potencial zeta.

As microemulsões SR-9 e SR-10 não possuem surfactante aniônico em sua composição, e portanto a estabilização ocorre somente por impedimento estérico devido a presença do copolímero EO/PO. Os resultados de Potencial Zeta não foram considerados para estas formulações.

Já as microemulsões SR-11, SR-12 e SR-14 apresentam surfactante aniônico e são estabilizadas por efeito estero-eletrostático. Através dos valores de Potencial zeta, é possível verificar que a Formulação SR- 11 é a menos estável, apresentando o valor mais próximo de zero, dentre as três.

Liberação in vitro

A partir dos resultados de DLS e Potencial Zeta, as formulações SR-10, SR-12 e SR-14 foram selecionadas para verificação da liberação de Protioconazol através do método de diálise.

Resumidamente, cerca de 14 g de cada microemulsão foi colocada na bolsa de diálise (Spectra/Por7 Dialysis Membrane, MWCO 1 kD). A bolsa foi então imersa em 150 mL de água destilada.

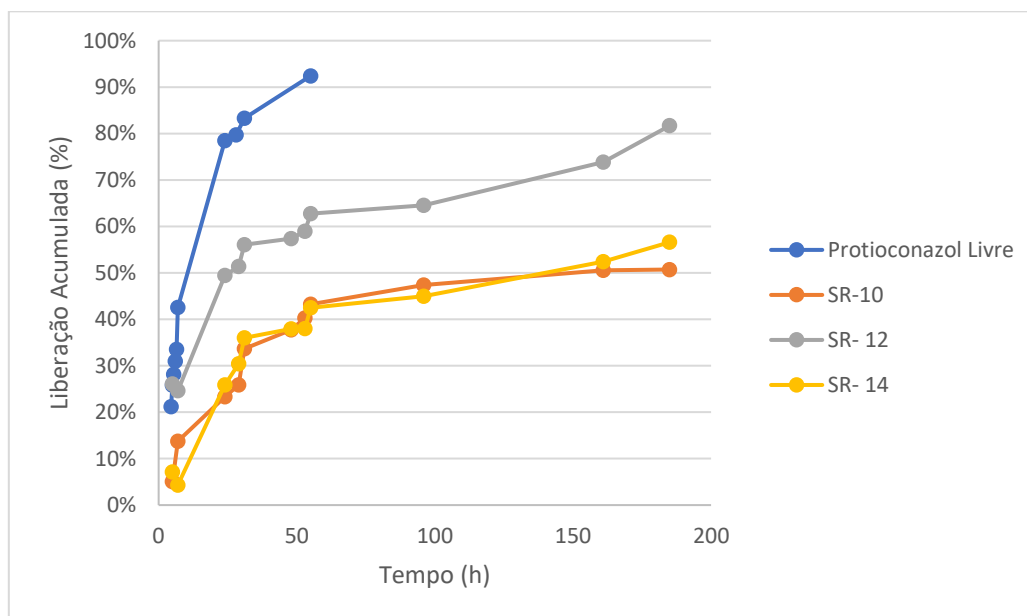
O sistema foi mantido sob agitação magnética contínua (600 rpm) a temperatura ambiente. Em intervalos de tempo específicos, uma alíquota de 1 g do meio de liberação foi retirada e substituída por 1 g de uma nova solução.

Foi adicionado 1 g de etanol a cada alíquota retirada para garantir a análise por UV-VIS, no Espectrofotômetro UV 5 da Mettler Toledo.

Utilizando uma curva de Absorbância versus Concentração previamente obtida a partir da diluição de Protioconazol em diferentes concentrações em etanol, foi possível determinar a quantidade de Protioconazol liberada.

O perfil de liberação das Microemulsões preparadas foi comparado ao perfil de liberação da formulação chamada “Protioconazol Livre”, em que o ativo protioconazol foi solubilizado em etanol, sem a presença de surfactantes. Esta formulação foi inserida na bolsa de diálise e submetida ao processo descrito anteriormente.

A Figura 2 mostra a liberação acumulada das formulações. Foi possível verificar que as microemulsões garantiram a liberação sustentada de Protioconazol. Nas primeiras 50 horas, as formulações SR-10 e SR-14 liberaram cerca de 40% do fungicida e a formulação SR-12 liberou 60% do mesmo, enquanto o protioconazol “livre” (fungicida solubilizado) foi liberado totalmente, durante o mesmo período.



Conclusões

As microemulsões preparadas apresentaram boa estabilidade e perfil de liberação sustentada, confirmando a utilização de copolímeros EO/PO para encapsulamento de ativos hidrofóbicos.

As formulações SR-10, SR12 e SR-14 serão utilizadas em testes *in vivo* para verificação da bioeficácia contra doenças fúngicas, especificamente a ferrugem asiática que acomete culturas de soja.

Agradecimentos

Agradecemos a empresa Oxiteno, pelo fornecimento de amostras e pelas instalações nas quais foram conduzidos os experimentos.

Referências

1. RAHDAR, A. et al.; *J. Mol. Liq.*, **2019**, 277, 624–630
2. HEYDARI et al.; *J. Mol. Liq.*; **2021**, 326, 115263.
3. RAHDAR, A. et al.; *J. Mol. Liq.*, **2020**, 313, 113449.
4. XU, C. et al.; *Carbohydr. Polym.*, **2021**, 262, 117933.
5. FAO, PROTHIOCONAZOLE. Disponível em: <http://www.fao.org>. Acesso em 19 mai. 2021, 19:00:00
6. JIMENEZ, S et al.; *J. Chromatogr.*, **2021**, 1651, 462255.
7. OXITENO, MA-1234: *Varredura UV-VIS*
8. OXITENO, MA-1258: *Tamanho de Partículas, determinação pelo método de Espalhamento Dinâmico da Luz. Varredura*

Desenvolvimento e Validação de Método Analítico para Quantificação de Impurezas Elementares em IFA (Insumo Farmacêutico Ativo) por ICP-MS

Diego Figueiredo Laira^{1*}, Rafael Wihby Leite^{2*}, Pedro Vitoriano Oliveira^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Eurofarma Laboratórios S/A

diego.laira@hotmail.com

Resumo: Os novos padrões e diretrizes para a determinação de impurezas elementares em insumos farmacêuticos ativos (IFA) geraram um maior interesse no desenvolvimento de métodos para quantificá-las. Com os níveis de especificações cada vez mais baixos para concentrações de impurezas elementares em insumos e medicamentos, os métodos desenvolvidos por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS), por apresentarem sensibilidade analítica superior as demais técnicas, são os mais indicados para atender aos critérios para todos os elementos previstos no capítulo 232 da USP (*United States Pharmacopeia*). A grande variedade de IFAs existentes requer um cuidado especial na etapa de preparo de amostra, para que o método a ser desenvolvido seja robusto e atenda a todos os requisitos de validação exigidos pelos guias analíticos presentes na farmacopeia. Assim, o emprego de forno de micro-ondas com frasco fechado para a digestão de amostra se torna indispensável durante a etapa de preparo de amostras. Por fim, os resultados serão discutidos com base na otimização dos parâmetros do ICP-MS, como plasma e o próprio espectrômetro de massa, na presença e na ausência de amostra e com a necessidade ou não de utilização de padrões internos, visando a correção de erros aleatórios intrínsecos às medidas do ICP-MS, para que protocolos com resultados precisos e exatos sejam produzidos.

Palavras-chave: *impurezas elementares, desenvolvimento de método, insumo farmacêutico ativo, plasma indutivamente acoplado-espectrômetro de massa, USP 232/233.*

Development and Validation of Analytical Method for Quantification of Elementary Impurities in API (Active Pharmaceutical Ingredient) by ICP-MS

Abstract: The new standards and guidelines for the determination of elemental impurities in active pharmaceutical ingredients (API) have generated great interest in the development of methods for quantification of them. The smaller and smaller specifications for concentrations of elemental impurities in raw materials and drugs requires the development of methods with high sensitivity, such as inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) in comparison to other techniques. Due to this main characteristic, ICP-MS is the most indicated to meet the criteria for all elements set in Chapter 232 of the USP (*United States Pharmacopeia*). The wide variety of existing APIs requires special care in the sample preparation step to guarantee that the method to be developed is robust and meets all the validation requirements demanded by the analytical guidelines present in the pharmacopeia. Therefore, the use of microwave oven with a closed flask for sample digestion becomes indispensable during the sample preparation stage. Finally, the results will be discussed based on the optimization of ICP-MS parameters, such as plasma and mass spectrometer itself, in the presence and absence of sample and according of need or not of using internal standards, aiming at the correction of random errors, intrinsic for the ICP-MS measurements, allowing protocols with precise and exact results.

Keywords: *elemental impurities, method development, active pharmaceutical ingredient, inductively coupled plasma-mass spectrometry, USP 232/233.*

Introdução

Os fabricantes e fornecedores de insumos farmacêuticos ativos (IFAs) e excipientes e as indústrias farmacêuticas estão preocupados com o impacto dos novos padrões e diretrizes para determinação de impurezas elementares em seus produtos. Atualmente, quando aplicável, os fornecedores demonstram que seus insumos cumprem os limites de concentração presentes, principalmente, no capítulo 232 da USP (*United States Pharmacopeia*) e do conselho internacional

de harmonização (ICH) Q3D, para impurezas elementares. Porém, a grande maioria das indústrias farmacêuticas está solicitando uma avaliação quantitativa extensa de todas as impurezas elementares presentes e, potencialmente presentes, nos insumos para demonstrar que os medicamentos produzidos a partir dos mesmos estão em conformidade com os novos padrões e atendem às recomendações das novas diretrizes presentes nos capítulos 232 e 233 da USP.¹ Seguindo as indicações presentes no capítulo 233 da USP, os métodos analíticos baseados em espectrometria de emissão óptica com plasma indutivamente acoplado (ICP OES) e espectrometria de massas com plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) são as alternativas mais adequadas para realizar análises multi-elementares e com sensibilidade para atender as demandas e requisitos da indústria farmacêutica. A principal vantagem que o método de ICP-MS apresenta em relação ao de ICP OES está relacionada a possibilidade de realizar determinações em concentrações de ultra traço (ng L^{-1}) até valores mais elevados em soluções (mg L^{-1}). Assim, como cada vez mais são esperados níveis de especificações muito baixos para concentrações de impurezas elementares em insumos e medicamentos, os métodos de ICP-MS, por apresentar sensibilidade analítica superior ao ICP OES, são mais indicados para atender aos critérios para todos os elementos previstos no capítulo 232 da USP.^{1,2} Atualmente, a grande maioria das indústrias farmacêuticas possui um portfólio de produtos muito amplo e diferenciado que deve ser submetido aos testes recomendados pelo capítulo 232 da USP.³ Por se tratar de variadas amostras, que podem ser compostas por matéria orgânica e/ou inorgânica, o preparo de amostras torna-se parte fundamental para o desenvolvimento de um método analítico robusto e que atenda a todos os outros critérios de validação exigidos pelos guias analíticos da farmacopeia. Com isso, o emprego de forno de micro-ondas com frasco fechado para a digestão de amostra se torna indispensável durante a etapa de preparo de amostras. Desta forma, é crítico otimizar os métodos de preparo de amostras baseados na digestão com aquecimento assistido por micro-ondas, sejam daquelas amostras com alto teor de matéria orgânica ou de matéria inorgânica, com mistura oxidante concentrada ou diluída ($\text{HNO}_3 + \text{H}_2\text{O}_2$) e agentes complexantes. Para amostras líquidas e solúveis em água uma simples diluição seria a etapa preferida para o preparo, no entanto, devido às interferências que podem ocorrer, a comparação de resultados obtidos com diluição das amostras com aquelas digeridas faz se necessário.⁴

Outro aspecto determinante é a otimização dos parâmetros de operação do ICP-MS, tais como os do plasma como fonte de íons para o MS (potência, fluxos dos gases do plasma, introdução de amostra, e taxa de aspiração da amostra) e os do espectrômetro de massas (distância do cone de amostragem, potenciais do quadrupolo e célula de reação/colisão, bem como do detector) para obtenção de sinais com a maior razão sinal ruído. É importante destacar que a otimização dos parâmetros instrumentais deve ser feita na ausência e presença da amostra para avaliar a resposta analítica na presença de contaminantes ou possíveis interferentes, e como proceder para minimizar ou eliminar esses efeitos.⁵ Finalmente, nas determinações por ICP-MS é necessário avaliar a necessidade ou não de utilização de padrões internos, visando a correção de erros aleatórios intrínsecos às medidas obtidas no equipamento, para que os protocolos produzam resultados exatos e precisos.

