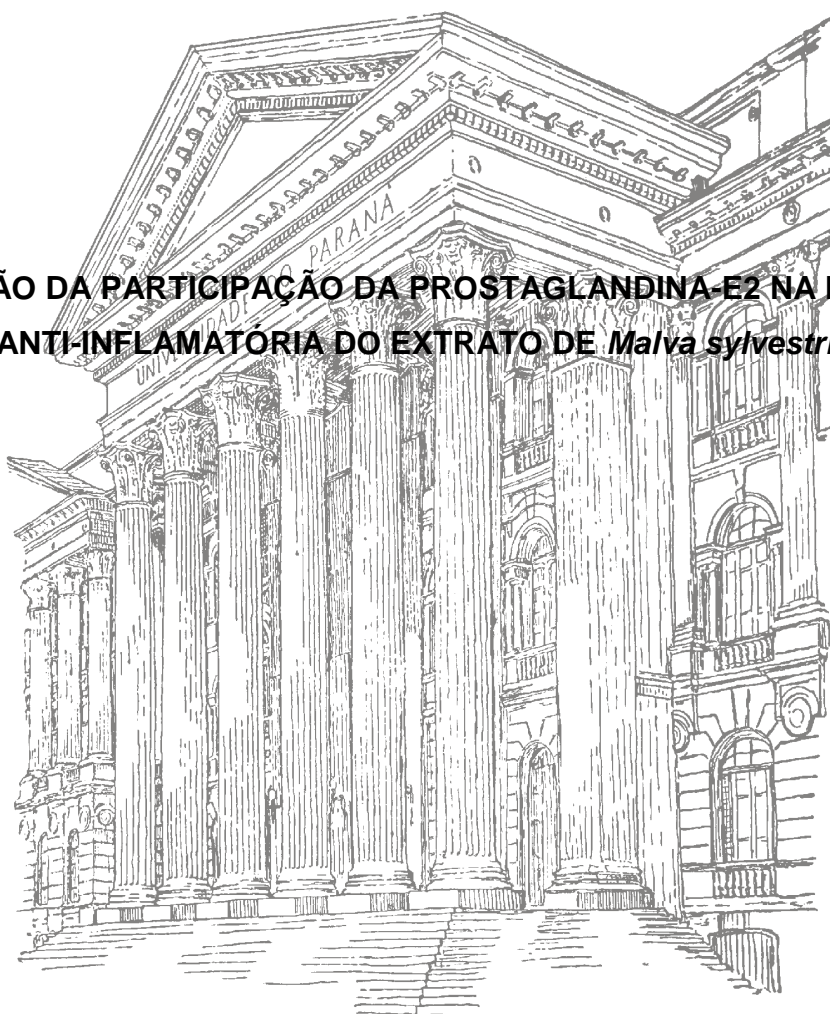


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CLEVERSON ANTONIO FERREIRA MARTINS

AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROSTAGLANDINA-E2 NA RESPOSTA  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE *Malva sylvestris*



CURITIBA  
2011

**CLEVERSON ANTONIO FERREIRA MARTINS**

**AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DA PROSTAGLANDINA-E2 NA RESPOSTA  
ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO DE *Malva sylvestris***

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração Insumos, Medicamentos e Correlatos, linha de pesquisa Produção e Qualidade, do setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Roberto Pontarolo

Co-Orientador: Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Michel Fleith Otuki

**CURITIBA  
2011**

## AGRADECIMENTOS

Agradecer a todos que auxiliaram de forma positiva no desenvolvimento desta dissertação não é uma tarefa fácil, pois vários foram os que deram a sua contribuição. Mas algumas pessoas merecem uma menção especial:

Agradeço ao meu orientador, professor Dr<sup>o</sup>. Roberto Pontarolo, pelo apoio, perseverança e otimismo em todos os momentos. Por acreditar em mim e em minha integridade pessoal, mostrando-me que o sucesso é a jornada, e não o destino. Você é demais, professor!

À querida professora Dr<sup>a</sup>. Almeriane Maria Weffort-Santos, pela coragem de me ajudar a desenvolver um trabalho num tempo relativamente curto. Agradeço também pelas suas boas idéias, por permitir que eu trabalhasse em seu laboratório e pela paciência em me ensinar.

À minha família, que me ajudou de várias maneiras, durante toda a minha vida. O incentivo e apoio incondicionais vindos de vocês sempre serão um fator motivador para mim. Obrigado!

Aos meus colegas do CEB: Flavonóide, Marcão, Consuelo, Johnny, Thaís, Carol, Cyber e Letícia. Agradeço o coleguismo e disposição em ajudar, contribuindo sempre positivamente. Palavras e atos de vocês tornaram o caminho mais fácil.

A toda a galera do laboratório de Hemato: Monique, Ju, Dani e Thais foram importantes no desenvolvimento do trabalho. Sempre me orgulharei de ter dividido o fluxo laminar com vocês.

Agradeço a contribuição dos professores Dr<sup>o</sup>. Michel F. Otuki e Dr<sup>a</sup>. Daniela de Almeida Cabrini, bem como de seus alunos, que colaboraram na realização de estudos prévios a este trabalho e também no fornecimento de folhas de *Malva sylvestris* e de padrões de PGE<sub>2</sub>.

Agradeço também a alguns professores que contribuíram e ajudaram de forma bastante significativa: Dr<sup>a</sup>. Tania Maria Bordin Bonfim, Dr<sup>a</sup>. Francinete Ramos Campos, Dr. Obdúlio Gomes Miguel e Dr<sup>a</sup>. Cyntia Maria Telles Fadel-Pichet.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro.

*“Gracias a la vida, que me ha dado tanto”.*

*Violeta Parra*

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
1.1 OBJETIVO GERAL .....	3
1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	4
2.1 INFLAMAÇÃO .....	4
2.1.1 Mediadores químicos da inflamação do tipo eicosanóide .....	5
2.1.1.1 Prostaglandinas .....	6
2.1.1.1.1 PGE <sub>2</sub> .....	10
2.1.2 Inflamações orais (periodontites) .....	12
2.1.2.1 O papel da PGE <sub>2</sub> na perda óssea periodontal .....	14
2.2 O TECIDO CONJUNTIVO E AS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA DOENÇA PERIODONTAL .....	17
2.2.1 Macrófagos .....	17
2.2.1.1 Macrófagos derivados de monócitos U937 .....	18
2.3 CULTIVOS CELULARES .....	21
2.4 PLANTAS MEDICINAIS COM USO NA ODONTOLOGIA .....	22
2.4.1 <i>M. sylvestris</i> .....	23
2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO DO TIPO EICOSANÓIDE .....	25
2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrômetro de massas .....	26
2.5.1.1 Fontes de ionização .....	28
2.5.1.2 Analisadores de amostra .....	30
2.5.1.3 Detectores .....	32
2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS .....	32
2.6.1 Especificidade e seletividade .....	33
2.6.2 Linearidade e intervalo .....	34
2.6.3 Precisão .....	35
2.6.4 Exatidão .....	36
2.6.5 Limite de Detecção (LD) .....	37
2.6.6 Limite de Quantificação (LQ) .....	37
2.6.7 Robustez .....	37

2.6.8 Estabilidade.....	38
2.6.9 Recuperação.....	38
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>40</b>
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	40
3.2 PREPARO DO EXTRATOS POR MACERAÇÃO .....	40
3.2.1 Preparo das soluções de extrato de <i>M. sylvestris</i> .....	41
3.2.2 Perfil cromatográfico do extrato por CLAE-UV .....	41
3.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> DO MEIO DE CULTIVO CELULAR.....	42
3.3.1 Procedimento de extração de prostaglandinas de meio de cultivo celular .....	46
3.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PGE <sub>2</sub> POR CLAE-EM/EM.....	46
3.4.1 Instrumentação.....	46
3.4.2 Preparo de padrões de PGE <sub>2</sub> e PGB <sub>2</sub> -d4.....	47
3.4.3 Desenvolvimento do método.....	47
3.4.3.1 Infusão direta no EM .....	47
3.4.3.2 Otimização automática do equipamento por <i>MRM</i> .....	48
3.4.3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA) .....	48
3.4.3.4 Análise por CLAE-EM/EM .....	49
3.4.4 Validação do método.....	50
3.4.4.1 Seletividade.....	50
3.4.4.2 Limite de detecção (LD) .....	51
3.4.4.3 Limite de Quantificação (LQ).....	51
3.4.4.4 Linearidade.....	52
3.4.4.5 Precisão .....	53
3.4.4.6 Exatidão .....	54
3.4.4.7 Robustez .....	54
3.4.4.8 Recuperação .....	55
3.4.4.9 Estabilidade.....	56
3.4.4.9.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento da matriz .....	56
3.4.4.9.2 Estabilidade de curta duração .....	57
3.4.4.9.3 Estabilidade de longa duração.....	57

3.4.4.9.4 Estabilidade pós-processamento .....	58
3.4.4.9.5 Estabilidade das soluções de trabalho .....	58
3.5 CÉLULAS DA LINHAGEM U937 .....	59
3.5.1 Indução da produção de PGE <sub>2</sub> por células U937-d .....	59
3.5.1.1 Obtenção de meio condicionado de <i>E. coli</i> .....	60
3.5.2 Avaliação da viabilidade e da proliferação celular .....	61
3.5.3 Avaliação do efeito de extrato de <i>M. sylvestris</i> sobre a liberação de PGE <sub>2</sub> por células U937-d .....	61
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	63
4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL .....	63
4.2 PREPARO DOS EXTRATOS POR MACERAÇÃO .....	63
4.2.1 Preparo das soluções de extrato de <i>M. sylvestris</i> .....	64
4.2.2 Perfil cromatográfico do extrato por CLAE-UV .....	64
4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO MEIO DE CULTIVO CELULAR .....	66
4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM .....	68
4.4.1 Infusão direta no EM .....	68
4.4.2 Otimização dos parâmetros por <i>MRM</i> .....	70
4.4.3 Análises por Injeção em Fluxo (FIA) .....	74
4.4.4 Análises por CLAE-EM/EM .....	74
4.4.5 Validação do método de CLAE-EM/EM .....	81
4.4.5.1 Seletividade .....	81
4.4.5.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) .....	83
4.4.5.3 Linearidade .....	84
4.4.5.4 Precisão .....	85
4.4.5.4.1 Repetibilidade .....	85
4.4.5.4.2 Precisão intermediária .....	86
4.4.5.5 Exatidão .....	86
4.4.5.6 Robustez .....	89
4.4.5.7 Recuperação .....	92
4.4.5.8 Estabilidade .....	92
4.4.5.8.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento da matriz .....	93
4.4.5.8.2 Estabilidade de curta duração .....	94



4.4.5.8.3 Estabilidade de longa duração .....	97
4.4.5.8.4 Estabilidade pós-processamento .....	98
4.4.5.8.5 Estabilidade das soluções de trabalho .....	100
4.5 CÉLULAS DA LINHAGEM U937 .....	102
4.5.1 Indução da produção de PGE <sub>2</sub> por células U937-d .....	103
4.5.2 Avaliação da viabilidade e da proliferação celular .....	105
4.5.3 Avaliação do efeito do extrato de <i>M. sylvestris</i> sobre a liberação de PGE <sub>2</sub> por células U937-d .....	108
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>112</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>113</b>

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 -	PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO PERIODONTO SAUDÁVEL E NA PERIODONTITE CRÔNICA.....	13
TABELA 2 -	CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> EM MEIO DE CULTIVO CELULAR, UTILIZANDO EFS.....	44
TABELA 3 -	COLONAS UTILIZADAS DURANTE O DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO.....	49
TABELA 4 -	PREPARO DE AMOSTRAS CONTENDO PGE <sub>2</sub> E PADRÃO INTERNO PGB <sub>2</sub> -d4 PARA ENSAIO DE LINEARIDADE.....	52
TABELA 5 -	PREPARO DE AMOSTRAS CONTENDO PGE <sub>2</sub> E PADRÃO INTERNO PGB <sub>2</sub> -d4 PARA ENSAIO DE PRECISÃO.....	53
TABELA 6 -	MUDANÇAS PROPOSTAS NO SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE ROBUSTEZ.....	55
TABELA 7 -	SUBSTÂNCIAS/CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O ESTÍMULO DA PRODUÇÃO DE PGE <sub>2</sub> POR CÉLULAS U937-d.....	60
TABELA 8 -	QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> , POR CLAE-UV.....	65
TABELA 9 -	PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE <sub>2</sub> E PGB <sub>2</sub> -d4.....	72
TABELA 10 -	TRANSIÇÕES MONITORADAS NA QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DA PGE <sub>2</sub> E DA PGB <sub>2</sub> -d4.....	72
TABELA 11 -	PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO.....	74
TABELA 12 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, VARIANDO A PROPORÇÃO DA FASE AQUOSA DE 65 A 55%.....	78
TABELA 13 -	GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, VARIANDO A PROPORÇÃO DA FASE AQUOSA DE 65 A 50%.....	79
TABELA 14 -	VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA A PGE <sub>2</sub> E PGB <sub>2</sub> -d4.....	83
TABELA 15 -	VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS NO ESTUDO DA LINEARIDADE DO MÉTODO DESENVOLVIDO POR CLAE-EM/EM (ESI-).....	85
TABELA 16 -	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.....	85

TABELA 17 -	COEFICIENTES DE VARIAÇÃO CALCULADOS ATRAVÉS DAS ÁREAS DE PGE <sub>2</sub> E PGB <sub>2</sub> -D4 OBTIDAS COM ANALISTAS DIFERENTES APÓS DOIS DIAS DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE.....	86
TABELA 18 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-EM/EM UTILIZANDO O MÉTODO DE ADIÇÃO DO PADRÃO.....	88
TABELA 19 -	RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ EM CLAE-EM/EM.....	90
TABELA 20 -	PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> E PGB <sub>2</sub> -d4 DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO, POR TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	92
TABELA 21 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS A CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO.....	93
TABELA 22 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO PARA MATRIZ DE VALIDAÇÃO ARMAZENADA POR 3 E 6 HORAS.....	95
TABELA 23 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO PARA MATRIZ DE VALIDAÇÃO ARMAZENADA POR 12 E 24 HORAS.....	96
TABELA 24 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO.....	97
TABELA 25 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO.....	99
TABELA 26 -	RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO.....	101
TABELA A.1 -	MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES.....	125

## LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - PRINCIPAIS AÇÕES FISIOLÓGICAS DAS PROSTAGLANDINAS PGD <sub>2</sub> , PGE <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGI <sub>2</sub> , PGE <sub>1</sub> E PGF <sub>1α</sub> QUANDO LIGADAS AOS SEUS RECEPTORES CARACTERÍSTICOS.....	8
QUADRO 2 - MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	30
QUADRO 3 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> POR CLAE-UV.....	42

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 -	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO.....	5
FIGURA 2 -	PROCESSO DE SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS.....	7
FIGURA 3 -	ESTRUTURA QUÍMICA DAS PROSTAGLANDINAS PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGI <sub>2</sub> .....	9
FIGURA 4 -	EVENTOS CELULARES ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> POR CÉLULAS ESTIMULADAS.....	11
FIGURA 5 -	MATURAÇÃO DE OSTEOCLASTOS ATRAVÉS DE RECEPTORES RANK.....	15
FIGURA 6 -	PARTES AÉREAS DA <i>Malva sylvestris</i> .....	24
FIGURA 7 -	ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA IONIZAÇÃO POR <i>ELETTROSPRAY</i> .....	29
FIGURA 8 -	ASPECTO DAS FOLHAS SECAS DE <i>Malva sylvestris</i> .....	63
FIGURA 9 -	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> .....	65
FIGURA 10 -	MÉDIAS DE RECUPERAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> DO MEIO DE CULTIVO RPMI- 1640 PELOS DIFERENTES MÉTODOS DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO EFS.....	67
FIGURA 11 -	<i>FULL SCAN</i> DOS PADRÕES DE PGE <sub>2</sub> E PGB <sub>2</sub> -d4 UTILIZANDO <i>ESI</i> / NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	70
FIGURA 12 -	ÍONS FRAGMENTOS DA PGE <sub>2</sub> OBTIDOS ATRAVÉS DE <i>MRM</i> NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	71
FIGURA 13 -	ÍONS FRAGMENTOS DA PGB <sub>2</sub> -d4 OBTIDOS ATRAVÉS DE <i>MRM</i> NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO.....	71
FIGURA 14 -	MECANISMOS DE FORMAÇÃO DOS ÍONS-FILHOS (FRAGMENTOS) DA PGE <sub>2</sub> .....	73
FIGURA 15 -	CROMATOGRAMA DA PGE <sub>2</sub> (Tr: 4,49 min) E DA PGB <sub>2</sub> -d4 (Tr: 5,97 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL ACETONITRILA/ÁGUA/AFO (50:50:0,1 v/v/v) EM MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO.....	76
FIGURA 16 -	CROMATOGRAMA DA PGE <sub>2</sub> (Tr: 12,95 min) E DA PGB <sub>2</sub> -d4 (Tr: 36,97 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL ACETONITRILA/ÁGUA/AFO (30:70:0,1 v/v/v) EM MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO.....	77

FIGURA 17 - CROMATOGRAMA DA PGE <sub>2</sub> (Tr: 6,24 min) E DA PGB <sub>2</sub> -d4 (Tr: 13,09 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO.....	78
FIGURA 18 - CROMATOGRAMA DA PGE <sub>2</sub> (Tr: 6,29 min) E DA PGB <sub>2</sub> -d4 (Tr: 10,59 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO.....	80
FIGURA 19 - CROMATOGRAMA DO MEIO RPMI-1640 COMPLETO (A); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO ISENTA DE PADRÃO INTERNO (B); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM PADRÃO INTERNO (C); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM 5,0 ng/mL de PGE <sub>2</sub> e 50 ng/mL DE PGB <sub>2</sub> -d4 (D); PADRÕES ANALÍTICOS EM SOLUÇÃO (E).....	82
FIGURA 20 - LINEARIDADE DA PGE <sub>2</sub> OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM.....	84
FIGURA 21 - FENÓTIPOS DAS CÉLULAS U937, ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO AO PMA.....	102
FIGURA 22 - AUMENTO NA PRODUÇÃO DE PGE <sub>2</sub> POR DESFERROXAMINA E 17-β-ESTRADIOL EM CÉLULAS U937-d, QUANDO COMPARADAS AO GRUPO CONTROLE.....	104
FIGURA 23 - IMAGEM OBSERVADA AO MICROSCÓPIO ÓTICO REPRESENTANDO CÉLULAS U937-d EXPOSTAS AO CORANTE AZUL DE TRYPAN.....	105
FIGURA 24 - EFEITO <i>IN VITRO</i> DE SUBSTÂNCIAS ESTIMULANTES (A), EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> (B), EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> ASSOCIADO A DESFERROXAMINA 400 μM (C), E EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> ASSOCIADO A 17-β-ESTRADIOL 40 nM (D) SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS U937-d.....	107
FIGURA 25 - EFEITO DO EXTRATO DE <i>M. sylvestris</i> (10 μg/mL) SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE <sub>2</sub> EM CÉLULAS U937-d.....	109

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ACN	- Acetonitrila
AcOEt	- Acetato de Etila
AFO	- Ácido Fórmico
AINES	- Anti-inflamatório não-esteroidal
AMPc	- Adenosina monofosfato cíclica
ANVISA	- Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	- Ionização Química à Pressão Atmosférica
BHT	- Butilhidróxidotolueno
°C	- Graus Celsius
C5a	- Fragmento do sistema complemento que atua como agente quimiotático para neutrófilos
CAD	- Gás de colisão
CE	- Energia de colisão
CEP	- Potencial de Entrada da célula de colisão
CG	- Cromatografia Gasosa
CLAE	- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-EM/EM	- CLAE acoplado à espectrometria de massas <i>Tandem</i>
CO <sub>2</sub>	- Gás Carbônico
COX	- Ciclooxygenase
cPLA <sub>2</sub>	- Fosfolipase A2 citosólica
Cps	- Contagens por segundo
CUR	- Gás de Curtina
CV%	- Coeficiente de Variação
CXP	- Potencial da célula de saída
Cyp	- Citocromo-oxidase
d.C	- Depois de Cristo
Da	- Dalton
DP	- Potencial de desagregação
DPR	- Desvio Padrão Relativo
EDTA	- Ácido Etilenodiaminotetracético
EFS	- Extração em Fase Sólida
EM	- Espectrômetro de Massas
EP	- Potencial de entrada
ESI	- <i>Eletrospray</i>
FAP	- Fator de agregação plaquetária
Fc	- Parte da molécula do anticorpo que se liga ao antígeno
FIA	- Análise por Injeção em Fluxo
g	- grama
GS1	- Gás de Nebulização
GS2	- Gás Secante

Kg	- Quilograma
LPS	- Lipopolissacarídeo
LOX	- Lipooxigenase
MeOH	- Metanol
MPO	- Mieloperoxidase
MRM	- Monitoramento de Reações Múltiplas
<i>m/z</i>	- Relação massa/carga
NAG	- N-acetil-glicosaminidase
NO	- Óxido Nítrico
IL	- Interleucina
INMETRO	- Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IS	- Voltagem do capilar
IUPAC	- União Internacional de Química Pura e Aplicada
PBS	- Tampão fosfato-salino
PGE <sub>2</sub>	- Prostaglandina-E2
PLA <sub>2</sub>	- Fosfolipase A2
PMA	- Forbol 12-miristato 13-acetato
p:p	- peso:peso
<i>R</i>	- Coeficiente de correlação linear
RDC	- Resolução da Diretoria Colegiada
RE	- Resolução Específica
ROS	- Espécies reativas de oxigênio
RPM	- Rotações por minuto
SFB	- Soro Fetal Bovino
TBME	- Terc-Butil-Metil-Éter
TOF	- Tempo de Vôo
UV	- Ultra violeta
V	- Volts



## RESUMO

A *Malva sylvestris* é uma planta tradicionalmente utilizada como alternativa para terapias anti-inflamatórias há vários séculos. É relatada como capaz de reduzir edemas e aliviar a dor, sendo indicada principalmente contra afecções de boca e garganta, como nas dores de dente e inflamações de gengiva. Dessa forma, possui uso potencial na odontologia contra a periodontite, uma doença de alta prevalência e que pode levar à perda do dente. Apesar do uso disseminado desta planta, pouca informação se tem a respeito de seu mecanismo de ação. Modelos de estudo *in vitro* de periodontite utilizam células derivadas da linhagem U937, as quais liberam PGE<sub>2</sub>, um mediador químico que apresenta alta incidência em tecidos inflamados. Este trabalho teve como objetivo desenvolver e validar um método de detecção e quantificação de PGE<sub>2</sub> por CLAE-EM/EM, que foi utilizado na avaliação do efeito do extrato de *M. sylvestris* sobre a liberação do mediador por células derivadas de monócitos U937. A matriz de validação utilizada foi o sobrenadante de um meio de cultivo que permaneceu 24 horas em contato com as células utilizadas no estudo. As análises foram conduzidas em um sistema CLAE 1200 Agilent<sup>®</sup> acoplado a um espectrômetro de massas API 3200 Applied Biosystems<sup>®</sup>, utilizando coluna XBridge<sup>™</sup> Waters<sup>®</sup> (C18, 5 µm, 150 x 2,1 mm). A validação do método mostrou excelente linearidade ( $r = 0.9984$ ) para a curva de calibração, abrangendo concentrações de 5,0 a 500 ng/mL de PGE<sub>2</sub>. Taxas de recuperação do analito do meio de cultivo alcançaram valores superiores a 63%, valor considerado excelente tendo em vista a complexidade da matriz. A repetibilidade e a precisão intermediária do método foram consideradas adequadas, sendo encontrados valores de coeficiente de variação inferiores a 3,38% e 6,23%, respectivamente. A exatidão do método permaneceu dentro dos parâmetros aceitáveis pela RE ANVISA N<sup>o</sup> 899/03, que preconiza variações máximas de 15%. O estudo de estabilidade da PGE<sub>2</sub> sob várias condições de estresse mostrou que amostras contendo o analito se mantêm estáveis por no máximo 12 horas, quando não submetidas ao congelamento. Na avaliação *in vitro* do seu potencial anti-inflamatório, a *M. sylvestris* se mostrou capaz de reduzir em  $10,74 \pm 2,86\%$  as taxas de liberação de PGE<sub>2</sub>, quando o agente estimulante da liberação deste mediador da inflamação era a desferroxamina (400 µM).

Palavras-chave: *Malva sylvestris*, PGE<sub>2</sub>, células U937, atividade anti-inflamatória, validação de método analítico

## ABSTRACT

The *Malva sylvestris* is a plant traditionally used as an alternative to anti-inflammatory therapies for centuries. It is reported to be able to reduce swelling and relieve pain and indicated mainly against diseases of the mouth and throat, as in toothache and gum inflammation. Thus, it has potential use in dentistry against periodontitis, a disease of high prevalence, which can lead to tooth loss. Despite the widespread use of this plant, we have little information about its mechanism of action. *In vitro* study models of periodontitis using cells derived from strain U937, which release PGE<sub>2</sub>, a chemical mediator of inflammation that has high incidence in inflamed tissues. This study aimed to develop and validate a method for detection and quantification of PGE<sub>2</sub> by CLAE-EM/EM, which was used in evaluating the effect of extracts of *M. sylvestris* on the release of the inflammatory mediator PGE<sub>2</sub> by monocyte-derived U937 cells. The matrix of validation used was the supernatant of a culture medium that remained 24 hours in contact with the cells used in the study. Analyses were conducted on an Agilent® 1200 HPLC system coupled to a spectrometer Applied Biosystems® API 3200, using Waters® XBridge™ column (C18, 5 µm, 150 x 2.1 mm). The validation of the method showed excellent linearity ( $r = 0.9984$ ) for the calibration curve, with concentrations ranging from 5.0 to 500 ng/mL of PGE<sub>2</sub>. Recovery rates of the analyte from the medium reached values above 63%, which is considered excellent in view of the complexity of the matrix. The repeatability and intermediate precision of the method were considered adequate, found values of coefficient of variation less than 3.38% and 6.23% respectively. The accuracy of the method remained within acceptable parameters by RE ANVISA N. 899/03, which calls for maximum variation of 15%. The stability study of PGE<sub>2</sub> under various stress conditions showed that samples containing the analyte are stable for up to 12 hours, when not subject to freezing. *In vitro* evaluation of potential anti-inflammatory, the *M. sylvestris* has been shown to reduce by  $10.74 \pm 2.86\%$  rates of release of PGE<sub>2</sub>, when the agent stimulating the release of this inflammation mediator was deferoxamine (400 µM).

Key-words: *Malva sylvestris*, PGE<sub>2</sub>, U937 cells, anti-inflammatory activity, analytical method validation

## 1. INTRODUÇÃO

Remédios à base de plantas têm sido utilizados desde tempos remotos para o tratamento de uma infinidade de doenças (COLVARD *et al.*, 2006). Para muitas comunidades e grupos étnicos espalhados pelo mundo, o conhecimento sobre as plantas medicinais ainda representa o único recurso terapêutico (BUFFON *et al.*, 2001; PAIXÃO *et al.*, 2002).

Dentre as plantas com efeito anti-inflamatório utilizadas com base no conhecimento etnobotânico, destaca-se a *Malva sylvestris*, com ação principalmente contra afecções de boca e garganta, como nas dores de dente, inflamações de gengiva (PIERONI *et al.*, 2004), aftas (PASSALACQUA *et al.*, 2007), inflamações buco-faríngeas (NOVAIS *et al.*, 2004) e abscessos dentários (LOI *et al.*, 2004). É uma planta da família das Malváceas, citada na literatura botânica como capaz de reduzir edemas (CONFORTI *et al.*, 2008) e aliviar a dor (ESTEVES *et al.*, 2009), sendo empregada pela população na forma de infusões e decoctos, e administrada na forma de chás, enxaguatórios bucais e gargarejos (NOVAIS *et al.*, 2004; LOI *et al.*, 2004). Como a sua ação principal abrange o alívio das inflamações da mucosa oral, possui uso potencial na odontologia atuando contra a periodontite, uma doença de alta prevalência e que envolve a reabsorção de osso alveolar e perda do dente (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Contudo, apesar do uso disseminado desta planta, poucos estudos são encontrados na literatura abordando suas propriedades farmacológicas e mecanismos de ação (CONFORTI *et al.*, 2008; LODDI, 2008; SLEIMAN, DAHER, 2009; ESTEVES *et al.*, 2009).

No tecido gengival, monócitos e macrófagos são encontrados em grandes quantidades em regiões com lesões periodontais ativas, e portanto possuem um significativo papel na resposta anti-inflamatória contra periodontopatógenos (BODET; CHANDAD; GRENIER *et al.*, 2006). Estas células respondem bem a lesões, produzindo mediadores inflamatórios do tipo eicosanóide, dentre eles PGE<sub>2</sub> (TANJI *et al.*, 2001). Este mediador é o responsável pelo desenvolvimento de sinais da inflamação (como edema, calor e rubor) e também pela mobilização dos sistemas de defesa celular e humoral do organismo, incluindo quimiotaxia de leucócitos,

modulação da resposta imunológica e regulação da hiperalgisia (HARA *et al.*, 2010).

Para identificar e quantificar mediadores da inflamação do tipo eicosanóide em células *in vitro*, diversas metodologias já foram descritas por diferentes autores. Neste sentido, destaca-se a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (EM), pela sua alta sensibilidade e seletividade (BLEWETT *et al.*, 2007).

Somando os fatos acima descritos com a carência de estudos científicos a respeito do mecanismo de ação da *M. sylvestris* como anti-inflamatório, o presente trabalho visa avaliar este efeito terapêutico da planta através da incorporação de extratos em meio de cultivo de células derivadas de monócitos U937, detectando e quantificando a geração do mediador da inflamação do tipo eicosanóide PGE<sub>2</sub>, através de CLAE-EM/EM.

## 1.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a relação entre o metabólito do ácido araquidônico PGE<sub>2</sub> e a atividade anti-inflamatória do extrato de *M. sylvestris* em meio de cultivo celular, através da detecção e quantificação do mediador da inflamação por técnica de CLAE-EM/EM.

## 1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Obter extratos liofilizados de folhas de *M. sylvestris*, através da técnica da maceração, utilizando etanol como solvente;
- ✓ Desenvolver metodologia analítica de detecção e quantificação do mediador eicosanóide PGE<sub>2</sub>, por técnica de CLAE-EM/EM;
- ✓ Realizar cultivo de células derivadas da linhagem histomonocítica U937;
- ✓ Avaliar diferentes metodologias de estímulo à liberação de mediadores inflamatórios pelas células;
- ✓ Desenvolver metodologia para a recuperação do analito do meio de cultivo;
- ✓ Validar a metodologia analítica utilizada, considerando os parâmetros de “Validação para Métodos Bioanalíticos”, da RE ANVISA nº 899, de 29 de março de 2003 (BRASIL, 2003);
- ✓ Realizar a quantificação dos eicosanóides do meio de cultivo celular;
- ✓ Avaliar o efeito dos extratos *M. sylvestris* sobre a liberação de PGE<sub>2</sub> nas células sob cultivo.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 INFLAMAÇÃO

A palavra inflamação tem origem no grego (*phlogosis*) e no latim (*flamma*), ambas significando “fogo”, ou “área em chamas”. Descrições sobre as características clínicas da inflamação já existiam há mais de dois milênios, porém, somente no século I d.C., os quatro sinais cardinais da inflamação (rubor, inchaço, calor e dor) foram descritos por Celsius (ROCK; KONO, 2008). Hoje se sabe que estes quatro sinais primários se relacionam com eventos fisiológicos durante o processo inflamatório, que envolvem dilatação de vasos, aumento de fluxo sanguíneo, aumento de permeabilidade vascular, aumento de temperatura local e quimiotaxia de células e mediadores da inflamação (CUZZOCREA, 2005). Muitos séculos depois, em 1843, Rudolf Virchow instituiu a *perda de função* como o quinto sinal cardinal da inflamação, inclusive relacionando este fato com a origem de alguns tipos de câncer (GREENE *et al.*, 2009).

A inflamação se traduz como uma intensa mobilização dos sistemas de defesas celular e humoral do organismo, com participação vascular, neural e hormonal, desencadeada por estímulos físicos, químicos ou biológicos (VITA RODRIGUEZ; LAWRENCE, 2010). Apesar de ser a primeira linha de defesa do organismo contra injúrias teciduais, uma resposta inflamatória excessiva pode tornar-se uma fonte de lesão ainda maior do que a provocada pelo estímulo inicial (GAO *et al.*, 2003). É dividida classicamente entre inflamação aguda e crônica. A primeira refere-se à resposta que começa de maneira abrupta, sendo associada à agressão súbita. Dura de poucos minutos a algumas horas e envolve reação exsudativa na qual fluído, proteínas e leucócitos do tipo neutrófilos saem da circulação e se dirigem para o local da agressão. Se o agente agressor é persistente, a inflamação pode tornar-se crônica, onde ocorre uma reação proliferativa com propagação de fibroblastos, elementos vasculares e células mononucleares (macrófagos e linfócitos, principalmente) (BUCKLEY *et al.*, 2001; BOGATCHEVA *et al.*, 2005).

O tecido inflamado responde, controla e modula a inflamação através de uma variedade complexa de reações atreladas a mediadores químicos, muitos dos quais ainda não são totalmente conhecidos. Os mediadores químicos farmacologicamente significativos incluem a histamina, Fator de Ativação Plaquetária (FAP), citocinas, bradicinina e os eicosanóides (RANG *et al.*, 2007).

### 2.1.1 Mediadores químicos da inflamação do tipo eicosanóide

Os eicosanóides são os principais metabólitos oxidativos do ácido araquidônico (ácido 5,8,11,14-eicosatetraenóico), um ácido graxo insaturado de vinte carbonos (“*eicosa*”) contendo quatro duplas ligações (“*tetraenóico*”) (LUO; FLAMAND; BROCK, 2006).

A Figura 1 representa a estrutura química do ácido araquidônico.

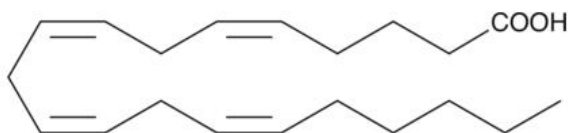


FIGURA 1 – ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

**FONTE:** Adaptado de BLEWETT *et al.*, ( 2008)

O ácido araquidônico encontra-se na forma esterificada na membrana de todas as células, sendo integralmente proveniente dos fosfolípídeos, que por sua vez são essencialmente advindos da dieta de ácidos graxos. Através da ação de enzimas como a Fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>), os fosfolípídeos da membrana são clivados e o ácido araquidônico surge como produto desta reação (LUO; FLAMAND; BROCK, 2006). Diversos estímulos podem levar à ativação da PLA<sub>2</sub>, entre eles a ligação de trombina nas plaquetas, C5a nos neutrófilos, bradicinina nos fibroblastos, reações antígeno-anticorpo nos mastócitos, infecções, hormônios e perturbação da membrana celular por trauma físico (BOGATCHEVA *et al.*, 2005; RANG *et al.*, 2007).

O ácido araquidônico liberado pode então tornar-se substrato de três caminhos enzimáticos oxidativos diferentes: a ciclooxigenase (COX), a lipooxigenase (LOX) e o citocromo P450 (CYP). A via da COX está relacionada com a síntese de prostanóides, que incluem as prostaglandinas (PGs) e os tromboxanos (TXs), enquanto que a LOX está envolvida na síntese de leucotrienos (LTs), lipoxinas (LX) e alguns ácidos hidroxieicosatetraenóicos (HETEs). O CYP produz principalmente os ácidos epoxieicosatrienóicos (EETs), os ácidos dihidroxieicosatrienóicos (DiHETEs) e alguns HETEs (BLEWETT *et al.*, 2008; PÉREZ-CHACÓN *et al.*, 2009). Estes caminhos metabólicos exibem certa redundância, na medida em que um mesmo eicosanóide pode ser produzido por mais de uma enzima, e também uma única enzima pode ser capaz de produzir mais de um eicosanóide. Além dos caminhos enzimáticos, estes metabólitos podem sofrer reações não-enzimáticas (como oxidação e desidratação), produzindo uma série de outros compostos como estereoisômeros dos produtos enzimáticos (DEEMS *et al.*, 2007).