Neste sentido, o objetivo do trabalho é desenvolver método analítico para a quantificação de impurezas elementares em insumos farmacêuticos ativos, utilizados na produção de medicamentos comercializados mundialmente, por espectrometria de massa com fonte de plasma indutivamente acoplado (ICP-MS) para atendimento dos Capítulos 232 e 233 da USP e da diretriz do ICH Q3D.

Experimental

Os experimentos realizados estão divididos em 3 partes principais: (i) otimização do ICP-MS para os ensaios iniciais e determinações pretendidas; (ii) avaliação da necessidade de utilização de padrão interno (Sc, In e Tb); e (iii) análise de um insumo farmacêutico ativo (IFA) valaciclovir com apenas diluição da amostra.

Todos os experimentos foram realizados em um espectrômetro de massas com fonte de plasma acoplado indutivamente, modelo Agilent 7800 (Agilent Technologies, Tóquio, Japão), simples quadropolo, com um amostrador automático Agilent SPS 4 (Santa Clara, EUA). O instrumento é equipado com um gerador de RF de 27 MHz de estado sólido e um sistema ORS4[®] (Agilent Technologies, Tóquio, Japão) para remover interferências isobáricas através de DEC/DIC usando He de alta pureza (99,999% v v⁻¹). O software utilizado para o controle do equipamento é o *Mass Hunter*.

Para a etapa de preparo de amostras pretende-se utilizar um forno micro-ondas com frasco fechado, modelo Multiwave Pro (Anton-Paar, Graz, Austria).

Resultados e Discussão

Otimização do ICP-MS para as determinações de 24 elementos

Soluções padrões multi-elementares de 1 µg mL⁻¹ e 10 µg mL⁻¹ de Ce, Co, Li, Tl e Y ICP-MS Stock Tuning Solution) foram utilizadas para otimização das condições operacionais do ICP-MS. As soluções analíticas foram obtidas de soluções padrões de 1000 mg L⁻¹ dos 24 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V) de interesse nesta pesquisa, adquiridos da Agilent Technologies. Soluções de ácido de HNO₃ (ACS ISSO, Supelco) foram utilizadas para preparar soluções analíticas e de limpeza do ICP-MS. Em todos os experimentos foi utilizada água Tipo 1 (Millipore).

O capítulo 233 da USP apresenta a concentração máxima permitida de cada elemento na amostra a ser analisada, chamado de valor *J*. A equação para a definição do valor de *J* é baseada em três parâmetros principais, que são: (i) exposição diária permitida (PDE) para um dado elemento, que depende da via de administração do medicamento; (ii) dosagem máxima diária (DMD) permitida para o medicamento; e (iii) o fator de diluição (FD) envolvido no processo de preparo das amostras para posterior análise, utilizando os métodos espectroscópicos. O valor de *J* é calculado de acordo com a equação abaixo:

$$J = \frac{PDE}{DMD \cdot FD}$$

Sendo assim, com a variação desses parâmetros, podemos encontrar os valores necessários para detecção em diferentes ordens de grandeza, que podem estar na faixa de mg L⁻¹ até ng L⁻¹ nas soluções.⁶

Os padrões dos 24 elementos (Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V) foram preparados seguindo as concentrações de 0,25 de *J* até 1,5 de *J*. Esses valores foram definidos utilizando o IFA Cloridrato de Valaciclovir como referência, variando os valores de PDE para cada elemento, mantendo o valor de DMD como equivalente a 8g e, por fim, utilizando o fator de diluição como 1000. Ou seja, nestas condições as menores concentrações foram

de Cd, variando de $0,156 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,25 J) a $0,938 \mu\text{g L}^{-1}$ (1,5 J) e as maiores para Cr, variando de $343 \mu\text{g L}^{-1}$ (0,25J) a $2.062 \mu\text{g L}^{-1}$ (1,5 J). As soluções padrões foram preparadas em solução de ácido nítrico 2% (v v⁻¹). A curva de calibração com cinco pontos (0,25J a 1,5J), além do ponto zero, que foi definido pela injeção do branco (diluente utilizado no método). Os resultados mostraram que os valores encontrados de repetibilidade para os 24 elementos foram muito precisos ($n = 3$ medidas), apresentando faixas de desvio padrão relativo (DPR), variando de 3,6% para o elemento Cu a 8,5% para o elemento Ag. Os valores de coeficiente de correlação linear (R^2) também apresentaram resultados próximos do ideal (1,0). A vantagem de se trabalhar com soluções muito diluídas se dá por conta da própria sensibilidade intrínseca do método de ICP-MS, minimiza efeito de memória para alguns elementos (e.g. Ag, Cu e Hg), que podem causar em concentrações mais elevadas e ajuda na diluição de concomitantes que podem produzir interferências.

Avaliação do uso de Padrões Internos (Sc, In e Tb)

O padrão interno ideal deve ter massas próximas às dos analitos e também comportamento semelhante frente as variações instrumentais, sendo assim, três elementos foram escolhidos para serem investigados (Sc, $m/z=45$; In $m/z=115$; e Tb $m/z=159$). Com as melhores condições instrumentais estabelecidas para o ICP-MS e com esse primeiro intervalo linear das concentrações da curva de calibração pré-estabelecido, foi avaliada a necessidade de utilização de padrão interno para a quantificação dos analitos de interesse. Foram realizados testes com 1 mg L^{-1} e 10 mg L^{-1} de Sc, In e Tb como padrões internos.

As concentrações dos padrões internos em 1 mg L^{-1} apresentaram resultados mais precisos, tanto para os valores de intensidades de sinais obtidos para as curvas de calibração quanto para as quantificações das amostras. As intensidades de sinais dos elementos Sc e Tb se mantiveram constantes em diferentes tipos de respostas quando a concentração de 1 mg L^{-1} foi utilizada. Por outro lado, quando concentrações de 10 mg L^{-1} foram utilizadas, o comportamento não seguiu a tendência esperada frente aos analitos monitorados. Com a concentração em 10 mg L^{-1} houve variações entre as injeções, fazendo com o que os resultados também sofressem variação, afetando os critérios de aceitação, como desvio padrão relativo (%DPR), além da quantificação dos elementos. A Tabela 1 apresenta os resultados comparativos entre as quantificações dos analitos de interesse para avaliar a exatidão no nível de 1,5 de J, utilizando os três elementos como padrão interno. Dentre os 24 elementos analisados, foram escolhidos três elementos representativos, um de massa atômica baixa (Li, $m/z=7$), um de massa atômica média (Pd, $m/z=105$) e um de massa atômica alta (Pb, $m/z=208$).

Tabela 1 – Comparação entre a recuperação dos analitos de interesse para o teste de exatidão de acordo com o padrão interno utilizado em soluções analíticas.

Elemento	Recuperação (%)				Critério de Aceitação (%)
	Sem Padrão Interno	Sc	In	Tb	
Li ($m/z = 7$)	72,2	86,1	21,6	79,9	70,0 - 150,0
Pd ($m/z = 105$)	82,9	96,4	24,9	89,6	
Pb ($m/z = 208$)	82,2	95,9	24,4	89,4	

A partir dos resultados expressos na Tabela 1, temos que, em comparação com a quantificação sem a utilização do padrão interno, o elemento que melhor respondeu como padrão interno foi o Sc, independentemente das massas, pois apresentou melhores resultados de recuperação para os três analitos de interesse, tanto em relação aos outros padrões internos quanto em comparação a quantificação direta sem a utilização dos padrões internos. O Tb também apresentou resultados satisfatórios, porém inferiores e mais próximos ao limite inferior do critério de aceitação se comparado com o Sc. Por fim, o In apresentou resultados ruins muito provavelmente devido as variações sofridas durante as injeções.

Análise do IFA cloridrato de valaciclovir

A avaliação da eficiência do preparo de amostra apenas com diluição foi feita a partir de testes de exatidão, que consiste em preparar amostras com adições de concentrações conhecidas dos 24 elementos de interesse e, após determinações dos elementos, avaliar a recuperação dos valores adicionados. As concentrações adicionadas foram feitas conforme valor de J (concentração máxima permitida do analito em solução aquosa), que leva em conta a via de administração do medicamento, a dosagem máxima diária e fator de diluição do preparo, segundo os parâmetros do capítulo 232 da USP. No caso, para o IFA cloridrato de valaciclovir, os elementos de interesse foram adicionados na proporção de 0,50 de J; 1,0 de J e 1,5 de J, todas elas na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$. Nestas determinações foi utilizado o padrão interno Sc para correções de eventuais problemas associados à introdução da amostra e desvios instrumentais. As recuperações variaram de 88,5% para o elemento Co ($m/z=59$) até 144,5% para o As ($m/z=75$), mostrando que neste caso, as determinações tendo como preparo de amostra com apenas uma diluição em meio de HNO_3 2 % v v⁻¹ produz resultados exatos e precisos.

Conclusões

A análise do IFA cloridrato de valaciclovir para as determinações de Ag, As, Au, Ba, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ir, Li, Mo, Ni, Os, Pb, Pd, Pt, Rh, Ru, Se, Sb, Sn, Tl e V mostrou que o método por ICP-MS após otimização, com simples diluição da amostra e uso de padrão interno Sc produziu resultado promissores e dentro dos limites preconizados pela USP 232 e 233, podendo ser ajustado para validação e aplicação em rotina de laboratório.

Referências

1. LI, Gang et al. Elemental impurities in pharmaceutical excipients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 104, n. 12, p. 4197-4206, (2015).
2. STØVING, Celina et al. Development and validation of an ICP-OES method for quantitation of elemental impurities in tablets according to coming US pharmacopeia chapters. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, v. 84, p. 209-214, 2013.
3. R. Lorençato, G. G. A. de Carvalho, P. V. Oliveira, Direct analysis of liquid drugs by ICP-MS using aerosol dilution, *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, Vol 35, n. 10, October 2020, p. 2077-2396.
4. The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 232: Elemental Impurities - Limits. First Supplement to USP 40-NF 35. Oficial em 1º. De Dezembro de 2017. Disponível em <<https://www.usp.org/sites/default/files/usp/document/our-work/chemical-medicines/keyissues/232-40-35-1s.pdf>>. Acesso em 03 de Junho de 2021.

5. BECKER, J. S. Inorganic mass spectrometry: principles and applications. Chichester, England: John Wiley & Sons, 2007.
6. The United States Pharmacopeia Convention, The United States Pharmacopeia, Chapter 233: Elemental Impurities - Procedures. Revision Bulletin. Oficial em 1º. De Abril de 2015. Disponível em www.usp.org/sites/default/files/usp/document/ourwork/chemicalmedicines/keyissues/c233.pdf. Acesso em 08 de Novembro de 2022.

Atividade antioxidante e anti-tirosinase nas folhas de *Guadua angustifolia*

var. *bicolor* Lodoño (Bambusoideae:Poaceae)

João Kazlauckas C. Corrêa^{1*}, Paulo Roberto H. Moreno^{2*}

1-Graduação em Farmácia-Bioquímica - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

joaokazlauckas@usp.br

2-Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño é uma das duas variedades da espécie *Guadua angustifolia*, uma espécie Colombiana introduzida no Brasil cuja composição fitoquímica ainda não foi estudada. Este estudo visa identificar substâncias presentes nessa variedade com atividade antioxidante e anti-tirosinase. Folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foram extraídas com etanol (70%) em aparelho de Soxhlet. Os extratos foram concentrados utilizando rota-evaporador sob pressão reduzida e submetidos a uma partição sólido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). As frações diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram empregadas nas análises. A fração de *n*-butanol demonstrou maior atividade antioxidante e as maiores quantidades de fenólicos. Na sequência, as frações foram submetidas à cromatografia em coluna fornecendo nove sub-frações cada uma. As subfrações diclorometano (C, D, E), acetato de Etila (G) e *n*-butanol (B, C, D) apresentaram as maiores inibições da tirosinase, sendo 40,66 % para diclorometano C e 39,78% para diclorometano E. A subfração diclorometano C não apresentou flavonóides de acordo com os resultados obtidos, apenas compostos fenólicos. A subfração *n*-butanol B demonstrou maior atividade antioxidante com 86,39%. Os resultados obtidos indicam que *G. angustifolia* var. *bicolor* possui compostos com potencial atividade antioxidante e inibidora da tirosinase.

Palavras-chave: *Guadua angustifolia* var. *bicolor*; atividade antioxidante; atividade anti tirosinase.

Antioxidant and anti-tyrosinase activity in *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño leaves (Bambusoideae:Poaceae)

Abstract: *Guadua angustifolia* var. *bicolor* Lodoño is one of the two varieties of *Guadua angustifolia*, a Colombian species introduced in Brazil, whose phytochemical composition has not yet been studied. This study aims to identify substances present in the species with antioxidant and anti-tyrosinase activity. *G. angustifolia* var. *bicolor* leaves were extracted with ethanol (70%) in a Soxhlet apparatus. The extracts were concentrated using a rotary evaporator under reduced pressure and subjected to solid-liquid partition with solvents of increasing polarity (hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol). The dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol fractions were used in the analyses. The *n*-butanol fraction showed the highest amounts of phenolics and antioxidant activity. Subsequently, the fractions were subjected to column chromatography providing nine sub-fractions each. The dichloromethane (C, D, E), Ethyl Acetate (G) and *n*-butanol (B, C, D) subfractions afforded the highest tyrosinase inhibitions, with 40.66% for dichloromethane C and 39.78% for dichloromethane E. Subfraction dichloromethane C did not contain flavonoids, only phenolic compounds. The *n*-butanol B subfraction showed the highest antioxidant activity with 86.39%. The results obtained indicate that *G. angustifolia* var. *bicolor* has compounds with potential antioxidant and tyrosinase inhibitory activity.

Keywords: *Guadua angustifolia* var. *bicolor*; antioxidant activity; anti-tyrosinase. activity.

Introdução

Desde os primórdios da civilização, o homem busca soluções e respostas na natureza para resolver suas dificuldades de sobrevivência. Assim, o uso de plantas para fins medicinais é recorrente desde os tempos remotos até os dias atuais. Um exemplo disso é o emprego de fármacos da classe dos opióides, originados da morfina, encontrada originalmente na espécie *Papaver somniferum* L., cujo uso documentado data de 5000 A.C¹. Nesse contexto, a exploração de produtos do metabolismo secundário vegetal contribui para o desenvolvimento não só de novos medicamentos, como também pode ser expandido para aplicações na indústria alimentícia, cosmética e de higiene pessoal baseado em suas propriedades físicas, químicas e biológicas².

Bambus são nativos de todos os continentes, exceto Europa e Antártica e apresentam distribuição desde o nível do mar até altitudes de 4300m. Seus colmos são utilizados comumente para fins de construção, devido à sua resistência, e ainda, em países de origem asiática, suas folhas são utilizadas para revestir alimentos permitindo sua conservação³. Além disso, na Medicina Tradicional Chinesa os bambus são citados como fontes de compostos capazes de reduzir o risco de desenvolvimento de câncer e doenças cardíacas, como também auxiliam na desintoxicação do organismo, estudos apontam que fenólicos, flavonóides^{4,5}, lactonas e glicosídeos^{6,7} são as classes de substâncias presentes na espécie vegetal responsáveis por essas atividades biológicas. *Guadua* Kunth é um dos gêneros mais importantes que cresce na América Central e do Sul; suas espécies são mais altas e mais espessas do que as espécies de bambu asiáticas⁸. Estudos fitoquímicos com o gênero *Guadua* foram realizados com as espécies *G. angustifolia* Kuth⁹ e *G. chacoensis*¹⁰, mostrando que tais espécies apresentam atividade biológica antioxidante e anti-tirosinase, bem como semelhanças em suas composições químicas. *G. angustifolia* var. *bicolor* é classificada como uma das duas variedades de *G. angustifolia* sendo identificada pela primeira vez na em bosques tropicais úmidos na Colômbia¹¹. A variedade bicolor apresenta como característica muito marcante a presença de colmos verdes com listras amarelas e nós esbranquiçados. Contudo existem dificuldades taxonômicas na identificação de de outras espécies próximas do grupo *Guadua* que poderão ser minimizadas com estudos taxonômicos e fitoquímicos.

Antioxidantes são frequentemente utilizados na indústria alimentícia para retardar a degradação de alimentos. Também inibem o ataque de radicais livres em estruturas de DNA, RNA e proteínas nas células. Eles reagem com os radicais livres no meio formando estruturas de ressonância mais estáveis e pouco reativas devido à presença de elétrons π e/ou elétrons livres conjugados em suas estruturas, assim impedindo que as demais moléculas sejam afetadas¹². Nos bambus, as principais substâncias antioxidantes são os compostos fenólicos e os flavonóides.

A tirosinase é uma enzima presente nos melanócitos que promove a biossíntese da melanina, substância que dá cor à pele. A biossíntese da melanina inicia-se com a conversão da tirosina em dopamina, seguindo-se uma série de etapas oxidativas. A produção em excesso de melanina causa distúrbios dermatológicos, que levam ao surgimento de melasmas, podendo evoluir para um melanoma, isto é, um câncer de pele. Desse modo, a atividade anti-tirosinase visa a inibição da enzima para retardar o crescimento de um melasma, ou auxiliar no tratamento de um melanoma¹³.

Tendo em vista a importância dessas atividades e a falta de informações sobre a composição química e atividades biológicas dos bambus americanos, o principal objetivo deste trabalho foi a avaliação fitoquímica de *G. angustifolia* var. *bicolor*, a fim de comparar esta variedade com as demais do grupo. Adicionalmente, foi estudado o seu potencial antioxidante e anti-tirosinase.

Experimental

Preparo dos Extratos

As folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foram coletadas no Laboratório de Experimentação com Bambu da Universidade Estadual Paulista, Campus Bauru. Após a secagem em estufa 40°C, as folhas picotadas (36,4 g) e extraídas em aparelho de Soxhlet com álcool etílico à 70%, até a total exaustão do material. Finalizado o processo, o solvente foi eliminado em um evaporador rotatório sob pressão reduzida. O extrato vegetal seco foi fracionado da seguinte por extração sólido-líquido com 4 porções de 100 mL de cada solvente de polaridade crescente, *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, por 10 minutos em um agitador magnético. Posteriormente os solventes foram eliminados sob pressão reduzida com um evaporador rotatório, resultando em quatro frações diferentes.

Fracionamento das amostras

As frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram fracionadas por cromatografia em coluna, usando de sílica gel como fase estacionária. Para tanto, 40 g de sílica gel foram colocadas em uma coluna de vidro com diâmetro de 4 cm até a altura de 5 cm, ocupando um volume de aproximadamente 63 mL. As amostras foram aplicadas após a mistura com 1 g de sílica para amostra, 500 mg da fração de diclorometano, 487 mg da fração de acetato de etila e 279,6 mg da fração de *n*-butanol. A eluição foi realizada com três porções de 90 mL de cada uma das polaridades, totalizando 270 mL da mistura de solventes em cada subfração. A composição das fases móveis utilizadas na separação de cada fração estão organizadas no Quadro 1. Cada fração deu origem a nove subfrações, das quais foram nomeadas de acordo com sua fração de origem, sendo diferenciadas por letras de A até I de acordo com a ordem de saída da coluna.

Quantificação dos Compostos Fenólicos Totais

Os fenólicos totais foram quantificados pelo método colorimétrico com o reagente de Folin-Ciocalteu^{10,11}. As amostras utilizadas foram solubilizadas em metanol:água (8:2 v/v) com concentrações entre 5-6 mg/mL e aplicadas em uma placa de 96 poços, para posteriormente, realizar a leitura de sua absorbância em 760 nm, após duas horas de reação. Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico por mg de extrato (µg EAG/mg).

Quantificação dos Flavonoides Totais

A quantificação de flavonoides foi feita pelo método de complexação com o reagente AlCl₃ à 1% em metanol (m/v)^{10,11}. As amostras utilizadas foram solubilizadas também em metanol:água (8:2 v/v) com concentrações entre 5-6 mg/mL. Os resultados foram expressos em µg equivalentes de quercetina por mg de extrato (µg EQ/mg)

Quadro 1-Sequência de polaridade dos eluentes utilizados na cromatografia em coluna com as frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol de *G. angustifolia* var. *bicolor*.