A COX possui duas isoformas identificadas, a COX-1 e a COX-2. A COX-1 apresenta-se de forma constitutiva nos tecidos, envolvendo-se na produção de prostanóides em processos fisiológicos de manutenção da homeostase, enquanto a COX-2 é produzida principalmente em função do estímulo gerado por estados inflamatórios (BURIAN, GEISLINGER, 2005). Estas duas isoformas têm essencialmente os mesmos mecanismos catalíticos, porém, dentro da enzima, os sítios responsáveis pela ciclooxigenação e pela peroxidação (suas principais reações catalíticas) estão em regiões separadas (PILBEAM *et al.*, 2007).

Dentre os metabólitos da COX, as prostaglandinas apresentam como característica estrutural um anel de ciclopentano, e os tromboxanos apresentam um anel de seis membros. As substituições nestes anéis conferem as diferenças entre as famílias destas moléculas, as quais são classificadas por letras, e os números subscritos representam sempre o número de duplas ligações existentes (por exemplo, PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub>, PGF<sub>2α</sub>) (NAKAHATA, 2008).

#### 2.1.1.1 Prostaglandinas



Todas as células, com exceção dos eritrócitos, têm capacidade de produzir prostaglandinas por um fenômeno conhecido como “cascata do ácido araquidônico” (HARRIS, 2006).

Após a metabolização do ácido araquidônico pela  $PLA_2$ , a síntese de prostaglandinas inicia-se com a produção dos endoperóxidos instáveis  $PGG_2$  (através de ciclooxygenação) e  $PGH_2$  (por peroxidação), realizada por uma enzima bifuncional denominada prostaglandina endoperóxido H-sintase ou prostaglandina G/H sintase (PGHS), a popularmente conhecida COX, em referência a sua primeira função (PILBEAM *et al.*, 2007). Então, sintetases prostaglandina-específicas existentes nas células convertem a  $PGH_2$  em uma série de prostaglandinas biologicamente ativas, dentre as quais a  $PGI_2$ ,  $PGF_{2\alpha}$ ,  $PGD_2$  e  $PGE_2$  (HARRIS *et al.*, 2002; TAKEMIYA; MATSUMURA; YAMAGATA, 2007). Algumas células conseguem sintetizar apenas um tipo específico de prostaglandina, enquanto células como as do pulmão e do baço podem produzir múltiplas variedades (MILLER, 2006). O fluxograma da Figura 2 mostra o processo de síntese de alguns tipos de prostaglandinas.

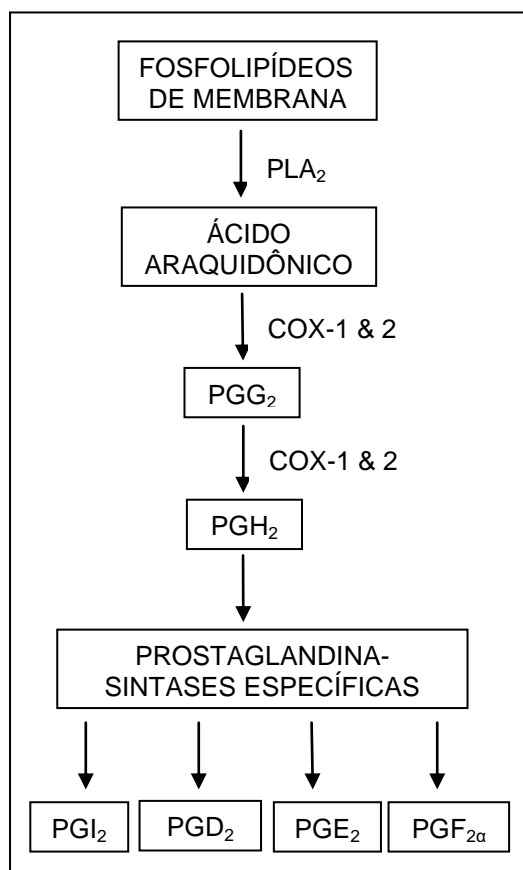


FIGURA 2 – PROCESSO DE SÍNTESE DE PROSTAGLANDINAS  
FONTE: Adaptado de: HARRIS *et al.* (2002); MUBARAK, 2010.

Após a síntese, as prostaglandinas são rapidamente liberadas das células e agem próximo ao sítio de produção, por ligação a receptores celulares específicos e de alta afinidade (HARRIS *et al.*, 2002). Dessa forma, agindo de maneira autacóide e atuando em receptores denominados *DP*, *EP*, *FP* e *IP*, as principais moléculas de prostaglandinas estão envolvidas em uma série de processos fisiológicos, como mostra o Quadro 1.

PROSTAGLANDINA	RECEPTOR	AÇÕES FISIOLÓGICAS
PGD <sub>2</sub>	DP	Vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, relaxamento dos músculos gastrointestinal e uterino, regulação da liberação de hormônios hipotalâmicos/hipofisários.
PGE <sub>2</sub>	EP <sub>1</sub>	Contração do músculo liso brônquico e gastrointestinal.
	EP <sub>2</sub>	Bronco e vasodilatação, aumento da secreção gastrointestinal e relaxamento do músculo liso gastrointestinal.
	EP <sub>3</sub>	Contração do músculo liso intestinal, inibição da secreção ácida gástrica, aumento da secreção ácida de muco, inibição da lipólise e da liberação de neurotransmissores autonômicos e estimulação do útero gravídico.
	Desconhecido	Produção de febre, inibição da proliferação das células T, ativação dos macrófagos, liberação de esteróides supra-renais e eritropoietina pelo rim, broncodilatação, vasodilatação e relaxamento do músculo liso intestinal.
PGF <sub>2α</sub>	FP	Contração do miométrio em humanos.
PGI <sub>2</sub>	IP	Vasodilatação, inibição da agregação plaquetária, liberação de renina e natriurese por efeitos sobre a reabsorção tubular de sódio.
PGE <sub>1</sub>	IP, EP <sub>3</sub> e EP <sub>4</sub>	Vasodilatação, relaxante muscular liso, gera aumento da circulação de sangue periférico, inibição da agregação plaquetária, analgésico e antitérmico, aumenta fluidez sanguínea induzindo eritrócitos a alterarem sua morfologia.
PGF <sub>1α</sub>	Desconhecido	Efeito antifertilidade e luteolítico, indução da contração de músculos lisos do trato respiratório.

QUADRO 1 – PRINCIPAIS AÇÕES FISIOLÓGICAS DAS PROSTAGLANDINAS PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>1</sub> E PGF<sub>1α</sub> QUANDO LIGADAS AOS SEUS RECEPTORES CARACTERÍSTICOS

**FONTE:** Adaptado de: (RANG *et al.*, 2007); (WANG; DuBOIS, 2008); (MUBARAK, 2010); (IYÚ *et al.*, 2010).

Todos os processos inflamatórios favorecem a biossíntese de prostaglandinas, que contribuem para a gênese dos sinais e sintomas da inflamação. Assim, algumas prostaglandinas estão envolvidas na vasodilatação e no aumento da permeabilidade vascular (WANG; DuBOIS, 2008), na regulação da quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (HARA *et al.*; 2010) e na resposta

imunológica e hiperalgesia, através da hipersensibilização dos nociceptores polimodais das fibras C a estímulos mecânicos e químicos (CHEN; TANNER; LEVINE, 1999). A PGE<sub>2</sub> e a PGI<sub>2</sub> são responsáveis pela maior parte dos efeitos relacionados à inflamação, estando envolvidas no desenvolvimento da febre, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e hiperalgesia (BLEWETT *et al.*, 2008). As prostaglandinas também possuem papel fundamental no desenvolvimento de doenças como esclerose múltipla, Doença de Alzheimer (HOOZEMANS *et al.*, 2002; CHAUDHRY; ZHUANG; DORÉ, 2010), isquemia cerebrovascular e aterosclerose (ZHANG, 2010; CIPOLLONE *et al.*, 2008), doenças cardiovasculares (PETRONELLA *et al.*, 2004), doenças reumáticas, AIDS (HAYES *et al.*, 2002; MINAMI *et al.*, 2003), entre outras.

A Figura 3 mostra estrutura química de algumas prostaglandinas essenciais para o processo inflamatório.

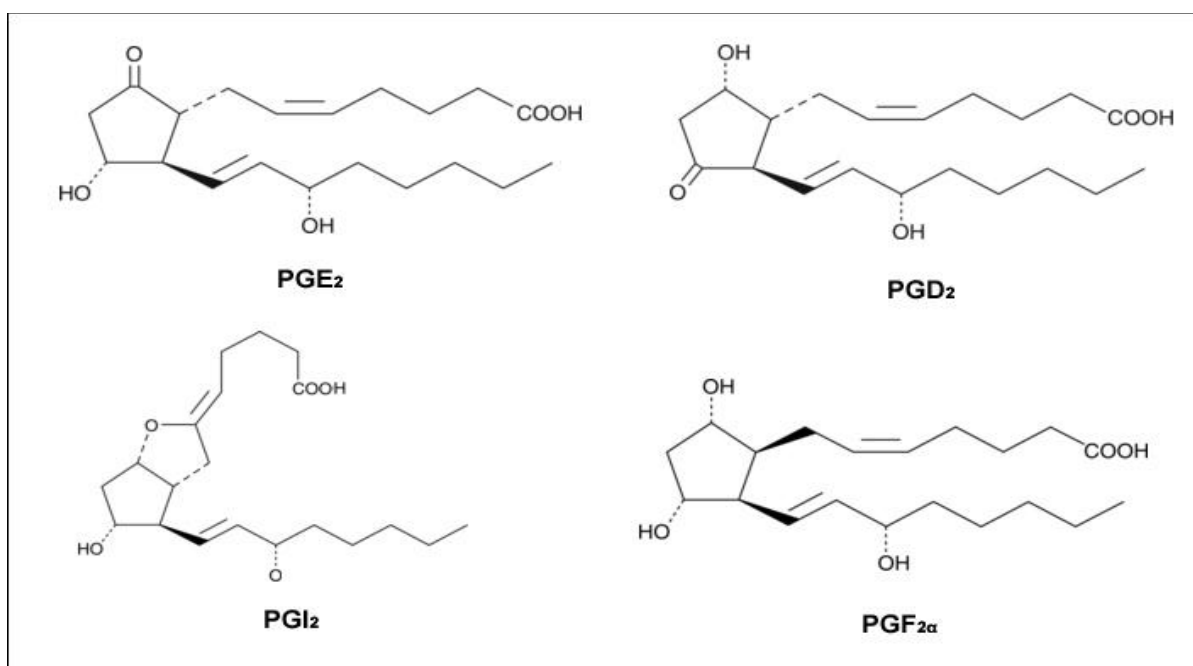


FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DAS PROSTAGLANDINAS PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e PGF<sub>2α</sub>  
**FONTE:** Adaptado de: BLEWETT *et al.*, (2007).

Como as prostaglandinas não são armazenadas intracelularmente, elas são muito lábeis e somente pequenas quantidades de componentes ativos são mensuráveis na circulação sistêmica durante os estados fisiológicos normais. Via de regra, em torno de 95% da quantidade de prostaglandina disponível é glucoronada pelo fígado e degradada (HARRIS, 2006).

### 2.1.1.1.1 PGE<sub>2</sub>

O mais abundante e versátil mediador lipídico prostanóide do corpo humano é a PGE<sub>2</sub>, a qual é secretada para o meio extracelular em resposta a traumas, estímulos ou sinalizações moleculares. Pesquisas recentes indicam que a PGE<sub>2</sub> é o mediador chave de respostas inflamatórias agudas, diferenciação de células tronco, artrite e de alguns tipos de câncer. Assim, dependendo do contexto e do receptor envolvido, a PGE<sub>2</sub> exerce efeitos homeostáticos, inflamatórios ou anti-inflamatórios. Desse modo, a inibição da síntese de PGE<sub>2</sub> tem sido uma importante estratégia anti-inflamatória utilizada nos últimos 100 anos, inicialmente com a aspirina e mais tarde com outros anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) (PARK *et al.*, 2006).

Os quatro receptores de PGE<sub>2</sub> conhecidos até o momento (EP1, EP2, EP3 e EP4), sinalizam efeitos característicos para cada tipo celular, sendo que EP3 e EP4 possuem alta afinidade, ao passo que EP1 e EP2 possuem afinidade relativamente menor (CHELL *et al.*, 2006). A ativação do receptor EP1 resulta num aumento de fosfatidil inositol e íons cálcio intracelulares; a do receptor EP2 e EP4 levam a um aumento do AMPc e o receptor EP3 à diminuição do AMPc (ANDREASSON, 2010). Após a ligação no receptor da célula-alvo, a PGE<sub>2</sub> é rapidamente retirada do espaço extracelular, por “proteínas transportadoras de prostaglandina”, e então metabolizada de tal forma a se transformar em uma molécula de menor atividade biológica (CHELL *et al.*, 2006).

As enzimas denominadas prostaglandina-sintases convertem o metabólito instável PGH<sub>2</sub> em prostaglandinas específicas, mas o mecanismo pelo qual a PGH<sub>2</sub> é convertida preferencialmente em uma ou outra prostaglandina ainda não é bem compreendido. No caso da PGE<sub>2</sub>, existem relatos da existência de três sintases, duas microssomais (m-PGES-1 e m-PGES-2) e uma citosólica (cPGE2), que exercem suas atividades dependendo do tecido e da condição fisiológica envolvidos (PARK *et al.*, 2006).

Já é bem estabelecido que enquanto a COX-1 é responsável principalmente pela produção de prostanóides constitutivos para a manutenção da homeostase, a COX-2 está relacionada com a produção de prostanóides envolvidos no metabolismo da inflamação. Nas células não-estimuladas (em condição fisiológica normal), a Fosfolipase-A2 (cPLA2) é constitutivamente presente no citoplasma, e a

COX-2 e a mPGES-1 (prostaglandina E2 sintase) não são expressadas. Nas células que recebem um estímulo inflamatório, um influxo de cálcio leva a translocação de cPLA<sub>2</sub>α do citosol para a membrana nuclear, onde ela enzimaticamente hidrolisa a membrana fosfolipídica liberando ácido araquidônico. O estímulo inflamatório também induz a transcrição e expressão protéica de COX-2 e mPGES-1 na membrana nuclear e no retículo endoplasmático. A COX-2 então transforma o ácido araquidônico em PGG<sub>2</sub> e em seguida em PGH<sub>2</sub>. A mPGES-1 pode então agir sobre a PGH<sub>2</sub> para gerar PGE<sub>2</sub>, que sai da célula por simples difusão ou por transporte ativo via transportador MRP4 (PARK *et al.*, 2006). A Figura 4 ilustra o mecanismo de liberação da PGE<sub>2</sub>.

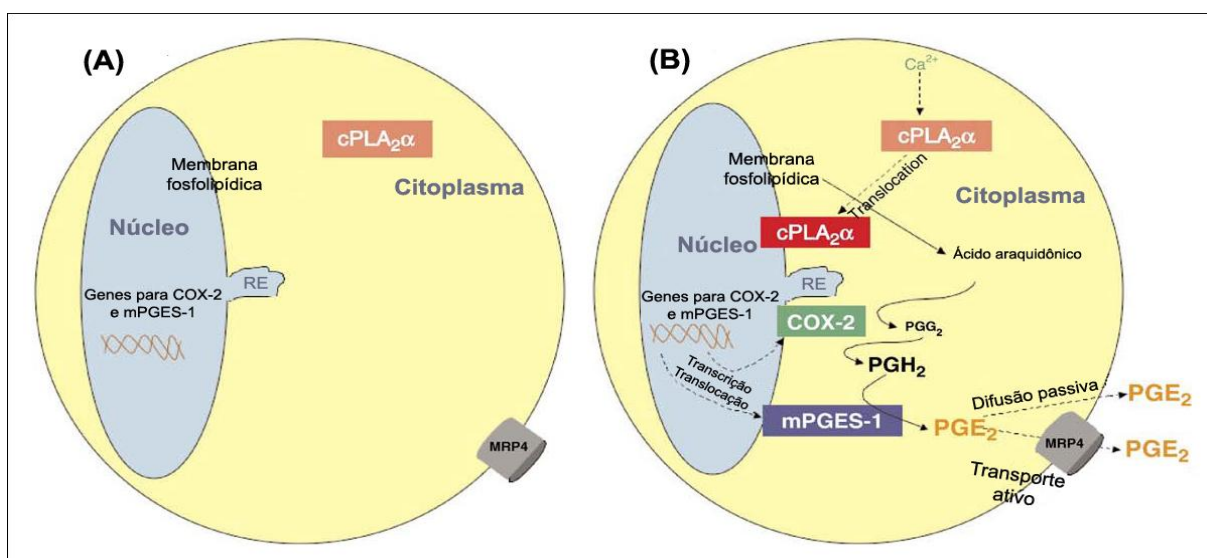


FIGURA 4 – EVENTOS CELULARES ENVOLVIDOS NA LIBERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> POR CÉLULAS ESTIMULADAS

**NOTA:** (A) Células sem estímulo inflamatório; (B) Células com estímulo inflamatório

**FONTE:** Adaptado de (PARK *et al.*, 2006).

Dessa forma, haja vista a necessidade de regulação da COX-2 via estímulo inflamatório, é provável que a presença constitutiva de COX-1 seja responsável pela geração de PGE<sub>2</sub> durante as fases preliminares de uma inflamação, antes da regulação da COX-2, que em função da transcrição genética, demanda algum tempo. Todos os prostanóides são inativados rapidamente na circulação. O passo inicial de inativação da PGE<sub>2</sub> é a oxidação para o composto 13,14-dihidro-15-ceto-PGA<sub>2</sub>, numa reação catalizada por enzimas da família da 15-hidroxiprostaglandina desidrogenase (15-PGDH). Além disso, catabolismos adicionais envolvem a redução

da dupla ligação entre C-13 e C-14, co-oxidações e 13-oxidação (SMITH; MURPHY, 2008).

Portanto, os níveis celulares de PGE<sub>2</sub> dependem das taxas relativas de biossíntese de COX-2/mPGES-1 e de 15-PGDH. Existem relatos de que, em vários tipos de tumores malignos, ocorre perda significativa de 15-PGDH, o que eleva os níveis de PGE<sub>2</sub>, fato possivelmente relacionado ao desenvolvimento de câncer (WANG; DuBOIS, 2008).

### 2.1.2 Inflamações orais (periodontites)

Doenças periodontais compreendem uma longa lista de condições patológicas envolvendo as estruturas de suporte dos dentes. As duas mais prevalentes e mais investigadas doenças periodontais são a gengivite induzida por placa bacteriana e a periodontite crônica (ARMITAGE, 1999).

A periodontite é uma doença crônica inflamatória de natureza infecciosa, causada por desequilíbrio da flora bacteriana oral e que provoca a destruição progressiva e não-reversiva dos tecidos de suporte dentário (ligamento periodontal, osso alveolar e cemento). Histologicamente, na região lesada encontram-se células inflamatórias agudas, macrófagos, aumento da vascularização do tecido conjuntivo da região, substancial perda de colágeno e colônias de micro-organismos da placa (PAIXÃO *et al.*, 2002; TATAKIS; KUMAR, 2005). É uma doença infecciosa de alta prevalência, podendo acometer cerca de 10 a 15% da população mundial, sendo considerada a causa mais comum de perda dos dentes entre os adultos (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Em condições normais, a microflora que envolve os dentes contém diversas espécies de bactérias aeróbicas e anaeróbicas vivendo de forma equilibrada. Porém, no curso de uma periodontite crônica (sobretudo em função da maior susceptibilidade do hospedeiro a um biofilme invasor), o número de bactérias anaeróbicas, principalmente gram-negativas, aumenta em até 80% (SOCRANSKY; HAFFAJEE, 1992; GUTIÉRREZ-VENEGAS; JIMÉNEZ-ESTRADA; MALDONADO, 2007). A Tabela 1 mostra as principais bactérias encontradas no periodonto saudável e na periodontite crônica.

TABELA 1 – PRINCIPAIS ESPÉCIES DE BACTÉRIAS ENCONTRADAS NO PERIODONTO SAUDÁVEL E NA PERIODONTITE CRÔNICA

PERIODONTO SAUDÁVEL		PERIODONTITE CRÔNICA	
Gram-positivas	Gram-negativas	Gram-positivas	Gram-negativas
<i>Atopobium rimae</i>	<i>Bacteroides sp</i>	<i>Peptostreptococcus micros</i>	<i>Porphyromonas gingivalis</i>
<i>Streptococcus sanguis</i>	<i>Veillonella spp</i>		<i>Tannerella forsythensis</i>
<i>Streptococcus mitis</i>	<i>Gemella spp</i>		<i>Prevotella intermedia</i>
	<i>Capnocytophaga spp</i>		<i>Campylobacter rectus</i>
			<i>Eikenella corrodens</i>
			<i>Fusobacterium nucleatum</i>
			<i>Actinobacillus</i>
			<i>actinomycetemcomitans</i>
			<i>Treponema spp.</i>
			<i>Filifactor alocis</i>
			<i>Megasphaera sp.</i>
			<i>Deferribacteres sp.</i>
			<i>Desulfobulbus sp.</i>
			<i>Bacteroides sp.</i>

**FONTE:** Adaptado de: TATAKIS; KUMAR, (2005); GUTIÉRREZ-VENEGAS; JIMÉNEZ-ESTRADA; MALDONADO, (2007)

No curso da doença, as bactérias periodontopatogênicas gram-negativas são as responsáveis pela liberação de leucotoxinas, collagenases, fibrinolisinases e proteases que colaboram na destruição dos componentes estruturais do periodonto. Além disso, na membrana externa destas bactérias, a existência de fatores de virulência altamente antigênicos como lipopolissacarídeos (LPS) e peptidoglicanos, induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias e PGE<sub>2</sub> pelo hospedeiro, fundamentais para o desencadeamento do processo inflamatório e erosivo (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

Além do desequilíbrio da flora bacteriana oral, outros fatores também são importantes para o desenvolvimento de periodontites, tais como questões genéticas, uso de tabaco e álcool, HIV e AIDS, osteoporose, diabetes, stress e fatores que envolvem a predisposição e susceptibilidade do hospedeiro, como sistema imune comprometido ou doenças que abrangem a adesão deficitária de células de defesa (TATAKIS; KUMAR, 2005; FENG *et al.*, 2006).

Os principais sintomas relatados por pacientes portadores de periodontite crônica são o sangramento gengival, o amolecimento dos dentes, a presença notável de tártaro, inchaço da gengiva (evidenciada pela excessiva vermelhidão),

mau hálito, maior sensibilidade do dente para impressões de “frio” e “quente” e retração gengival (NUTO; NATIONS; COSTA, 2007).

A prevenção e tratamento desta doença bucal envolvem diversas ações que incluem hábitos rotineiros de higiene oral. Dessa forma, escovação, limpeza interdente com fio-dental e uso de enxaguatórios e pastas dentais com agentes antibacterianos auxiliam na remoção do acúmulo de placa supragengival (DENTINO; KASSAB; RENNERT, 2005). Popularmente, terapias para o tratamento da periodontite crônica incluem bochechos de água morna com sal, pedra umes (alumina de potássio), bicarbonato de sódio e plantas como aroeira, ameixa e *M. sylvestris* (NUTO; NATIONS; COSTA, 2007). Nos casos de doença mais avançada, medidas tomadas por profissionais também se fazem necessárias, como a aplicação de antibióticos e anti-inflamatórios sistêmicos, intervenções cirúrgicas de restauração e/ou implantação de próteses e ações locais de redução da perda óssea da coroa e da raiz dentária (PIHLSTROM; MICHALOWICZ; JOHNSON, 2005).

#### 2.1.2.1 O papel da PGE<sub>2</sub> na perda óssea periodontal

O osso é um tecido conjuntivo vivo e complexo, que tem como funções principais a proteção e o suporte de outros tecidos e órgãos e a participação ativa na homeostasia do cálcio no organismo. A estrutura deste tecido é continuamente alterada, através da ação de osteoblastos e osteoclastos, células que possuem papel fundamental no remodelamento ósseo (HIKIJ I *et al.*, 2008).

Os osteoblastos surgem da diferenciação de células osteoprogenitoras locais (de origem tronco-mesenquimal), e são responsáveis pela regulação da mineralização do tecido e produção de matriz-óssea. São encontradas na superfície dos ossos, e eventualmente podem ser presas dentro da matriz óssea formada por elas mesmas, transformando-se então em osteócitos. Já os osteoclastos, originários de células-tronco hematopoiéticas de origem monocítica-macrofágica, são células migratórias e multinucleadas, que têm a principal função de reabsorver osso mineralizado (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001).

No estado fisiológico normal, uma série de substâncias reguladoras atuam nestas células, ocasionando um perfeito equilíbrio entre a reabsorção e a



neoformação óssea (HIKIJ I *et al.*, 2008). Entretanto, em estados patológicos como a periodontite, a inflamação local leva a uma maior produção de citocinas, prostaglandinas, fatores de crescimento e enzimas líticas que, aliadas ao recrutamento de células inflamatórias, induzem à ativação anormal dos osteoclastos formando a base da destruição periodontal (LIMA *et al.*, 2008).

Dentre as várias classes de moléculas envolvidas no metabolismo ósseo, destacam-se as prostaglandinas, que têm ação notória especialmente sobre a reabsorção, sendo a PGE<sub>2</sub> o elemento principal (HIKIJ I *et al.*, 2008). No sistema ósseo, a PGE<sub>2</sub> é produzida primariamente pelos osteoblastos, e a partir de então atua de forma autócrina e/ou parácrina, principalmente sobre os osteoclastos. Um grande número de substâncias (como por exemplo interleucinas, hormônios, bradicininas, trombina, cálcio, fator de crescimento derivado de plaquetas-PGDF, entre outras) são conhecidos por aumentar a produção de PGE<sub>2</sub> pelos osteoblastos (PILBEAM *et al.*, 2007).

A ação da PGE<sub>2</sub> na reabsorção óssea pode ser indireta, atuando nos osteoblastos que posteriormente ativam os osteoclastos, ou direta, exercendo efeito sobre os osteoclastos (HIKIJ I *et al.*, 2008). Atuando de forma indireta, a PGE<sub>2</sub> liga-se principalmente nos receptores EP4 dos osteoblastos, induzindo a produção do fator nuclear NF- $\kappa$ B. Este fator ativa os genes responsáveis pela expressão de RANKL (ligante do receptor do ativador nuclear *kappa*-B), também conhecido como ODF (Fator de Diferenciação de Osteoclastos), na parede externa dos osteoblastos. RANKL é um membro da família do Fator de Necrose Tumoral (TNF), e a sua interação com os receptores RANK dos osteoclastos através do contato célula-célula é essencial para a diferenciação dos progenitores de osteoclastos (denominados pré-osteoclastos) em osteoclastos maduros (SUZAWA *et al.*, 2000; SOMMERFELDT; RUBIN, 2001).

Nos receptores RANK também pode se ligar a osteoprotegerina (OPG), molécula produzida pelos próprios osteoblastos, mas cuja síntese é inibida pelo PGE<sub>2</sub>. Ela atua como antagonista solúvel de RANKL, inibindo a ligação RANK/RANKL com conseqüente inibição da osteoclastogênese (SOMMERFELDT; RUBIN, 2001).

Desse modo, nos osteoblastos a PGE<sub>2</sub> atua tanto estimulando a produção de RANKL quanto diminuindo a produção de OPG, o que culmina nos dois casos com o

aumento da atividade dos osteoclastos (HIKIJI *et al.*, 2008). A Figura 5 mostra a relação entre a interação RANK/RANKL e OPG na maturação de osteoclastos.

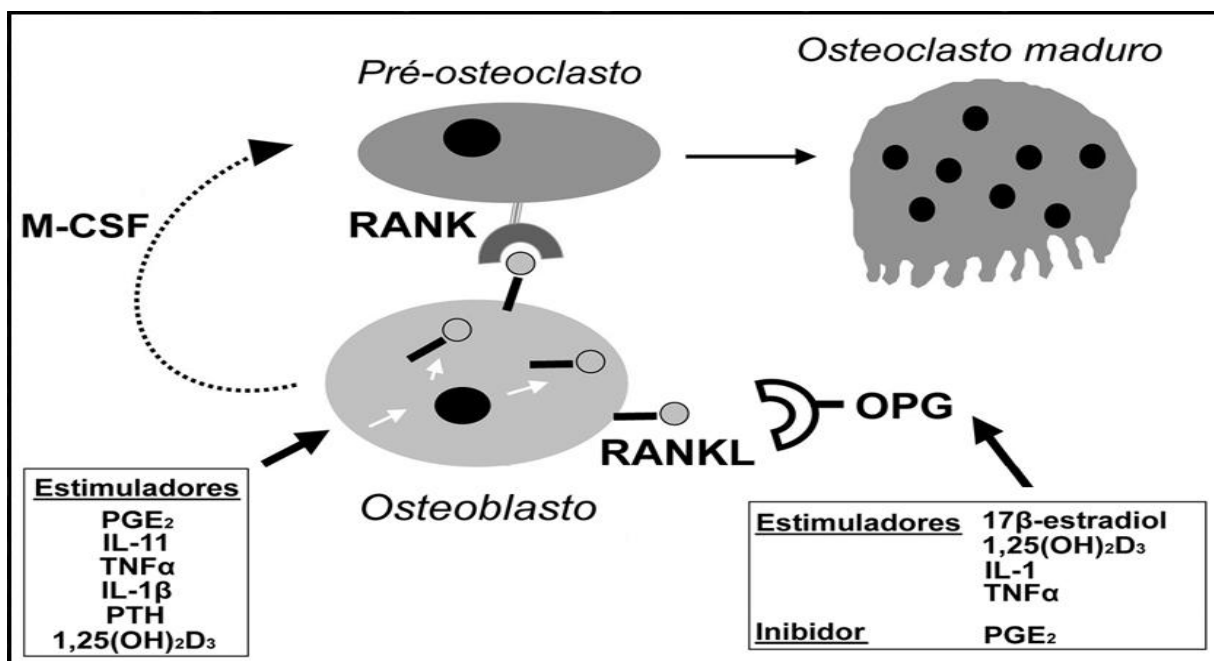


FIGURA 5 – MATURAÇÃO DE OSTEOCLASTOS ATRAVÉS DE RECEPTORES RANK

FONTE: Adaptado de ROUX; ORCEL (2000).

Atuando de forma direta sobre os osteoclastos, a PGE<sub>2</sub> pode tanto auxiliar a diferenciação de precursores osteoclásticos imaturos quanto atuar em células maduras. Foi demonstrado que PGE<sub>2</sub> liga-se em receptores EP1, EP2 e EP4 de macrófagos derivados de medula-óssea e os induz à diferenciação em osteoclastos. Além disso, atuando em receptores EP3 de células maduras, PGE<sub>2</sub> parece aumentar o número de lamelipódios, estimulando a movimentação celular e aumentando a reabsorção (HIKIJI *et al.*, 2008).

Dessa forma, se torna clara a relação entre os derivados eicosanóides (principalmente a PGE<sub>2</sub>) e a reabsorção do tecido ósseo. E esta relação tem, portanto, importantes implicações na doença periodontal (LIMA *et al.*, 2008). Além disso, a PGE<sub>2</sub> estimula os osteoblastos do periodonto a produzirem proteinases capazes de degradar o colágeno, o que favorece a destruição do tecido local e a evolução da periodontite (HIKIJI *et al.*, 2008). Dada a importância da PGE<sub>2</sub> na reabsorção óssea, estudos sugerem que a concentração desta prostaglandina no

fluido gengival pode ser utilizada como um marcador da periodontite (LIMA *et al.*, 2008).

## 2.2 O TECIDO CONJUNTIVO E AS CÉLULAS ENVOLVIDAS NA DOENÇA PERIODONTAL

A principal função do tecido conjuntivo é fornecer a estrutura de suporte e ligação para todos os outros tecidos do corpo. Além disso, ele pode atuar na nutrição de alguns órgãos e suas células também auxiliam na defesa do organismo. Apresenta como características a rica variedade de células, alta vascularização e abundância de matriz extracelular (constituída de proteínas fibrosas e substância fundamental). O tecido conjuntivo é constituído pelas seguintes células: fibroblastos, macrófagos, mastócitos, plasmócitos, adipócitos e leucócitos (CARNEIRO; JUNQUEIRA, 1999).

### 2.2.1 Macrófagos

Os macrófagos desempenham funções de fagocitose e síntese nos tecidos. Estas células são particularmente numerosas no tecido inflamado, e são derivados dos monócitos circulantes do sangue que migram para o tecido por quimiotaxia. O núcleo desta célula é caracterizado por invaginações de tamanhos variados, e uma zona intensa de condensação de cromatina pode ser vista em sua periferia. O Complexo de Golgi é bem desenvolvido e numerosas vesículas estão presentes no citoplasma. Restos de materiais fagocitados são encontrados nas vesículas lisossômicas, denominadas fagossomos. Além disso, há um grande número de microvilosidades na periferia da célula, que auxiliam na projeção em direção ao material a ser fagocitado (LINDHE *et al.*, 2010).

A atividade fagocitária destas células é aumentada por apresentarem na superfície receptores para a porção Fc da IgG, o que promove o contato dos antígenos com a célula, ativando-a. Porém, atuam também sem especificidade com

antígenos, o que permite a capacidade de destruição de um grupo diverso de bactérias antigenicamente não-relacionado (CARRANZA, 1992).

Os macrófagos são as células-chave do sistema imune inato envolvido na progressão da doença periodontal de uma condição aguda para uma patologia crônica, estando presentes em maiores quantidades em lesões periodontais ativas do que em inativas (CARRANZA, 1992). Estas células são importantes fontes de citocinas, incluindo IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , as quais estimulam a ativação da imunidade celular, além de amplificar a cascata inflamatória e contribuir para a destruição do tecido do hospedeiro. Além disso, em resposta à presença de micro-organismos, macrófagos liberam IL-12, que age estimulando a atividade antibacteriana dos próprios macrófagos, induzindo-os à atividade fagocitária (CHOMYSZYN-GAJEWSKA *et al.*, 2002). Os macrófagos são também reconhecidamente produtores da citocina pró-inflamatória IL-17, que tem papel-chave na indução da cascata de liberação de outras citocinas produzidas e liberadas por diversas células gengivais, como os fibroblastos e os próprios macrófagos (BENKLEN *et al.*, 2007). Somado a isso, outros fatores como IL-1, TNF- $\alpha$ , PGE<sub>2</sub> e óxido nítrico também estão envolvidos com a reabsorção óssea observada na periodontite (YOUNES *et al.*, 2009).

Estudos mostram que células inflamatórias sempre estão presentes no tecido gengival conectivo, porém variam em número e função nos diferentes estágios da inflamação. O número de monócitos/macrófagos aumenta constantemente nos diferentes estágios patológicos, sugerindo que estas células estão bastante relacionadas com o curso da doença periodontal (BENKLEN *et al.*, 2007). Um importante fator de risco para o desenvolvimento da periodontite é o uso de tabaco. Apesar do mecanismo desta relação ainda não estar totalmente claro, estudos recentes utilizando análises de DNA de macrófagos da região periodontal mostram diversos genes são diferencialmente expressados em resposta à nicotina, causando resposta inflamatória exacerbada e portanto, distúrbios nos mecanismos de defesa contra os patógenos (BALDI *et al.*, 2009).