Fração diclorometano (v/v)	Fração acetato de etila (v/v)	Fração <i>n</i> -butanol (v/v)
CHCl ₃ :hexano (50%)	CHCl ₃ :acetato de etila (50%)	Clorofórmio
CHCl ₃	Acetato de etila	Clorofórmio:metanol (90%)
CHCl ₃ :metanol (95%)	Acetato de etila:metanol (95%)	Clorofórmio:metanol (90%)
CHCl ₃ :metanol (90%)	Acetato de etila:metanol (90%)	Clorofórmio:metanol (70%)
CHCl ₃ :metanol (80%)	Acetato de etila:metanol (80%)	Clorofórmio:metanol (50%)
CHCl ₃ :metanol (70%)	Acetato de etila:metanol (70%)	Clorofórmio:metanol (30%)
CHCl ₃ :metanol (50%)	Acetato de etila:metanol (50%)	Clorofórmio:metanol (10%)
metanol	metanol	metanol
metanol:H ₂ O (50%)	metanol:H ₂ O (50%)	metanol:H ₂ O (99%)

Potencial antioxidante

O teste colorimétrico com o radical estável difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)^{10,11}, foi utilizado para determinar o potencial antioxidante das frações e subfrações. Para a realização do teste foi preparada uma solução de 0,02% de DPPH em metanol. As concentrações das amostras utilizadas foram variadas. Após o tempo do ensaio, as microplacas tiveram sua absorbância determinada em 517 nm.

Atividade anti-tirosinase

Para a determinação da atividade anti-tirosinase foi feito o teste colorimétrico com a enzima tirosinase, utilizando *L*-Dopa (3,4-di-hidroxi-*L*-fenilalanina) como substrato¹². As subfrações foram dissolvidas em diferentes soluções contendo 18 % DMSO, 2 % Tween 20 e 80 % tampão fosfato pH 6,8, de maneira que a concentração das amostras ficassem entre 0,9-1,1 mg/mL. Após o tempo de incubação, as microplacas tiveram sua absorbância determinada em 495 nm.

Resultados e Discussão

Quantificação dos Compostos Fenólicos e Flavonoides Totais

Na análise das frações de folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor* foi possível notar a presença de compostos fenólicos em todas, sendo mais abundante na fração *n*-butanólica (Fig.1). Com relação aos flavonóides, todas as frações apresentaram valores semelhantes (Fig.1). Em comparação com *G. chacoensis*¹¹, o teor de fenólicos na espécie em estudo foi menor, Contudo, os teores de fenólicos foram similares aos reportados para *G. angustifolia* var. *angustifolia* Kunth¹⁰, com teores de flavonóides superiores. aos encontrados nessas duas espécies.

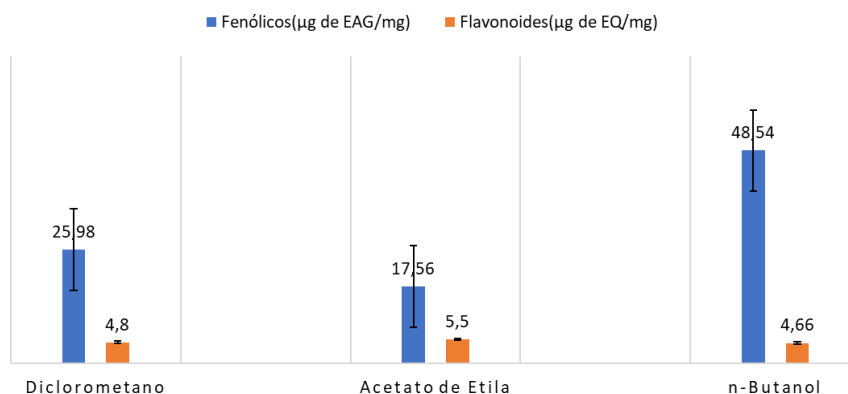


Figura 1- Determinação de compostos fenólicos e flavonóides nas frações de diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos, respectivamente, microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra ((µg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra ((µg EQ/mg)

Após a separação em coluna, cada fração deu origem a nove subfrações que foram triadas para as atividades antioxidante e anti-tirosinase, aquelas com maior atividade, diclorometano (Di. C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D), tiveram os teores de fenólicos totais e flavonoides determinados. Os resultados de suas quantificações quanto às classes químicas anteriormente citadas estão ilustradas na Fig.2, onde é possível notar a ausência de flavonóides em Di.C em relação aos demais, cujos valores são próximos entre si.

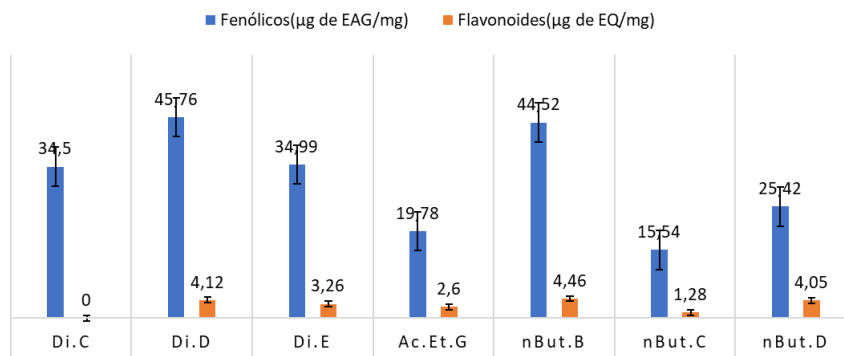


Figura 2- Determinação de compostos fenólicos e flavonóides nas subfrações de diclorometano (Di.C, D, E), acetato de etila (Ac. Et.G), e *n*-butanol (nBut. B, C, D) das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos, respectivamente, microgramas equivalentes de ácido gálico por miligrama de amostra (µg EAG/mg) e microgramas equivalentes de quercetina por miligrama de amostra (µg EQ/mg)

Atividade Anti-tirosinase

Dentre as subfrações, as de diclorometano C (Di. C) e E (Di. E) demonstraram a maior atividade com a menor quantidade de amostra (Fig.3). Tendo em vista os resultados apresentados na Fig.2, a atividade de Di. C está muito provavelmente associada com presença de compostos fenólicos simples ou fenilpropanóides, uma vez que não foram detectados flavonoides nessa subfração.

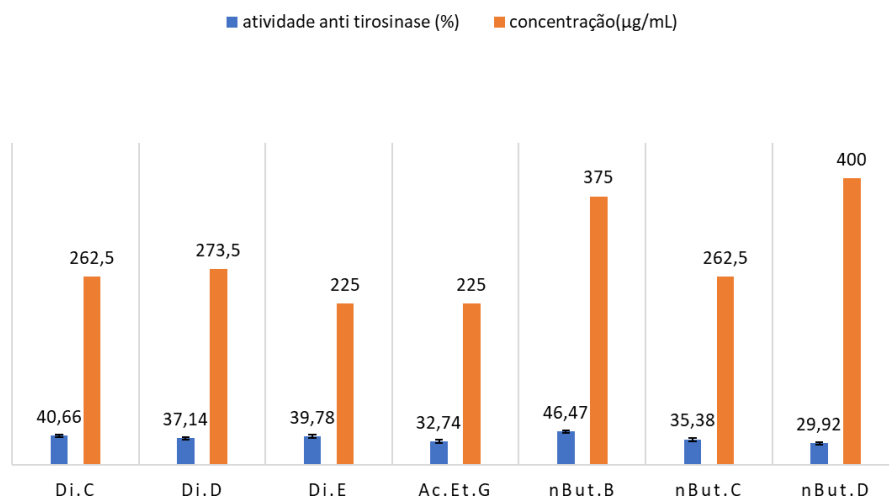


Figura 3- Atividade anti-tirosinase com as subfrações de diclorometano (Di. C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D), expressos em porcentagem (%) em função da concentração de amostra utilizada nos poços da placa. (µg/mL).

Atividade Antioxidante

As frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol foram quantificadas com relação ao seu potencial antioxidante, sendo expressas na forma de IC₅₀ (Fig.4), isto é, a concentração necessária para se neutralizar 50% do radical DPPH. As frações de diclorometano e acetato de etila apresentaram valores muito próximos, enquanto que a fração de *n*-butanol se destacou ao obter a mesma atividade em relação às demais com uma concentração bem mais baixa. Essa diferença de atividade pode estar relacionada com a quantidade superior de compostos fenólicos vista na Fig. 1 em comparação às demais.

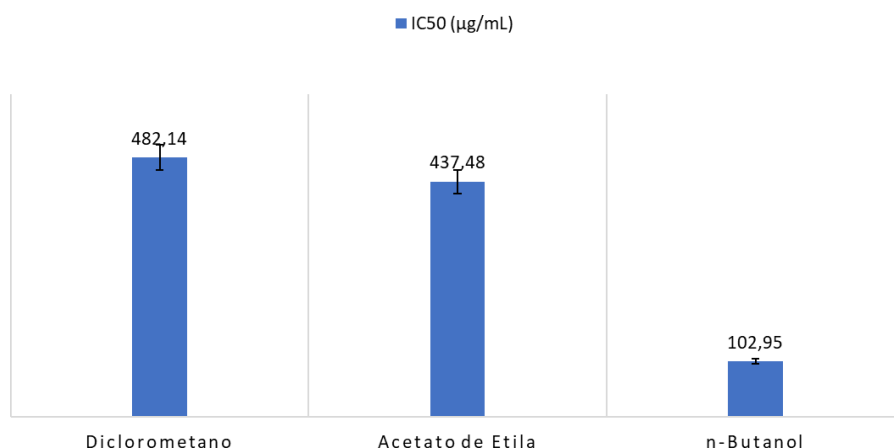


Figura 4- Atividade antioxidante das frações de diclorometano, acetato de etila, e *n*-butanol das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressos em função dos seus IC₅₀ (µg/mL).

Todas as subfrações, apresentaram atividade antioxidante (Fig.5), porém com diferentes valores em relação a quantidade de amostra utilizada. A subfração Ac.Et. G foi a menos potente para essa atividade, sendo a mais ativa a subfração Di. E, a qual também apresentou os melhores resultados para a inibição da tirosinase.

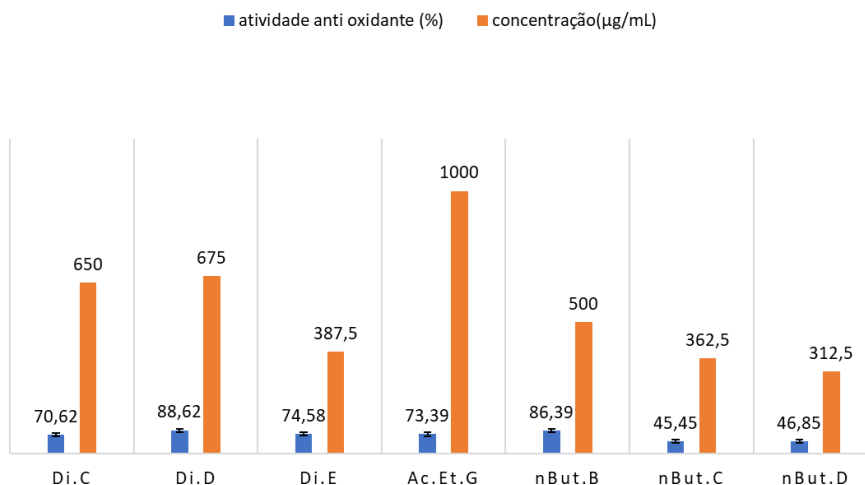


Figura 5- Atividade antioxidante das subfrações de diclorometano (Di.C, D e E), acetato de etila (Ac. Et. G), e *n*-butanol (nBut. B, C e D) das folhas de *G. angustifolia* var. *bicolor*, expressa em porcentagem (%) de inibição do radical DPPH para cada concentração de amostra analisada.

Conclusões

Os resultados obtidos indicam que *G. angustifolia* var. *bicolor* possui compostos com potencial atividade antioxidante e inibidora da tirosinase. Contudo, ainda são necessários estudos complementares para determinar a estrutura dos compostos com essas atividades, mas podem estar relacionados com a presença de compostos fenólicos e flavonoides. A análise dessas subfrações com técnicas hífenadas como cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massas (LC-MS) e cromatografia à gás acoplada com espectrometria de massas (CG-MS) pode auxiliar a elucidação dessas estruturas química.

Agradecimentos

CNPq, Instituto de Química da USP.

Referências bibliográficas

- 1- Pinto, A. C.; Silva, D. H. S.; Bolzani, V. S.; Lopes, N. P.; Epifanio, R. A.. *Quím. Nova*, **2002**, 25, 45. [<https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>]
- 2- Phillipson, J.David; Anderson, Linda A.; *J. Ethnopharmacol.*, **1989**, 25, 61. [[https://doi.org/10.1016/0378-8741\(89\)90045-7](https://doi.org/10.1016/0378-8741(89)90045-7)]
- 3- Hsiung, W., *J. Amer. Bamboo Soc*, **1991**, 8, 168. [https://bamboo.org/_uploads/pdfs/JABSV08_1991_OCR.pdf]
- 4- Afifi, F.; Shervington, A.; Darwish, R. M; *Acta Technologiae et Legis Medicamenti*, **1997**, 8, 105. [[doi:10.4103/0973-1296.204551](https://doi.org/10.4103/0973-1296.204551)]
- 5- Lu, B.; Wu, X.; Tie, X.; Zhang, Y; *Food Chem. Toxicol.*, **2005**, 43, 783. [<https://doi.org/10.1016/j.fct.2005.01.019>]

- 6- Wróblewska, K. B: *Atividade antioxidante e fotoprotetora de bambus nativos do Sudeste brasileiro*; PhD Thesis, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2019.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-07052019-151812/pt-br.php>]
- 7- Londoño, X. In *Catalogue of New World Grasses (Poaceae): I. Subfamilies Anomochlooideae, Bambusoideae, Ehrhartoideae, and Pharoideae, Contr. U.S. Natl. Herb*; Judziewicz, E. J.; Soreng, R. J.; Davidse, G.; Peterson, P. M.; Filgueiras, T. S; Zuloaga, F. O., eds.; Smithsonian Institution: Washington, D.C. USA, 2000, vol. 39.
- 8- Valko, M.; Rhodes, C.J.; Moncol, J.; Izakovic, M.; Mazur, M.; *Chem. Biol. Interact.*, **2006**, *160*, 1. [7241.
[<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>]
- 9- Mukherjee, P. K.; Biswas, R.; Sharma, A.; Banerjee, S.; Biswas, S.; Katiyar, C.K.; *J. Herb. Med.*, **2018**, *14*, 1. [<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2018.09.002>]
- 10- Oliveira, D. C. S.: *Composição química e atividades biológicas de extratos de Guadua angustifolia Kunth*; MSc Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2019.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9138/tde-22122021-132604/pt-br.php>]
- 11- Nunes, F. A.: *Composição química e atividades biológicas de extratos e frações de Guadua chacoensis (Rojas) Londoño & P.M. Peterson*; Msc Dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2020.
[<https://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/46/46136/tde-28042022-141652/pt-br.php>]
- 12- Hwang J.H.; Lee B.M.; *J. Toxicol. Environ. Health A.*, **2007**, *70*, 393.
[<https://doi.org/10.1080/10937400600882871>. PMID: 17454565]

IDENTIFICAÇÃO DOS EXTRAÍVEIS SEMIVOLÁTEIS PRESENTES NOS COMPONENTES INDIVIDUAIS DO MATERIAL DE EMBALAGEM DE UM SPRAY NASAL

Ângela Oliveira Francisco ^{1,2*}, Celso Blatt ³, Lourdes Marcela Yataco ², Ana Lúcia Borges Shimada ², Daniele de Souza Freitas ², Paulo R. H. Moreno ^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Ache Laboratórios Farmacêuticos

3 – Agilent Technologies do Brasil

prmoreno@iq.usp.br; angela.francisco@ache.com.br

Resumo: Extraíveis correspondem a quaisquer analitos passíveis de serem extraídos, os quais podem ser substâncias orgânicas e inorgânicas liberadas de um sistema de embalagem de um medicamento, em condições de laboratório. Essas substâncias têm o potencial de lixiviar para um produto farmacêutico nas condições normais de armazenamento durante seu período de validade, sendo denominadas lixiviáveis. Este trabalho investigou a composição química de origem semi-volátil presente no extrato de isopropanol dos componentes individuais do material de embalagem de um spray nasal analisados em cromatógrafo a gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM). A identificação destes compostos foi obtida através da comparação dos índices de retenção linear, dos espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento e da literatura. Foram identificados 55 compostos no total, sendo os principais hidrocarbonetos alifáticos, como hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano, hexacosano e octacosano, seguidos dos ácidos graxos, ácido palmítico e ácido esteárico, e um oligômero cíclico do Nylon-6, 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona. Estes resultados possibilitam determinar os potenciais lixiviáveis e estabelecer um protocolo para o acompanhamento destas substâncias no medicamento. Esse controle aumenta a segurança do usuário, por meio da avaliação da toxicidade e determinação dos limites permitidos para esses compostos, quando presentes no medicamento.

Palavras-chave: *spray nasal, compostos semivoláteis, extraíveis, índice de retenção linear.*

IDENTIFICATION OF SEMI VOLATILE EXTRACTABLES FOUND IN THE INDIVIDUAL COMPONENTS OF A NASAL SPRAY PACKAGING MATERIAL

Abstract: Extractables correspond to any analytes that can be extracted, which can be organic and inorganic substances that are released from a medicine packaging system, under laboratory conditions. These substances have the potential to leach into a pharmaceutical product under the standard storage conditions during its shelf life, so they are called leachables. This work investigated the semi volatile compounds present in the 2-propanol extracts of individual components from a nasal spray packaging material which were analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The compound identification was done by comparing the linear retention indexes and mass spectra obtained with libraries and the literature. A total of 55 compounds were identified, the main compounds present in all extracts were aliphatic hydrocarbons such as hexadecane, octadecane, eicosane, docosane, tetracosane, hexacosane and octacosane, followed by the fatty acids, palmitic acid and stearic acid, and a Nylon-6 cyclic oligomer, 1,8-diaza-cyclotetradecane-2,7-dione. These results enable to determine potential leachables, and to establish a protocol for monitoring these substances in the medicine. This control increases the user safety, through the assessment of toxicity and determination of allowed limits for these compounds, when present in the medicine.

Keywords: *nasal spray, semi-volatile compounds, extractables, linear retention index.*

Introdução

Medicamentos utilizam um sistema de embalagem para preservar e proteger o produto após sua fabricação, durante sua distribuição, armazenamento e uso. Alguns componentes provenientes do processo de manufatura do material de embalagem podem migrar para o produto farmacêutico, formando uma classe de impurezas conhecidas como lixiviáveis¹.

Uma gama de materiais, como vidro, metais, materiais sintéticos ou polímeros naturais são usados para fabricar componentes de embalagens e dispositivos médicos. Os plásticos usados em sistemas de embalagem de medicamentos são compostos por polímeros com uma ampla estrutura de massa molecular e incluem aditivos como plastificantes, estabilizantes, lubrificantes, antioxidantes, corantes entre outros, incorporados para produzir as propriedades necessárias para um fim específico².

Interações entre o produto e o sistema de embalagem podem afetar a qualidade e segurança do medicamento, sendo estas aditivas, quando um constituinte da embalagem é adicionado ao produto, ou redutoras, se o constituinte do produto é reduzido em qualquer nível devido à interação. A interação aditiva ocorre quando extraíveis orgânicos e/ou inorgânicos do sistema de embalagem migram para fora do sistema e acumulam como lixiviáveis no produto³.

O primeiro passo para avaliar os lixiviáveis é realizar estudos de extração, sendo estes de dois tipos, os de extração controladas e extração de uso simulado, que podem ser feitos em série ou em paralelo. Um estudo de extração controlada, também chamado de estudo de caracterização de materiais, envolve a extração do sistema de embalagem em dois ou três solventes de polaridades diferentes. Os solventes são selecionados com base nas características do medicamento, com um dos solventes sendo mais agressivo e representativo de pior caso. Uma extração de uso simulado é projetada para ser menos agressiva, desta forma menos extraíveis são identificados, no entanto neste estudo é mais provável identificar apenas os extraíveis que se tornarão lixiviáveis, em comparação com o estudo de extração controlada⁴.

Após a conclusão de um estudo de caracterização de extraíveis ou um estudo de lixiviáveis, uma lista de substâncias químicas é identificada, compondo assim o perfil dos extraíveis ou o perfil de lixiviáveis. Seguindo a metodologia proposta pelo *Product Quality Research Institute* (PQRI), qualquer composto acima de um limiar de avaliação denominado *Analytical Evaluation Threshold* (AET), que deve ser identificado e relatado ao toxicologista para avaliação específica de impacto ao produto⁵.

Experimental

O sistema de embalagem completo, e a nomenclatura referente a cada componente do material de embalagem analisado, são indicados na Figura 1.

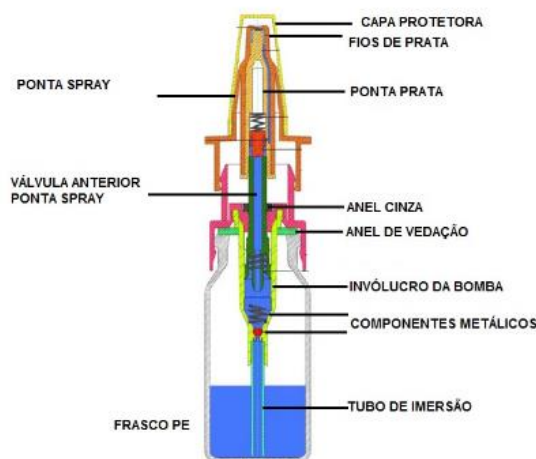


Figura 1 – Sistema de embalagem do spray nasal, adaptado ⁶

As vidrarias empregadas para preparação e análise dos extratos foram previamente descontaminadas em solução de ácido nítrico 5%. Os extratos foram obtidos por refluxo em carrossel (Radleys12 Plus) acoplado à banho termostático (Alpha RA8) a 90°C durante 3 horas, a partir dos componentes individuais em 20mL de isopropanol, sendo 1 componente inteiro por frasco e um branco para controle, conforme figura 2. Após término da extração, os extratos foram concentrados até secura e diluídos em 1mL de solução padrão de Bisfenol A com concentrações entre 1,5 e 67 µg/mL, de acordo com o AET requerido para cada componente.