#### 2.2.1.1 Macrófagos derivados de monócitos U937

Macrófagos são originários de monócitos da circulação, e a diferenciação ocorre em resposta a diversos estímulos, tais como citocinas e componentes bacterianos. Para desvendar os mecanismos da maturação macrofágica, diversos monócitos imaturos, como os provenientes das linhagens U937 e HL60, são largamente utilizadas como modelos *in vitro*. O estímulo à maturação pode ser realizada com forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), um tipo de forbol-éster que possui efeitos pleiotrópicos sobre os monócitos, ativando a proteína quinase C (PKC) e modulando fatores de transcrição tais como NF- $\kappa$ B, AP-1, AP-2 e AP-3. A ativação destes fatores sinaliza uma cascata bioquímica que induz a maturação celular, resultando em macrófagos de diversos fenótipos. Neste processo, a expressão de receptores de adesão muda notavelmente, sendo que no caso das células da família U937, ocorre aumento significativo de integrinas  $\beta$ -2 (SHELLEY *et al.*, 2002).

As células U937 são originárias de fluído pleural de pacientes com linfoma histiocítico difuso. Esta linhagem é homogênea e se mantém facilmente em cultura. Fenotipicamente, as U937 refletem a sua origem leucêmica, assemelhando-se às células blásticas de sua linhagem. Sob influência da maturação, aumentam em tamanho, adquirem um núcleo lobado e os seus grânulos citoplasmáticos são trocados por vacúolos. As mudanças morfológicas são as mais facilmente observáveis na maturação das células U937, ocorrendo um aumento significativo na aderência a um substrato quando as células são induzidas à diferenciação. Além disso, a maturação destas células é caracterizada geralmente por mudanças qualitativas e quantitativas na geração de uma variedade de enzimas (SHELLEY *et al.*, 2002). O mecanismo de maturação dos monócitos tem relação com a metilação dos fosfolípidos da membrana. Assim, postula-se que substâncias como o PMA induzam à diminuição da incorporação do grupo metila, estimulando a diferenciação (DEL BUFALO *et al.*, 2011).

Células em repiques recentes de uma linhagem U937 crescem rapidamente, dobrando a população a cada 20-48 horas. Naturalmente, como ainda não são maturadas, a capacidade de eliminar micro-organismos e células tumorais está ausente (SHELLEY *et al.*, 2002). A liberação de PGE<sub>2</sub> e outros derivados parece ser uma característica adquirida somente com a maturação (CHANG *et al.*, 2005; DEL BUFALO *et al.*, 2011).

Em função da grande quantidade de monócitos e macrófagos presentes no tecido periodontal, monócitos da linhagem U937 têm sido usados como modelos para estudos de liberação de mediadores pró-inflamatórios estimulados por LPS, visando aplicação em estudos envolvendo periodontite, uma vez que estas células participam da defesa do hospedeiro contra periodontopatógenos (BODET; CHANDAD; GRENIER, 2006; YOUNES *et al.*, 2006).

Diversas substâncias têm sido relatadas como estimuladoras da liberação de prostaglandinas (principalmente PGE<sub>2</sub>) por macrófagos derivados de células U937. Tradicionalmente, LPS de parede celular de bactérias gram-negativas têm grande potência quanto este efeito (BODET; CHANDAD; GRENIER, 2006). Além disso, 17-β estradiol também tem sido usado como estimulante à liberação de PGE<sub>2</sub> por células derivadas de monócitos U937. A ativação de macrófagos por hormônios sexuais femininos tem sido relatada, em especial estrogênios e seus análogos. Estudos mostram que o mecanismo pelo qual ocorre o estímulo da PGE<sub>2</sub> envolve o aumento da liberação de ácido araquidônico e da produção de COX-1 e COX-2, mediados pela ligação com os clássicos receptores de estrogênio (do tipo ERα). O aumento da produção de COX-1 e COX-2 é correlacionado com o aumento dos níveis correspondentes de RNAm, via fatores transcripcionais tais como AP-1 e SP-1. Porém não devem ser descartados efeitos não-genômicos via ligação com receptores de membrana. De qualquer modo, o modelo ainda permanece incerto (LU *et al.*, 2004). Similarmente, estudos utilizando células U937 como modelo têm relatado que tanto o íon ferro quanto quelantes do íon ferro podem modular certos mediadores químicos e regular o processo inflamatório. Neste sentido, o quelante de ferro desferroxamina regula a expressão de COX-2, o que é mostrado por análises de *northern blot* onde se vê aumento de RNAm de COX-2 induzido pela molécula. Aparentemente, o aumento na expressão de COX-2 está relacionado com a ativação de quinases reguladoras de sinal extracelular (ERK), que fosforilam e ativam o fator de transcrição NF-IL6, levando ao aumento da expressão de COX-2. O aumento na expressão de proteína estrutural de COX-2 também foi observado por análise *western blot*, sendo correspondente e proporcional ao aumento de RNAm. Assim, através destes mecanismos, ocorreu um aumento considerável na produção do derivado eicosanóide PGE<sub>2</sub>, o que sugere, ao menos em parte ao menos em parte, que a indução do RNAm de COX-2 seja devido ao caminho de sinalização ERK.

Além disso, é possível também que a desferroxamina leve ao aumento de PGE<sub>2</sub> através do estímulo à produção de óxido nítrico (NO) (TANJI *et al.*, 2001).

## 2.3 CULTIVOS CELULARES

Desde o século XVIII já se tinha noção da importância de se conseguir um método que permitisse manter células eucarióticas em estado de proliferação fora do organismo, obtendo-se assim uma importante ferramenta para o entendimento dos processos biológicos (SOUZA, 2006).

O termo cultivo celular se refere a um cultivo *in vitro* de células dispersas, obtidas originalmente de um tecido, cultura primária ou de uma linhagem celular antecedente, sob condições controladas, mantendo ao máximo suas propriedades fisiológicas, bioquímicas e genéticas (PERES; CURI, 2005).

Apesar de o cultivo tentar mimetizar ao máximo o meio endógeno, deve-se levar em conta que uma célula em cultura funciona de forma bastante distinta de uma célula no organismo. *In vivo*, a célula faz parte de uma estrutura que mantém contato direto e indireto com outros tipos celulares formando um microambiente que não é completamente reproduzido na cultura, o que limita de certo modo as extrapolações (FRESHNEY, 2000). Desse modo, todas as condições e substâncias indispensáveis à sobrevivência e multiplicação das células devem estar presentes no meio de cultivo (ROGUET; SCHAEFER, 1997).

Existem dois tipos de cultivos celulares, os cultivos *primários* (ou culturas finitas) e os *permanentes* (também chamados de imortais ou transformados). Os cultivos primários são aqueles onde as células foram obtidas de tecidos normais mediante desagregação mecânica ou enzimática. Apresentam como característica principal o tempo limitado de vida da cultura, mesmo que lhes sejam oferecidas todas as condições necessárias à sobrevivência. Já os cultivos permanentes têm capacidade ilimitada de crescimento em cultura. Essas linhagens são derivadas de células tumorais, células transfectadas com oncogenes ou tratadas com substâncias carcinogênicas. Estas células geralmente não possuem malignidade, porém crescem continuamente e têm reprodução infinita (PEREIRA-SMITH, 1988).

Diferentes metodologias podem ser utilizadas para o crescimento das células, sendo o cultivo de *células aderidas* e o cultivo *em suspensão* os dois métodos principais. No cultivo celular através de células aderidas, o crescimento do cultivo ocorre através da adesão das células em um suporte (base dos frascos ou placas de cultura), que pode ser de vidro, plástico (PVC, Teflon<sup>®</sup>, polietileno) ou metal (aço inoxidável, titânio). Já na técnica em suspensão, as células proliferam diretamente no meio de cultivo, não sendo necessário nenhum suporte para ancoragem (PERES; CURI, 2005).

Para liberar as células da superfície de ancoragem, geralmente utiliza-se uma solução de tripsina-EDTA, com a tripsina agindo na digestão e clivagem das proteínas de adesão e o EDTA quelando cátions divalentes livres (como o cálcio e o magnésio), necessários para a função destas proteínas. Dependendo do tipo celular envolvido no experimento, a tripsina pode ser muito agressiva e então devem ser utilizadas collagenases, elastases, hialuronidases, pronases, dispases ou papaína (FRESHNEY, 2006).

Um aspecto importante que deve ser considerado é a necessidade de passagens ou “repiques”, possibilitando a nutrição adequada das células e a eliminação de metabólitos secretados para o meio. Porém, o aumento do número de passagens aumenta a probabilidade de acontecerem alterações que podem modificar o comportamento celular (PERES; CURI, 2005).

A aplicação de cultivos celulares traz muitas vantagens à ciência, como a diminuição do uso de modelos animais, redução dos custos dos experimentos e a possibilidade de investigação do metabolismo celular com poucas variáveis e sem interferentes fisiológicos. Porém, esta ferramenta apresenta algumas limitações técnicas, como a necessidade de condições de preparo assépticas, possibilidade de instabilidade genética e fenotípica das linhagens e envolvimento de questões éticas e religiosas (ROGUET; SCHAEFER, 1997; FRESHNEY, 2000).

## 2.4 PLANTAS MEDICINAIS COM USO NA ODONTOLOGIA

Um significativo crescimento da aplicação de plantas de uso tradicional dentro de programas preventivos e curativos vem ocorrendo na odontologia, estimulando a



avaliação da atividade de diferentes extratos de plantas para o controle do biofilme dental (fator determinante da cárie e das periodontites), bem como de outras afecções bucais. O Brasil possui grande potencial para o desenvolvimento da fitoterapia dirigida à odontologia, já que apresenta grande variedade vegetal, facilidade de aquisição de plantas a preços acessíveis e ampla sociodiversidade da população, o que denota diversos nichos de conhecimento tradicional. Além disso, a fitoterapia faz parte do Sistema Único de Saúde (SUS) (PAIXÃO *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Existem algumas dificuldades para o desenvolvimento dos medicamentos fitoterápicos com uso odontológico no país, em função do pequeno número de publicações disponíveis sobre o assunto e das escassas informações acerca da estrutura e atividade das substâncias ativas, além da resistência de alguns profissionais em trabalhar com esses produtos (FRANSCISCO, 2010). Isso demonstra que embora exista disponibilidade, poucos profissionais incluem os fitoterápicos em sua rotina (LIMA JR; DIMENSTEIN, 2006).

A finalidade do uso de plantas medicinais na cavidade oral inclui atividades anti-inflamatórias, antibacterianas, antifúngicas, analgésicas, anestésicas, anti-hemorrágicas, sialogogas, cicatrizantes e de combate ao mau hálito (TIPTON *et al.*, 2003; COLVARD *et al.*, 2006; PINHEIRO; ANDRADE, 2008). Dessa forma, óleos essenciais e extratos de plantas têm sido incorporados em diferentes formulações, como soluções orais, dentifrícios e enxaguatórios ou bochechos (LITTLE, 2004; PAIXÃO *et al.*, 2002; FRANCISCO, 2010).

Revisões acerca de plantas medicinais com uso potencial na odontologia revelaram a existência de mais de 130 espécies, distribuídas em 52 famílias botânicas, como úteis no tratamento de afecções bucais. Neste ínterim, destacam-se com maior número de indicações *Allium sativum*, *Aloe vera*, *Althaea officinalis*, *Calendula officinalis*, *Plantago major*, *Punica granatum*, *Salvia officinalis*, *Symphytum officinale*, *Syzygium aromaticum* e *M. sylvestris*, para a qual são relatados efeitos anti-inflamatórios, antibacterianos e cicatrizantes no tratamento de periodontites (OLIVEIRA *et al.*, 2007; LODDI, 2008; FRANCISCO, 2010).

#### 2.4.1 *M. sylvestris*

*M. sylvestris*, (Figura 6), é uma planta medicinal popularmente conhecida no Brasil como malva, malva-grande, malva-das-boticas, malva-verde, rosa-chinesa ou rosa-marinha. É uma planta da família das Malváceas que cresce em diversos tipos de solo, sendo nativa da Europa e Ásia, porém encontrada facilmente nas latitudes subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios (SLEIMAN; DAHER, 2009).

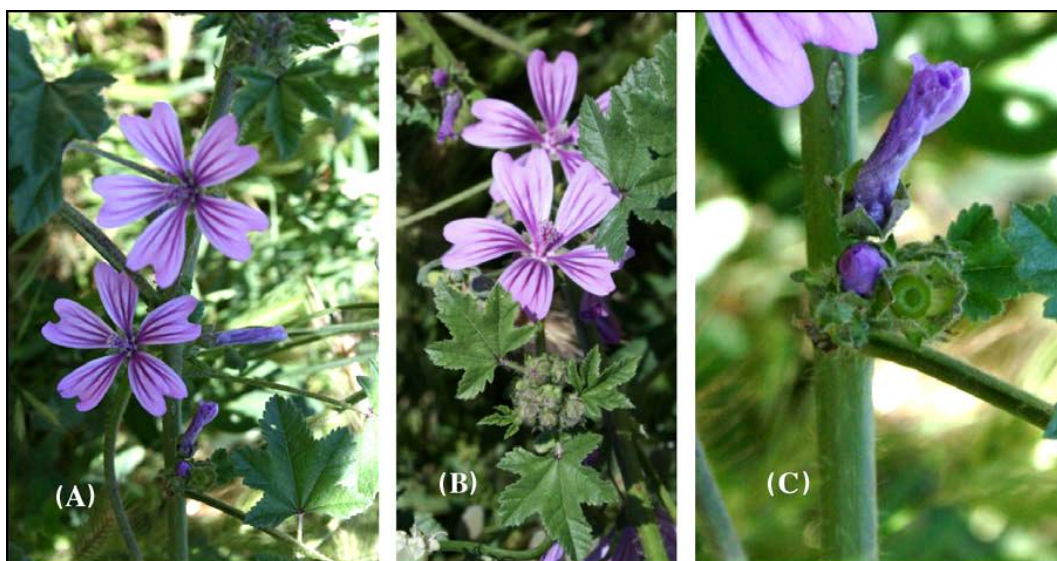


FIGURA 6 – PARTES AÉREAS DA *Malva sylvestris*

**NOTA:** (A) Inflorescências

(B) Folhas jovens

(C) Frutos imaturos

**FONTE:** Adaptado de (BARROS *et al.*, 2010)

O uso de diversas partes desta planta é vastamente conhecido, e suas atividades farmacológicas são amplas. Dentre todas as ações, destaca-se o uso como anti-inflamatório no tratamento de complicações respiratórias, do sistema urinário e inflamações da mucosa oral (PIERONI *et al.*, 2004; SCHERRER; MOTTI; WECKERL, 2005; GUARRERA *et al.*, 2005). A importância da utilização da *M. sylvestris* no combate a processos inflamatórios de boca e garganta foi reconhecida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da publicação da RDC Nº 10, de 09 de março de 2010. Esta resolução regulamenta o uso de plantas medicinais de uso tradicional popular no Brasil e traz em seu anexo uma lista com dezenas de espécies que são de venda livre no país. Neste sentido, o uso da *M. sylvestris* é recomendado sob a forma de infusão, administrando-a oral ou topicamente (BRASIL, 2010).

Estudos realizados até o momento mostram que o efeito anti-inflamatório das folhas da *M. sylvestris* pode ser devido à diversos fatores, tais como a atividade anti-complemento (TOMODA *et al.*, 1989); atividade antioxidante, que bloqueia a ação de radicais livres responsáveis pela liberação de mediadores inflamatórios por macrófagos e neutrófilos (CONFORTI *et al.*, 2008) ou diminuição das enzimas MPO e NAG, relacionadas com a quimiotaxia de células de defesa (LODDI, 2008). Além disso, foi demonstrado que, em diferentes partes da planta, estão presentes vários flavonóides que reconhecidamente apresentam atividade anti-inflamatória. Desse modo, folhas e flores de *M. sylvestris* mostraram teores significativos de genisteína, miricetina, apigenina, quercetina e kaempferol (SIKORSKA; MATLAWSKA; FRANSKI, 2004; ALESIANI *et al.*, 2007)

Em virtude da grande variedade de informações envolvendo esta espécie, uma revisão envolvendo aspectos farmacológicos, etnobotânicos, agrônômicos e fitoquímicos foi realizada e publicada em forma de artigo, objetivando contextualizar os avanços realizados até o momento e colaborar com futuras pesquisas sobre o tema (GASPARETTO *et al.*, 2012).

## 2.5 MÉTODOS ANALÍTICOS PARA ANÁLISE DE MEDIADORES DA INFLAMAÇÃO DO TIPO EICOSANÓIDE

Metodologias de identificação e quantificação de mediadores da inflamação do tipo eicosanóide, tanto em cultivos celulares como em meios biológicos são descritos na literatura desde o final da década de 1950 (HAMILTON; KAROL, 1982). Técnicas como cromatografia em coluna aberta, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detecção por ultra-violeta (UV) ou por fluorescência, cromatografia gasosa (CG), eletroforese capilar, análises imunoenzimáticas e radioimunoensaios, foram no passado avaliadas por diversos autores (MASOODI; NICOLAOU, 2006; BLEWETT *et al.*, 2007). Porém, todas elas possuem significativas desvantagens na medida em que requerem a existência de cromóforos (no caso de detecções por UV), exigem complexas e demoradas derivatizações de moléculas (no caso do uso de CG) e possuem baixa sensibilidade para detectar metabólitos endógenos, complicando o preparo de amostras e

introduzindo erros na análise (BLEWETT *et al.*, 2007). Além disso, técnicas que envolvem detecção por UV são dificultadas na medida em que eicosanóides absorvem em baixos comprimentos de onda, tornando a análise muito inespecífica (MASOODI; NICOLAOU, 2006).

Portanto, se fazia necessário o desenvolvimento de um método simples, sensível e seletivo para identificação e quantificação destes mediadores. Desse modo, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas seqüencial (CLAE-EM/EM) surgiu como uma valiosa ferramenta, permitindo análises quantitativas muito precisas e a obtenção de um perfil simultâneo de várias classes de eicosanóides (SHALE; STIRK; STADEN, 2005; MASOODI; NICOLAOU, 2006; BLEWETT *et al.*, 2007).

Quando analisados por CLAE-EM/EM, eicosanóides facilmente formam moléculas protonadas ou desprotonadas. O uso de ionização por *eletrospray* (ESI) permite análises sem a necessidade de derivatização ou demoradas preparações de amostra, além de oferecer alta versatilidade, sensibilidade e seletividade. ESI é muito aplicada nestas análises em função dos eicosanóides possuírem moléculas de ácido carboxílico livres, resultando em abundantes íons  $[M-H]^-$ , que permite detecções mesmo em baixas concentrações (MASOODI; NICOLAOU, 2006).

No Anexo 1 deste trabalho, a Tabela A.1 mostra métodos analíticos descritos na literatura envolvendo a identificação e quantificação de derivados eicosanóides em diferentes matrizes.

### 2.5.1 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM/EM)

O desenvolvimento dos primeiros espectrômetros de massas data do início do século passado, quando A. J. Dempster e Francis Aston fizeram, em experimentos paralelos, importantes descobertas sobre isótopos naturais de diversos elementos. Os conceitos desenvolvidos por estes pesquisadores são aplicados até hoje na construção dos mais modernos equipamentos (BUDZIKIEWICZ; GRIGSBY, 2006).

O espectrômetro de massas (EM) é um instrumento analítico que permite avaliar a massa molecular e a composição química de compostos isolados ou em misturas complexas. Através de um sistema de ionização, moléculas com carga

elétrica líquida negativa ou positiva são produzidas e então separadas por sua razão massa/carga ( $m/z$ ) pela passagem por um campo elétrico ou magnético (KORFMACHER, 2005). Dessa forma, o termo espectrômetro de “massas” não é muito adequado, uma vez que não é massa o parâmetro medido, mas sim a relação massa/carga do íon gerado (GLISH; VACHET, 2003).

Pode-se realizar o acoplamento do espectrômetro de massas com a já bem estabelecida técnica de CLAE, sendo esta estratégia usada em diversas áreas, como em análises ambientais, desenvolvimento de produtos pela indústria farmacêutica, avaliação de produtos naturais e caracterização de biomoléculas como peptídeos, proteínas, oligossacarídeos, lipídeos e oligonucleotídeos (NIESSEN, 2003). O acoplamento fornece uma eficiente transferência dos analitos da fase líquida para a fase gasosa, aumentando a seletividade e sensibilidade da análise e auxiliando a ionização, que é o processo crítico na espectrometria de massas (LEE; KERNS, 1999).

A instrumentação de um espectrômetro de massas acoplado a um sistema de cromatografia líquida (CLAE-EM) baseia-se na passagem da amostra através de diferentes módulos. Assim, o sistema é composto por um amostrador automático, onde as amostras são carregadas, pelo cromatógrafo, pela fonte de ionização (que é a interface entre os dois equipamentos) e pelo espectrômetro de massas propriamente dito (KORFMACHER, 2005).

O sistema de cromatografia líquida é composto basicamente por um reservatório de fase móvel, bomba de alta pressão, válvula de injeção e coluna (DEGANI; CASS, VIEIRA, 1998). O reservatório de fase móvel é o local onde se situa o solvente (ou a mistura de solventes) utilizado na eluição da amostra. A partir do momento em que a fase móvel e a amostra (proveniente do amostrador) se encontram, elas dirigem-se à bomba de alta pressão, cuja função é enviar um fluxo constante e reprodutível da mistura para a coluna. A coluna é considerada o coração do sistema cromatográfico, uma vez que é responsável pela separação dos componentes presentes na amostra, de acordo com a polaridade (JARDIM, COLLINS, GUIMARÃES, 2006). Tipicamente, sistemas CLAE-EM utilizam cromatografia em fase reversa, onde a fase móvel é uma combinação de água, metanol e acetonitrila, juntamente com modificadores químicos como acetato de amônio, ácido acético e ácido fórmico, que servem para melhorar o desempenho cromatográfico dos analitos de interesse (KORFMACHER, 2005).

Após a passagem da amostra pelo cromatógrafo, ela segue para o espectrômetro de massas, que é formado por três componentes principais: a fonte de ionização, o analisador de massas e o detector (LEE; KERNS, 2003).

### 2.5.1.1 Fontes de ionização

A fonte de ionização é o módulo mais importante do EM. Ela é responsável pelo processo de ionização das moléculas, através da adição ou remoção de partículas carregadas (elétrons, prótons ou íons de outros elementos) (NIESSEN, 2003).

Muitos mecanismos de ionização são descritos na literatura, dentre os quais podem ser citados a ionização por impacto de elétrons (EI), ionização química (CI), ionização por bombardeamento rápido de átomos (FAB), ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI), ionização por dessorção de *spray* de elétrons (DESI), ionização de campo (FI), dessorção de campo (FD), dessorção por plasma (PD), *thermospray*, *nanoelectrospray* e análise direta em tempo real (DART) (DE SOUZA, 2008). Porém, os dois tipos mais comuns de fontes de ionização são a ionização por Eletrospray (ESI) e a ionização química à pressão atmosférica (APCI), sendo inclusive considerados como padrão em sistemas hifenados CLAE-EM (KORFMACHER, 2005).

Na ESI, a ionização ocorre em função de uma alta voltagem (500 a 5000 V) aplicada na ponta de um fino capilar de aço inoxidável, por onde emerge a amostra contendo os analitos de interesse dissolvidos num solvente líquido volátil. O processo acontece à pressão atmosférica, e através da alta voltagem, ocorre o acúmulo de carga na superfície das gotículas localizadas no final do tubo capilar. Dessa forma, ocorre a nebulização da amostra (formando o cone de Taylor), que sai do capilar dispersa num aerossol composto por gotículas de solvente e analito altamente carregadas. A carga líquida do aerossol se torna positiva ou negativa dependendo da polaridade da voltagem aplicada. Concomitantemente, um gás inerte de nebulização (geralmente o nitrogênio) à alta temperatura (150-200°C) auxilia na evaporação do excesso de solvente e formação de gotículas ainda menores de aerossol. Com a diminuição da gotícula e a aproximação das cargas, a alta repulsão

eletrostática supera as forças de tensão superficial e ocorre então o fenômeno da “Explosão Coulombica”, onde os analitos em forma iônica são então liberados para atravessar o analisador de massas (GLISH; VACHET, 2003). A Figura 7 mostra um esquema do processo de ionização por ESI.

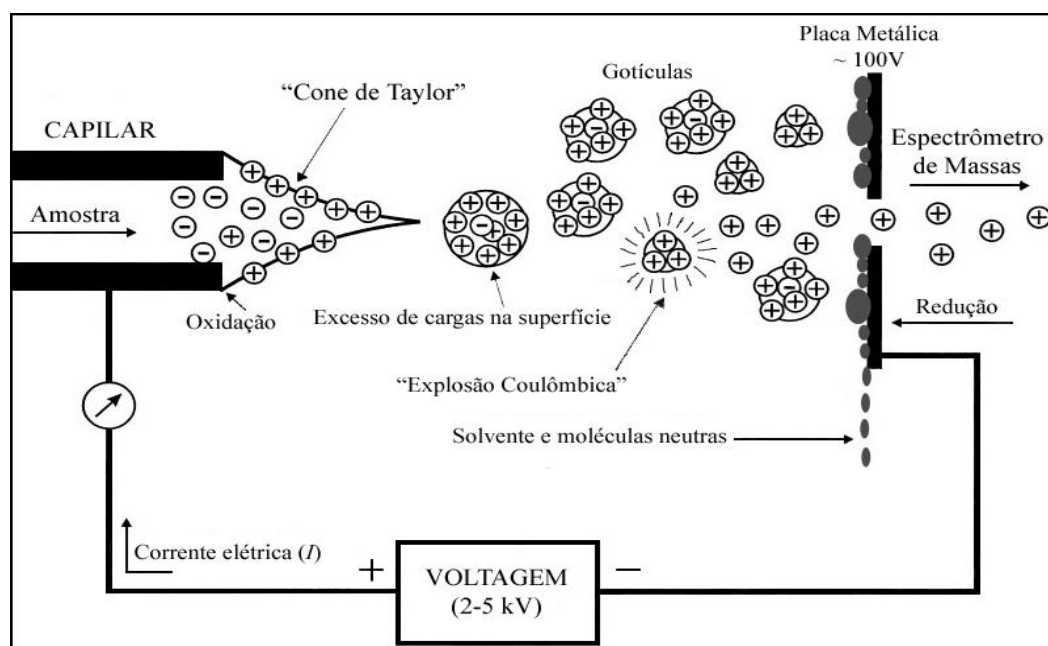


FIGURA 7 - ESQUEMA DE FUNCIONAMENTO DA IONIZAÇÃO POR *Eletrospray* (ESI)  
**FONTE:** adaptado de (CECH; ENKE, 2001).

A ESI é uma técnica considerada branda, pois ioniza a maioria das moléculas mantendo-as intactas, ocorrendo poucas quebras de ligações. Dessa forma, a ionização ocorre principalmente por mecanismos envolvendo protonação e desprotonação de sítios moleculares. Esta característica torna a técnica ESI muito versátil para a análise de compostos endógenos, ricos em funções ácido/base. Além disso, o tamanho das moléculas a serem ionizadas não é um fator limitante para esta técnica, pois ela consegue ionizar moléculas tão grandes quanto o DNA e complexos protéicos (GLISH; VACHET, 2003; NIESSEN, 2003). Apesar de adaptar-se bem ao acoplamento CLAE-EM, apresenta algumas desvantagens, tais como a susceptibilidade a efeitos de supressão de formação de íons quando em soluções que contenham alta concentração de sais (GLISH; VACHET, 2003).

Já na técnica APCI, a ionização é iniciada por uma descarga de corona (de -1 kV a 5 kV) proveniente de uma fina agulha. Os elétrons dessa descarga de corona

ionizam moléculas reagentes de gases aquecidos como  $N_2$ ,  $O_2$ ,  $H_2O$  e moléculas de solvente que estão presentes ao redor da agulha. A partir daí, uma série complexa de reações leva à ionização do analito quando este entra em contato com as moléculas reagentes pré-ionizadas. Dentre os atributos desta técnica, podem ser citados a facilidade de acoplamento com a CLAE e a menor susceptibilidade de interferências de matriz ocasionadas por sais. Como fator limitante, a alta temperatura dos gases de nebulização limita a utilização de compostos termicamente lábeis (GLISH; VACHET, 2003).

### 2.5.1.2 Analisadores de massas

Os analisadores de massa são os módulos responsáveis pelo controle da trajetória dos íons formados pela fonte de ionização. Através de campos elétricos e magnéticos, ocorre a separação entre os íons, segundo os valores de  $m/z$ , que são então encaminhados para o detector. Diversos mecanismos são utilizados para a análise das massas, entre eles os analisadores de setor, por armadilha de íons, por tempo de voo, com transformada de Fourier, por mobilidade de íons e os quadrupolares (DE SOUZA, 2008). O Quadro 2 mostra as diferentes metodologias empregadas pelos analisadores de massas mais comuns.

TIPO DE ANALISADOR DE MASSAS	MECANISMO DE SEPARAÇÃO DA $m/z$
Analisadores de setor	Utiliza campos elétricos e magnéticos em forma circular para afetar a trajetória e a velocidade dos íons até a sua chegada ao detector. Dessa forma, a separação ocorre em função da maior ou menor trajetória percorrida pelos íons em função da relação $m/z$ (quanto maior a $m/z$ , maior a trajetória percorrida).
Analisadores por armadilha de íons	O analito é aprisionado em um ambiente cercado por eletrodos, que cria um campo elétrico que mantém os íons em uma órbita estável em seu interior. Em função da aplicação de voltagem por radiofrequência, os íons são desestabilizados e ejetados para fora do analisador, de uma forma crescente de acordo com seus valores de $m/z$ .

QUADRO 2 – MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

FONTE: adaptado de (de SOUZA, 2008)



TIPO DE ANALISADOR DE MASSAS	MECANISMO DE SEPARAÇÃO DA $m/z$
Analisadores por mobilidade de íons	Possuem um ambiente denominado “câmara de deslizamento”, na qual existe um campo elétrico uniforme (que impulsiona os íons até o detector) e um gás como o argônio (que oferece resistência para o deslocamento dos íons). Dessa forma, íons mais volumosos percorrem a câmara e atingem o detector mais lentamente, quando comparados com íons mais compactos
Analisadores quadrupolares	Utilizam campos elétricos oscilantes (gerados por corrente-direta ou por radiofrequência), que aplicados em quatro barras metálicas dispostas como nos vértices de um quadrado, estabilizam ou desestabilizam seletivamente íons com determinadas $m/z$ durante sua passagem pelo centro do quadrupolo. Dessa forma, o quadrupolo atua como um filtro, permitindo a chegada ao detector somente de íons que conseguiram atravessar o campo elétrico, e ainda assim, cada qual em um tempo diferente.
Analisadores por tempo de voo	Baseiam-se no princípio de que íons de mesma carga possuem velocidades iguais se acelerados em um campo elétrico com potencial constante, e então a velocidade dentro do analisador será proporcional apenas a sua massa. Dessa forma, íons de menor $m/z$ , ou seja, com massas menores, atingirão o detector antes dos íons de massa maior
Analisadores por transformada de Fourier	Aprisionam íons em órbitas através de campos magnéticos e elétricos estáticos, e pulsos característicos de voltagem por radiofrequência excitam íons de acordo com suas $m/z$ , que então mudam de órbita e conseguem atingir o detector.

QUADRO 2 – MECANISMOS DE SEPARAÇÃO DE ÍONS PELOS ANALISADORES DE MASSAS MAIS COMUNS USADOS EM ESPECTROMETRIA DE MASSAS (continuação)

FONTE: adaptado de (de SOUZA, 2008)

Os sistemas quadrupolares de análise de massas, utilizando analisadores do tipo triplo-quadrupolo são os mais utilizados (NIESSEN, 2003). Esses modelos são formados por três componentes em seqüência, sendo dois analisadores separados por uma câmara de fragmentação. No primeiro quadrupolo, os íons precursores (também chamados de íons pais) são filtrados e isolados de acordo com sua  $m/z$ , e então passam pela câmara de colisão onde ocorre decomposição e conseqüente formação dos íons-filhos, os quais são analisados pelo segundo quadrupolo (JIAO *et al.*, 2002; GLISH; VACHET, 2003).

A maior vantagem da técnica se encontra justamente na possibilidade de análises seqüenciais, também conhecida como espectrometria de massas *tandem* (EM/EM). Esta técnica aumenta significativamente a especificidade da detecção de uma molécula, na medida em que os íons-filhos formados são sempre característicos para um determinado composto. Além disso, estes analisadores são

baratos e compactos, e se adaptam muito bem ao acoplamento CLAE-EM/EM (KORFMACHER, 2005).

### 2.5.1.3 Detectores

Os detectores compreendem a porção final dos espectrômetros de massas, e sua função é detectar os íons que chegam até eles e amplificar o sinal, convertendo feixes de íons em sinais elétricos que então podem ser traduzidos em imagens. Assim, eles são responsáveis por medir a abundância relativa de fragmentos de cada massa (DE SOUZA, 2008).

Dentre os vários tipos de detectores existentes, destaca-se o multiplicador de elétrons, utilizado em diferentes tipos de espectrômetros de massas. Sua habilidade em amplificar pequenas correntes iônicas em correntes ou pulsos elétricos facilmente mensuráveis faz desta técnica uma sensível ferramenta para a quantificação de analitos. O princípio de funcionamento de um multiplicador de elétrons baseia-se na *emissão secundária de elétrons*, onde uma partícula carregada (proveniente do analisador de massas) atinge uma superfície denominada dinodo, causando a liberação de elétrons dos átomos que a constituem, geralmente cobre ou berílio. Dessa forma, os dinodos atuam refletindo as partículas que se chocam a eles, atuando na amplificação do sinal inicial, que pode chegar à ordem de  $10^7$  a  $10^8$  (RICHTER *et al.*, 2001).

## 2.6 VALIDAÇÃO DE MÉTODOS BIOANALÍTICOS

A validação de um método é um aspecto crucial da garantia da qualidade analítica, e assim tem recebido uma atenção considerável por parte da comunidade científica, comitês industriais e entidades reguladoras (SILVA; ALVES, 2006). Além disso, a necessidade de se mostrar a comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade dos resultados analíticos têm sido cada vez mais reconhecida e exigida (RIBANI *et al.*, 2004).

A finalidade da validação é garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda as exigências das aplicações analíticas, assegurando dessa forma a credibilidade dos resultados. Para tanto, quando do desenvolvimento de um novo método ou de mudanças na síntese da substância ativa e/ou na composição do produto acabado, faz-se necessária a análise de uma série de parâmetros que garantam que o método de análise seja confiável (ANVISA, 2003).

Nesse sentido, existem alguns pré-requisitos para que o processo de validação transcorra adequadamente, como a qualificação dos equipamentos e a estabilidade das soluções analíticas. Além disso, o correto uso das ferramentas estatísticas para a análise dos resultados também é muito importante (SHABIR, 2003).

Desse modo, a validação deve garantir que os parâmetros de desempenho analítico especificidade/seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de quantificação, limite de detecção, robustez e exatidão, estejam adequados (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

#### 2.6.1 Especificidade e seletividade

É a capacidade que o método possui de medir exatamente um composto específico na amostra, independente da presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e demais elementos da matriz (ANVISA, 2003). Dessa forma, a seletividade garante que o pico da resposta seja exclusivamente do composto de interesse. A seletividade é o primeiro passo no desenvolvimento e validação de um método instrumental (RIBANI *et al.*, 2004).

Para análises qualitativas, como testes de identificação, é necessário demonstrar a capacidade de seleção do método entre compostos com estruturas relacionadas que podem estar presentes. Isto pode ser confirmado pela obtenção de resultados positivos em amostras contendo o analito, comparativamente com resultados negativos obtidos com amostras que não contém o analito, mas contendo estruturas semelhantes. Já para análises quantitativas, a seletividade pode ser determinada pela comparação entre amostras contaminadas com quantidades

apropriadas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, demonstrando que estes materiais não afetam o resultado (ANVISA, 2003).

A especificidade e a seletividade estão relacionadas ao evento da detecção. Segundo o INMETRO, um método de separação é específico quando causa uma resposta para uma única substância de interesse, e é seletivo quando produz sinais distintos para vários compostos químicos com características em comum. (SILVA; ALVES, 2006). Na medida em que há poucos métodos cromatográficos que respondem a apenas uma substância, o termo seletividade é mais apropriado, como sugerido pela IUPAC (RIBANI *et al.*, 2004).

### 2.6.2 Linearidade e intervalo

Linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica de demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de um intervalo especificado (ANVISA, 2003). A faixa linear também pode ser definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante (SILVA; ALVES, 2006).

A linearidade deve ser analisada através da construção de uma curva de calibração, com no mínimo cinco concentrações diferentes, que abranjam o intervalo de concentração teórica do teste (ANVISA, 2003).

A linearidade é obtida através de padronização interna e/ou externa, e a relação matemática resultante da interpolação dos dados de concentração (eixo x) com a resposta gerada pelo equipamento (eixo y) pode ser expressa por uma equação da reta (equação da regressão linear), usada para o cálculo da concentração do analito na amostra real. O coeficiente de correlação linear (R) é freqüentemente usado para indicar a adequabilidade da curva como modelo matemático, sendo que o critério mínimo de aceitação deste parâmetro varia de 0,98 a 0,99 dependendo do tipo da metodologia a ser validada (ANVISA, 2003; SILVA; ALVES, 2006). Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais (RIBANI *et al.*, 2004)

O intervalo é derivado da linearidade e corresponde à faixa entre o maior e menor nível de concentração do analito de interesse que pode ser determinada com precisão e exatidão (BRITO *et al.*, 2003). No caso da determinação de fármacos ou matéria-prima, o intervalo normalmente compreende a faixa de 80% a 120% da concentração teórica do teste (ANVISA, 2003).

### 2.6.3 Precisão

É a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra. Dessa forma, o procedimento analítico é aplicado várias vezes sob condições idênticas de ensaio numa amostra homogênea, e a precisão é então expressa em função da dispersão dos resultados, através do desvio padrão relativo (DPR), ou do coeficiente de variação (CV%), entre as determinações. A precisão é considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade (ANVISA, 2003; SILVA; ALVES, 2006).

A repetibilidade, também chamada de precisão intra-corrída, representa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo, com o mesmo analista e a mesma instrumentação. Este ensaio pode ser realizado através de nove determinações, contemplando concentrações dentro do intervalo linear do método (triplicatas dos níveis baixo, médio e alto), ou seis determinações a 100% da concentração do teste (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003). O resultado é expresso através do DPR entre as leituras, sendo que, para estudos bioanalíticos, não se admite valores superiores a 15%, exceto para o limite inferior de quantificação, para o qual se admite valores menores ou iguais a 20% (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

A precisão intermediária, ou precisão inter-corrídas, revela a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, porém obtidos em dias diferentes e com analistas e/ou equipamentos diferentes, avaliando-se portanto os efeitos aleatórios do procedimento analítico. Ela representa com mais confiabilidade a variabilidade dos resultados em um laboratório (RIBANI *et al.*, 2004). Recomenda-se no mínimo dois dias de intervalo entre os ensaios, e o resultado é expresso em função do DPR

ou do CV% entre as leituras das amostras dos dois analistas e/ou equipamentos diferentes, sendo os valores de referência os mesmos adotados para a repetibilidade (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003)

A reprodutibilidade, também conhecida como precisão inter-laboratorial, mostra a concordância entre os resultados obtidos em laboratórios diferentes (ANVISA, 2003). Embora a reprodutibilidade não seja um componente de validação de método executado por um único laboratório, é considerada importante quando uma empresa ou instituição busca a verificação do desempenho dos seus métodos (SILVA; ALVES, 2006).

#### 2.6.4 Exatidão

A exatidão de um método analítico é definida como a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro. Este parâmetro, que é a chave para o propósito da validação, pode ser calculado como porcentagem de recuperação da quantidade conhecida de analito adicionado à amostra, ou como a diferença entre as médias e o valor verdadeiro aceito, acrescido dos intervalos de confiança. Este parâmetro deve ser determinado após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da seletividade, sendo verificada a partir de no mínimo 9 determinações contemplando o intervalo linear (triplicatas dos níveis de concentração baixo, médio e alto) (ANVISA, 2003; BRITO *et al.*, 2003). A exatidão é expressa em porcentagem, pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente, como na equação (1).

$$Exatidão(\%) = \frac{Concentração\ experimental}{Concentração\ teórica} \times 100 \quad (1)$$

Existem vários mecanismos de avaliar a exatidão, tais como a utilização de Materiais de Referência Certificados (MRC), comparação de métodos, ensaios de recuperação e adição de padrão (RIBANI *et al.*, 2004).

### 2.6.5 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção representa a menor quantidade de analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (ANVISA, 2003). Ele é estabelecido por meio da análise de soluções de concentrações conhecidas e decrescentes do analito, até o menor nível detectável, através da diferenciação confiável do ruído de fundo. Na prática, no caso dos métodos instrumentais como CLAE e CG, o limite de detecção pode ser estimado com base na relação sinal-ruído, onde o sinal do analito deve ser pelo menos três vezes o ruído da linha de base (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

### 2.6.6 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. Este parâmetro também pode ser determinado através da análise de soluções de concentração conhecida sucessivamente diluídas, por meio da relação sinal-ruído gerada. Neste sentido, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1 (ANVISA, 2003). O LQ faz parte do estudo para determinação da faixa de trabalho (SILVA; ALVES, 2006).

### 2.6.7 Robustez

A robustez de um método é a medida de sua capacidade em resistir a pequenas e deliberadas variações dos parâmetros analíticos, indicando assim sua confiança durante o uso normal. Diversos parâmetros podem resultar na variação da resposta do método, como por exemplo o tempo utilizado e a estabilidade das

soluções durante preparo das amostras. No caso de métodos cromatográficos, podem ser avaliadas variações na temperatura, marcas de colunas, fabricantes de solventes, pH e fluxo de fase móvel (ANVISA, 2003). Desse modo, diz-se que um método é robusto se ele se mostrar praticamente insensível às variações sujeitas a ocorrerem durante a validação do método (SILVA; ALVES, 2006).

As mudanças introduzidas refletem as alterações que podem ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI *et al.*, 2004). A avaliação da robustez deve ser considerada durante a fase de desenvolvimento do método, e uma vez constatada a susceptibilidade a alguma variação, esta deve ser adequadamente controlada ou precauções devem ser incluídas no procedimento (ANVISA, 2003).

#### 2.6.8 Estabilidade

A estabilidade é um parâmetro que visa determinar se um analito mantém-se quimicamente inalterado numa dada matriz sob condições específicas, em determinados intervalos de tempo. As condições de realização dos ensaios de estabilidade devem reproduzir as reais condições de manuseio e análise das amostras. Dessa forma, este estudo deve ser realizado durante a coleta e sob armazenamento de curta e longa duração das amostras. Devem ser realizados também estudos de estabilidade das soluções-padrão preparadas com solventes adequados e em concentrações conhecidas (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

#### 2.6.9 Recuperação

O ensaio de recuperação mede a eficiência de extração do método analítico, expressa como a porcentagem da quantidade conhecida de um analito, obtida da comparação dos resultados analíticos de uma amostra branco acrescida de quantidade conhecida de padrão e submetida ao processo de extração, com o resultado analítico de soluções-padrão não extraídas. Porcentagens de recuperação



do analito e do padrão interno próximos a 100% são desejáveis, porém admitem-se valores menores, desde que a recuperação seja precisa e exata. O ensaio deve ser realizado em três níveis de concentração, contemplando a faixa de linearidade do método (ANVISA, 2003; RIBANI *et al.*, 2004).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas secas de *M. sylvestris* utilizadas nos experimentos foram fornecidas pela empresa Quimer Ervas e Especiarias<sup>®</sup> (Lote 001). A autenticidade da amostra foi confirmada pela obtenção do Laudo de Análise Botânica fornecido pela empresa (Anexo 2), que atesta que as folhas foram aprovadas quanto à identificação, baseando-se em características morfoanatômicas micro e macroscópicas descritas em monografias farmacopêicas (BRASIL, 2005).

Aproximadamente 2 kg de folhas secas foram submetidas a um moinho triturador de facas e martelos (Trapp<sup>®</sup> TRF-400), para a obtenção de material granulado de aproximadamente 3 mm, que foi armazenado em local seco, fresco e ao abrigo da luz, até o momento da utilização.

#### 3.2 PREPARO DO EXTRATO POR MACERAÇÃO

Uma quantidade de 250 g de material vegetal granulado foi misturada com 1500 mL de etanol absoluto (relação 1:6 p/v). O sistema foi mantido por 7 dias a temperatura ambiente, em recipiente fechado e opaco, com agitação de 30 segundos, duas vezes ao dia. Decorrido o tempo necessário para o término do processo de extração, o líquido extrator foi separado do material vegetal através de sistema de filtração com papel filtro quantitativo de poro de 28 µm.

O volume total de extrato alcoólico foi então submetido ao rotaevaporador sob pressão reduzida, controlando-se a temperatura de tal forma que não fosse superior a 60°C. Após a concentração do extrato, o material foi congelado sob temperatura de -80°C, e posteriormente liofilizado (Liobrás<sup>®</sup> L101).

A avaliação do rendimento do extrato foi realizada através da equação (2).

$$R(\%) = \frac{\text{Peso de extrato liofilizado obtido (g)}}{\text{Peso de folhas secas utilizadas (g)}} \times 100 \quad (2)$$

O extrato liofilizado foi mantido em recipiente fechado e opaco e armazenado em refrigerador (-80°C) até o momento do uso.

### 3.2.1 Preparo das soluções de extrato de *M. sylvestris*

Para o preparo da solução-mãe, o extrato liofilizado de *M. sylvestris* foi dissolvido a uma concentração de 1% (p/v) ou 10.000 µg/mL, em solução contendo 10% de etanol absoluto em meio de cultivo celular (meio RPMI-1640 completo, com 1% de Soro Fetal Bovino, antibióticos - 300 mg/mL de penicilina-G e 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina -, isento de vermelho de fenol, Himedia®). A solução foi submetida a banho de ultrassom por 30 minutos (25°C) e então filtrada em membrana de 0,45 µm (Millipore®). Uma nova filtração, desta vez em ambiente estéril, foi realizada com filtros de 0,22 µm (Millipore®), para garantir a ausência de contaminantes de origem microbiana na solução.

Através de diluições da solução-mãe, foram preparadas soluções de extrato a 1.000 µg/mL, 100 µg/mL e 10 µg/mL, utilizando como solvente somente o meio de cultivo. Todas as soluções foram acondicionadas em recipientes de polipropileno e congeladas a -30°C, até o momento da utilização.

### 3.2.2 Perfil cromatográfico do extrato por CLAE-UV

O extrato de *M. sylvestris* foi submetido ao CLAE-UV para a obtenção do perfil cromatográfico, no sentido de caracterizá-lo quanto a presença de flavonóides e outras substâncias de interesse anti-inflamatório. Dessa forma, foram preparadas soluções do extrato diluídas em metanol, as quais foram filtradas em membranas de

poro de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore<sup>®</sup>) e injetadas no CLAE-UV de acordo com o método desenvolvido por HAYASHI, (2012).

As análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Agilent<sup>®</sup> 1100 (Waldbronn, Alemanha), bomba quaternária G1311A, degaseificador G1379A, injetor automático G1320A e detector de fotodiodo G1315B. Os dados foram processados através do software ChemStation<sup>®</sup> versão A10.02. O Quadro 3 mostra as condições cromatográficas utilizadas.

PARÂMETROS CROMATOGRÁFICOS	ESPECIFICAÇÕES*
Coluna	XBridge <sup>™</sup> Waters <sup>®</sup> C18 (150 mm x 4,6, 5 $\mu\text{m}$ )
Volume de injeção	5 $\mu\text{L}$
Temperatura do forno da coluna	25°C
Comprimento de onda monitorado	348 nm
Tempo de corrida	55 minutos
Fluxo de Fase Móvel	800 $\mu\text{L}/\text{min}$
Modo de eluição	Gradiente
Composição da Fase Móvel	H <sub>2</sub> O 10% AFO (v/v); MeOH 10% AFO (v/v) e ACN

QUADRO 3 – CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS UTILIZADAS PARA A CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE *M. sylvestris* POR CLAE-UV

**NOTA:** \*Método desenvolvido por HAYASHI, (2012).

### 3.3 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> DO MEIO DE CULTIVO CELULAR

Diferentes experimentos foram realizados no sentido de se obter o maior rendimento possível de recuperação do analito PGE<sub>2</sub> do meio de cultivo celular. A análise da literatura mostrou uma grande variedade de técnicas, envolvendo principalmente extração por partição líquido-líquido e extração por fase sólida (EFS) utilizando cartuchos de sílica C-18, sílica híbrida ou similares (NITHIPATIKOM *et al.*, 2003; SCHMIDT; COSTE; GEISLINGER, 2005; HISHINUMA *et al.*, 2007; BLEWETT *et al.*, 2008).

O desenvolvimento do método de extração foi realizado somente utilizando cartuchos de extração em fase sólida (HLB Oasis<sup>™</sup> Waters<sup>®</sup>, 30  $\mu\text{m}$  de poro, 30 mg de fase estacionária copolímerica, capacidade de 1 mL), através do auxílio de sistema *Manifold* (Waters<sup>®</sup>, Milford-Massachussetts, USA). Dessa forma, 950  $\mu\text{L}$  do

meio de cultivo RPMI-1640 completo (suplementado com 1% de SFB, antibióticos, isento de vermelho de fenol, Himedia<sup>®</sup>), foi fortificado com 50 µL de solução-padrão de PGE<sub>2</sub> a 100 ng/mL, e em seguida submetido a diferentes condições de extração (Tabela 2). Após os processos extrativos serem realizados e o eluato evaporado, o resíduo seco foi ressuscitado com 100 µL da fase móvel utilizada no CLAE-EM/EM.

Para o cálculo da porcentagem de recuperação, um padrão de PGE<sub>2</sub> a 50 ng/mL diluído em fase móvel foi preparado no momento do uso, e a área relativa a este padrão (considerada 100%) foi comparada com a área do analito recuperado na amostra, segundo a equação (3).

$$R(\%) = \frac{\text{Área do pico na amostra}}{\text{Área do pico na solução padrão}} \times 100 \quad (3)$$

Os testes foram realizados em triplicata, e os resultados foram expressos em porcentagem de recuperação. O critério de escolha do método de extração foi baseado na maior percentual de recuperação, com reprodutibilidade aceitável.

TABELA 2 – CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> EM MEIO DE CULTIVO CELULAR, UTILIZANDO EFS

TÉCNICA	PREPARO DA AMOSTRA	PRÉ-ACONDICIONAMENTO DA COLUNA	LAVAGEM DA COLUNA	ELUIÇÃO DO ANALITO	SECAGEM DA AMOSTRA
1	-	2 mL de MeOH e 2 mL de H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O e 1 mL de MeOH 5%	1 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
2	-	2 mL de MeOH e 2 mL de H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O e 1 mL de MeOH 10%	1 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
3	-	2 mL de MeOH e 2 mL de H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O e 1 mL de MeOH 10%	0,5 mL de ACN, 0,5 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
4	-	2 mL de MeOH e 2 mL de H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O e 1 mL de ACN 10%	1 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
5	-	2 mL de MeOH e 2 mL de H <sub>2</sub> O	2 mL H <sub>2</sub> O e 2 mL de ACN 10%	1 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
6	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL 0,1% AFO e 2 mL de MeOH com 0,1% AFO	1,0 mL de AcOEt e 1,0 mL de MeOH com 0,2% AFO	Através de <i>centrivap</i> a 40°C.
7	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL 0,1% AFO e 2 mL de MeOH com 0,1% AFO	0,5 mL de MeOH, 1,0 mL de AcEtila e 0,5 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
8	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH com 0,1% AFO	1,0 mL de MeOH e 1,0 mL de ACN	Através de fluxo de nitrogênio
9	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	1,5 mL de AcOEt e 0,5 mL de MeOH com 0,2% AFO	Através de fluxo de nitrogênio
10	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	1 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
11	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	0,5 mL de MeOH, 0,5 mL de AcOEt e 1 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
12	Adição de 10 µL de BHT 10%	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	0,5 mL de MeOH, 0,5 mL de ACN, 0,5 mL de AcOEt e 0,5 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
13	Adição de 10 µL de BHT 10%, 175 µL de etanol e 20 µL de ácido acético.	2 mL de 0,1% AFO, 2 mL de MeOH e 2 mL de AcOEt	2 mL de 0,1% AFO	1 mL de AcOEt, 0,5 mL de MeOH e 0,5 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio

TABELA 2 – CONDIÇÕES EMPREGADAS NOS TESTES DE RECUPERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> EM MEIO DE CULTIVO CELULAR, UTILIZANDO EFS (continuação)

TÉCNICA	PREPARO DA AMOSTRA	PRÉ-ACONDICIONAMENTO DA COLUNA	LAVAGEM DA COLUNA	ELUIÇÃO DO ANALITO	SECAGEM DA AMOSTRA
14	Adição de 10 µL de BHT 10%, 175 µL de etanol e 40 µL de ácido acético.	2 mL de MeOH e 2 mL de 0,1% AFO	2 mL de 0,1% AFO	1 mL de AcOEt com 0,1% BHT e 1 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
15	Adição de 10 µL de BHT 10%, 175 µL de etanol e 40 µL de ácido acético.	2 mL de MeOH e 2 mL de 0,1% AFO	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	1,5 ml de AcOEt com 0,1% AFO e 0,5 mL de hexano	Através de fluxo de nitrogênio
16	Adição de 10 µL de BHT 10%, 175 µL de etanol e 40 µL de ácido acético.	2 mL de MeOH e 2 mL de 0,1% AFO	2 mL de 0,1% AFO e 2 mL de MeOH 10% com 0,1% AFO	1,0 ml de AcOEt com 0,1% AFO e 1,0 mL de EMTB	Através de fluxo de nitrogênio

**NOTA:** ACN: Acetonitrila; AcOEt: Acetato de etila; AFO: Ácido fórmico; BHT: Butilhidróxidotolueno; MeOH: Metanol; EMTB: Éter metil terciário butílico

### 3.3.1 Procedimento de extração de prostaglandinas de meio de cultivo celular

Em um tubo de polipropileno (2 mL) contendo 1 mL de meio de cultivo celular, foram adicionadas alíquotas de 10 µL de uma solução de BHT 10%, 175 µL de etanol e 40 µL de ácido acético. O material foi centrifugado por 5 minutos a 7000 rpm a -9°C (Eppendorf®, Centrifugue 5810R), e então o sobrenadante foi submetido ao processo de extração.

O pré-acondicionamento da coluna de EFS (Oasis HLB™) foi realizado com 2 mL de metanol e 2 ml de ácido fórmico 0,1%. Após a passagem da amostra, o cartucho foi lavado com 2 ml de ácido fórmico 0,1%. Então, o cartucho foi eluído com 1 ml de acetato de etila (com 0,1% de BHT 10%) e 1 mL de hexano, sendo estas frações recuperadas (tubos de polipropileno de 2 mL) e então evaporadas através de fluxo de nitrogênio. Em seguida, o resíduo foi reconstituído com 100 µl de fase móvel, agitado em vórtex durante 1 minuto e mantido em banho de ultra-som por 30 segundos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas a 14000 rpm (-9°C) por 5 minutos, e então 70 µL do sobrenadante foram transferidos para insertos em *vials* âmbar para a injeção no CLAE-EM/EM.

## 3.4 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE ANÁLISE DE PGE<sub>2</sub> POR CLAE-EM/EM

Um novo método para análise do metabólito PGE<sub>2</sub> foi desenvolvido, buscando especificidade, qualidade dos picos cromatográficos e rapidez na análise.

### 3.4.1 Instrumentação

O cromatógrafo líquido utilizado nas análises foi um modelo Agilent® Technologies 1200 Series, com bomba binária G1312B, degaseificador G1379B e forno de coluna TCC SL G1316B. O sistema foi acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo da Applied Biosystems® modelo API 3200,



utilizando fonte de ionização do tipo *Eletrospray* (ESI). O injetor automático e gerenciador de amostras utilizado foi o modelo CTC Waters<sup>®</sup> 2777 Sample Manager, e os dados obtidos pelo CLAE-EM/EM foram processados através do *software* Analyst<sup>®</sup>, versão 1.4.2.

#### 3.4.2 Preparo de padrões de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4

Foram adquiridos padrões de PGE<sub>2</sub> de concentração 200 µg/mL (Cayman<sup>®</sup> Chemical, lote 0423249) e de PGB<sub>2</sub>-d4 de concentração 500 µg/mL (Cayman<sup>®</sup> Chemical, lote 2745-5), ambos diluídos em acetato de metila. Os padrões foram mantidos em suas embalagens de origem sob refrigeração a -80°C até o momento do uso.

Foram preparadas soluções-estoque dos dois analitos, de concentração 1000 ng/mL, diluídas em acetonitrila (Tedia<sup>®</sup> Brazil). Estas soluções também foram armazenadas em refrigerador a -80°C. As soluções de trabalho foram preparadas diluindo a solução-estoque em diluente adequado de acordo com a necessidade de cada experimento.

Durante todo o processo de preparo das soluções, evitou-se a incidência direta de luz sobre as amostra, trabalhando-se em ambiente com pouca luminosidade. Além disso, o tempo de exposição das soluções a temperatura ambiente foi sempre o menor possível, para evitar degradações.

#### 3.4.3 Desenvolvimento do método

##### 3.4.3.1 Infusão direta no Espectrômetro de Massas (EM)

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através da técnica da infusão direta. Este passo foi necessário para a avaliação da intensidade da ionização sofrida pelos analitos na solução. Dessa forma, uma solução contendo a mistura dos

padrões de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 foi elaborada a uma concentração de 250 ng/mL de cada composto, diluídos em acetonitrila/água (50:50 v/v). Esta concentração foi suficiente para obter-se uma intensidade de sinal com valores próximos entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps (contagens por segundo), preconizada pelo fabricante do equipamento como sendo suficiente para que seja possível a posterior otimização automática dos parâmetros de detecção.

Para este experimento, a posição do capilar vertical do ESI foi mantido em 10 mm e do horizontal em 5 mm. As amostras então foram infundidas no EM utilizando uma seringa (Hamilton<sup>®</sup>, Reno, NV-USA), mantendo um fluxo de alimentação de 10 µL/min. O monitoramento dos dois analitos foi realizada no modo negativo, em função das suas características de ionização.

#### 3.4.3.2 Otimização automática do equipamento por *MRM*

Uma vez que a concentração utilizada para os analitos se adequou às características do equipamento, foi então realizada a otimização automática dos parâmetros de DP (*potencial de desagregação*), EP (*potencial de entrada*), CEP (*potencial de entrada na célula de colisão*), CE (*energia de colisão*) e CXP (*potencial da célula de saída*) do analisador de massas do equipamento. Um ajuste fino de cada parâmetro foi realizado automaticamente para cada analito, e ao final deste procedimento o software utilizado para o processamento de dados forneceu um relatório contendo todos os valores otimizados.

Após a otimização por *MRM*, foram obtidos os espectros do *íons moleculares* [M-H]<sup>-</sup> da PGE<sub>2</sub> e do padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4, bem como seus fragmentos (íons-filhos). Foram então escolhidos para o monitoramento no espectrômetro de massas os dois fragmentos mais intensos (estáveis) relativos a cada analito.

#### 3.4.3.3 Análise por Injeção em Fluxo (FIA)

Após o ajuste dos parâmetros do analisador de massas, foram então otimizados os parâmetros da fonte de ionização. Para isto foi realizada uma Análise por Injeção em Fluxo (FIA), que ajustou CUR (*gás de cortina*), CAD (*gás de colisão*), GS1 (*gás nebulizador*), GS2 (*gás secante*), IS (*voltagem do capilar*) e TEM (*temperatura da fonte*).

A injeção em fluxo foi realizada acoplando-se o cromatógrafo líquido, sem a coluna cromatográfica, ao espectrômetro de massas. A fase móvel utilizada foi acetonitrila/água (50:50 v/v), com fluxo de 200 µL/min e volume de injeção de 10 µL. A posição vertical do capilar do *Eletrospray* foi ajustada para 3 mm, e a horizontal para 5 mm.

#### 3.4.3.4 Análise por CLAE-EM/EM

O desenvolvimento do método cromatográfico foi inicialmente baseado em estudos prévios disponíveis na literatura (MASOODI; NICOLAOU, 2006, BLEWETT *et al.*, 2007). O método foi desenvolvido utilizando como matriz o sobrenadante do cultivo celular obtido após 24 horas de incubação com as células U937-d por 24 horas, em ambiente a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub> (item 3.5). Esta matriz foi fortificada com de PGE<sub>2</sub> e padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4 (100 ng/mL de cada), e em seguida submetida ao processo de extração conforme item 3.3.1.

Em função das características moleculares dos analitos e da análise da literatura, optou-se pela utilização de coluna cromatográfica de sílica do tipo C18. Diferentes comprimentos e marcas de colunas foram avaliadas, como mostra a Tabela 3.

TABELA 3 – COLUNAS UTILIZADAS DURANTE O DESENVONVIMENTO DO MÉTODO CROMATOGRÁFICO

COLUNA	DIÂMETRO DA COLUNA	DIÂMETRO DE PORO DE SÍLICA	COMPRIMENTO	FABRICANTE
Zorbax™ Eclipse XDB	2,1 mm	5 µm	150 mm	Agilent® Technologies
XBridge™	2,1 mm	5 µm	150 mm	Waters® Corporation
XBridge™	2,1 mm	5 µm	100 mm	Waters® Corporation

Ajustes no sistema cromatográfico, como variações no fluxo (de 300 a 400  $\mu\text{L}/\text{min}$ ), composição (diferentes proporções de acetonitrila em água, variando de 30% a 65%) e modo de eluição da fase móvel (isocrática ou por gradiente) também foram avaliadas. Além disso, a necessidade do uso de aditivo na fase móvel (ácido fórmico) também foi considerada.

Em todas as condições, o volume de injeção foi mantido em 20  $\mu\text{L}$ , e a temperatura do forno da coluna em 25°C, a fim de evitar a degradação dos analitos durante a fase cromatográfica.

Foram escolhidos a coluna e os parâmetros que forneceram o melhor sistema cromatográfico, considerando o adequado perfil dos picos, a maior intensidade do sinal gerado e o menor tempo de corrida possível.

#### 3.4.4 Validação do método

A validação do método de quantificação da PGE<sub>2</sub> foi realizada de acordo com a RE nº 899 de 29 de março de 2003 publicada pela ANVISA (BRASIL, 2003). Para conferir uma maior credibilidade ao método desenvolvido, foram realizados os ensaios preconizados pela norma para “Métodos Bioanalíticos”. Dessa forma, foram avaliados os parâmetros sensibilidade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão (repetibilidade e precisão intermediária), exatidão, robustez, recuperação e estabilidade.

Como matriz de validação, foi utilizado o sobrenadante do cultivo celular obtido após 24 horas de incubação com células U937-d, em ambiente a 37°C e com 5% de CO<sub>2</sub> (item 3.5). Esta matriz foi fortificada com concentração conhecida dos analitos, e então submetida ao processo de EFS, conforme item 3.3.1. Em seguida, as amostras foram injetadas no CLAE-EM/EM.

##### 3.4.4.1 Seletividade

O parâmetro de seletividade foi avaliado através do método da comparação da matriz. Para tanto, as seguintes amostras foram preparadas, extraídas (item 3.3.1) e injetadas em CLE-EM/EM:

- 1 mL de meio de cultivo RPMI-1640 completo isento de vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB e antibióticos;
- 900 µL de matriz de validação;
- 900 µL de matriz de validação fortificada com PGB<sub>2</sub>-d4 (50 ng/mL);
- 900 µL de matriz de validação fortificada com PGE<sub>2</sub> (5 ng/mL) e PGB<sub>2</sub>-d4 (50 ng/mL)

Os cromatogramas obtidos com estas amostras foram por fim comparados com aquele obtido por meio da injeção de uma solução-padrão de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 previamente preparada em acetonitrila/água/AFO 35:65:0,1 v/v/v (50 ng/mL cada). Para o meio de cultivo RPMI 1640, nenhum pico interferente deve ser observado nos mesmos tempos de retenção do analito e do padrão interno. Para as matrizes de validação, nenhum interferente significativo deve ser observado junto ao pico basal de PGE<sub>2</sub>, ou no mesmo tempo de retenção do padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4.

#### 3.4.4.2 Limite de Detecção (LD)

O limite de detecção foi avaliado em triplicata a partir de diluições sucessivas de soluções de trabalho de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4, a uma concentração inicial de 100 ng/mL de cada composto. O diluente utilizado foi acetonitrila/água/AFO 35:65:0,1 v/v/v. Foi considerado como limite de detecção a concentração dos analitos que resultou num pico de no mínimo 3 vezes a altura do ruído da linha de base do cromatograma.

#### 3.4.4.3 Limite de Quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi avaliado de forma análoga ao LD, no entanto considerando um pico de no mínimo 10 vezes a altura do ruído da linha de base do cromatograma, com precisão e exatidão aceitáveis.

#### 3.4.4.4 Linearidade

A linearidade da curva analítica de PGE<sub>2</sub> foi determinada através do método de padronização interna, em sete níveis de concentração contemplando a faixa de 5,0 a 500,0 ng/mL. O padrão interno utilizado foi PGB<sub>2</sub>-d4, a uma concentração de 50,0 ng/mL.

Cada nível da curva foi preparado em triplicata, adicionando a 900 µL da matriz de validação, 50 µL das soluções de trabalho de PGE<sub>2</sub> e 50 µL da solução de trabalho do padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4. A Tabela 4 mostra, de forma sumarizada, o esquema de preparo das amostras para a elaboração da curva de calibração.

TABELA 4 – PREPARO DE AMOSTRAS CONTENDO PGE<sub>2</sub> E PADRÃO INTERNO PGB<sub>2</sub>-d4 PARA ENSAIO DE LINEARIDADE

NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO	ANALITO				CONCENTRAÇÃO FINAL APÓS EXTRAÇÃO (ng/mL)	
	PGE <sub>2</sub>		PGB <sub>2</sub> -d4*		PGE <sub>2</sub>	PGB <sub>2</sub> -d4*
	Solução de trabalho utilizada (ng/mL)	Volume de solução de trabalho adicionado à 900 µl de matriz (µl)	Solução de trabalho utilizada (ng/mL)	Volume de solução de trabalho adicionado 900 µl de matriz (µl)		
Nível 1	10,0	50,0	100,0	50,0	5,0	50,0
Nível 2 <sup>a</sup>	20,0	50,0	100,0	50,0	10,0	50,0
Nível 3	50,0	50,0	100,0	50,0	25,0	50,0
Nível 4 <sup>b</sup>	100,0	50,0	100,0	50,0	50,0	50,0
Nível 5	200,0	50,0	100,0	50,0	100,0	50,0
Nível 6 <sup>c</sup>	500,0	50,0	100,0	50,0	250,0	50,0
Nível 7	1000,0	50,0	100,0	50,0	500,0	50,0

\* Padrão interno

**NOTA:** <sup>a</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Baixa concentração; <sup>b</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Média concentração; <sup>c</sup> Nível de concentração utilizado como Controle de Qualidade de Alta concentração

A curva de calibração foi gerada automaticamente pelo *software Analyst*<sup>®</sup> versão 1.4.2, para confirmar a relação linear entre a área do analito/área do padrão interno *versus* a concentração do analito/concentração do padrão interno. O coeficiente angular, o intercepto e o coeficiente de correlação foram calculados para determinar a equação da reta, obtida através da regressão 1/x. Além disso, para cada nível da curva de calibração, a precisão e a exatidão também foram avaliadas. Os níveis relativos aos controles de qualidade baixo (CQB), médio (CQM) e alto (CQA), foram respectivamente 10,0, 50,0 e 250,0 ng/mL.

#### 3.4.4.5 Precisão

A precisão do método foi avaliada em dois níveis: repetibilidade (através análises intra-dia) e precisão intermediária (através de análises inter-dia).

Os ensaios de precisão foram realizados por meio do preparo de uma sextuplicata de amostras contemplando os níveis de concentração CQB, CQM e CQA da curva de calibração, conforme demonstrado na Tabela 5.

TABELA 5 – PREPARO DE AMOSTRAS CONTENDO PGE<sub>2</sub> E PADRÃO INTERNO PGB<sub>2</sub>-d4 PARA ENSAIO DE PRECISÃO

ANALITO	SOLUÇÃO DE TRABALHO UTILIZADA (ng/mL)	VOLUME DE SOLUÇÃO DE TRABALHO ADICIONADO A 900 µL DE MATRIZ DE VALIDAÇÃO (µL)	CONCENTRAÇÃO FINAL APÓS EXTRAÇÃO (ng/mL)
PGE <sub>2</sub>	20,0	50,0	10,0
	100,0	50,0	50,0
	500,0	50,0	250,0
PGB <sub>2</sub> -d4*	100,0	50,0	50,0

\* Padrão interno

A repetibilidade foi realizada pelo mesmo analista e em um mesmo equipamento, sob condições idênticas de uso, durante um curto espaço de tempo (6 horas). A precisão intermediária foi realizada da mesma forma, no entanto por um segundo analista, dois dias após o ensaio de repetibilidade. Neste caso, foram

avaliados os mesmos níveis de concentração da repetibilidade e o preparo das amostras seguiu o mesmo procedimento.

A precisão foi expressa em termos do coeficiente de variação (CV%) entre as áreas da PGE<sub>2</sub> e da PGB<sub>2</sub>-d4 obtidas com as duas corridas analíticas (repetibilidade), e entre as áreas obtidas entre os dois analistas (precisão intermediária).

#### 3.4.4.6 Exatidão

A exatidão foi avaliada através do método de adição do padrão (RIBANI *et al.*, 2004). Para tanto, 900 µL da matriz de validação foi submetida à extração (conforme item 3.3.1) e injetada no CLAE-EM/EM, sendo as áreas do pico de PGE<sub>2</sub> registradas (área basal). Em seguida, a matriz de validação foi fortificada com PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 nos mesmos níveis de concentração do ensaio de precisão (Tabela 5). Para cada nível de concentração, a área experimental foi determinada subtraindo a área basal de PGE<sub>2</sub> daquelas obtidas com as amostras fortificadas.

Em uma segunda etapa, soluções de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 foram preparadas em água/acetoneitrila/AFO 65:35:0,1 v/v/v de modo a obter os mesmos níveis de concentração do ensaio experimental, sendo em seguida submetidas ao processo de extração (item 3.3.1). As amostras relativas a estas soluções foram injetadas em CLAE-EM/EM e as áreas obtidas foram consideradas teóricas.

O ensaio foi conduzido em sextuplicata, sendo a exatidão do método calculada por meio da razão entre as áreas médias experimentais e a áreas teóricas, conforme a equação (4).

$$E(\%) = \frac{\text{Área experimental}}{\text{Área teórica}} \times 100 \quad (4)$$

#### 3.4.4.7 Robustez



A robustez foi avaliada através da comparação entre as áreas dos picos de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 em corridas cromatográficas utilizando o método original em relação a métodos com pequenas e deliberadas modificações (Tabela 6). Para tanto, foram elaboradas, em triplicata, soluções de trabalho de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 diluídas em fase móvel (água/acetoneitrila/AFO 65:35:0,1 v/v/v), na concentração de 50,0 ng/mL de cada analito. O resultado foi expresso em termos de coeficiente de variação (CV%) entre as corridas. A avaliação de diferenças entre os grupos foi realizada através da aplicação de teste *t* (duas amostras em par para médias), sendo considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .