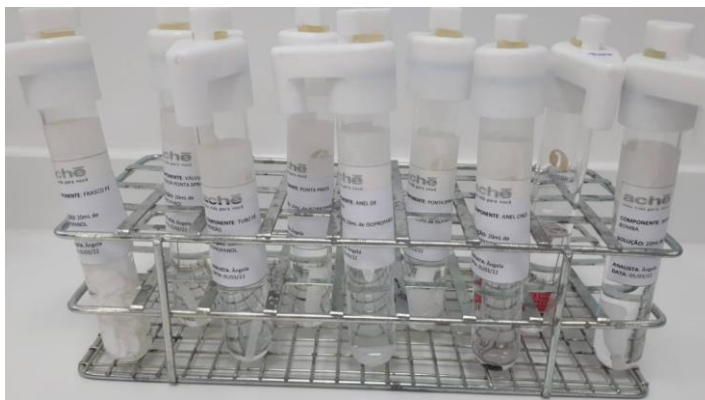
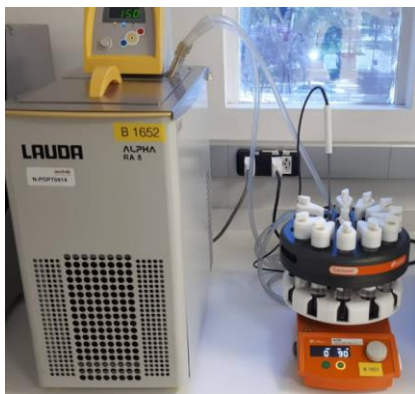


Figura 2 – Preparação dos extratos em carrossel dos componentes individuais da embalagem primária de um spray nasal em isopropanol

Cada extrato foi analisado individualmente por injeção direta em Cromatógrafo a gás Agilent 7890B Series GC (Agilent Santa Clara, CA, USA) acoplado a detector de massas 5977B Quadrupolo (Agilent Santa Clara, CA, USA) e equipado com coluna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). As condições cromatográficas seguiram conforme descrito: 40°C por 1 minuto, com aquecimento subsequente de 12°C/minuto até 320°C, manteve-se esta temperatura final por 15 minutos; gás de arraste Hélio fluxo de 1,2 mL/minuto; temperatura do injetor de 300°C; modo *splitless*, *liner* 250µL, temperatura da linha de transferência 320°C, fonte de ionização por

elétrons 70 eV, temperatura da fonte 300°C, temperatura do quadrupolo 150°C, intervalo de detecção do MS 33-650 (m/z).

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado de acordo com Dool e Kratz⁷, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma Aldrich, C8-C40) submetidas às mesmas condições de análise cromatográfica das amostras. A identificação dos compostos semivoláteis foi realizada através da comparação dos índices de retenção, espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Wiley 2014) e literatura^{8,9}.

A avaliação de toxicidade para os compostos identificados foi feita através do software de predição *in silico* Derek e Sarah Nexus[®] da Lhasa Limited (Leeds, Reino Unido, Nexus 2.3.0).

Resultados e discussão

A Tabela 1 contém a composição química e a classificação atribuída pelo *International Council for Harmonisation* guia M7 (ICH M7), que trata da avaliação e controle de impurezas reativas de DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o potencial cancerígeno¹⁰.

As substâncias semivoláteis estão presentes no extrato de isopropanol, dos componentes individuais do material de embalagem, reportadas acima do AET, considerando-se o *Safety Concern Threshold* (SCT) de 0,15 µg/dia.

Os compostos majoritários presentes na maioria dos componentes individuais do sistema de embalagem são hidrocarbonetos alifáticos hexadecano, octadecano, eicosano, docosano, tetracosano, hexacosano e octacosano, seguidos dos ácidos graxos, ácido palmítico e ácido esteárico, e um monômero cíclico do Nylon-6, 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona.

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear.

Composto	IR ^a	IR _{Lit.} ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem							
				% Área							
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS
Dietilenoglicol	969	941	*	0,84	-	-	-	-	-	-	-
Tetradecano	1402	1400	5	6,24	-	-	-	-	-	-	-
Pentadecano	1501	1500	5	0,72	-	-	-	-	-	-	-
NI	1544	-	-	-	1,66	-	-	-	-	-	1,04
Hexadecano	1601	1600	5	11,71	-	3,20	2,98	-	2,92	-	2,96
Heptadecano	1701	1700	5	0,81	-	-	-	-	-	-	-
NI	1715	-	-	-	1,35	-	-	-	-	-	1,44
NI	1745	-	5	-	-	-	-	-	-	-	1,25
NI	1758	-	-	-	2,19	-	-	-	-	1,70	3,19
NI	1773	-	5	0,57	-	-	-	-	-	-	0,56
NI	1781	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,59
Octadecano	1802	1800	5	11,70	3,98	8,84	4,29	-	10,80	-	3,12
Palmitato metila	1929	1925	5	-	-	-	-	-	0,56	-	-

^aÍndice de Retenção Calculado, ^bÍndice de Retenção da Literatura, PE: frasco de polietileno, TI: tubo de imersão, IB: invólucro da bomba, AV: anel de vedação, AC: anel cinza, VPS: válvula da ponta do spray, PP: ponta próxima ao fio de prata, PS: ponta spray, NI: não identificado, *Não se enquadra no escopo do ICH M7 (*International Council for Harmonisation*), para avaliação e controle de impurezas reativas de DNA (mutagênicas) em produtos farmacêuticos para limitar o potencial cancerígeno.

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear. (Cont.)

Composto	IR ^a	IRLit. ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem							
				% Área							
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	OS
2,6,10,15-tetrametil-heptadecano	1930	1914	5	-	-	-	-	-	-	-	1,15
7,9-Di- <i>terc</i> -butil-1-oxaspiro(4.5)deca-6,9-dieno-2,8-diona	1934	1929	5	-	-	-	-	-	-	-	0,55
3-[3,5- <i>bis</i> (1,1-dimetiletil)-4-hidróxi-fenil]-propionato de metila	1954	1943	5	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Ácido palmítico	1961	1962	5	2,86	1,67	1,53	-	-	-	1,99	7,60
NI	1972	-	5	-	-	-	-	-	-	2,05	-
NI	1974	-	-	0,58	3,60	1,19	-	-	-	-	3,11
NI	1988	-	-	-	1,81	-	-	-	-	-	1,80
NI	1997	-	-	0,68	-	1,32	-	-	-	1,90	0,91
Eicosano	2002	2000	5	9,00	2,19	11,34	-	-	13,92	-	1,65
NI	2010	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,74
NI	2020	-	5	-	-	-	-	-	-	-	0,83
2-metil-eicosano	2066	2063	5	-	1,60	-	-	-	-	-	-
NI	2082	-	-	3,02	-	-	-	-	-	-	-
Estearato de metila	2131	2130	5	-	-	0,99	-	-	1,04	-	-
NI	2145	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,39
Ácido esteárico	2169	2180	5	4,04	-	1,99	-	-	-	-	11,23
NI	2177	2171	-	-	1,44	-	-	-	-	-	0,72
NI	2187	-	-	-	2,15	-	-	-	-	-	2,84
Docosano	2201	2200	5	6,46	2,05	10,11	-	-	14,11	-	1,86
NI	2209	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,69
2-Hidroxietil-palmitato	2245	2220	5	-	-	-	-	-	-	-	3,99
NI	2258	-	-	-	-	-	-	-	2,32	-	-
1,8-Diaza-ciclotetradecano-2,7-diona	2278	-	3	1,96	20,16	4,95	10,57	-	-	23,38	6,04
Tricosano	2300	2300	5	-	2,72	1,27	-	-	-	-	0,55
7-hexil-eicosano	2359	2542	5	-	-	-	-	-	-	-	0,72
NI	2375	-	-	-	-	-	-	-	0,85	-	-
NI	2391	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58
Tetracosano	2404	2400	5	6,44	-	11,16	-	-	14,01	-	1,59
NI	2415	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,83
NI	2429	-	-	3,08	-	-	-	-	-	-	0,55
NI	2443	-	-	-	-	-	-	-	-	1,79	-
NI	2449	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5,43
7-hexil-docosano	2465	2542	5	-	-	-	2,91	-	-	-	-

Tabela 1. Compostos semivoláteis identificados em CG-EM pela biblioteca de espectros de massa e índice de retenção linear. (Cont.)

Composto	IR ^a	IRLit. ^b	Classe ICH M7	Parte da Embalagem							
				% Área							
				PE	TI	IB	AV	AC	VPS	PP	PS
NI	2539	-	-	-	-	-	-	-	-	1,69	-
NI	2576	-	-	-	-	-	-	-	0,86	-	-
Hexacosano	2604	2600	5	3,86	-	8,08	-	-	11,68	-	-
NI	2611	-	-	-	2,94	-	-	-	-	-	0,85
NI	2630	-	-	-	-	-	-	-	-	1,97	-
11-decil-tetracosano	2667	-	5	-	1,38	-	3,13	-	-	-	-
Heptacosano	2706	2700	5	2,35	-	-	-	-	-	-	-
β-monoestearato de glicerila	2727	2697	5	-	-	0,83	-	-	-	-	-
NI	2777	-	-	-	-	-	-	-	0,69	-	-
Octacosano	2803	2800	5	3,13	-	5,94	-	-	8,87	-	-
NI	2815	-	-	-	-	-	-	-	-	1,67	-
NI	2828	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,70
NI	2856	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,81
NI	2911	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,50
NI	2947	-	-	1,65	-	-	-	-	-	-	-
NI	2978	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-
Triacotano	3005	3000	5	2,16	-	4,10	-	-	6,36	1,78	-
NI	3042	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,58
NI	3070	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,16
NI	3172	-	-	0,78	-	-	-	-	-	-	-
Dotriacontano	3205	3200	5	1,42	-	2,59	-	-	4,30	-	-
NI	3385	-	-	0,68	-	-	-	-	-	-	-
Tetatriacontano	3405	3400	5	0,83	-	1,20	-	-	2,28	-	-
Fosfito de tris(2,4- <i>terc</i> -butilfenila)	3453	3397	5	-	-	-	-	-	-	11,87	-
Hexatriacontano	3602	3600	5	-	-	-	-	-	1,19	-	-
NI	3609	-	-	0,54	-	-	-	-	-	-	-
NI	3614	-	-	0,61	4,97	1,59	6,51	-	-	2,77	-
NI	3619	-	-	-	-	1,37	-	-	-	1,84	-

A predição toxicológica *in silico* permite uma classificação dos diferentes compostos com respeito ao potencial mutagênico e carcinogênico, baseada nas diretrizes do ICH M7¹⁰. Nesta avaliação, todos os compostos encontrados foram classificados como classe 5, exceto para 1,8-Diazacicotetradecano-2,7-diona, pertencente à classe 3, e dietilenoglicol que é conhecidamente carcinogênico, mas não mutagênico, ou seja, não se enquadra no escopo do ICH M7 e deve ser controlado no limite da dose tóxica mediana (TD₅₀) de 849 mg/Kg/dia¹¹. Todos os compostos devem ser investigados no medicamento como potenciais lixiviáveis, levando-se em conta que os dados obtidos são provenientes de um estudo de extração controlada representativo de pior caso.

Conclusões

A análise dos compostos semivoláteis presentes no material de embalagem primária de um spray nasal, identificou a presença de 55 compostos, sendo majoritários os hidrocarbonetos alifáticos, seguidos de ácidos graxos e um monômero cíclico do Nylon-6.