TABELA 6 – MUDANÇAS PROPOSTAS NO SISTEMA CROMATOGRÁFICO PARA REALIZAÇÃO DO TESTE DE ROBUSTEZ

CARACTERÍSTICAS DO MÉTODO	MÉTODO ORIGINAL	MUDANÇAS PROPOSTAS
% de AFO na Fase Móvel	0,1%	0,09% e 0,11%
Fluxo da Fase Móvel	300 µL/min	298 µL/min e 302 µL/min
Temperatura do forno da coluna	25°C	23°C e 27°C
Fabricante do Solvente Orgânico	Tedia® Brazil	Panreac® Química SA e Carlo Erba® Reagents
Lote da coluna	0110381161	0115370731

#### 3.4.4.8 Recuperação

A recuperação foi realizada em triplicata, em três níveis de concentração para a PGE<sub>2</sub> (10,0; 50,0 e 250,0 ng/mL) e em um único nível de concentração para o padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4 (50,0 ng/mL).

Numa primeira etapa, 900 µL da matriz de validação foi submetida à extração (conforme item 3.3.1) e injetada no CLAE-EM/EM, sendo as áreas do pico de PGE<sub>2</sub> registradas (área basal). Em seguida, a matriz de validação foi fortificada com PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 nos mesmos níveis de concentração do ensaio de precisão (Tabela 5). As áreas basais de PGE<sub>2</sub> foram subtraídas das áreas obtidas com matrizes fortificadas (áreas experimentais).

A recuperação foi determinada comparando as áreas experimentais com aquelas obtidas através de soluções-padrão (diluídas em água/acetoneitrila/AFO 65:35:0,1 v/v/v) injetadas diretamente em CLAE-EM/EM, nas mesmas concentrações do ensaio experimental. O percentual de recuperação foi obtido através da equação (5).

$$R(\%) = \frac{\text{Área dos analitos da amostra}}{\text{Área dos analitos da solução}} \times 100 \quad (5)$$

#### 3.4.4.9 Estabilidade

O ensaio de estabilidade foi realizado no sentido de avaliar a degradação sofrida pelos analitos nas condições reais de armazenamento e manuseio da amostra.

A estabilidade foi analisada em triplicata, em três níveis de concentrações para a PGE<sub>2</sub> (10,0; 50,0 e 250,0 ng/mL) e em um único nível de concentração para PGB<sub>2</sub>-d4 (50,0 ng/mL), quando aplicável. O preparo das amostras seguiu o mesmo protocolo do ensaio de precisão (Tabela 5). As condições de armazenamento avaliadas foram: estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento em matriz de validação; estabilidade de curta duração em matriz de validação; estabilidade de longa duração em matriz de validação; estabilidade pós-processamento e estabilidade das soluções-padrão.

A estabilidade foi avaliada comparando as áreas dos analitos obtidas nas condições de armazenamento com aquelas obtidas em amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração, de acordo com a equação (6).

$$E(\%) = \frac{\text{Área da amostra armazenada}}{\text{Área da amostra recém - preparada}} \times 100 \quad (6)$$

##### 3.4.4.9.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento da matriz

As matrizes de validação utilizadas para avaliar a estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento da matriz foram primeiramente fortificadas com PGE<sub>2</sub> em três níveis de concentração (Tabela 5), e em seguida foram congeladas a -80°C por 24 horas. Após esse período, as matrizes congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente (21-23°C) e ao abrigo da luz. Quando completamente descongeladas, as amostras foram novamente congeladas na temperatura indicada por 24 horas, e assim sucessivamente, até completarem três ciclos. Ao final do processo, as amostras foram submetidas à EFS conforme item 3.3.1 e injetadas no CLAE-EM/EM.

#### 3.4.4.9.2 Estabilidade de curta duração

A estabilidade de curta duração foi realizada para avaliar o tempo em que as amostras podem permanecer sobre a bancada ou sob refrigeração a 4°C antes que seja realizado o processo de extração em fase sólida, sem que ocorra degradação significativa.

As matrizes de validação foram fortificadas com PGE<sub>2</sub> em três níveis de concentração de acordo com o procedimento descrito (Tabela 5). Um lote de matriz de validação fortificada foi armazenado sobre a bancada (em local escuro, à temperatura de 21-23°C) e outro lote em refrigerador a 4°C. As matrizes de validação fortificadas foram então submetidas à EFS (item 3.3.1) após 3, 6, 12 e 24 horas de armazenamento, e as áreas obtidas em cada período comparadas com amostras recém-preparadas nos mesmos níveis de concentração.

#### 3.4.4.9.3 Estabilidade de longa duração

As matrizes de validação foram preparadas em três níveis de concentração de PGE<sub>2</sub> de acordo com o procedimento descrito Tabela 5, e imediatamente congeladas a -80°C por 7 dias. Após o período de armazenamento, as matrizes foram submetidas à extração (item 3.3.1) e injetadas em CLAE-EM/EM. As áreas

obtidas foram comparadas com as de amostras recém-preparadas, nos mesmos níveis de concentração.

#### 3.4.4.9.4 Estabilidade pós-processamento

A estabilidade pós-processamento foi realizada para avaliar a possível degradação dos analitos no gerenciador de amostras do CLAE-EM/EM durante o período de análise. A realização deste ensaio consistiu no preparo de matrizes de validação fortificadas com PGE<sub>2</sub> em três níveis de concentração e com padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4 a 50 ng/mL (Tabela 5), que foram em seguida e submetidas à EFS (item 3.3.1). Após a extração, as amostras foram solubilizadas em ACN/H<sub>2</sub>O/AFO 35:65:0,1 v/v/v, e em seguida mantidas no gerenciador de amostras (4°C ) durante 6, 12 e 24 horas. As áreas obtidas em cada período de armazenamento foram comparadas com aquelas obtidas com amostras recém-preparadas e injetadas, nos mesmos níveis de concentração.

#### 3.4.4.9.5 Estabilidade das soluções de trabalho

A estabilidade das soluções de trabalho de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 foi realizada para avaliar o tempo em que estes analitos podem permanecer sobre a bancada ou congeladas a -80 °C, sem que sofram degradação significativa. As soluções foram preparadas em acetonitrila, de modo a obter as concentrações de 20,0; 100,0 e 500,0 ng/mL de PGE<sub>2</sub> e 100,0 ng/mL de PGB<sub>2</sub>-d4.

Um lote destas soluções foi mantido sobre a bancada por 6 e 12 horas (temperatura controlada de 21-23°C, ao abrigo da luz), enquanto outro foi congelado a -80°C por 3 dias.

A estabilidade foi avaliada através da comparação entre a área dos picos de cada analito nas soluções armazenadas com aquelas obtidas em soluções recém-preparadas.

### 3.5 CÉLULAS DA LINHAGEM U937

Células histomonocíticas da linhagem U937, adquiridas da Associação Técnico-Científica Paul Ehrlich – APABCAM – UFRJ, foram mantidas em meio RPMI-1640 completo (Himedia<sup>®</sup>), suplementado com 10% (v/v) de Soro Fetal Bovino (SFB), 300 mg/mL de penicilina-G e 50 mg/mL de sulfato de estreptomicina. A incubação foi realizada a 37°C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>, sendo as células sub-cultivadas a cada 4 dias, na concentração de 10<sup>5</sup> células/mL.

Para os experimentos de diferenciação, células U937 em fase exponencial de crescimento foram tratadas com 100 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), lote BCB1847V (Sigma-Aldrich<sup>®</sup>) por 48 horas. Em seguida, o meio de cultivo foi renovado para meio RPMI-1640 suplementado com antibióticos, mas com apenas 1% de SFB, onde as células permaneceram em repouso por mais 24 horas (TANJI *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004). Ao final deste período, as células diferenciadas (doravante denominadas U937-d), foram lavadas com PBS (400 g / 5 minutos), ressuspensas em meio RPMI-1640 isento de vermelho de fenol (Himedia<sup>®</sup>) suplementado com 1% de SFB e antibióticos e plaqueadas na densidade de 10<sup>6</sup> células/mL em placas de 24 poços (TPP<sup>®</sup>).

#### 3.5.1 Indução da produção de PGE<sub>2</sub> por células U937-d

Para induzir a liberação de PGE<sub>2</sub> a valores acima dos níveis basais, células U937-d foram expostas as diferentes substâncias e/ou condições especificadas na Tabela 7 por 24 horas, a 37° C, em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

TABELA 7 – SUBSTÂNCIAS/CONDIÇÕES UTILIZADAS PARA O ESTÍMULO DA PRODUÇÃO DE PGE<sub>2</sub> POR CÉLULAS U937-d

SUBSTÂNCIA/CONDIÇÃO	CONCENTRAÇÕES UTILIZADAS NO MEIO DE CULTIVO
Desferroxamina	200,0 e 400,0 µM
17-β-estradiol	10,0; 20,0 e 40,0 nM
LPS*	0,5; 1,0; 10,0; e 100,0 µg/mL
Interferon-α	1,0 e 5,0 ng/mL
(LPS + Interferon-α)	(1,0 µg/mL + 5,0 ng/mL) e (10,0 µg/mL + 5,0 ng/mL)
Meio condicionado de <i>Escherichia coli</i>	10 <sup>-2</sup> – 10 <sup>-5</sup> (v/v)
DMSO**	10,0 e 50,0 µL/mL

\* Lipopolissacarídeo

\*\* Dimetilsulfóxido

As soluções-estoque de desferroxamina, LPS e interferon-α foram preparadas em meio RPMI-1640 isento de vermelho de fenol, suplementado com antibióticos e 1% de SFB. O 17-β-estradiol, em função de sua imiscibilidade em solventes aquosos, foi preparado em meio de cultivo contendo 25% de DMSO (v/v). O meio condicionado de *Escherichia coli* foi preparado de acordo com o item 3.5.1.1.

Após 24 horas de incubação, o sobrenadante dos cultivos foi colhido e centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos, sendo em seguida submetido ao processo de extração (conforme item 3.3.1) e injetado no CLAE-EM/EM.

Os resultados foram expressos em função da razão entre as concentrações de PGE<sub>2</sub> nas amostras tratadas em relação às amostras controle, caracterizadas pelo meio obtido de células não expostas a indutores. Três ou mais experimentos independentes foram realizados para cada grupo e analisados estatisticamente com o teste *t* (duas amostras em par para médias) com auxílio do programa Microsoft Office Excel<sup>®</sup> 2007. Valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

#### 3.5.1.1 Obtenção do meio condicionado de *E. coli*

Colônias de *E. coli* ATCC 25922 desenvolvidas em meio TSA após 24 horas de cultivo a 37°C, foram transferidas para tubos Falcon<sup>®</sup> de 15 mL, centrifugadas e

ressuspendidas em 10 mL de água ultra-pura estéril. Após agitação vigorosa em vórtex, a suspensão bacteriana foi centrifugada a 4.000 rpm por 5 minutos, e o *pellet* celular foi ressuspendido em 3 mL de solução de Alsever™ (Sigma Aldrich®). Para inativação da cepa, a suspensão bacteriana obtida foi submetida a cinco ciclos de congelamento (-80°C/30 minutos) e descongelamento (60°C/60 minutos) em banho de ultra-som aquecido (Branson®, modelo 8510). O meio condicionado resultante foi aliquoteado e armazenado a -80° C. No momento do uso, diluições apropriadas foram realizadas também em solução de Alsever™, cuja composição era NaCl (4,2 g/L), citrato de sódio (8,0 g/L), ácido cítrico (0,55 g/L) e D-Glucose (20,5 g/L).

### 3.5.2 Avaliação da viabilidade e da proliferação celular

A viabilidade das células U937-d após 24 horas de tratamento foi observada em microscópio óptico (Olympus® CH30) após diluição com solução a 0,4% Azul de Trypan em salina tamponada com fosfatos (PBS). As células foram contadas em câmaras de Neubauer Improved e discriminadas como viáveis (as que se apresentaram incolores, íntegras, brilhantes e redondas) e não viáveis (as coradas em azul, muitas com perda da definição de contorno). A viabilidade foi expressa em porcentagem de células viáveis em relação ao total de células contadas e, onde necessário, comparadas ao grupo controle (células sem tratamento). À contagem do número total de células (vivas e mortas) atribuiu-se a atividade de proliferação celular. Os resultados foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão de, pelo menos três experimentos independentes. De acordo com a conveniência, análise de Variância Simples (ANOVA – *one way*) e teste *t* (duas amostras em par para médias) foram usados para avaliar a significância dos resultados, onde valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

### 3.5.3 Avaliação do efeito de extrato de *M. sylvestris* sobre a liberação de PGE<sub>2</sub> por células U937-d

Células U937-d foram submetidas a tratamento com o extrato de *M. sylvestris*, com 10  $\mu$ M do anti-inflamatório de referência indometacina, e com os estimulantes de produção de PGE<sub>2</sub> por 24 horas, a 37° C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>. Em alguns experimentos, as células foram simultaneamente tratadas com o extrato de *M. sylvestris* e com os estimulantes de liberação de PGE<sub>2</sub>. Células que não receberam nenhum tratamento foram consideradas como controle.

Após incubação, o sobrenadante desses cultivos foi centrifugado a 7.000 rpm por 5 minutos e submetido ao processo de extração (item 3.3.1). Em seguida, o doseamento de PGE<sub>2</sub> foi realizado por CLAE-EM/EM, utilizando a metodologia analítica validada (item 3.4.4). Os resultados foram expressos em função da razão entre as concentrações de PGE<sub>2</sub> nas amostras tratadas e no controle. A diferença entre os grupos foi avaliada pelo teste *t* (duas amostras em par para médias), sendo considerados estatisticamente significativos valores de  $p \leq 0,05$ .



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A Figura 8 representa o aspecto das folhas secas inteiras e do triturado de *M. sylvestris* obtido após a passagem pelo moinho.



FIGURA 8 – ASPECTO DAS FOLHAS SECAS DE *Malva sylvestris*

**NOTA:** (A) Folhas inteiras  
(B) Folhas trituradas

**FONTE:** O autor

### 4.2 PREPARO DOS EXTRATOS POR MACERAÇÃO

A maceração foi escolhida por ser um método bastante simples de ser executado e apresentar baixo custo, apesar do tempo de preparo ser relativamente longo. Além disso, em função de ser uma técnica de extração passiva, apresenta como vantagem o fato de proporcionar uma extração suave dos metabólitos, não ocasionando, por exemplo, perdas por termodegradação, uma vez que a técnica é realizada à temperatura ambiente.

No momento da concentração do extrato, a temperatura do rotaevaporador também foi rigorosamente controlada (inferior a 60°C), para evitar ao máximo a

degradação sobretudo dos flavonóides, principais componentes indicados como responsáveis pela ação anti-inflamatória da planta.

Ao término do processo extrativo, o extrato liofilizado apresentou um rendimento de 9,14% (p/p).

#### 4.2.1 Preparo das soluções de extrato de *M. sylvestris*

O extrato liofilizado de *M. sylvestris* foi completamente solubilizado em um solvente representado por 10% (v/v) de etanol absoluto dissolvido em meio de cultivo RPMI completo isento de vermelho de fenol, suplementado com 1% de SFB e antibióticos.. Utilizando este solvente e após a submissão da solução ao ultrassom, não foi possível detectar a presença de materiais particulados em suspensão, sendo considerado, portanto, um diluente adequado. A solução foi filtrada em membrana de poro 0,45  $\mu\text{m}$  e em seguida em filtro de poro 0,22  $\mu\text{m}$ , a fim de garantir a ausência de contaminantes bacterianos.

É importante salientar que foi utilizada no diluente a menor quantidade de etanol que proporcionou a solubilização do material, na medida em que este álcool pode ser tóxico para as células.

#### 4.2.2 Perfil cromatográfico do extrato por CLAE-UV

O método desenvolvido por HAYASHI, 2012, permitiu a identificação e a quantificação de três compostos no extrato de *M. sylvestris*, os ácidos cafeico e ferúlico e a escopoletina. A Figura 9 mostra o perfil do cromatograma que caracteriza o extrato, enquanto que a Tabela 8 mostra a quantificação dos compostos.

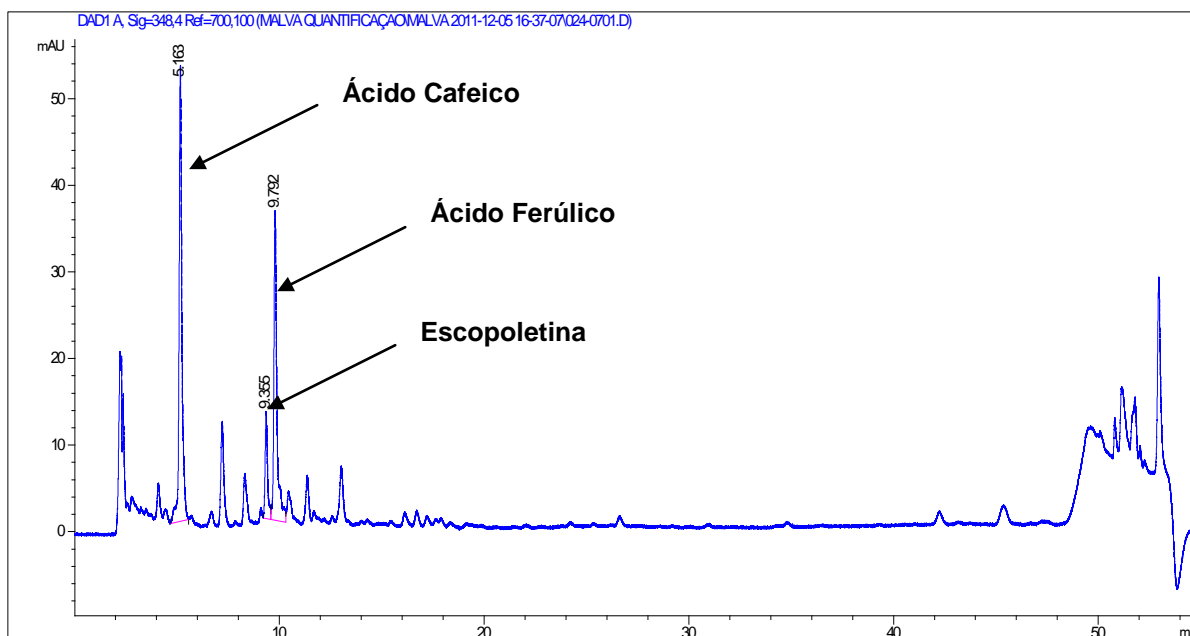


FIGURA 9 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO DE *M. sylvestris*

TABELA 8 – QUANTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS IDENTIFICADOS NO EXTRATO DE *M. sylvestris*, POR CLAE-UV

COMPOSTO	CONCENTRAÇÃO (µg/mg de extrato)
Ácido Cafeico	13,54
Ácido Ferúlico	13,43
Escopoletina	2,89

Das substâncias encontradas no extrato, o ácido ferúlico e a escopoletina apresentam estudos que comprovam o seu efeito anti-oxidante e anti-inflamatório, respectivamente. A forte relação entre a inflamação e o estresse oxidativo fazem do ácido ferúlico uma substância-chave na resolução de processos inflamatórios (ZHAO; MOGHADASIAN, 2008). É bem estabelecido também que a escopoletina é responsável pela diminuição na produção de citocinas pró-inflamatórias e PGE<sub>2</sub>, pela inibição da expressão de COX-2 (KIM *et al.*, 2004).

Dessa forma, estas substâncias podem atuar direta ou indiretamente na resolução de processos inflamatórios, e assim contribuir para o principal efeito terapêutico da *M. sylvestris*.

### 4.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO DOS ANALITOS DO MEIO DE CULTIVO CELULAR

Diversos métodos de extração dos eicosanóides do cultivo celular foram testados. Todos eles envolveram a utilização de cartuchos EFS, na medida em que análises na literatura mostraram resultados promissores utilizando esta técnica (DEEMS *et al.*, 2007; LUNDSTRÖM *et al.*, 2009).

Optou-se pelo modelo de cartucho Oasis HLB™ (Waters®), por ele apresentar uma grande tolerância de valores de pH da amostra extraída e adsorver compostos de uma ampla faixa de polaridade. Estes cartuchos apresentam um sorvente de fase-reversa produzido com uma mistura de copolímeros hidrofílico (N-vinilpirrolidona) e lipofílico (divinilbenzeno). Este balanço proporciona uma capacidade três vezes superior de adsorção de compostos hidrofóbicos, quando comparado com os cartuchos tradicionais de sílica-C18 (WATERS®, 2008).

Diferentes variações na quantidade e polaridade dos solventes utilizados em todas as fases do processo de extração foram analisadas, baseando-se em métodos adaptados da literatura (TAKABATAKE *et al.*, 2002; NITHIPATIKOM *et al.*, 2003; BLEWETT *et al.*, 2008).

As 16 condições utilizadas para a recuperação da PGE<sub>2</sub> (Tabela 2) mostraram diferentes eficiências de extração. Como pode ser observado na Figura 10, a maior média de recuperação foi alcançada utilizando o método “14”.

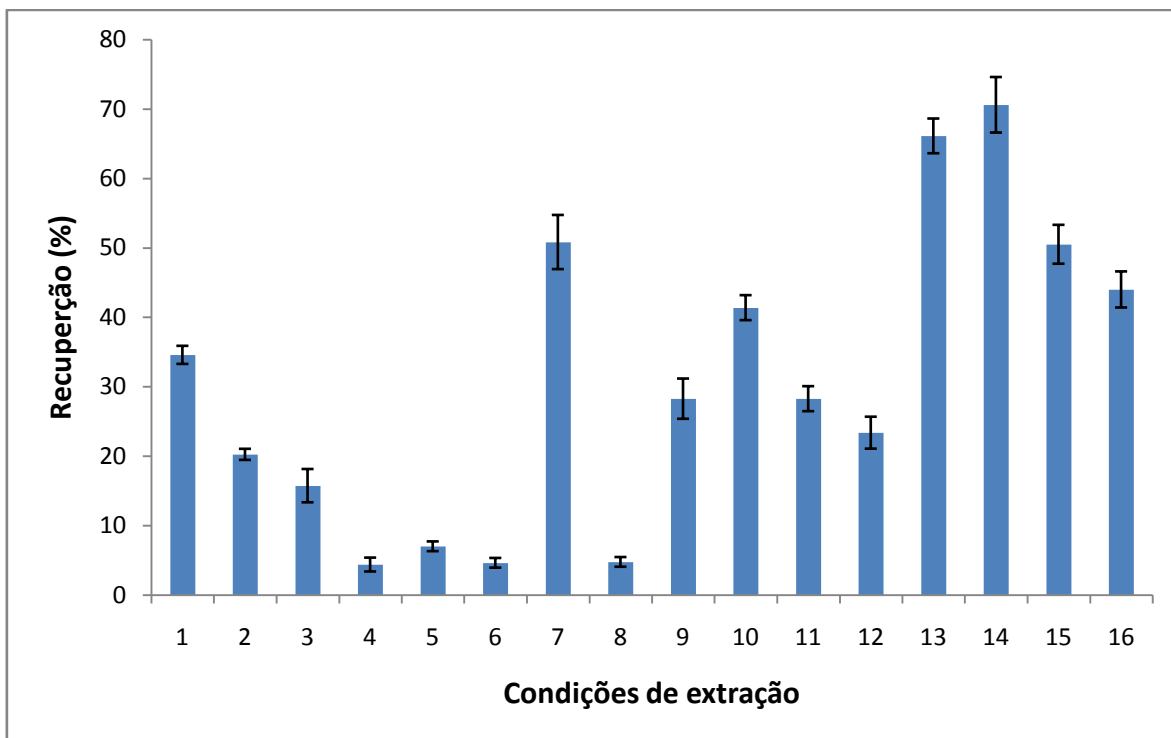


FIGURA 10 – MÉDIAS DE RECUPERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> DO MEIO DE CULTIVO RPMI-1640 PELAS DIFERENTES CONDIÇÕES DE EXTRAÇÃO UTILIZANDO EFS

A análise da literatura mostrou que diversos autores encontraram dificuldades em obter recuperações satisfatórias de metabólitos eicosanóides (acima de 75%), principalmente quando a matriz se tratava de meio de cultivo celular (KINGSLEY *et al.*, 2005; DEEMS *et al.*, 2007). Em nosso caso, utilizando do método “14”, uma recuperação média de 70,6% foi obtida com grande precisão (CV% = 5,76). Este resultado foi considerado satisfatório frente aos demais apresentados pela literatura.

Em relação ao método de extração escolhido, a ausência do vermelho de fenol na matriz foi necessária para evitar que o corante interferisse no processo de recuperação, uma vez que também poderia ser adsorvido pela fase estacionária do cartucho e comprometer a eluição dos analitos.

Dados da literatura também demonstram que as prostaglandinas são extremamente lábeis, e portanto, seria prudente que se evitasse ao máximo as oxidações (LUNDSTRÖM *et al.*, 2009). Neste contexto, durante o preparo da amostra foi utilizado 10 µL do antioxidante BHT (10%) a fim de diminuir possíveis perdas por termo e fotodegradações do analito. A adição de etanol nesta fase teve a função de romper as ligações da prostaglandina com as proteínas do meio, facilitando a sua recuperação (MESAROS; LEE; BLAIR, 2009). Finalmente, a adição

de ácido acético foi utilizada para acidificação do meio (em torno de pH 4), na medida em que as prostaglandinas apresentam um pKa de aproximadamente 4,7. Esta etapa foi fundamental para favorecer a manutenção dos compostos na forma molecular, facilitando a adsorção na fase estacionária do cartucho (RINNE *et al.*; 2007).

O pré-acondicionamento do cartucho consistiu na eluição consecutiva de metanol e ácido fórmico a 0,1%. A passagem do solvente aquoso acidificado teve como função preparar o adsorvente quanto ao pH e a polaridade para a passagem da amostra. Após a passagem da amostra, a lavagem do cartucho foi realizada com AFO 0,1%, na medida em que ensaios utilizando pequenos volumes de solvente orgânico revelaram perdas na eficiência de recuperação (Tabela 2, Figura 10).

A eluição dos analitos foi realizada com acetato de etila e hexano, em função das características moleculares das prostaglandinas, que apresentam baixa polaridade por serem derivadas de ácidos graxos. Por fim, a evaporação dos solventes orgânicos utilizados na eluição foi realizada através da aplicação de fluxo de nitrogênio gasoso, dada a grande sensibilidade dos analitos à temperatura elevada (LUNDSTRÖM *et al.*, 2009). Métodos que utilizaram aquecimento da amostra não mostraram grandes eficiências de recuperação.

#### 4.4 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO POR CLAE-EM/EM

Os metabólitos derivados do ácido araquidônico, tais como a PGE<sub>2</sub>, são liberados pelas células na ordem de ng/mL (LU *et al.*, 2004). Assim, a escolha pela técnica de CLAE-EM/EM para detecção e quantificação desse metabólito se justifica na medida em que esta técnica possibilita a determinação de compostos em pequenas concentrações em matrizes de alta complexidade, como é o caso dos meios de cultivo. Além disso, a alta seletividade fornecida pela técnica torna a análise mais confiável, quando comparada com imuno e radioimunoensaios, CLAE e CG.

##### 4.4.1 Infusão direta no EM

O tipo de fonte de ionização escolhida para o desenvolvimento do método foi a ionização por *Eletrospray* (ESI), em função da sua capacidade de ionizar analitos de forma branda, sem promover a degradação dos mesmos. Além disso, este sistema é facilmente acoplável ao sistema cromatográfico e é capaz de promover com facilidade a ionização de derivados do ácido araquidônico, tais como as prostaglandinas (DEEMS *et al.*, 2007).

Apesar das prostaglandinas poderem ser analisadas tanto no modo positivo quanto negativo de ionização, é no modo negativo que a análise se mostra mais sensível, em função da abundante geração de íons carboxilato  $[M-H]^-$ , o que permite a detecção da PGE<sub>2</sub> a baixas concentrações (MURPHY *et al.*, 2005). Portanto, em nossos experimentos, a fonte operou no modo negativo de ionização.

A checagem do sinal dos analitos foi realizada através da infusão direta de solução-padrão de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 a 250 ng/mL de cada analito. Como pode ser observado na Figura 11, nesta concentração, sinais característicos intensidade próxima a valores entre  $2 \times 10^5$  e  $1 \times 10^6$  cps para a PGE<sub>2</sub> ( $m/z$  350,8) e para a PGB<sub>2</sub>-d4 ( $m/z$  337,2) foram obtidos. Esta intensidade de sinal é preconizada pelo fabricante do equipamento como ideal para a realização da otimização automática dos parâmetros do analisador de massas através de *Multiple Reaction Monitoring* (MRM).

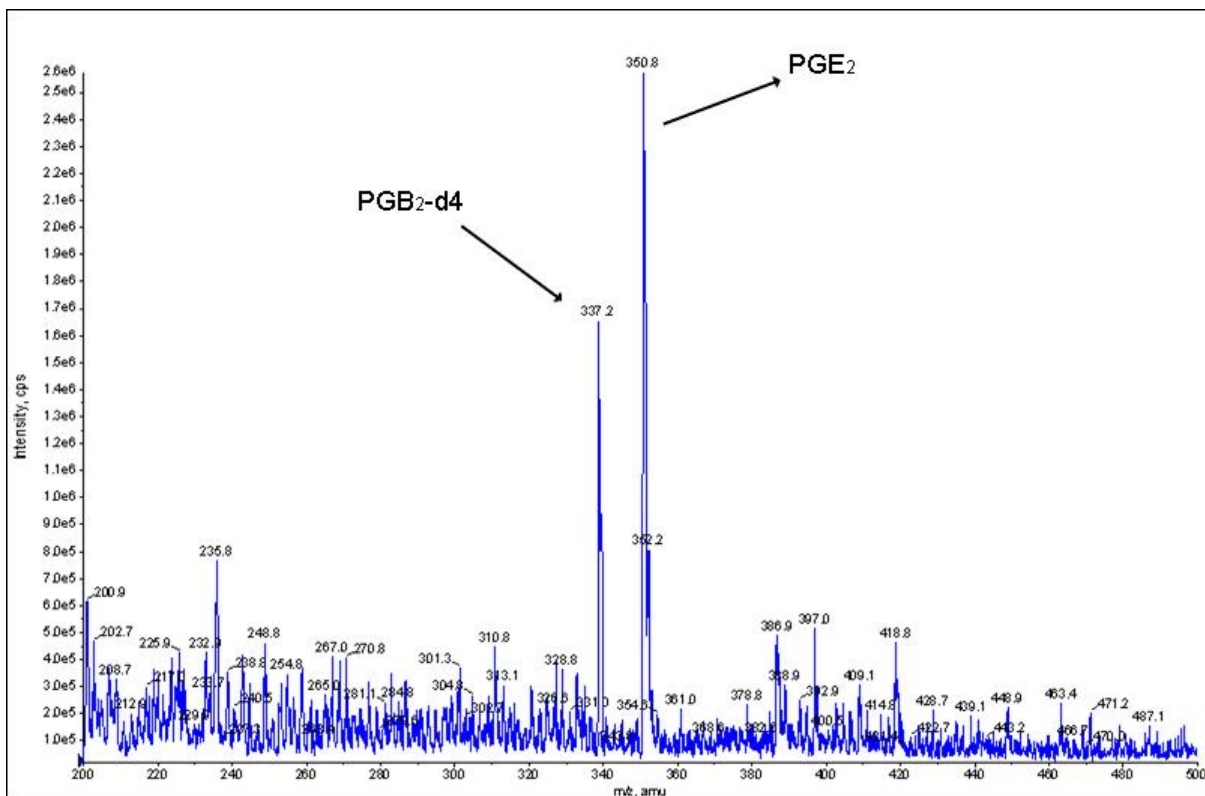


FIGURA 11 – FULL SCAN DOS PADRÕES DE PGE<sub>2</sub> E PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub>, UTILIZANDO ESI NO MODO NEGATIVO DE IONIZAÇÃO

#### 4.4.2 Otimização dos parâmetros por MRM

Após a obtenção do sinal adequado dos dois analitos, a otimização dos parâmetros do analisador de massas foi realizado através de MRM. Dessa forma, para cada composto, o “potencial de desagregação” (DP), “potencial de entrada” (EP), “potencial de entrada da célula de colisão” (CEP), “energia de colisão” (CE) e “potencial de saída da célula de colisão” (CXP) foram ajustados automaticamente pelo equipamento.

Ao final das otimizações, foram definidos para cada analito os dois “íons-fragmentos” mais intensos, sendo o de maior intensidade utilizado para a quantificação e o segundo maior em intensidade utilizado para a qualificação dos compostos. Os espectros dos “íons-fragmentos” da PGE<sub>2</sub> e da PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> são mostrados nas Figuras 12 e 13, respectivamente, enquanto que a Tabela 9 mostra as voltagens obtidas após os ajustes de cada parâmetro.