A avaliação de toxicidade dos compostos semivoláteis identificados, foi obtida através da predição *in silico*, indicando que a maioria dos compostos não possuem alerta estrutural para mutagenicidade, ou seja, classe 5. O composto 1,8-diaza-ciclotetradecano-2,7-diona, foi classificado como classe 3 e o composto dietilenoglicol é conhecido como carcinogênico, mas não mutagênico, ou seja, não se enquadra no escopo do ICH M7 e deve ser controlado no limite de TD₅₀ 849 mg/Kg/dia, sendo a dose administrada capaz de provocar toxicidade em 50% dos casos. Todos os compostos serão investigados no medicamento como potenciais lixiviáveis, uma vez que os dados obtidos são provenientes de um estudo de extração controlada, sendo neste estudo um extrato orgânico representativo de pior caso.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do Aché Laboratórios Farmacêuticos, Agilent Technologies do Brasil e Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Referências

1. Jenke, D. et al. *PDA J Pharm Sci and Tech* **2017**, 71, 68.
2. Rodriguez, L. C. et al. *Int. J. Pharm.* **2020**, 583. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2020.119332>.
3. Jenke, D. et al. *PDA J Pharm Sci and Tech* **2013**, 67, 448-511.
4. Moyer, K. L., et al. *Specification of Drug Substances and Products : Extractables and Leachables*. Oxford : Elsevier **2020**. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102824-7.00020-8>
5. Broschard, T. et al. *Regul Toxicol. Pharmacol.* **2016**, 81, 201-211
6. Klocker, N., et al. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, 489-493.
7. Dool, V. D. H., Kratz, P. D. *J. Chromatogr. A* **1963**, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
8. Adams, R. P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography Mass Spectrometry*. Academic Press: New York **2007**. ISBN 978-1-932633-21-4
9. NIST. National Institute of Standards and Technology. US. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov>, disponível em outubro de 2022.
10. <https://www.ema.europa.eu/en/ich-m7-assessment-control-dna-reactive-mutagenic-impurities-pharmaceuticals-limit-potential>, disponível em outubro de 2022.
11. Fitzhugh, O. G., Nelson A. A. *J. Ind. Hyg Toxicol.* **1946**, 28, 40-43.

AVALIAÇÃO DE MODELOS *IN VIVO* DE CAQUEXIA ONCOLÓGICA INDUZIDA POR XENOTRANSPLANTE DE CÉLULAS DE NEUROBLASTOMA EM CULTURAS 2D E 3D

Gabriela E. Sbardellotto^{1,2*}, Lara M. F. Guimarães^{2*}, Claudiana Lameu^{2*}

1 – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

esteves.gabriela@usp.br

Resumo: Caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial que se desenvolve frequentemente em quadros clínicos crônicos como no câncer. O quadro caquético está associado à perda de peso corporal acentuada, estresse psicológico, incapacidade física e diminuição da qualidade de vida, por isso é responsável por piorar o prognóstico dos pacientes. Com o objetivo de melhorar a compreensão da caquexia oncológica, estudamos dois modelos experimentais utilizando camundongos imunodeficientes BALB/c nude xenoenxertados com a linhagem celular de neuroblastoma humano SH-SY5Y em culturas 2D (monocamada) ou 3D (tumoresferas). Foi observada significativa perda de peso nos grupos xenotransplantados quando comparado com o grupo controle (sem tumor), que não foi revertida, apesar da aumentada ingestão de ração pelos animais do grupo tumoresferas. O desenvolvimento tumoral do grupo 3D foi mais lento e gradual do que o do grupo 2D, possibilitando um maior tempo para o estabelecimento da síndrome caquética. A perda de massa do tecido adiposo branco (TAB) e do fígado foi significativa nos grupos portadores de xenoenxerto em comparação ao grupo controle; já a perda de massa muscular esquelética tibialis anterior foi significativa apenas no grupo tumoresferas. Nossos dados indicam que os modelos de xenoenxerto de monocamada e tumoresferas induzem quadros caquéticos-like de estágios distintos, moderado e severo, respectivamente. Nós sugerimos que essa diferença seja devido a presença de células fenotipicamente diferentes na massa tumoral a depender do modo de cultura empregado para desenvolvimento do tumor e indução do quadro caquético.

Palavras-chave: *caquexia; modelos; neuroblastoma.*

Evaluation of in vivo models of cancer-induced cachexia via neuroblastoma cell xenograft in 2D and 3D cultures

Abstract: Cachexia is a multifactorial metabolic syndrome that often develops in chronic conditions such as cancer. The cachectic picture is associated with marked body weight loss, psychological stress, physical disability and decreased quality of life, which is why it is responsible for worsening the prognosis of patients. To improve the understanding of oncological cachexia, we studied two experimental models using immunodeficient BALB/c nude xenografted mice with the human neuroblastoma cell line SH-SY5Y in 2D (monolayer) or 3D (tumorspheres) cultures. Significant weight loss was observed in the xenotransplanted groups when compared to the control group (no tumor), which was not reversed, despite the increased feed intake by the animals in the tumorsphere group. Tumor development in the 3D group was slower and more gradual than that in the 2D group, allowing a longer time for the establishment of cachectic syndrome. The loss of white adipose tissue (WAT) and liver mass was significant in the xenograft-bearing groups compared to the control group; the loss of tibialis anterior skeletal muscle mass was significant only in the tumorsphere group. Our data indicate that the monolayer and tumorsphere xenograft models induce cachectic-like conditions of distinct, moderate and severe stages, respectively. We suggest that this difference is due to the presence of phenotypically different cells in the tumor mass, depending on the culture method used for tumor development and cachectic induction.

Keywords: *cachexia; models; neuroblastoma.*

Introdução

A caquexia é uma síndrome metabólica multifatorial que se desenvolve frequentemente em quadros clínicos crônicos, como o câncer. O quadro caquético atinge grande parte dos pacientes oncológicos e é responsável por piorar o prognóstico, sendo responsável direto pelo óbito de 22% desses pacientes. A caquexia está associada à perda de tecido muscular, onde a perda de tecido adiposo pode, ou não, ocorrer, resultando em perda de peso corporal acentuada, estresse psicológico, incapacidade física e diminuição da qualidade de vida^{1, 2, 3}.

Considerando cada vez mais a necessidade de se entender e estudar a caquexia no câncer, modelos pré-clínicos têm sido propostos. Um modelo de grande relevância é o modelo com xenoinxertos de tumores humanos ou linhagens tumorais, os quais possibilitam a criação de um microambiente tumoral próximo ao do presente no paciente humano⁴.

Muitos estudos relatam o envolvimento das células-tronco tumorais (cancer stem cells – CSCs) na agressividade do tumor⁵. As CSCs são células capazes de se auto renovar, de se diferenciar em várias células especializadas diferentes, de migrar e invadir outros tecidos para formar metástases^{6,7}. Células tumorais cultivadas em suspensão e na presença de fatores de crescimento formam tumoresferas, um modelo 3D *in vitro* que enriquece a cultura com CSCs. Os modelos 3D são capazes de apresentar uma maior heterogeneidade celular, o que condiz melhor com a realidade do tumor⁴. Essas culturas de células 3D apresentam diferenças tanto morfológicas quanto fisiológicas quando comparadas às culturas de células 2D que crescem em monocamada⁸, além de reproduzirem condições mais severas como uma maior resistência às drogas anticâncer, por exemplo⁹.

Experimental

Cultivo Celular

Foi cultivada em laboratório a linhagem celular derivada de neuroblastoma humano (SH-SY5Y ATCC®CRL2266TM) para posterior injeção nos animais. Para isso, utilizou-se o meio DMEM high glucose, suplementado com 10% de soro bovino fetal e 1% antibióticos (penicilina e estreptomicina). A cultura celular foi mantida a 37 °C em atmosfera 5% de CO₂ e a troca do meio foi realizada a cada três dias.

Indução de Tumoresferas

Para a indução da formação de tumoresferas, frascos T75 foram tratados previamente com ácido plurônico (2%) por 24h para evitar a adesão das células. Após o tratamento dos frascos, foram semeadas 3.10⁶ células (SH-SY5Y) por frasco utilizado por um período de 96h com meio definido (β-FGF 20 ng/ml; EGF 20 ng/ml; B27 1x e antibióticos à 1% - penicilina/estreptomicina).

Implantação dos Tumores

Para a implantação dos tumores, foram utilizados 15 camundongos machos atímicos nude (BALB/c nude) com aproximadamente seis semanas de idade. Cerca de 3X10⁶ células derivadas das culturas 2D (monocamada) e 3D (tumoresferas), foram ressuspensas em 50% Matrigel e 50% PBS e injetadas subcutaneamente nos animais.

Protocolo Experimental Animal

A experimentação animal teve aprovação da Comissão de Ética do Uso de Animais do Instituto de Química da Universidade de São Paulo (CEUA 133/2019). Os animais foram divididos em 3 grupos: nu/nu controle; nu/nu xenotransplantado com células cultivadas em cultura 2D (monocamada) e nu/nu xenotransplantados com células cultivadas em cultura 3D (tumoresferas). O consumo de água e de ração foi administrado *ad libitum*. Foi realizado o acompanhamento dos animais a cada 48h para monitoramento de peso, do consumo de alimento e do peso e tamanho tumoral assim que este se tornou visível e palpável. O experimento teve duração de 90 dias.

Eutanásia

Os camundongos foram eutanasiados com isoflurano assim que atingiram o ponto final humanitário (endpoint), estabelecido pela IACUC. O endpoint humanitário foi calculado com base no volume tumoral, surgimento de úlceras, peso e análise comportamental de cada animal. Após a eutanásia do animal, foi realizada a perfusão com PBS seguida de PFA nos animais para preservação e armazenamento dos órgãos e tecidos. Em seguida, realizou-se a coleta dos órgãos (mantidos em paraformaldeído numa temperatura de aproximadamente 4 °C) para posterior análise.

Resultados e Discussão

Os três grupos analisados iniciaram o período do experimento com um peso médio de aproximadamente 24,5 g. No decorrer dos dias após a injeção das células tumorais, foi possível observar que o grupo controle manteve um maior peso com média de $28,71 \text{ g} \pm 0,2307$, enquanto os grupos monocamada e tumoresferas mantiveram uma média de $27,64 \text{ g} \pm 0,2101$ e $27,30 \text{ g} \pm 0,2133$, respectivamente. A partir da análise dos dados, obteve-se um p-valor $\leq 0,05$ entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados, ou seja, verificou-se uma diferença significativa na variação de peso. As médias do grupo controle, monocamada e tumoresferas com seus respectivos erros padrão foram: $5,104 \text{ g} \pm 0,1057$, $4,877 \text{ g} \pm 0,09655$ e $5,325 \text{ g} \pm 0,1277$. Apesar da maior média de ingestão de ração pelo grupo tumoresferas, quando esse valor é relacionado com a variação de peso apresentada acima, é possível dizer que o maior consumo de alimento não foi capaz de atenuar o efeito da perda de peso apresentado pelo grupo. A partir da análise dos dados, obteve-se um p-valor $\leq 0,05$ entre o grupo tumoresferas e o grupo monocamada, ou seja, verificou-se uma diferença significativa na ingestão de ração. Na comparação entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados, obteve-se um p-valor não significativo. Os resultados obtidos encontram-se na **Figura 1**.