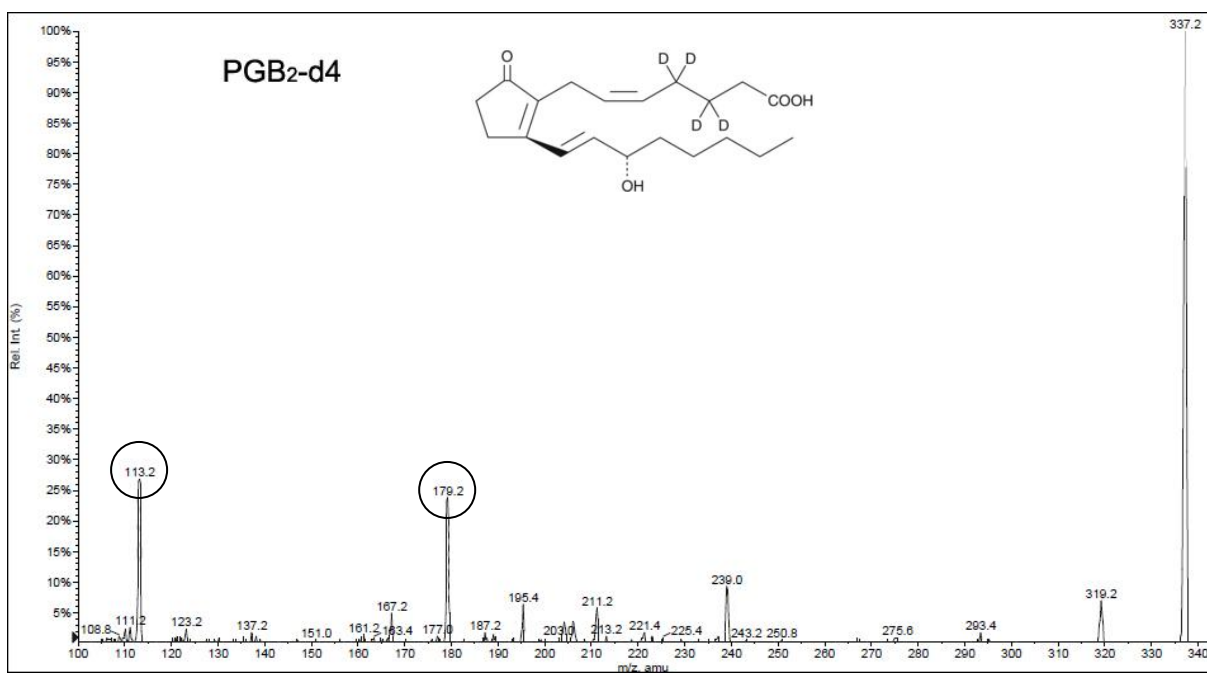
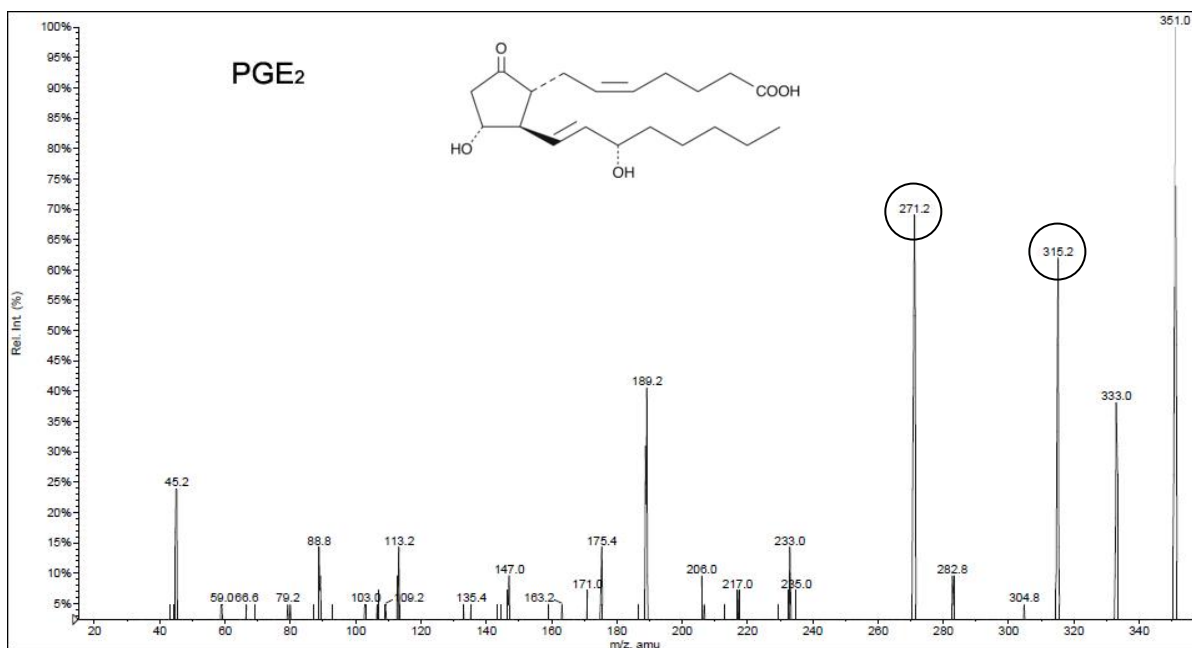


TABELA 9 – PARÂMETROS DE VOLTAGEM OTIMIZADOS ATRAVÉS DE MRM PARA OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS MAIS INTENSOS DE PGE<sub>2</sub> E PGB<sub>2</sub>-d4

PARÂMETRO	VOLTAGEM (V)			
	PGE <sub>2</sub>		PGB <sub>2</sub> -d4	
	Fragmento de m/z 271	Fragmento de m/z 315	Fragmento de m/z 113	Fragmento de m/z 179
DP <sup>1</sup>	-30,0	-30,0	-50,0	-50,0
EP <sup>2</sup>	-5,0	-5,0	-4,0	-4,0
CEP <sup>3</sup>	-20,0	-20	-18,0	-18,0
CE <sup>4</sup>	-24,0	-14,0	-26,0	-30,0
CXP <sup>5</sup>	-4,0	-4,0	-2,0	-4,0

**NOTA:** <sup>(1)</sup> *Potencial de desagregação*  
<sup>(2)</sup> *Potencial de entrada*  
<sup>(3)</sup> *Potencial de entrada na célula de colisão*  
<sup>(4)</sup> *Energia de colisão*  
<sup>(5)</sup> *Potencial de saída da célula de colisão*

Como pode ser visualizado nas Figuras 12 e 13, a PGE<sub>2</sub> apresentou como fragmentos principais os íons de *m/z* 315,2 e 271,2, enquanto que a PGB<sub>2</sub>-d4 os íons de *m/z* de 113,2 e 179,2. Assim, ficaram definidas quais as transições a serem monitoradas na quantificação e qualificação dos analitos. A Tabela 10 representa estes valores.

TABELA 10 – TRANSIÇÕES MONITORADAS NA QUANTIFICAÇÃO E QUALIFICAÇÃO DA PGE<sub>2</sub> E DA PGB<sub>2</sub>-d4

ANALITOS	TRANSIÇÕES MONITORADAS ( <i>m/z</i> )	
	Quantificação	Qualificação
PGE <sub>2</sub>	351,2-315,2	351,2-271,2
PGB <sub>2</sub> -d4	337,8-113,2	337,8-179,2

A geração destes íons-fragmentos para a PGE<sub>2</sub> está de acordo com a literatura, que ainda relata que o mecanismo de fragmentação de todas as prostaglandinas é muito similar (MURPHY *et al.*, 2005). Na Figura 14, está representado mecanismo para a formação dos íons mais intensos da PGE<sub>2</sub>, onde pode ser observado que a formação do íon de *m/z* 315 está relacionada com a perda de duas moléculas de água, e que a formação do íon de *m/z* 271 ocorre devido à perda de uma molécula de CO<sub>2</sub>.

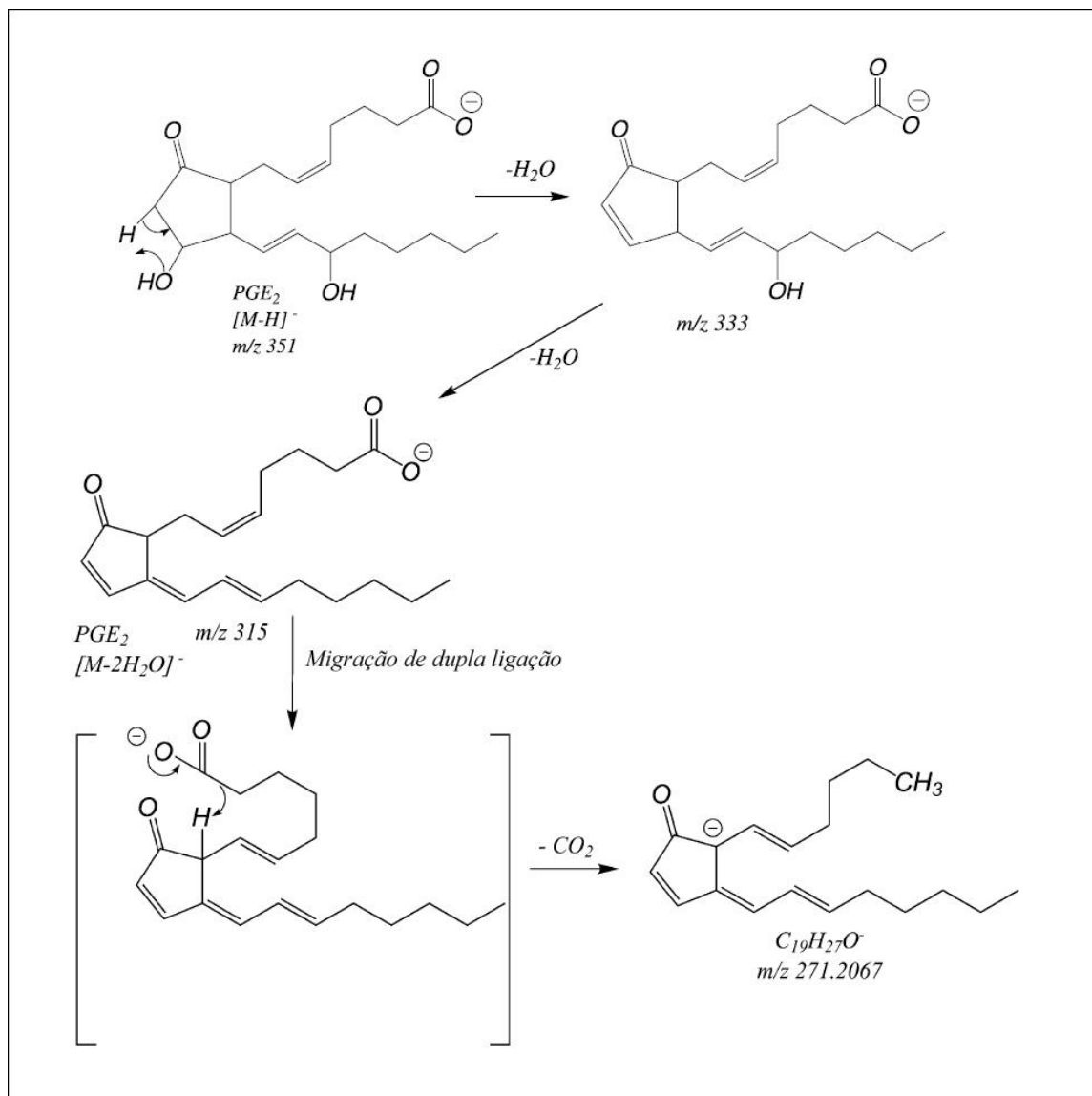


FIGURA 14 – MECANISMO DE FORMAÇÃO DOS ÍONS-FILHOS (FRAGMENTOS) DA PGE<sub>2</sub>  
 FONTE: Adaptado de MURPHY *et al.* (2005)

Uma vez que a PGB<sub>2</sub> é o produto da desidratação da PGE<sub>2</sub> (HISHINUMA *et al.*, 2007), infere-se que o mecanismo de geração dos fragmentos da PGB<sub>2</sub>-d4 seja similar ao da PGE<sub>2</sub>. Isto pode ser deduzido pela existência de fragmentos de  $m/z$  109,2 e 175,4 no espectro da PGE<sub>2</sub>, e de  $m/z$  113,2 e 179,2 no espectro da PGB<sub>2</sub>-d4, cuja diferença é relacionada somente as 4 unidades adicionais de massa relativas ao deutério.

#### 4.4.3 Análises por Injeção em Fluxo (FIA)

Após a otimização dos parâmetros de voltagem dos analitos, análises por injeção em fluxo (FIA) foram realizadas a fim de ajustar os parâmetros da fonte de ionização. Assim, as pressões do “gás de cortina” (CUR), do “gás de colisão” (CAD), do “gás de nebulização” (GS1) e do “gás secante” (GS2), além da “voltagem do capilar” (IS) e da “temperatura da fonte” (TEM), foram automaticamente ajustadas pelo equipamento, utilizando o modo negativo de ionização. A Tabela 11 mostra os valores obtidos.

TABELA 11 – PARÂMETROS DA FONTE DE IONIZAÇÃO OTIMIZADOS ATRAVÉS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO

PARÂMETRO	VALOR
IS <sup>1</sup> (V)	-4500,0
CAD <sup>2</sup> (psi)	4,0
CUR <sup>3</sup> (psi)	10,0
GS1 <sup>4</sup> (psi)	45,0
GS2 <sup>5</sup> (psi)	45,0
TEM <sup>6</sup> (°C)	300,0

**NOTA:** <sup>(1)</sup> *Voltagem do Capilar*

<sup>(2)</sup> *Gás de colisão*

<sup>(3)</sup> *Gás de cortina*

<sup>(4)</sup> *Gás nebulizador*

<sup>(5)</sup> *Gás secante*

<sup>(6)</sup> *Temperatura*

#### 4.4.4 Análises por CLAE-EM/EM

No sentido de avaliar a possível presença de interferentes (metabólitos celulares) no mesmo tempo de retenção do analito e do padrão interno, o método cromatográfico foi desenvolvido utilizando como matriz o sobrenadante do meio de cultivo celular obtido após 24 horas de incubação com células U937-d, que foi centrifugado a 7000 rpm por 5 minutos para a remoção das células. Após esta etapa, esta matriz foi devidamente fortificada com analito e padrão interno (100 ng/mL cada) e foi submetida à extração por fase sólida (conforme item 3.3.1) antes das injeções.

Os primeiros ensaios para a determinação da PGE<sub>2</sub> foram conduzidos com métodos disponíveis na literatura (MASOODI; NICOLAOU, 2006, BLEWETT *et al.*, 2007), porém utilizando marcas distintas de colunas. No que concerne ao formato e à intensidade do pico, o melhor desempenho foi obtido com a coluna XBridge™ C18 (5 µm, 2,1x100 mm, Waters® Corporation), levando sempre em consideração a presença de 0,1% de ácido fórmico (AFO) na fase móvel, tanto na fase orgânica quanto na fase aquosa. Segundo SCHMIDT *et al.* (2005), fases móveis constituídas somente de acetonitrila, água e AFO resultam em separações cromatográficas adequadas para análises de prostaglandinas, utilizando-se colunas de fase reversa. Em função disso, a fase móvel utilizada em nossas análises sempre envolveu somente estes três componentes.

Embora pareça um paradoxo utilizar um solvente ácido com uma fonte *ESI* operando no modo negativo, não há relatos de que isto possa prejudicar a intensidade e a qualidade do sinal do espectrômetro de massas (NEWBY; MALLET, 1997). Além disso, as prostaglandinas possuem um pKa em torno de 4,7 (RINNE *et al.*, 2007), e a adição de um ácido na fase móvel é estritamente indispensável, pois reduzindo o pH do meio essas substâncias são mantidas em sua forma molecular, sendo eluídas uniformemente dentro da coluna sem causar prejuízos quanto a simetria dos picos cromatográficos (NEWBY; MALLET, 1997).

Logo nas primeiras injeções um tempo de retenção excessivo do padrão interno (~17 minutos) foi observado. Além disso, o método original que melhor se adaptou às colunas disponíveis utilizava fluxos altos como, por exemplo, 1mL/min (BLEWETT *et al.*, 2007). Portanto sua reprodução não se traduzia em análises de baixo custo e ambientalmente corretas. Portanto, algumas modificações foram então propostas com o intuito de diminuir o tempo de corrida e o custo das análises.

As primeiras modificações partiram de uma fase móvel composta de acetonitrila/água/AFO (50:50:0,1 v/v/v) eluída de forma isocrática. O volume de injeção de amostra foi de 20 µL (compatível com a coluna utilizada), o fluxo foi ajustado para 400 µL/min e a temperatura do forno da coluna mantida em 25°C, a fim de evitar degradação das substâncias de interesse durante a corrida cromatográfica. Durante este ensaio, foi observada a presença de um pequeno pico eluindo praticamente no mesmo tempo de retenção da PGE<sub>2</sub> ( $r = 0,98$ ), como mostra a Figura 15. Esse pico era formado pelas mesmas transições (quantificação e qualificação) da substância alvo, e, portanto poderia comprometer as análises.

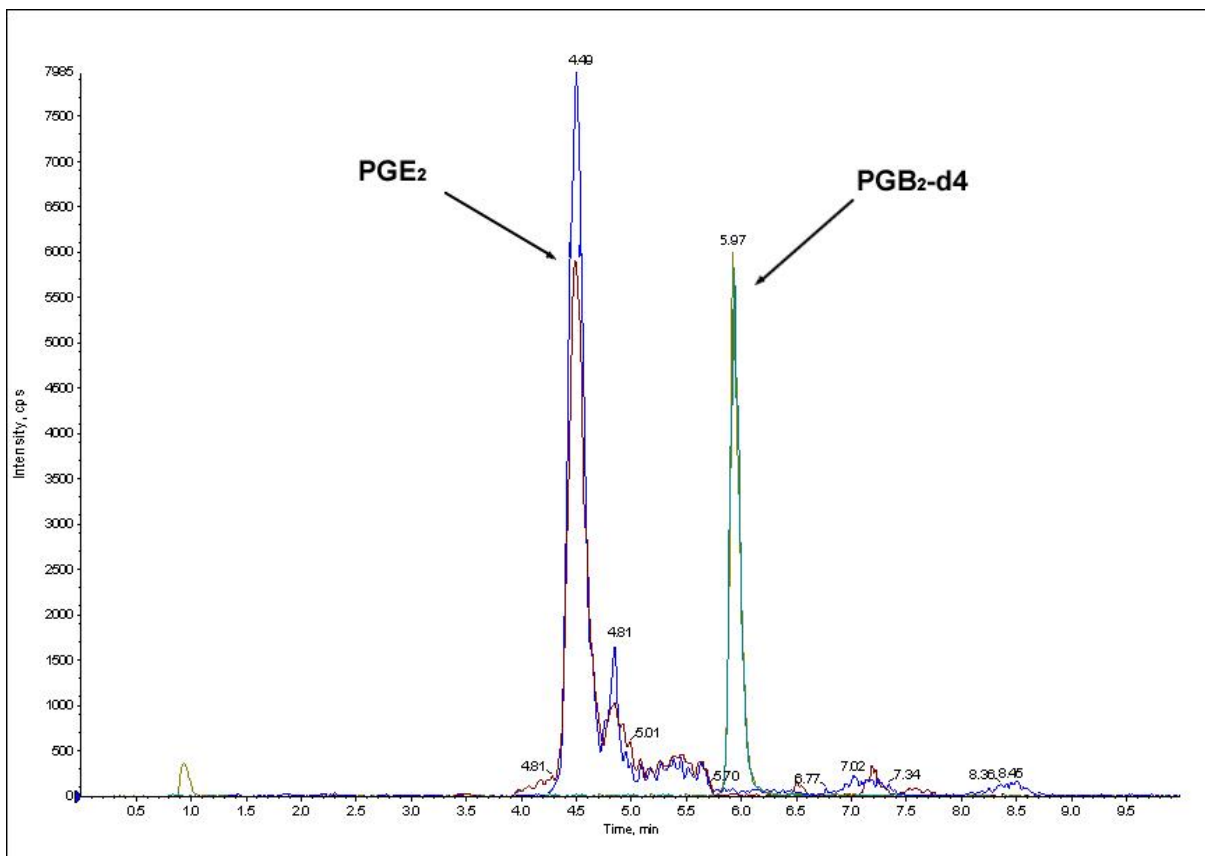


FIGURA 15 – CROMATOGRAMA DA PGE<sub>2</sub> (Tr: 4,49 min) E DA PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> (Tr: 5,97 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL ACETONITRILA/ÁGUA/AFO (50:50:0,1 v/v/v) EM MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO. DADOS: COLUNA XBridge™ C18 (5 µm, 2,1x100 mm, Waters® Corporation)

Dados da literatura revelam que a PGE<sub>2</sub> apresenta isômeros estruturais tais como PGD<sub>2</sub>, 8-iso-PGE<sub>2</sub>, 8-iso-15-ceto-PGE<sub>2</sub> e  $\Delta^{12}$ -PGE<sub>2</sub>, os quais rendem espectros de produtos de fragmentação idênticos à PGE<sub>2</sub> (SCHMIDT *et al.*, 2005; ARAÚJO; FROYLAND, 2006). Por isso, mesmo utilizando uma técnica altamente seletiva como a espectrometria de massas, não seria possível obter seletividade adequada para uma determinação segura da PGE<sub>2</sub>. Havia, portanto, a necessidade de novos ajustes cromatográficos (RINNE *et al.*, 2007).

A fim de garantir uma separação adequada entre a PGE<sub>2</sub> e seu isômero, uma coluna de maior comprimento e de igual fase estacionária foi utilizada XBridge™ C18 (5 µm, 2,1x150 mm, Waters® Corporation). A proporção de água na fase móvel também foi aumentada de 50 para 70% mantendo constantes o fluxo (400 µL/min) e a temperatura do forno (25°C). A Figura 16 mostra o cromatograma obtido com a aplicação destas modificações.

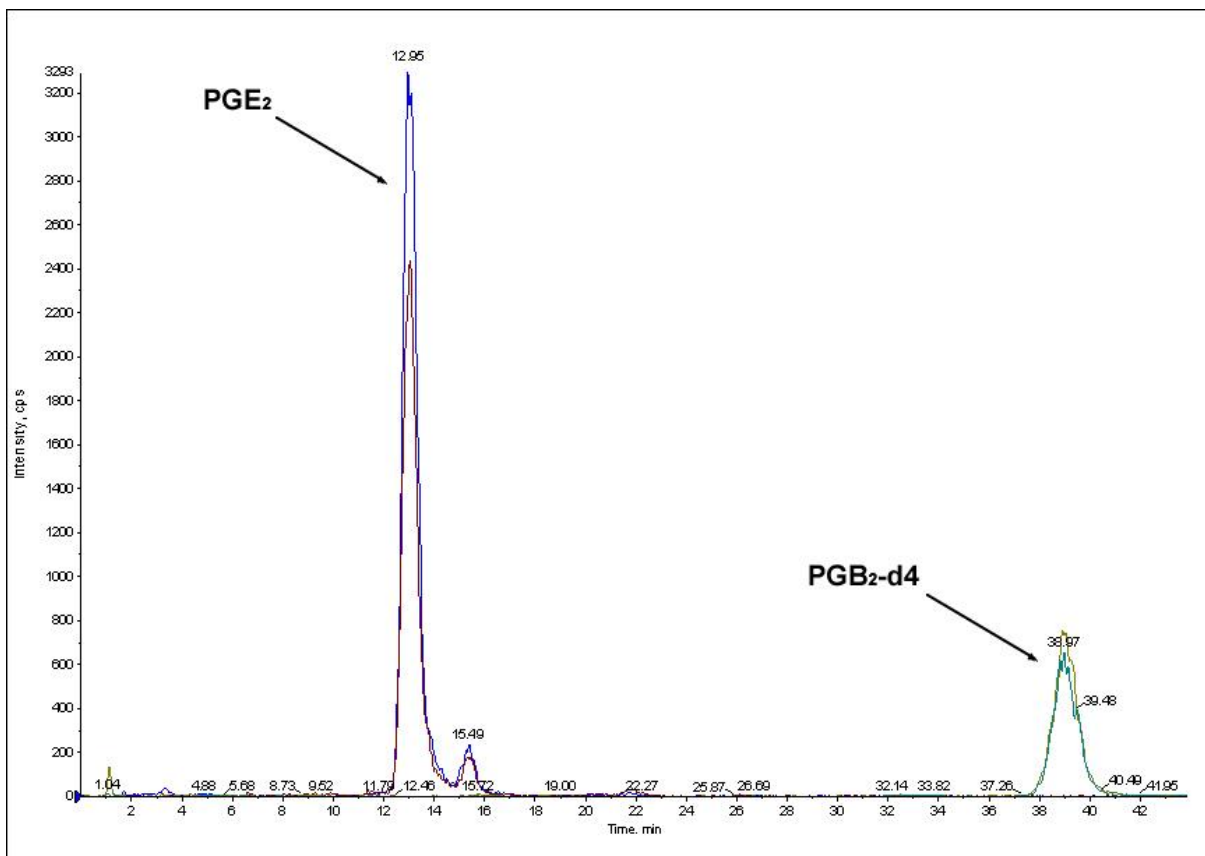


FIGURA 16 – CROMATOGRAMA DA PGE<sub>2</sub> (Tr: 12,95 min) E DA PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> (Tr: 36,97 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO COMO FASE MÓVEL ACETONITRILA/ÁGUA/AFO (30:70:0,1 v/v/v) EM MODO DE ELUIÇÃO ISOCRÁTICO. DADOS: COLUNA XBridge™ C18 (5 µm, 2,1x150 mm, Waters® Corporation)

O que pôde ser observado é que houve uma pequena melhora na separação dos compostos isobáricos ( $R_s = 1,03$ ), porém dadas as características mais apolares do padrão interno, o tempo de corrida se tornou excessivo (~43 min). Além disso, o aumento de água na composição da fase móvel promoveu um alargamento considerável dos picos cromatográficos, com perda adicional da intensidade do sinal dos analitos.

No sentido de diminuir o tempo da corrida e melhorar ainda mais a qualidade da separação dos isômeros, uma alteração na forma de eluição da fase móvel foi proposta. Um gradiente de eluição foi criado (Tabela 12) reduzindo a proporção inicial de água de 70 para 65%. O fluxo também foi reduzido de 400 para 300 µL/min, objetivando sempre uma melhor separação cromatográfica entre os dois compostos de mesma massa.

TABELA 12 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, VARIANDO A PROPORÇÃO DA FASE AQUOSA DE 65 A 55%

TEMPO (min)	FLUXO ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0.0	300	65	35
6.0	300	65	35
6.1	300	55	45
7.5	300	55	45
7.6	300	65	35
13.0	300	65	35

O cromatograma obtido com a aplicação destas alterações pode ser visualizado na Figura 17.

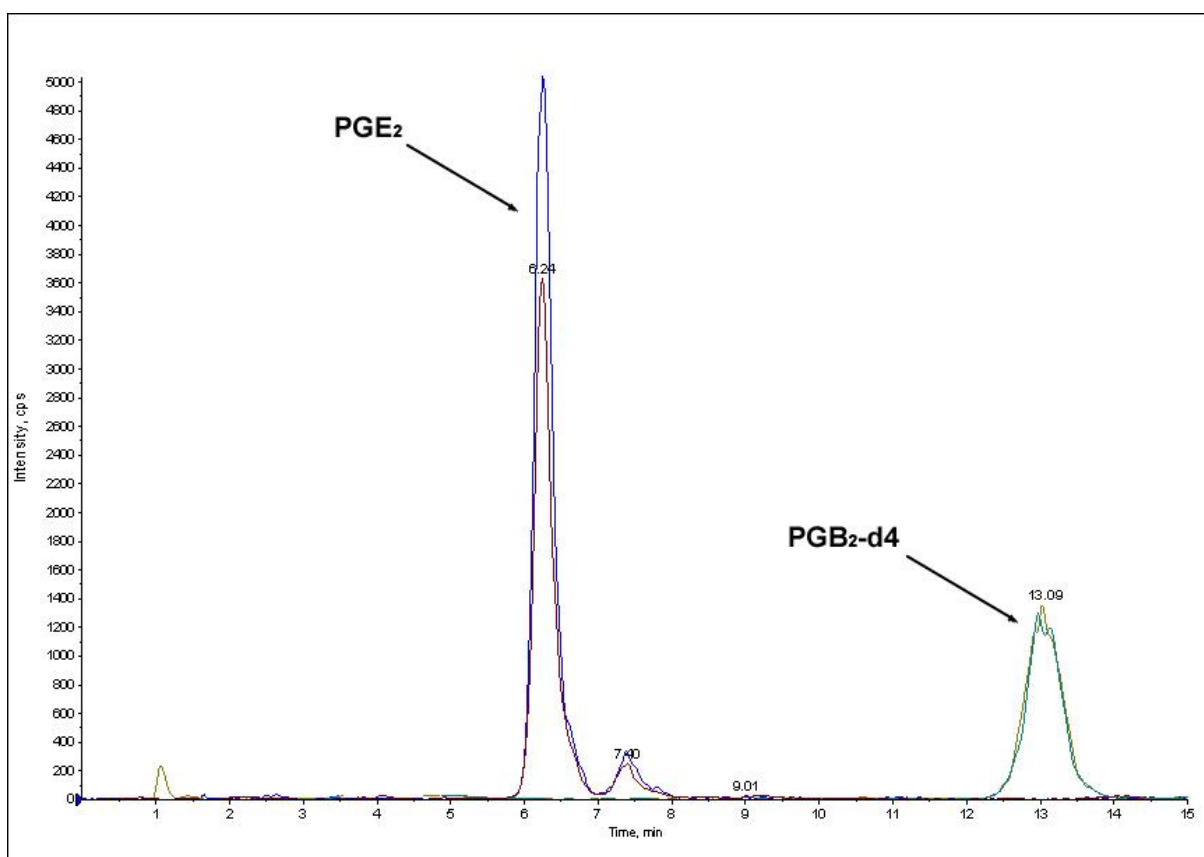


FIGURA 17 – CROMATOGRAMA DA PGE<sub>2</sub> (Tr: 6,24 min) E DA PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> (Tr: 13,09 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO. DADOS: COLUNA XBridge™ C18 (5  $\mu\text{m}$ , 2,1x100 mm, Waters® Corporation)

O uso de um gradiente de eluição reduziu drasticamente o tempo de retenção do padrão interno. Além disso, o aumento de solvente orgânico no início da corrida analítica reduziu significativamente o tempo de eluição dos compostos isobáricos (de



13.0 para 6.2 minutos), apresentando, além de tudo uma melhora considerável na resolução entre estas substâncias ( $R_s = 1,34$ ). Todavia, um alargamento da base do pico do padrão interno foi observado (2 min de eluição) o que prejudicou o seu perfil e reduziu a intensidade do sinal.

Um novo ajuste no gradiente foi então realizado antecipando a força orgânica da fase móvel para um minuto antes da eluição dos compostos isobáricos, como mostra a Tabela 13.

TABELA 13 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DE FASE MÓVEL, VARIANDO A PROPORÇÃO DA FASE AQUOSA DE 65 A 50%

TEMPO (min)	FLUXO ( $\mu\text{L}/\text{min}$ )	SOLVENTES	
		Água 0,1% AFO (%)	Acetonitrila 0,1% AFO (%)
0.0	300	65	35
5.0	300	65	35
5.1	300	50	50
7.5	300	50	50
7.6	300	65	35
13.0	300	65	35

Conforme demonstrado na Figura 18, o novo gradiente melhorou consideravelmente o perfil do pico do padrão interno e manteve otimizada a separação dos isômeros ( $R_s = 1,30$ ). Além de tudo um aumento considerável na intensidade do sinal do padrão interno foi observada.

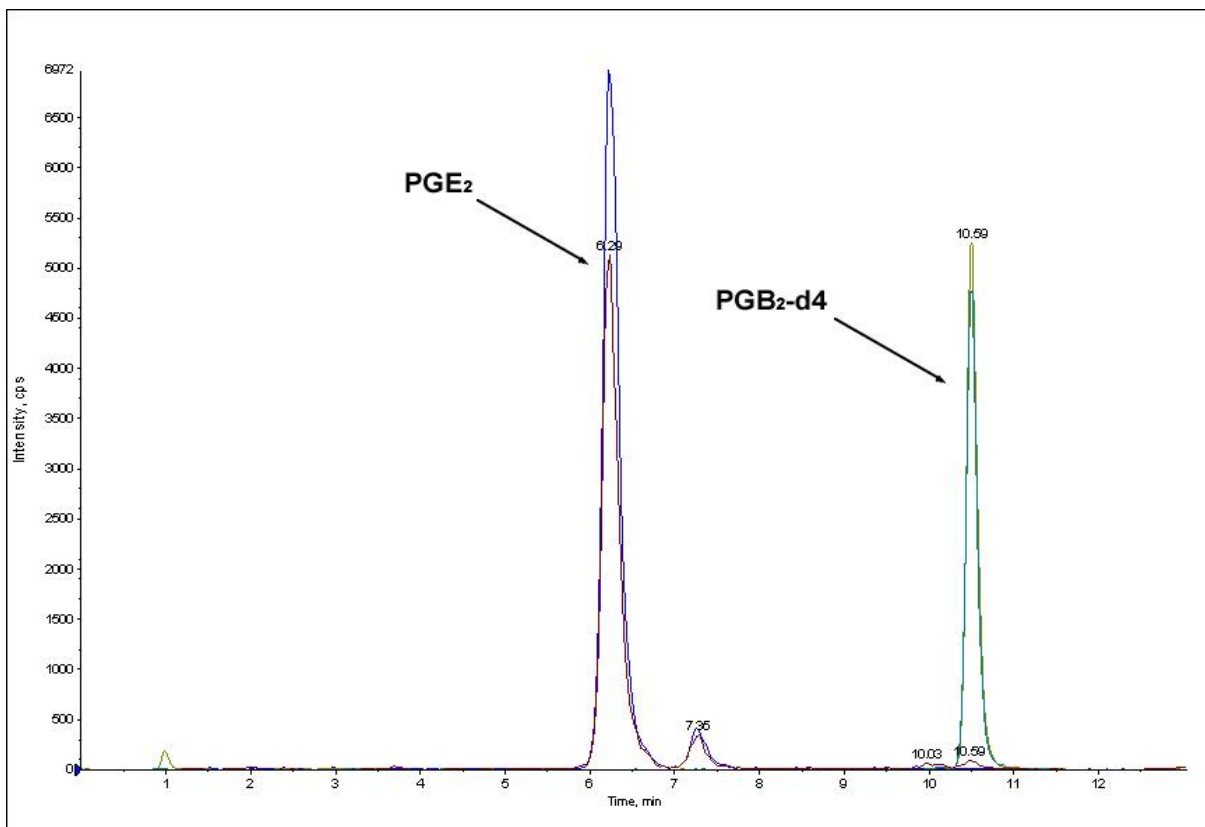


FIGURA 18 – CROMATOGRAMA DA PGE<sub>2</sub> (Tr: 6,29 min) E DA PGB<sub>2</sub>-d<sub>4</sub> (Tr: 10,59 min) OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM (ESI-) UTILIZANDO GRADIENTE DE ELUIÇÃO ENTRE ÁGUA E ACETONITRILA, AMBOS CONTENDO 0,1% DE AFO. DADOS: COLUNA XBridge™ C18 (5 µm, 2,1x100 mm, Waters® Corporation)

Importante mencionar que dos métodos disponíveis na literatura, apenas os que utilizam colunas com partículas de sílica de diâmetro reduzido (3 ou 4 µm) conseguiram separar a PGE<sub>2</sub> de seus compostos isobáricos (SCHMIDT; COSTE; GEISSLINGER, 2005, HISHINUMA *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2002; CAO *et al.*, 2008). Em outros casos, utilizando colunas com partículas de 5 µm, uma boa cromatografia foi alcançada apenas com corridas demasiadamente longas (NITHIPATIKOM *et al.*, 2002; ARAÚJO; FROYLAND, 2006).

O presente método demonstrou um excelente perfil dos picos cromatográficos (incluindo padrão interno) em um tempo de corrida relativamente curto. Se por um lado alguns autores conseguiram separar os isômeros da PGE<sub>2</sub> apenas com colunas com partículas de sílica de diâmetro reduzido, aqui uma excelente separação foi alcançada com o uso de uma coluna comumente utilizada na maioria dos laboratórios, a de 5 µm de partícula. Isso nos leva a crer que essa separação ocorreu graças ao substrato híbrido da partícula da coluna XBridge™ a qual conta com um triplo *endcapped* que reduz a atividade silanol e aumenta a eficiência de

separação. Aliado a isso, baixos fluxos de fase móvel foram utilizados, tornando a análise mais econômica e ambientalmente sustentável.

Em virtude dos bons resultados obtidos com o presente método, a próxima etapa foi validá-lo.

#### 4.4.5 Validação do método de CLAE-EM/EM

O método desenvolvido através de CLAE-EM/EM foi validado de acordo com a RE N° 899/03, publicada pela ANVISA (BRASIL, 2003). A validação transcorreu de acordo com os parâmetros preconizados para “Métodos Bioanalíticos”. Dessa forma, os parâmetros avaliados foram: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão (intra-corrída e inter-corrídas), exatidão, robustez, recuperação e estabilidade.

A matriz utilizada na validação foi o meio de cultivo que se manteve em contato com as células U937-d por 24 horas, em condições de incubação. Dessa forma, diversos metabólitos celulares estavam presentes em solução, tornando a matriz mais complexa e aproximando ao máximo a validação das condições reais de análise de PGE<sub>2</sub>.