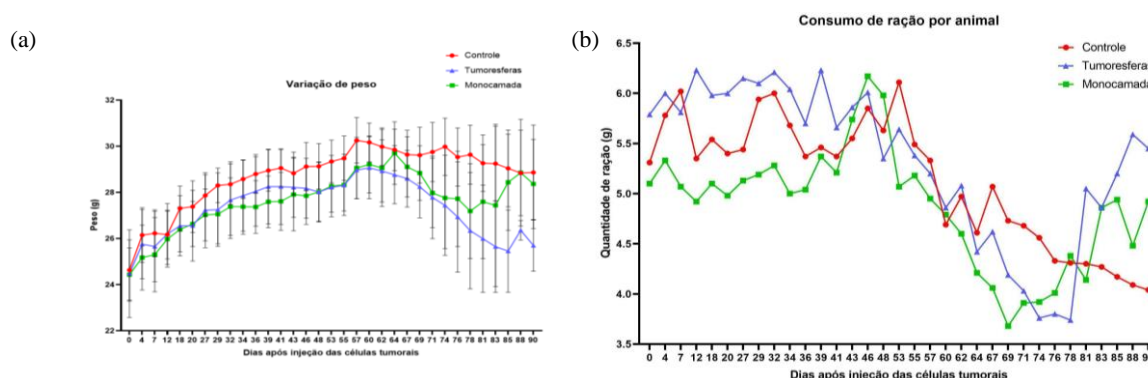


Figura 1 - Valores do peso (a) e ingestão alimentar (b) obtidos dos grupos controle (vermelho), 3D (azul) e 2D (verde). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis e pós-teste de Dunn e foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$; $n = 5$ em cada grupo.

A análise do volume e do peso tumoral foi realizada para comparar o desenvolvimento tumoral dos grupos monocamada e tumoresferas. Após a injeção da mesma quantidade de células tumorais nos dois grupos, foi possível observar que o tumor se tornou visível e palpável em torno do 39º dia para o grupo monocamada, enquanto que, para o grupo tumoresferas, o tumor teve um desenvolvimento mais lento e gradual, tornando-se visível e palpável apenas a partir do 62º dia. Além disso, o volume médio atingido pelos tumores no grupo monocamada ($840,6 \text{ mm}^3 \pm 138,0$) foi bem maior do que o volume médio atingido pelos tumores no grupo tumoresferas ($327,5 \text{ mm}^3 \pm 81,89$). A partir do 83º dia, é possível notar que houve uma queda significativa no valor médio do volume tumoral do grupo monocamada. Isso ocorreu pois os animais atingiram o ponto final humanitário e foram eutanasiados, diminuindo o valor médio do grupo. Portanto, é possível dizer que o grupo monocamada foi eutanasiado principalmente por fatores de tamanho e aparência tumoral do que pelo fator peso. A partir da análise dos dados, obteve-se um valor-p significativo apenas para o parâmetro volume tumoral. Quanto ao peso, não houve variação significativa. Os resultados encontrados estão representados na **Figura 2**.

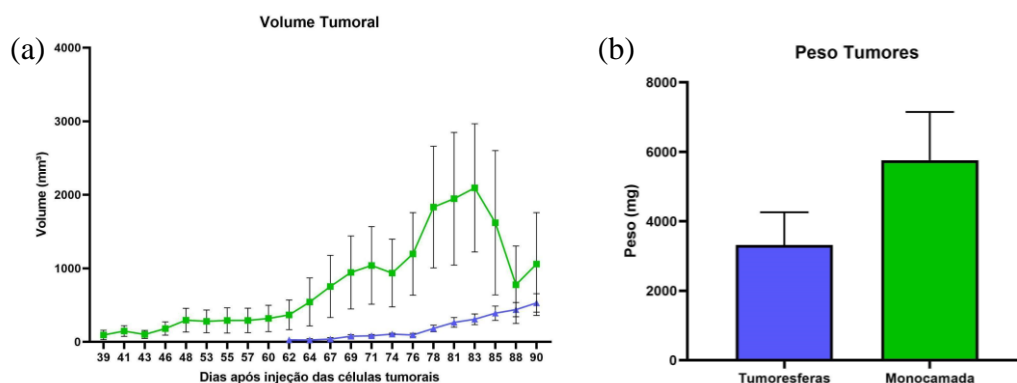
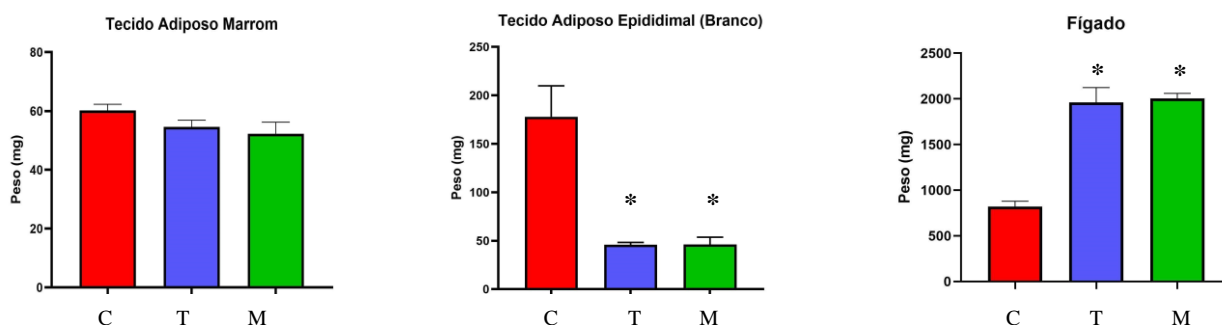


Figura 2 - Efeito dos diferentes tipos de cultura celular no surgimento e crescimento tumoral in vivo. (A) Volume tumoral [$\frac{1}{2}$ (comprimento \times largura²), mm³]. As linhas representam a média \pm S.E., os dados foram analisados utilizando teste de Mann-Whitney e foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$; $n = 5$ em cada grupo; (B) peso dos tumores (mg). As barras representam a média \pm S.E., os dados foram analisados utilizando teste t não pareado, e considerado estatisticamente significativo com $p \leq 0,05$; $n = 5$ em cada grupo.

Dos tecidos analisados e pesados, apenas notou-se uma diferença significativa (p -valor $\leq 0,05$) entre o grupo controle e os grupos xenotransplantados quanto ao tecido adiposo branco (TAB) e o fígado. Já com relação aos tecidos musculares esqueléticos, apenas notou-se uma diferença significativa (p -valor $\leq 0,05$) entre os grupos tumoresferas e controle no músculo tibial anterior (**Figura 3**).



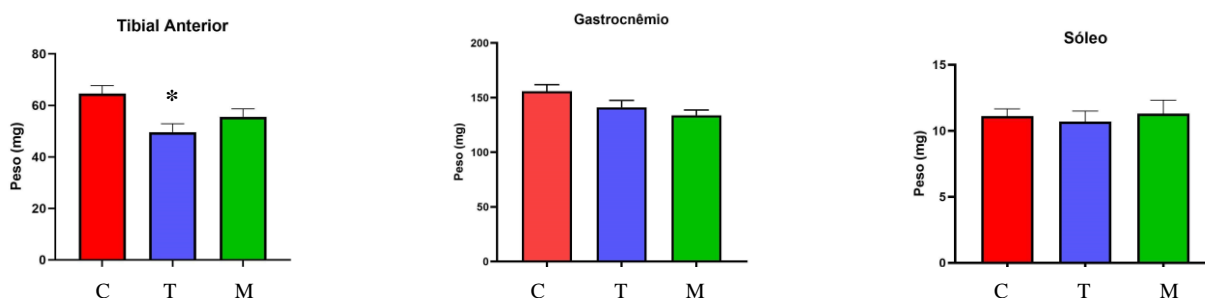


Figura 3 - Valores do tecido adiposo marrom (TAM), tecido adiposo branco (TAB), fígado, músculo tibial, músculo gastrocnêmio e músculo sóleo obtidos do controle (grupos vermelho), 3D (azul) e 2D (verde). Os dados são apresentados como média \pm erro padrão (EP) e foram analisados pelo teste One-Way ANOVA e foram considerados estatisticamente significativos quando $p \leq 0,05$; $n = 5$ em cada grupo.

Conclusões

É possível observar que no modelo de caquexia oncológica feito com células 3D teve uma perda de peso mais acentuada, o tumor teve um desenvolvimento mais lento e com menores variações de tamanho entre os tumores dos animais o que abre a possibilidade para estudar caquexia severa, provavelmente pelo maior número de CSCs na massa tumoral. Enquanto que modelo de indução de caquexia oncológica com células em 2D, embora tenha havido perda de peso significativa, a perda de massa muscular não foi observada, indicando que esse é deve ser um modelo útil para o estudo da caquexia moderada.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (processos FAPESP 2015/19128-2 e 2021/09867-3).

Referências

- Evans, W. J., Morley, J. E., Argilés, J., Bales, C., Baracos, V., Guttridge, D., ... Anker, S. D. (2008). Cachexia: A new definition. *Clinical Nutrition*, 27(6), 793–799. doi:10.1016/j.clnu.2008.06.013
- Peixoto da Silva, S., Santos, J. M. O., Costa e Silva, M. P., Gil da Costa, R. M., & Medeiros, R. (2020). Cancer cachexia and its pathophysiology: links with sarcopenia, anorexia and asthenia. *Journal of Cachexia, Sarcopenia and Muscle*. doi:10.1002/jcsm.12528;
- Argiles JM, Busquets S, Stemmler B, Lopez-Soriano FJ. Cancer cachexia: understanding the molecular basis. *Nat Rev Cancer*. 2014;14:754–62 ;
- Liu, X., & Raju, P. (2011). In Vitro Cancer Model for Drug Testing. *Comprehensive Biotechnology*, 543–549. doi:10.1016/b978-0-08-088504-9.00502-x
- ARNAUD-SAMPAIO, V. F. et al. The P2X7 Receptor in the Maintenance of Cancer Stem Cells, Chemoresistance and Metastasis. **Stem Cell Reviews and Reports**, v. 16, n. 2, p. 288–300, 2020;
- Yu, Z., Pestell, T. G., Lisanti, M. P., & Pestell, R. G. (2012). *Cancer stem cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 44(12), 2144–2151. doi:10.1016/j.biocel.2012.08.022;
- Kobayashi, N. C. C., & Noronha, S. M. R. de. (2015). *Cancer stem cells: a new approach to tumor development. Revista Da Associação Médica Brasileira*, 61(1), 86–93. doi:10.1590/1806-9282.61.01.086;
- Edmondson, R., Broglie, J. J., Adcock, A. F., & Yang, L. (2014). *Three-Dimensional Cell Culture Systems and Their Applications in Drug Discovery and Cell-Based Biosensors. ASSAY and Drug Development Technologies*, 12(4), 207–218. doi:10.1089/adt.2014.573;
- Balla, M. M. S., Yadav, H. D., & Pandey, B. N. (2019). Tumorsphere Assay Provides A Better In Vitro Method for Cancer Stem-like Cells Enrichment in A549 Lung Adenocarcinoma Cells. *Tissue and Cell*. doi:10.1016/j.tice.2019.07.003.