##### 4.4.5.1 Seletividade

O ensaio de seletividade foi realizado através do método da comparação da matriz. Assim, diferentes matrizes foram avaliadas quanto a possível presença de interferentes significativos nos tempos de retenção da PGE<sub>2</sub> e do padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4. A Figura 19 mostra os cromatogramas obtidos com as matrizes avaliadas e com a solução-padrão dos analitos (50 ng/mL)

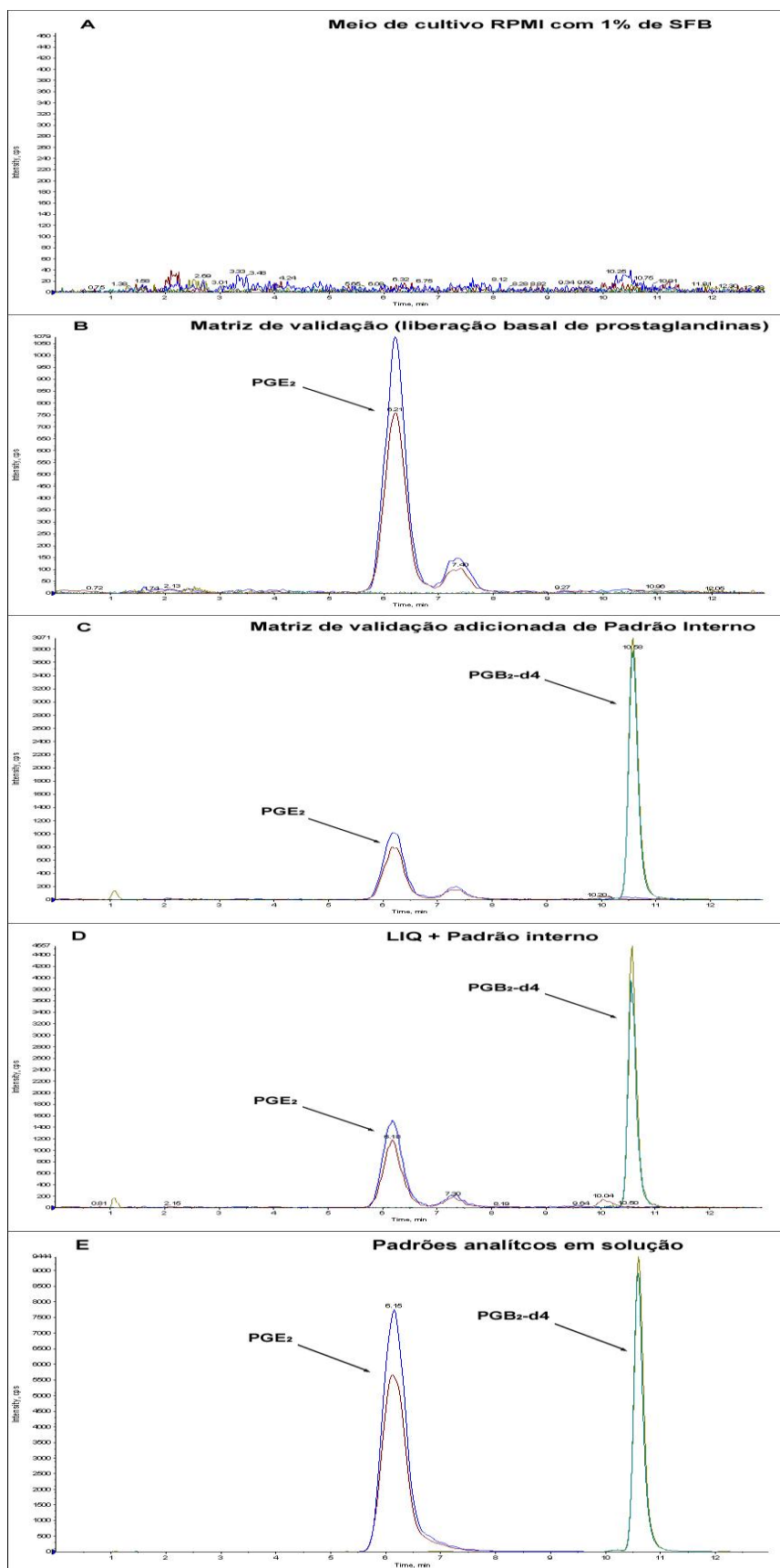


FIGURA 19 – CROMATOGRAMA DO MEIO RPMI-1640 COMPLETO (A); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO ISENTA DE PADRÃO INTERNO (B); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM PADRÃO INTERNO (C); DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO FORTIFICADA COM 5,0 ng/mL de PGE<sub>2</sub> e 50,0 ng/mL de PGB<sub>2</sub>-d4 (D); PADRÕES ANALÍTICOS EM SOLUÇÃO (E)

Como pode ser visualizado na Figura 19 (A), o meio de cultivo RPMI 1640 não apresentou nenhum pico interferente nos tempos de retenção do analito e do padrão interno. Adicionalmente, nas matrizes de validação (fortificadas somente com PGB<sub>2</sub>-d4 ou com PGB<sub>2</sub>-d4 e PGE<sub>2</sub>) não foram visualizados interferentes ou quaisquer modificações no perfil dos picos cromatográficos. Dessa forma, amostras fortificadas (quando comparadas com a matriz de validação representando liberação basal de prostaglandinas) mostraram somente elevação na intensidade dos picos dos analitos, não ocorrendo formação de picos adicionais.

Em virtude dos resultados obtidos, e considerando que CLAE-EM/EM é uma técnica altamente seletiva (pois monitora os analitos por transições específicas) o método foi por fim considerado seletivo, oferecendo confiabilidade sobre a identidade do composto monitorado.

#### 4.4.5.2 Limites de detecção (LD) e quantificação (LQ)

O LD e o LQ foram avaliados a partir da relação sinal ruído oferecida pelos cromatogramas (mínimo de 3 e 10 vezes, respectivamente). Dessa forma, soluções de concentração conhecida dos padrões analíticos de PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 foram diluídas sucessivamente e injetadas até a obtenção do menor pico detectável. Conforme demonstrado na Tabela 14, o método demonstrou uma alta sensibilidade, com valores de LD inferiores a 0,2 ng/mL e LQ menores que 0,7 ng/mL.

TABELA 14 – VALORES DE LIMITE DE DETECÇÃO E LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO PARA A PGE<sub>2</sub> E PGB<sub>2</sub>-d4

METABÓLITOS	LD		LQ	
	Concentração (ng/mL)	Sinal / Ruído	Concentração (ng/mL)	Sinal / Ruído
PGE <sub>2</sub>	0,10	4,5	0,30	14,3
PGB <sub>2</sub> -d4*	0,20	4,2	0,70	11,3

\*Padrão interno

#### 4.4.5.3 Linearidade

A linearidade foi determinada em sete níveis de concentração, contemplando as faixas de 5,0 a 500 ng/mL. A análise de regressão demonstrou que a curva de calibração ( $y = 1,22x + 0,527$ ) é linear com valor do coeficiente de correlação ( $r$ ) de 0,9984, superior ao estabelecido pela RE N° 899/03 da ANVISA, que preconiza valores de “ $r$ ” iguais ou superiores a 0,98. Além disso, os erros de precisão e exatidão obtidos em cada nível de concentração foram menores que 10%, resultados estes considerados satisfatórios visto que erros menores de 15% podem ser aceitos para métodos bionálticos. Em virtude dos resultados obtidos, pode-se inferir que dentro da faixa de concentração estabelecida, o método desenvolvido garante uma resposta linear precisa e exata para a PGE<sub>2</sub>.

A regressão linear do ensaio é apresentada na Figura 20, enquanto que os valores individuais de precisão e exatidão calculados para cada nível de concentração são demonstrados na Tabela 15.

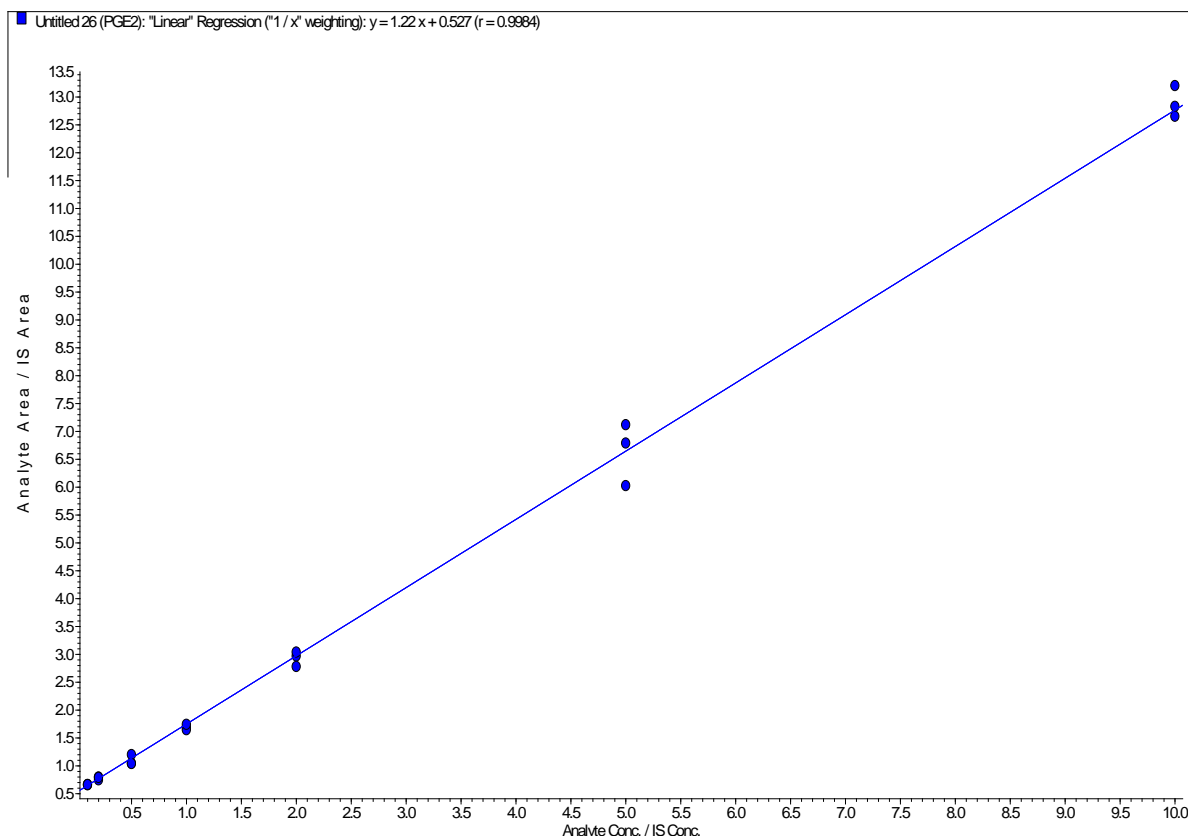


FIGURA 20 – LINEARIDADE DA PGE<sub>2</sub> OBTIDO ATRAVÉS DE CLAE-EM/EM

TABELA 15 – VALORES DE PRECISÃO E EXATIDÃO OBTIDOS POR CLAE-EM/EM (ESI-) DURANTE O ESTUDO DA LINEARIDADE

ANALITO	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (ng/mL)	CONCENTRAÇÃO EXPERIMENTAL (ng/mL)	DESVIO PADRÃO	PRECISÃO (CV%)	EXATIDÃO (%)
PGE <sub>2</sub>	5,0	5,49	0,12	2,27	109,95
	10,0	10,26	1,12	9,95	102,69
	25,0	23,76	1,68	7,09	95,00
	50,0	47,64	1,97	4,15	95,29
	100,0	98,16	5,47	5,57	98,16
	250,0	249,93	22,90	9,16	99,97
	500,0	505,26	11,48	2,27	101,05

#### 4.4.5.4 Precisão

##### 4.4.5.4.1 Repetibilidade

O ensaio de repetibilidade foi realizado em sextuplicata, em três níveis de concentração para a PGE<sub>2</sub> e em um único nível de concentração para o padrão interno PGB<sub>2</sub>-d4. A repetibilidade foi avaliada em termos da dispersão dos resultados obtidos com amostras similares injetadas em um curto período de tempo (6 horas). A Tabela 16 apresenta os resultados do ensaio de repetibilidade.

TABELA 16 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO OBTIDOS ATRAVÉS DAS ÁREAS NO ENSAIO DE REPETIBILIDADE

ANALITO	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (ng/mL)	PERÍODO 1 (Área ± DP)	PERÍODO 2 (Área ± DP)	MÉDIA ± DP	CV (%)
PGE <sub>2</sub>	10,0	37.866 ±	36.100 ±	36.983 ±	3,38
		1.401	1.562	1.249	
	50,0	74.066 ±	72.999 ±	73.533 ± 754	1,03
PGB <sub>2</sub> -d4	50,0	4.245	3.039		
		250,0	326.000 ±	314.009 ±	320.004 ±
		21.931	10.813	8.478	
		48.600 ±	46.583 ±	47.591 ±	2,99
		1.381	4.969	1.425	

**NOTA:** Dados obtidos referem-se ao CQB (concentração de 10,0 ng/mL), CQM (concentração de 50,0 ng/mL) e CQA (concentração de 250,0 ng/mL).

#### 4.4.5.4.2 Precisão intermediária

A precisão intermediária foi realizada de forma similar ao ensaio de repetibilidade, no entanto foi avaliada a dispersão dos resultados obtidos com amostras injetadas em dias diferentes e com analistas diferentes. A Tabela 17 mostra as variações obtidas para cada composto.

TABELA 17 – COEFICIENTES DE VARIAÇÃO CALCULADOS ATRAVÉS DAS ÁREAS DE PGE<sub>2</sub> E PGB<sub>2-d4</sub> OBTIDAS COM ANALISTAS DIFERENTES APÓS DOIS DIAS DO ENSAIO DE REPETIBILIDADE

ANALITO	CONCENTRAÇÃO TEÓRICA (ng/mL)	DIA 1 (Área ± DP)	DIA 2 (Área ± DP)	MÉDIA ± DP	CV (%)
PGE <sub>2</sub>	10,0	37.539 ±	39.202 ± 692	38.370 ±	3,07
		928		1.176	
	50,0	74.070 ±	77.707 ±	75.889 ±	3,39
		4.241	6.023	2.571	
	250,0	317.671 ±	314.696 ±	316.184 ±	0,66
		19.346	17.655	2.103	
PGB <sub>2-d4</sub>	50,0	45.542 ±	41.700 ±	43.621 ±	6,23
		3.850	3.934	2.717	

**NOTA:** Dados obtidos referem-se ao CQB (concentração de 10,0 ng/mL), CQM (concentração de 50,0 ng/mL) e CQA (concentração de 250,0 ng/mL).

Conforme demonstrado nas Tabelas 16 e 17, a variação máxima obtida no ensaio de precisão foi próxima de 6,0%. Esses resultados estão de acordo com o preconizado pela RE N° 899/03 (BRASIL, 2003), que admite variações de até 15% para as concentrações analisadas, considerando Métodos Bioanalíticos. Em virtude dos baixos coeficientes de variação obtidos tanto na repetibilidade quanto na precisão intermediária, o método desenvolvido foi considerado preciso.

#### 4.4.5.5 Exatidão



A exatidão foi determinada através do método da adição do padrão. Para tanto amostras da matriz de validação foram fortificadas em três níveis de concentração para a  $PGE_2$  e em um único nível de concentração para o padrão interno  $PGB_2-d4$ . As áreas experimentais de cada analito (após subtração da área basal de  $PGE_2$ ), foram comparadas com aquelas obtidas em solução, nos mesmos níveis de concentração das amostras fortificadas. Conforme demonstrado na Tabela 18, os valores de exatidão da  $PGE_2$  e da  $PGB_2-d4$  (85,61% a 102,90%) estão de acordo com o preconizado pela legislação vigente, a qual determina que os erros de exatidão sejam menores que 15%. Dessa forma, o método foi considerado exato.

TABELA 18 – RESULTADOS DO ENSAIO DE EXATIDÃO EM CLAE-EM/EM UTILIZANDO O MÉTODO DA ADIÇÃO DE PADRÃO

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA DAS SOLUÇÕES-PADRÃO** (Média ± DP)	ÁREA BASAL (Média ± DP)	ÁREA APÓS FORTIFICAÇÃO (Média ± DP)	ÁREA EXPERIMENTAL (Média ± DP)	% EXATIDÃO
PGE <sub>2</sub>	10,0	16.580 ± 1.475	22.933 ± 665	37.866 ± 1.401	14.933 ± 1.401	90,06 ± 8,01
	50,0	59.724 ± 2.568	22.933 ± 665	74.066 ± 4.245	51.133 ± 4.245	85,61 ± 3,68
	250,0	294.511 ± 19.437	22.933 ± 665	326.000 ± 21.931	303.067 ± 21.931	102,90 ± 6,79
PGB <sub>2</sub> -d4 *	50,0	63.704 ± 3.885	-	54.983 ± 4.969	54.983 ± 4.969	86,31 ± 5,26

\* Padrão Interno

\*\* Após submissão ao processo de extração

#### 4.4.5.6 Robustez

O teste da robustez foi realizado através da comparação entre os resultados obtidos com o método original, em relação a novos métodos com pequenas e deliberadas modificações cromatográficas. Tanto a PGE<sub>2</sub> quanto a PGB<sub>2</sub>-d4 foram avaliadas na concentração de 50 ng/mL, utilizando soluções-padrão diluídas em fase móvel. Conforme demonstrado na Tabela 19, os índices de variação entre as áreas dos picos obtidos entre as análises foi abaixo de 2,7%, um valor considerado baixo. Além disso, as comparações entre os resultados fornecidos pelo método original e pelos métodos modificados utilizando Teste *t* (duas amostras em par para médias), revelaram valores de *p* sempre maiores que 0,05. Dessa forma, o método desenvolvido foi considerado robusto.

TABELA 19 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ EM CLAE-EM/EM

PARÂMETROS AVALIADOS	ANALITO	VARIAÇÕES	ÁREA DO PICO (Média ± DP)	CV%	p*
% de AFO na Fase Móvel	PGE <sub>2</sub>	0,1% (Método original)	102.922 ± 2.310	1,53	-
		0,09%	103.345 ± 2.936		0,4353
		0,11%	105.924 ± 4.509		0,5196
	PGB <sub>2</sub> -d4	0,1% (Método original)	87.160 ± 2.765	1,08	-
		0,09%	85.515 ± 2.220		0,5502
		0,11%	87.135 ± 3.171		0,9837
Fluxo da Fase Móvel	PGE <sub>2</sub>	300 µL/min (Método original)	102.922 ± 2.310	1,90	-
		298 µL/min	103.653 ± 4.885		0,8656
		302 µL/min	106.667 ± 2.722		0,0714
	PGB <sub>2</sub> -d4	300 µL/min (Método original)	87.160 ± 2.765	0,92	-
		298 µL/min	85.617 ± 5.251		0,6519
		302 µL/min	86.764 ± 1.929		0,6601
Temperatura do forno da coluna	PGE <sub>2</sub>	25°C (Método original)	102.922 ± 2.310	1,95	-
		23°C	106.889 ± 4.214		0,1697
		27°C	105.849 ± 4.259		0,3597
	PGB <sub>2</sub> -d4	25°C (Método original)	87.160 ± 2.765	2,19	-
		23°C	87.472 ± 6.139		0,8992
		27°C	84.049 ± 3.862		0,2758

**NOTA:** p\*, considerando comparação entre o resultado do método original e dos métodos com modificações

TABELA 19 – RESULTADOS DO ENSAIO DE ROBUSTEZ EM CLAE-EM/EM (Continuação)

PARÂMETROS AVALIADOS	ANALITO	VARIAÇÕES	ÁREA DO PICO (Média ± DP)	CV%	p*
Fabricante do Solvente Orgânico	PGE <sub>2</sub>	Tedia® Brazil (Método original)	102.922 ± 2.310	2,12	-
		Panreac® Química SA	105.511 ± 3.381		0,3794
		Carlo Erba® Reagents	107.387 ± 2.189		0,1991
	PGB <sub>2</sub> -d4	Tedia® Brazil (Método original)	87.160 ± 2.765	2,21	-
		Panreac® Química SA	84.585 ± 3.874		0,4989
		Carlo Erba® Reagents	83.498 ± 3.941		0,4442
Lote da coluna	PGE <sub>2</sub>	0110381161 (Método original)	102.922 ± 2.310	2,12	-
		0115370731	106.066 ± 5.624		0,5234
	PGB <sub>2</sub> -d4	0110381161 (Método original)	87.160 ± 2.765	2,66	-
		0115370731	83.937 ± 4.530		0,2336

**NOTA:** p\*, considerando comparação entre o resultado do método original e dos métodos com modificações

#### 4.4.5.7 Recuperação

A RE ANVISA Nº 899/03 preconiza que valores de recuperação próximos de 100% são desejáveis, no entanto valores menores são aceitos desde que estes sejam precisos e exatos. A Tabela 20 mostra o percentual de recuperação obtido para os analitos, após o processo de extração por fase sólida.

TABELA 20 – PERCENTUAL DE RECUPERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> e PGB<sub>2</sub>-d4 DA MATRIZ DE VALIDAÇÃO, POR TÉCNICA DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

ANALITOS	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	PADRÃO EM SOLUÇÃO		AMOSTRA EXTRAÍDA		RECUPERAÇÃO MÉDIA (%)
		Área do pico (Média ± DP)	CV (%)	Área do pico* (Média ± DP)	CV (%)	
PGE <sub>2</sub>	10,0	25.514 ±	7,72	17.375 ±	9,80	68,1
		1.970		1.704		
	50,0	92.702 ±	3,36	58.587 ±	8,14	63,2
		3.121		4.771		
	250,0	460.744 ±	1,05	299.483 ±	5,32	65,0
		4.882		15.962		
PGB <sub>2</sub> -d4	50,0	92.199 ±	3,44	64.908 ±	7,16	70,4
		3.180		4.651		

\*NOTA: Os valores de área do pico relativos as três concentrações de PGE<sub>2</sub> foram obtidos após a subtração do valor basal de PGE<sub>2</sub> pré-existente na matriz de validação (22.933 ± 665)

Os resultados de recuperação foram considerados satisfatórios, na medida em que vários autores relataram dificuldade em extrair os metabólitos da cascata da inflamação, principalmente em matrizes complexas como meios de cultivo celulares (KINGSLEY *et al.*, 2005; DEEMS *et al.*, 2007). Dentre os principais fatores que podem contribuir para esta baixa recuperação estão a degradação natural sofrida pelas moléculas, e a grande quantidade de etapas envolvidas no preparo da amostra, desde a extração até a injeção no CLAE-EM/EM.

#### 4.4.5.8 Estabilidade

A estabilidade da PGE<sub>2</sub> foi avaliada em três níveis de concentração enquanto que a estabilidade da PGB<sub>2</sub>-d4 apenas na concentração de uso. Dados da literatura mostram que os derivados eicosanóides são moléculas extremamente lábeis, sendo sensíveis principalmente a reações de foto-oxidação e termo-oxidação (BLEWETT *et al.*, 2008; CAO *et al.*, 2008; LUNDSTRÖM *et al.*, 2009). Além disso, a baixa estabilidade também é revelada pelo pequeno prazo de validade dos padrões fornecidos pelo fabricante (seis meses, com as soluções mantidas a -20°C).

A estabilidade foi determinada através do percentual de recuperação dos analitos. Assim, áreas de PGE<sub>2</sub> em amostras submetidas à diferentes condições de armazenamento (áreas experimentais), foram comparadas com áreas de PGE<sub>2</sub> em amostras recém-preparadas (áreas nominais), nos mesmos níveis de concentração.

#### 4.4.5.8.1 Estabilidade após ciclos de congelamento e descongelamento da matriz

Este teste foi realizado submetendo as amostras a três ciclos de congelamento (a -80°C) e descongelamento (a temperatura ambiente controlada). O percentual de recuperação obtido neste ensaio é demonstrado na Tabela 21.

TABELA 21 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS AMOSTRAS SUBMETIDAS A CICLOS DE CONGELAMENTO E DESCONGELAMENTO

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	ÁREA EXPERIMENTAL	RECUPERAÇÃO	
				Média (%) ± <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
PGE <sub>2</sub>	10,0	39.456 ± 817	31.058 ± 1.613	77,38 ± 6,39	8,26
	50,0	72.100 ± 2.404	55.840 ± 2.043	77,39 ± 2,75	3,56
	250,0	252.500 ± 9.192	191.333 ± 5.859	73,17 ± 5,72	7,82

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

Pode-se observar que houve redução significativa na quantidade dos analitos presentes na amostra submetida a esta condição de estresse (recuperações

inferiores a 78%). A análise dos resultados nos permite afirmar que as amostras não podem ser submetidas a três ciclos de congelamento e descongelamento, pois a recuperação obtida após este processo é inferior a 85%, valor mínimo preconizado pela RE ANVISA Nº 899/03 para as concentrações analisadas.

#### 4.4.5.8.2 Estabilidade de curta duração

Este teste foi realizado no sentido de avaliar o tempo em que os analitos permanecem estáveis nas amostras, antes da realização do processo de EFS. Dessa forma, as amostras foram armazenadas sobre a bancada a temperatura ambiente (21-23°C) e em refrigerador (4 °C), permanecendo assim por 3, 6, 12 e 24 horas. O percentual de recuperação obtido neste ensaio pode ser visualizado nas Tabelas 22 e 23.



TABELA 22 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO PARA PGE<sub>2</sub>, EM MATRIZ DE VALIDAÇÃO ARMAZENADA POR 3 E 6 HORAS

TIPO DE ARMAZENAMENTO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	RECUPERAÇÃO APÓS TEMPO DE ARMAZENAMENTO					
			3 horas			6 horas		
			Área experimental	Recuperação Média (%) ± <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)	Área experimental	Recuperação Média (%) ± <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
Temperatura de bancada (21-23°C)	10,0	37.866 ± 1401	36.950 ± 1.767	97,57 ± 4,67	4,79	34.400 ± 1979	90,84 ± 5,23	5,76
	50,0	72.300 ± 4.384	67.550 ± 3464	93,43 ± 4,79	5,12	69.250 ± 1.626	95,78 ± 2,25	2,35
	250,0	296.500 ± 9.192	285.500 ± 4.990	96,29 ± 1,68	1,74	270.000 ± 14.142	91,06 ± 4,77	5,24
Temperatura de refrigerador (4°C)	10,0	37.866 ± 1401	35.050 ± 1.060	93,35 ± 1,68	1,80	33.940 ± 1.781	89,62 ± 4,70	5,24
	50,0	72.300 ± 4.384	65.800 ± 4.525	91,01 ± 6,26	6,88	65.540 ± 2.036	90,65 ± 2,82	3,11
	250,0	296.500 ± 9.192	265.000 ± 25.455	89,37 ± 8,58	9,61	266.500 ± 13.435	89,88 ± 4,53	5,04

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

TABELA 23 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE CURTA DURAÇÃO PARA PGE<sub>2</sub>, EM MATRIZ DE VALIDAÇÃO ARMAZENADA POR 12 E 24 HORAS

TIPO DE ARMAZENAMENTO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	RECUPERAÇÃO APÓS TEMPO DE ARMAZENAMENTO					
			12 horas			24 horas		
			Área experimental	Recuperação Média (%) ± <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)	Área experimental	Recuperação Média (%) ± <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
Temperatura de bancada (21-23°C)	10,0	37.866 ± 1401	32.600 ± 1.131	86,05 ± 3,04	3,53	27.550 ± 1.202	72,75 ± 3,17	4,36
	50,0	72.300 ± 4.384	59.400 ± 1.838	82,10 ± 2,47	3,01	52.250 ± 1.767	72,26 ± 2,45	3,39
	250,0	296.500 ± 9.192	222.850 ± 7.283	75,16 ± 2,45	3,26	192.500 ± 9.192	64,97 ± 3,03	4,66
Temperatura de refrigerador (4°C)	10,0	37.866 ± 1401	31.100 ± 2.262	82,12 ± 5,97	7,27	27.250 ± 2.050	71,96 ± 5,41	7,52
	50,0	72.300 ± 4.384	57.140 ± 3.026	79,03 ± 4,19	5,30	52.650 ± 5.161	72,81 ± 7,13	9,79
	250,0	296.500 ± 9.192	226.500 ± 2.121	76,39 ± 0,71	0,93	206.500 ± 9.192	69,64 ± 3,09	4,44

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

Na medida em que a RE ANVISA Nº 899/03 preconiza que a recuperação mínima obtida após os ensaios de estabilidade deve ser de 85%, o tempo máximo que as amostras podem permanecer armazenadas nas dadas condições é de 6 horas. Após 12 horas de armazenamento, a degradação sofrida pelos analitos é tamanha que não é possível garantir a confiabilidade dos resultados (índices de recuperação inferiores a 84,05%).

O ensaio também demonstrou que o percentual de recuperação é muito semelhante quando as amostras são armazenadas em refrigerador ou sobre a bancada, mostrando que a redução de 21-23°C para 4°C na temperatura não é uma forma eficiente de se evitar a degradação do metabólito.

#### 4.4.5.8.3 Estabilidade de longa duração

A estabilidade de longa duração foi realizada após o congelamento das matrizes de validação a -80°C por 7 dias. Após este período, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente controlada (21-23°C), ao abrigo da luz, e imediatamente submetidas a EFS. O percentual de recuperação obtido neste ensaio pode ser analisado na Tabela 24.

TABELA 24 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DE LONGA DURAÇÃO

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	ÁREA EXPERIMENTAL	RECUPERAÇÃO	
				Média (%) $\pm$ <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
PGE <sub>2</sub>	10,0	39.450 $\pm$ 817	37.391 $\pm$ 1.037	94,77 $\pm$ 2,62	2,77
	50,0	72.100 $\pm$ 2.404	67.840 $\pm$ 3.568	94,08 $\pm$ 4,94	5,25
	250,0	252.500 $\pm$ 9.192	248.000 $\pm$ 10.535	98,21 $\pm$ 4,17	4,24

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

O tempo de armazenamento avaliado neste ensaio excede o intervalo de tempo compreendido entre a coleta da primeira amostra e a análise da última, como

recomenda a RE N° 899/03 da ANVISA. Conforme pode ser observado na Tabela 24, a temperatura de armazenamento utilizada neste ensaio foi suficiente para manter a estabilidade dos analitos, uma vez que não foram observados índices de recuperação inferiores a 94%. Considerando que para as concentrações avaliadas a legislação permite variações de até 15%, o congelamento a -80°C por 7 dias demonstrou-se eficiente para manter a estabilidade da PGE<sub>2</sub>.

#### 4.4.5.8.4 Estabilidade pós-processamento

O estudo de estabilidade pós-processamento foi realizado para avaliar a possível degradação da PGE<sub>2</sub> e da PGB<sub>2</sub>-d4 no gerenciador de amostras dentro de um período necessário entre a primeira e a última corrida analítica de um conjunto de amostras.

As análises foram realizadas ao abrigo da luz em equipamento que emprega sistema automático de amostragem/injeção (CTC Waters® 2777 Sample Manager), sob temperatura de 4°C. O percentual de recuperação obtido neste ensaio é demonstrado na Tabela 25.

TABELA 25 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE PÓS-PROCESSAMENTO

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	RECUPERAÇÃO APÓS TEMPO DE ARMAZENAMENTO NO GERENCIADOR DE AMOSTRAS					
			6 horas			12 horas		
			Área experimental	<sup>a</sup> Recuperação Média (%) ± DP	<sup>b</sup> CV (%)	Área experimental	<sup>a</sup> Recuperação Média (%) ± DP	<sup>b</sup> CV (%)
PGE2	10,0	34.466 ± 1.305	32.700 ± 989	95,16 ± 2,46	2,58	31.666 ± 1.815	91,72 ± 5,26	5,74
	50,0	79.966 ± 3.365	78.800 ± 3.394	98,54 ± 4,24	4,30	73.950 ± 7.003	92,47 ± 8,75	9,46
	250,0	266.666 ± 27.934	269.500 ± 12.020	101,06 ± 4,51	4,46	251.500 ± 4.949	94,31 ± 1,85	1,96
PGB2-d4	50,0	36.566 ± 4.265	36.866 ± 1.985	100,82 ± 5,43	5,38	35.100 ± 2.622	95,98 ± 7,17	7,47

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

A análise dos resultados evidencia que a degradação sofrida pelos analitos nas amostras que permaneceram por até 12 horas no gerenciador automático do equipamento (a 4°C) foi inferior aos 15% permitidos para análises bioanalíticas segundo a RE N° 899/03 da ANVISA. Dessa forma, as amostras foram consideradas estáveis quando mantidas nestas condições.

#### 4.4.5.8.5 Estabilidade das soluções de trabalho

As soluções de trabalho foram avaliadas quanto à estabilidade após 12 horas de armazenamento sobre a bancada (21-23°C, ao abrigo da luz) e após 3 dias de armazenamento a -80°C. O percentual de recuperação obtido neste ensaio pode ser visualizado na Tabela 26.

TABELA 26 – RESULTADO DO ENSAIO DE ESTABILIDADE DAS SOLUÇÕES DE TRABALHO

ANALITO	CONCENTRAÇÃO (ng/mL)	ÁREA NOMINAL	RECUPERAÇÃO								
			Condição de armazenamento								
			6 horas sobre a bancada			12 horas sobre a bancada			3 dias em refrigerador (-80°C)		
			Área experimental	Recuperação Média (%) $\pm$ <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)	Área experimental	Recuperação Média (%) $\pm$ <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)	Área experimental	Recuperação Média (%) $\pm$ <sup>a</sup> DP	<sup>b</sup> CV (%)
PGE <sub>2</sub>	20,0	54.116 $\pm$	49.833 $\pm$	92,08 $\pm$	6,13	48.800 $\pm$	90,17 $\pm$ 2,87	3,18	52.720 $\pm$	97,47 $\pm$ 2,22	2,28
		1.629	3.055	5,64		1.555			1.202		
	100,0	212.333 $\pm$	205.666 $\pm$	96,85 $\pm$	1,22	195.100 $\pm$	91,88 $\pm$ 1,93	2,10	211.000 $\pm$	99,42 $\pm$ 0,73	0,73
		19.857	2.516	1,18		4.101			1.414		
	500,0	859.000 $\pm$	807.655 $\pm$	94,02 $\pm$	0,62	768.000 $\pm$	89,41 $\pm$ 4,77	5,34	833.650 $\pm$	97,05 $\pm$ 2,58	2,66
		46.669	5.033	0,58		41.312			22.132		
PGB <sub>2</sub> -d4	100,0	170.750 $\pm$	159.675 $\pm$	93,50 $\pm$	3,82	152.000 $\pm$	89,02 $\pm$ 4,13	4,64	168.450 $\pm$	98,65 $\pm$ 3,77	3,82
		23.991	6.110	3,57		7.071			6.434		

**NOTA:** <sup>a</sup> Expresso em função da variação de recuperação comparando-se as áreas experimentais e a média das áreas nominais; <sup>b</sup> Expressa a variação da recuperação em termos percentuais

Os resultados apresentados na Tabela 26 mostram valores de recuperação >89% para as soluções de trabalho armazenadas por até 12 horas à temperatura ambiente controlada. Estes valores foram considerados satisfatórios levando em consideração que erros de até 15% são permitidos para os níveis de concentração avaliados (BRASIL, 2003).

Quando as amostras foram mantidas sob congelamento, os índices de recuperação foram próximos a 100% tanto para o analito quanto para o padrão interno. Isto nos permite concluir que este tipo de armazenamento é o mais adequado para as soluções utilizadas na rotina. Dessa forma, é prudente que para cada novo lote de amostras produzidas para a validação, as soluções de trabalho sejam obtidas de alíquotas que permaneceram sob congelamento.

#### 4.5 CÉLULAS DA LINHAGEM U937

A Figura 21 mostra o aspecto fenotípico das células da linhagem histomonocítica U937 antes (Figura 21-A) e após (Figura 21-B) a indução de diferenciação ocorrida em função da exposição ao PMA (100 nM) por 48 horas, a 37° C, em atmosfera úmida e 5% de CO<sub>2</sub>.

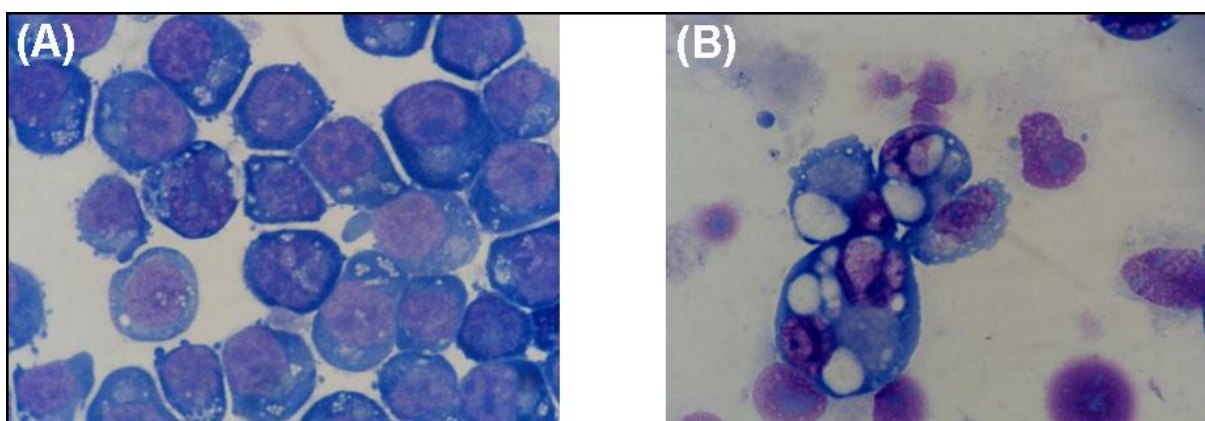


FIGURA 21 – FENÓTIPOS DAS CÉLULAS U937, ANTES E APÓS EXPOSIÇÃO AO PMA

(A) Células U937, mantidas em cultivo celular

(B) Células U937 diferenciadas (U937-d), após exposição ao PMA (100 nM) por 48 horas

**NOTA:** Células coradas com May-Grunwald-Giemsa e visualizadas por microscopia ótica sob aumento de 100 vezes

**FONTE:** O autor



Quando cultivadas somente em meio suplementado com soro e antibióticos, as células U937 proliferam abundantemente. Sob estas condições, a observação sob microscopia de luz invertida revela que, após leve agitação do frasco de cultura, pequenos cachos de tamanho regular flutuam livremente no sobrenadante. Raramente estas células aderem-se à base do frasco. Já quando expostas ao PMA para a diferenciação, a observação ao microscópio revela que a maioria das células aderem-se à base do frasco de cultura, mostrando projeções citoplasmáticas e vacúolos proeminentes.

Em citocentrifugados corados com May-Grunwald-Giemsa, a população de células indiferenciadas (Figura 21-A) revelou a manutenção do aspecto blástico original, de tamanho homogêneo e formato arredondado. Estas células também mostram o citoplasma intensamente basófilo, sem grânulos e com bordas bem delineadas, com a cromatina nuclear de aspecto frouxo, delicado, e presença de um ou mais nucléolos. A população de células diferenciadas com PMA (Figura 21-B) mostrou-se heterogênea em tamanho, sendo possível confirmar a presença dos vacúolos, bem pronunciados, e das bordas irregulares. A propriedade de se aderir à base da garrafa de cultivo, mostrando projeções citoplasmáticas é uma das características de diferenciação desta linhagem quando exposta ao PMA, a qual provavelmente está relacionada ao aumento da expressão de integrinas da família  $\beta$ -2 (SHELLEY *et al.*, 2002).

#### 4.5.1 Indução da produção de PGE<sub>2</sub> por células U937-d

As diferentes substâncias/condições utilizadas para estimular a liberação de PGE<sub>2</sub> pelas células U937-d mostraram comportamentos bastante diferenciados. LPS, interferon- $\alpha$ , DMSO e o meio condicionado de *E. coli*, nas concentrações e condições utilizadas, não foram capazes de estimular a produção de PGE<sub>2</sub> pelas células de forma significativa. Quando utilizadas em baixas concentrações, estas substâncias e o meio bacteriano não conseguiram atuar como agentes agressores para as células e estimular alguma via que leve ao aumento de produção de PGE<sub>2</sub>. Quando utilizadas em altas concentrações, as substâncias e o meio bacteriano se mostraram tóxicos, o que foi verificado pela excessiva morte celular.

Dessa forma, os ensaios foram direcionados utilizando como agentes estimulantes somente a desferroxamina (400  $\mu\text{M}$ ) e o 17- $\beta$ -estradiol (40 nM), pois estas foram as únicas substâncias capazes de elevar a produção do metabólito em relação ao controle de forma significativa, mantendo a viabilidade celular. A Figura 22 ilustra o efeito destas substâncias no aumento da liberação de  $\text{PGE}_2$ , quando comparadas ao grupo controle.

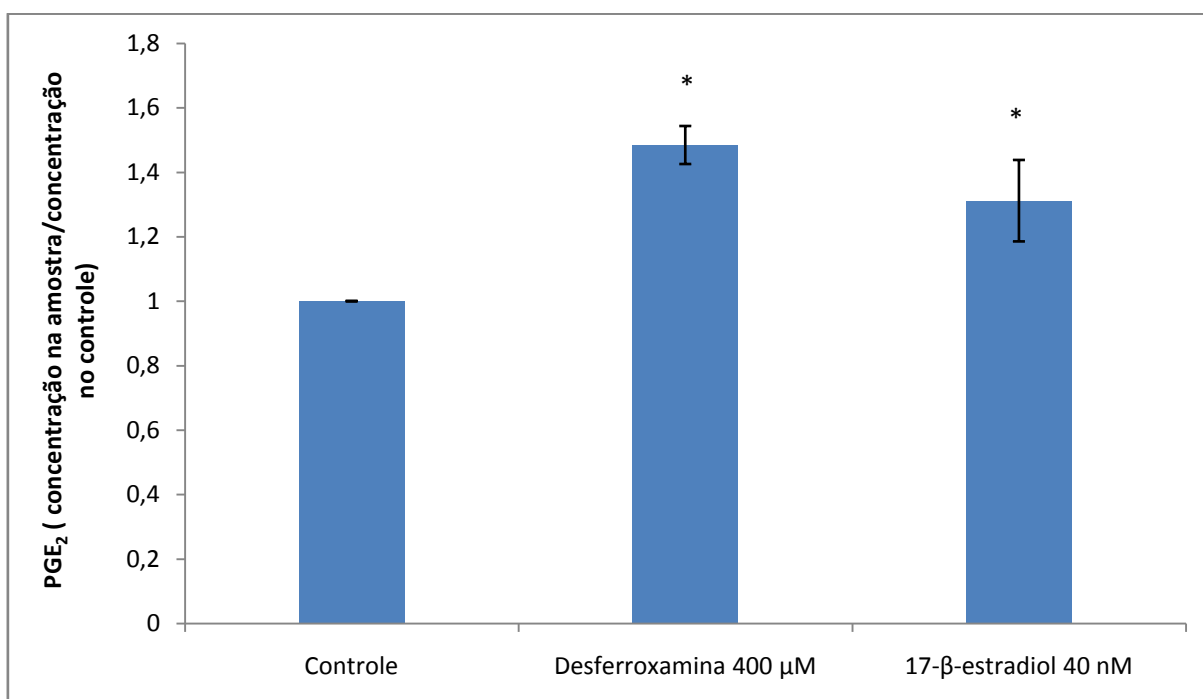


FIGURA 22 – AUMENTO NA PRODUÇÃO DE  $\text{PGE}_2$  POR DESFERROXAMINA E 17- $\beta$ -ESTRADIOL EM CÉLULAS U937-d, QUANDO COMPARADAS AO GRUPO CONTROLE

**NOTA:** n=5; \* $p \leq 0,05$ , em relação ao grupo

Quando mantidos sob incubação por 24 horas com as células U937-d, a desferroxamina (400  $\mu\text{M}$ ) e o 17- $\beta$ -estradiol (40 nM) foram capazes de elevar a produção de  $\text{PGE}_2$  em  $48,42 \pm 5,89\%$  ( $p=10^{-5}$ ) e em  $31,15 \pm 12,63\%$  ( $p=0,005$ ), respectivamente. Estas taxas de aumento na produção do metabólito são semelhantes aos valores encontrados na literatura, considerando um período de incubação equivalente (TANJI *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004).

Diversos autores relatam aumentos muito mais expressivos de liberação de prostaglandinas em comparação aos obtidos neste trabalho, quando diferentes substâncias estimulantes são adicionadas em cultivos celulares (OKAMURA *et al.*,

1999; TAKABATAKE *et al.*, 2002; TANJI *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2004). Porém, nestes casos, testes avaliando a viabilidade celular não são relatados e a quantificação dos analitos é realizada através de sistemas comerciais (*kits*) de imunoensaio do tipo ELISA, que são pouco específicos por apresentarem alto índice de reação cruzada (LUNDSTRÖM *et al.*, 2009).

#### 4.5.2 Avaliação da viabilidade e da proliferação celular

A avaliação da viabilidade celular foi realizada pelo teste do azul de Trypan 0,4%, onde as células viáveis permanecem incolores e as células mortas, cuja parede é permeável ao corante, se tingem de azul (MALTA *et al.*, 2006). A Figura 23 representa a morfologia das células U937-d quando expostas ao corante.

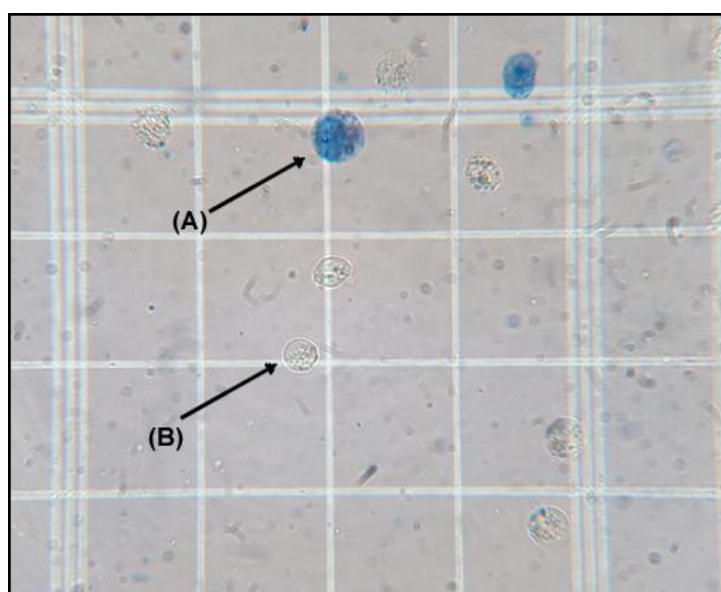


FIGURA 23 – IMAGEM OBSERVADA AO MICROSCÓPIO ÓPTICO REPRESENTANDO CÉLULAS U-937-d EXPOSTAS AO CORANTE AZUL DE TRYPAN

**NOTA:** (A) CÉLULA MORTA

(B) CÉLULA VIVA

**OBS:** Imagem observada ao microscópio óptico sob aumento de 40x

**FONTE:** O Autor

A influência da desferroxamina, do 17- $\beta$ -estradiol, da indometacina, do extrato de *M. sylvestris* (0,1 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ) e do extrato associado às substâncias

estimulantes sobre o comportamento da linhagem celular U937-d foi avaliado. Neste sentido, foram medidas as taxas de viabilidade celular, bem como sua influência sobre a proliferação. Os resultados estão apresentados na Figura 24, em gráficos do tipo dose-resposta, onde as barras representam a média  $\pm$  desvio padrão do número de células recuperadas em cada amostra, enquanto a curva representa a viabilidade celular média  $\pm$  desvio padrão, expressa em porcentagem.

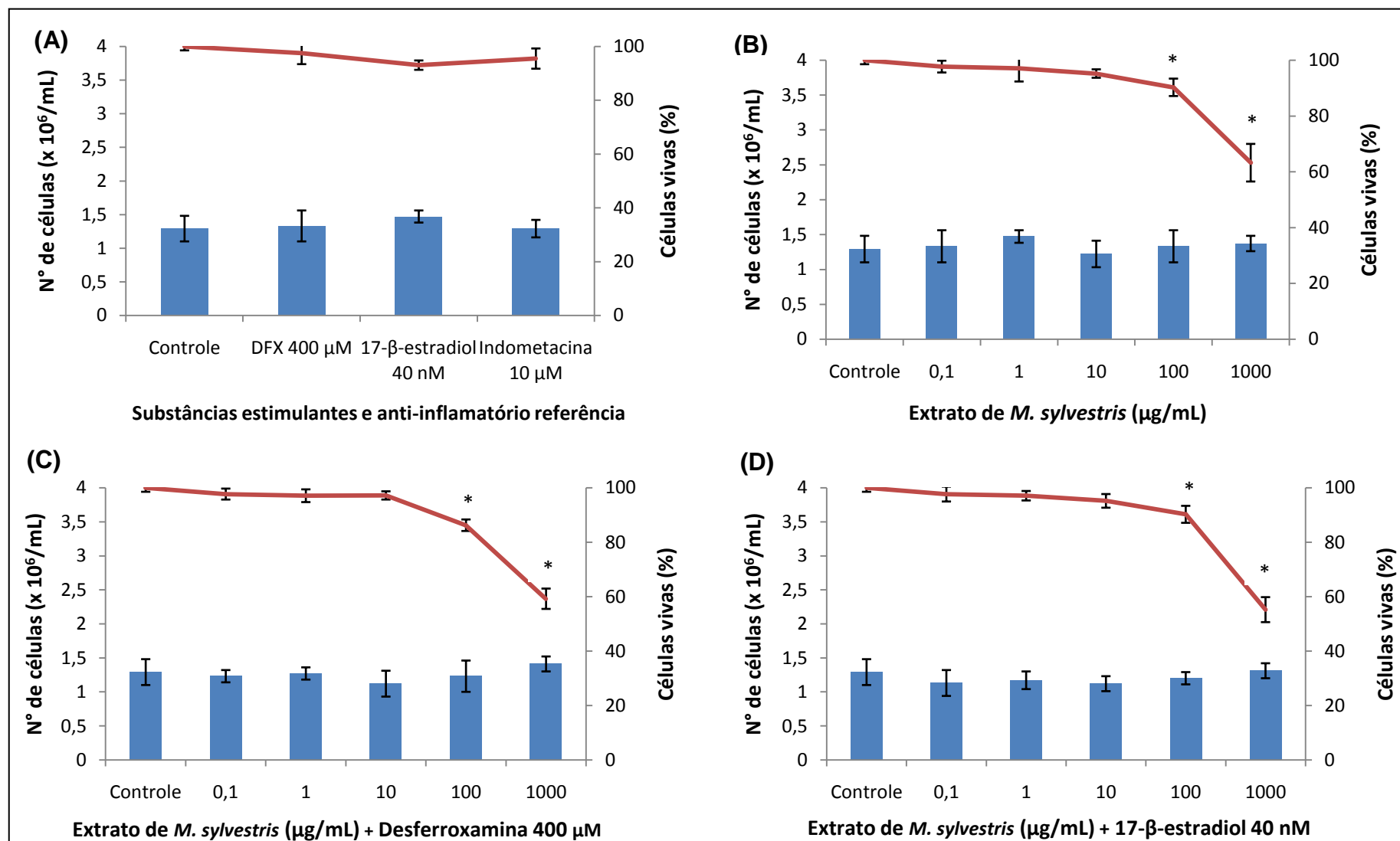


FIGURA 24 – EFEITO *IN VITRO* DE SUBSTÂNCIAS ESTIMULANTES (A), EXTRATO DE *M. sylvestris* (B), EXTRATO DE *M. sylvestris* ASSOCIADO A DESFERROXAMINA -DFX- 400 μM (C) E EXTRATO DE *M. sylvestris* ASSOCIADO A 17-β-ESTRADIOL 40 nM (D) SOBRE A PROLIFERAÇÃO E VIABILIDADE DE CÉLULAS U937-d

NOTA: \* $p \leq 0,05$ , em relação ao grupo controle

O percentual médio de viabilidade, avaliado pelo teste de exclusão com o azul de Trypan após incubação por 24 horas, revelou que a desferroxamina a 400  $\mu\text{M}$ , o 17- $\beta$ -estradiol a 40 nM, a indometacina a 10  $\mu\text{M}$  e o extrato de *M. sylvestris* até 10  $\mu\text{g/mL}$  não se mostraram tóxicos para as células U937-d. Somente as concentrações de 100  $\mu\text{g/mL}$  e 1000  $\mu\text{g/mL}$  de extrato de *M. sylvestris* (aplicados isoladamente ou em conjunto com as substâncias estimulantes) foram tóxicas para as células U937-d, afetando significativamente o percentual de viabilidade celular. Houve, nestes casos, diferença significativa no percentual de células vivas entre as populações tratadas e a população controle ( $1,29 \pm 0,19 \times 10^6$  células/mL). Quando a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$  de extrato foi aplicada isoladamente (Figura 24-B), o percentual de células viáveis foi reduzido para  $90,3 \pm 3,64\%$  ( $p=0,0439$ ). Quando esta mesma concentração foi aplicada em associação com as substâncias desferroxamina 400  $\mu\text{M}$  e 17- $\beta$ -estradiol 40 nM, as células viáveis foram reduzidas para  $86,35 \pm 2,82\%$  ( $p=0,01389$ ) (Figura 24-C) e para  $90,37 \pm 3,05\%$  ( $p=0,0319$ ) (Figura 24-D), respectivamente. A concentração de extrato de 1000  $\mu\text{g/mL}$  causou uma redução drástica no percentual de células viáveis, levando os índices de viabilidade para  $66,80 \pm 6,10\%$  ( $p=0,0111$ ) quando aplicada isoladamente sobre cultivo, e para  $59,20 \pm 3,74\%$  ( $p=0,0024$ ) e  $55,20 \pm 4,59\%$  ( $p=0,0034$ ), quando aplicada em associação com desferroxamina 400  $\mu\text{M}$  e 17- $\beta$ -estradiol 40 nM, respectivamente.

Nenhuma dose de extrato de *M. sylvestris*, e tampouco as substâncias estimulantes ou o anti-inflamatório de referência, mostraram capacidade de promover a proliferação das células U937-d. Todas as amostras mostraram contagens celulares nos cultivos muito próximas daquelas obtidas para a população controle. Este fato pode estar relacionado com a aquisição de características inerentes ao processo de diferenciação a que as células U937 foram submetidas, na medida em que a exposição a indutores de diferenciação, como o PMA, pode modificar as vias de transdução de sinais que atuam nos processos de proliferação, desviando-os para aqueles responsáveis pela diferenciação e maturação celulares (FRESHNEY, 2000).

4.5.3 Avaliação do efeito de extrato de *M. sylvestris* sobre a liberação de  $\text{PGE}_2$  por células U937-d

Células U937-d foram expostas ao tratamento com extrato de *M. sylvestris*, por um período de 24 horas em ambiente a 37°C e com 5% CO<sub>2</sub>. Tendo em vista que as concentrações de extrato superiores a 100 µg/mL se mostraram tóxicas e que as concentrações inferiores a 10 µg/mL revelaram-se inócuas às células U937-d (Figura 24), estabeleceu-se a concentração de 10 µg/mL para o estudo do efeito sobre a liberação de PGE<sub>2</sub>. A indometacina, por ser um AINES com potente atividade inibitória não-seletiva sobre a enzima ciclooxigenase, (RINNE *et al.*, 2007), foi utilizada nesta série de experimentos como controle positivo da inibição de PGE<sub>2</sub>.

A Figura 25 mostra as taxas de liberação de PGE<sub>2</sub> observadas nos grupos de amostras tratados com o extrato da planta, quando comparadas com o grupo controle.

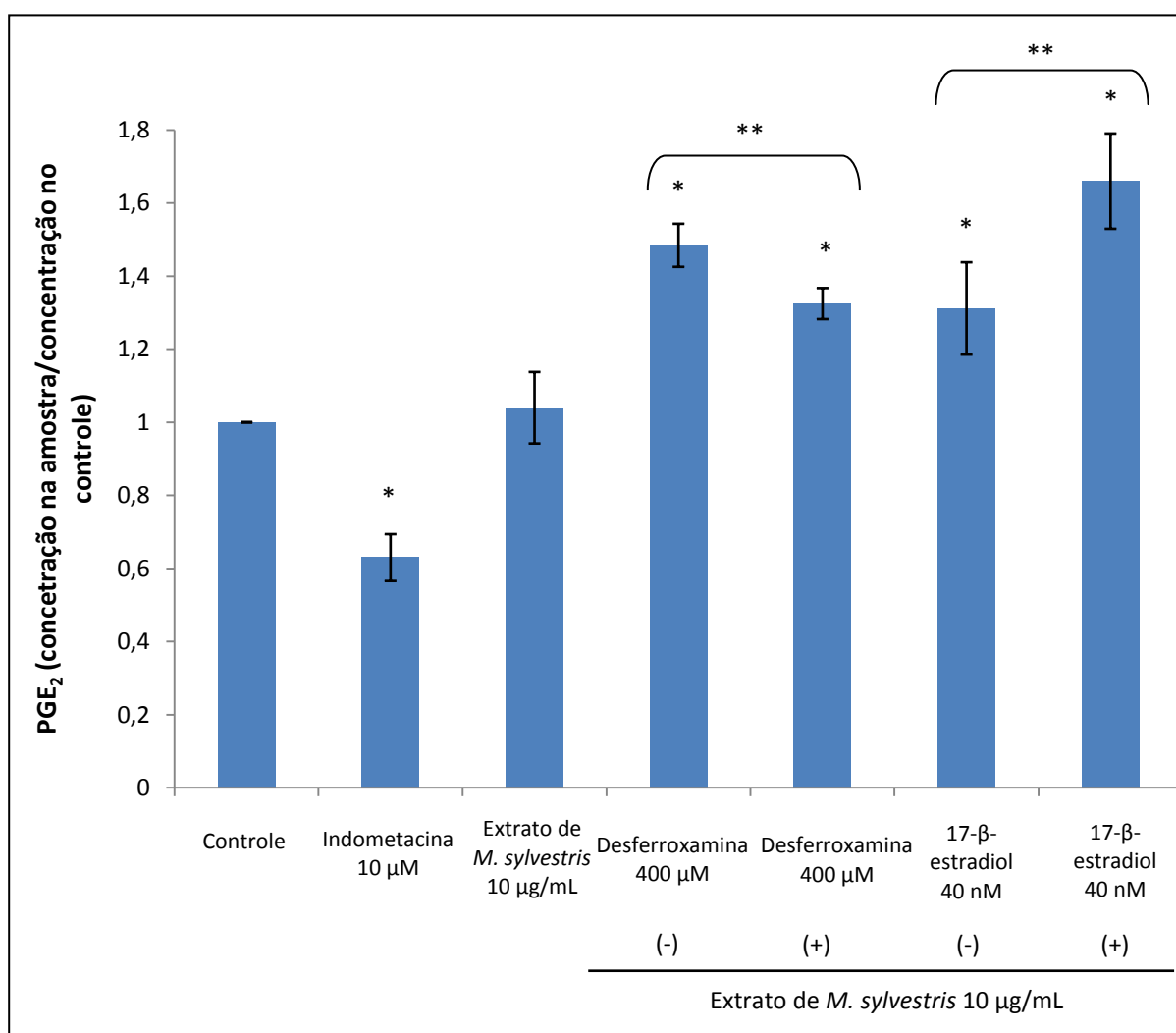


FIGURA 25 – EFEITO DO EXTRATO DE *M. sylvestris* (10 µg/mL) SOBRE A LIBERAÇÃO DE PGE<sub>2</sub> EM CÉLULAS U937-d

NOTA: n=3-7; \*p<0,05 em relação ao controle, \*\*p<0,05 entre os grupos comparados

Os resultados ilustrados na Figura 25 demonstram que, de fato, a indometacina a 10  $\mu$ M foi capaz de reduzir significativamente a liberação de PGE<sub>2</sub> a valores abaixo do nível basal, representado pela amostra controle. Foram obtidas taxas de redução de 37,03  $\pm$  6,40% (p=0,009), comprovando que o uso deste anti-inflamatório de referência é adequado para o modelo celular utilizado no estudo.

O extrato de *M. sylvestris*, quando aplicado isoladamente sobre o cultivo, não foi capaz de modificar a taxa de liberação de PGE<sub>2</sub> pelas células, não sendo considerada estatisticamente significativa a diferença entre o grupo que recebeu este tratamento e o grupo controle (p=0,4759).

Porém, quando o conjunto de amostras que recebeu o tratamento com o extrato da planta em associação com a desferroxamina é comparado com o conjunto de amostras que recebeu somente o estimulante, pode-se perceber que o extrato de *M. sylvestris* foi capaz de bloquear o aumento na liberação da prostaglandina causado pelo estimulante. A redução obtida na comparação entre estes dois grupos foi de 10,74  $\pm$  2,86% (p=0,018).

Já se demonstrou experimentalmente que células U937-d, quando tratadas com desferroxamina, aumentam a expressão de COX-2 e produção de PGE<sub>2</sub>, via NF- $\kappa$ B e NF-IL6, este último envolvido em mecanismos que aumentam da expressão de óxido nítrico, um sinalizador para o estímulo à liberação de prostaglandinas (DLASKA; WEISS, 1999; TANJI *et al.*, 2001). Portanto, é possível que o extrato bloqueie uma ou mais das vias que a desferroxamina utiliza para o aumento da expressão PGE<sub>2</sub>.

Dessa forma, foi possível observar ação positiva do extrato de *M. sylvestris* na diminuição da liberação de PGE<sub>2</sub>, em cultivos celulares da linhagem U937, os quais são usados como modelo *in vitro* para o estudo da periodontite (BODET; CHANDAD; GRENIER, 2006; YOUNES *et al.*, 2006). Assim, a diminuição dos níveis desta prostaglandina, um dos mais importantes mediadores químicos da inflamação, pode ser considerada como uma das formas pelas quais o extrato de *M. sylvestris* exerce o seu conhecido efeito anti-inflamatório, principalmente contra as afecções orais.

Com relação ao 17- $\beta$ -estradiol, em modelos experimentais usando células leucêmicas monocíticas como as usadas neste estudo, sabe-se que sua presença ativa macrófagos, os quais passam a ter funções exacerbadas (KRAMER; WRAY, 2002). Ainda, a presença de PMA em cultura dessas células favorece a expressão de receptores ER $\alpha$ , típicos de hormônios sexuais, como os estrogênios (CUTOLO *et*



*al.*, 2001). Neste contexto, é possível que o PMA usado para induzir a diferenciação de células U937 tenha estimulado a expressão de receptores de estrogênios, os quais se ligariam ao 17- $\beta$ -estradiol adicionado ao meio. Além disso, segundo LU *et al.* (2004), o mecanismo pelo qual o 17- $\beta$ -estradiol eleva a produção de PGE<sub>2</sub> em células U937 diferenciadas com PMA envolve o aumento da atividade das enzimas cPLA<sub>2</sub>, COX-1 e COX-2. O hormônio liga-se aos receptores ER $\alpha$ , o que permite a sua entrada no núcleo da célula e o aumento da expressão de RNAm das proteínas, através da regulação da transcrição genética via fatores transcripcionais tais como AP-1 e SP-1.

Quando o extrato da planta foi adicionado concomitantemente com o 17- $\beta$ -estradiol, não foi observado bloqueio ou diminuição nas taxas de liberação de PGE<sub>2</sub> quando comparado com o grupo que somente recebeu o estimulante. Houve aumento na produção do metabólito ( $26,20 \pm 9,91\%$ ,  $p=0,0438$ ), mostrando que o extrato de *M. sylvestris* pode ter atuado de forma sinérgica com a substância estimulante, elevando ainda mais o patamar de liberação da prostaglandina. Nesse sentido, necessitam-se de mais estudos para elucidar o mecanismo pelo qual este evento ocorreu.

## 5. CONCLUSÃO

O método desenvolvido por CLAE-EM/EM provou ser adequado para a análise de PGE<sub>2</sub> extraída de meio de cultivo celular, mostrando seletividade, linearidade, precisão e exatidão aceitáveis de acordo com a legislação nacional vigente (RE ANVISA Nº 899/03). O método desenvolvido, utilizando coluna cromatográfica bastante comum em laboratórios analíticos (C-18, 5µm, 2,1x150 mm), pode ser aplicado com segurança na determinação da PGE<sub>2</sub>. Porém, a garantia da estabilidade do analito e do padrão interno utilizado é um fator determinante para a confiabilidade e reprodutibilidade dos resultados. Dessa forma, é recomendado que a degradação do analito seja minimizada através do imediato congelamento das amostras (se a análise for postergada), bem como que o manuseio das mesmas a temperatura ambiente seja efetuado em tempo inferior a 12 horas.

O extrato de *M. sylvestris*, nas condições experimentais utilizadas, não foi capaz de estimular a proliferação das células U937 diferenciadas com PMA. Além disso, concentrações de extrato acima de 100 µg/mL se mostraram tóxicas para estas células. Diversas substâncias foram avaliadas quanto à capacidade de estimular a liberação de PGE<sub>2</sub> nestas células, porém somente a desferroxamina (400 µM) e o 17-β-estradiol (40 nM) se mostraram capazes de elevar a produção da prostaglandina de forma significativa, mantendo a viabilidade. Taxas de aumento de liberação de PGE<sub>2</sub> de 48,42 ± 5,89% e 31,15 ± 12,63% foram obtidas para a desferroxamina e para o 17-β-estradiol, respectivamente.

O extrato de *M. sylvestris*, na concentração de 10 µg/mL, foi capaz de bloquear o aumento da liberação de PGE<sub>2</sub> causado pela desferroxamina em 10,74 ± 2,86%. Assim, a diminuição dos níveis deste mediador inflamatório causado pelo extrato pode ser um dos mecanismos utilizados pela planta para exercer a sua conhecida ação anti-inflamatória, principalmente em afecções orais como a periodontite.

Porém, quando o agente estimulante era o 17-β-estradiol, o extrato de *M. sylvestris* não foi capaz de bloquear o aumento na produção da prostaglandina, sendo necessários mais estudos acerca do mecanismo pelo qual este evento ocorre.

## REFERÊNCIAS

ALESIANI, D.; PICHICHERO, E.; CANUTI, L.; CICCONI, R.; KAROU, D.; D'ARCANGELO G.; CANINI, A. Identification of phenolic compounds from medicinal and melliferous plants and their cytotoxic activity in cancer cells. **Caryologia**, v. 60, p. 90-95, 2007.

ANDREASSON, K. Emerging roles of PGE2 receptors in models of neurological disease. **Prostaglandins and other Lipid Mediators**, v. 91, n. 3-4, p. 104–112, abr 2010.

ARAUJO, P.; FROYLAND, L. Optimization of an extraction method for the determination of prostaglandin E<sub>2</sub> in plasma using experimental design and liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J of Chromatography B**, v. 830, n. 2, p. 212-217, jan. 2006.

ARMITAGE, G. C. Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. **Ann Periodontol**, v. 4, n. 1, p. 1-6, dez. 1999.

BALDI, D.; IZZOTTI, A.; BONICA, P.; PERA, P.; PULLIERO, A. Degenerative periodontal-diseases and oral osteonecrosis: The role of gene-environment interactions. **Mutat Res**, v. 667, n. 1-2, p. 118-131, jul 2009.

BENKLEN, A.; AINOLA, M.; HUKKANEN, M.; GÜRGAN, C.; SORSA, T.; KONTTINEN, Y. T. MMPs, IL-1, and TNF are regulated by IL-17 in periodontitis. **J Dent Res**, v. 86, n. 4, p. 347-51, 2007.

BLEWETT, J. A.; VARMA, D.; GILLES, T.; LIBONATI, J. R.; JANSEN, S. A. Development and validation of a high-performance liquid chromatography–electrospray mass spectrometry method for the simultaneous determination of 23 eicosanoids. **J Pharmaceut Biomed**, v. 46, n. 4, p. 653-666, mar. 2008.

BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Anti-inflammatory activity of a high-molecular-weight cranberry fraction on macrophages stimulated by lipopolysaccharides from periodontopathogens. **J Dent Res**, v. 85, n. 3, p. 235-239, 2006.

BOGATCHEVA, N. V.; SERGEEVA, M. G.; DUDEK, S. M.; VERIN, A. D. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. **Microvasc Res**, v. 69, n. 3, p. 107-127, maio 2005.

BRASIL. Agência Nacional da Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 10 de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. **Diário Oficial da União**. Brasília-DF, 9 mar. 2010.

BRASIL. Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução n 899 de 29 maio de 2003 que determina a publicação do Guia para Validação de Métodos Analíticos e Bioanalíticos. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 02 fev. de 2003.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 4ª ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BRITO, N. M.; JUNIOR, O. P. A.; POLESE, L.; RIBEIRO, M. L. Validação de métodos analíticos: Estratégia e discussão. Pesticidas: R. **Ecotoxicol. e Meio Ambiente**, Curitiba, v.13, p. 129-143, dez. 2003.

BUCKLEY, C. D.; PILLING, D.; LORD, J. M.; AKBAR, A. N.; SCHEEL-TOELLNER, D.; SALMON, M. Fibroblasts regulate the switch from acute resolving to chronic persistent inflammation. **Trends Immunol**, v. 22, n. 4, p. 199-204, abr. 2001.

BUDZIKIEWICZ, H.; GRIGSBY, R. D., Mass spectrometry and isotopes: A century of research and discussion. **Mass Spectrom**, v. 25, p. 146-157, 2006.

BUFFON, M. C. M.; LIMA, M. L. C.; GALARDA, I.; COGO, L. Avaliação da eficácia dos extratos de *Malva sylvestris*, *Calêndula officinalis*, *Plantago major* e *Curcuma zedoaria* no controle do crescimento das bactérias da placa dentária. Estudo "in vitro". **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 1, p. 31-38, 2001.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacol Therap**, v. 107, n. 2, p. 139-154, 2005.

CAO, H.; XIAO, L.; PARK, G.; WANG, X.; AZIM, A.; CHRISTMAN, J.; van BREEMEN, R. An improved LC-MS/MS method for the quantification of prostaglandins E<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> production in biological fluids. **Anal Biochem**, v. 372, n. 1, p. 41-51, jan. 2008.

CARNEIRO, J.; JUNQUEIRA, L. C. U. **Histologia Básica**. 9ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

CARRANZA, F. A. Jr. **Periodontia Clínica**. Sétima edição, Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 1992. p. 250.

CHANG, M.; CHEN, B.; YU, M.; SHEU, J.; CHEN, T.; LIN, C. Phorbol 12-myristate 13-acetate upregulates cyclooxygenase-2 expression in human pulmonary epithelial cells via Ras, Raf-1, ERK, and NF-κB, but not p38 MAPK, pathways. **Cell Signall**, v. 17, n. 3, p. 299-310, mar. 2005.

CHAPPLE, I. L. C. Periodontal disease diagnosis: current status and future developments. **J Dent**, v. 25, n. 1, p. 3-15, jan. 1997.

CHAUDHRY, U.; ZHUANG, H.; DORÉ, S. Microsomal prostaglandin E synthase-2: Cellular distribution and expression in Alzheimer's disease. **Exp Neurol**, v. 223, n. 2, p. 359-365, jun. 2010.

CHELL, S.; KADI, A.; WILLIAMS, A. C.; PARESKEVA, C. Mediators of PGE<sub>2</sub> synthesis and signalling downstream of COX-2 represent potential targets for the prevention/treatment of colorectal cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1766, n. 1, p. 104-119, ago 2006.

CHEN, X.; TANNER, K.; LEVINE, J. D. Mechanical sensitization of cutaneous C-fiber nociceptors by prostaglandin E2 in the rat. **Neurosci Lett**, v. 267, n. 2, p. 105-108, maio 1999.

CHOMYSZYN-GAJEWSKA, M.; CZAJKOWSKA, B.; BLAZEWICZ, M.; PAMULA, P.; PTAK, M. In vitro response of macrophages to a new carbon-poly lactide composite for the treatment of periodontal diseases. **Biomaterials**, v. 23, n. 2, p. 463-470, jan 2002.

CIPOLLONE, F.; CICOLINI, G.; BUCCI, M. Cyclooxygenase and prostaglandin synthases in atherosclerosis: Recent insights and future perspectives. **Pharmacol Therapeut**, v. 118, n. 2, p. 161-180, maio 2008.

COLVARD, M. D.; CORDEL, G. A.; VILLALOBOS, R.; SANCHO, G.; SOEJARTO, D. D.; PESTLE, W.; ECHEVERRI, T. L.; PERKOWITZ, K. M.; MICHEL, J. Survey of medical ethnobotanicals for dental and oral medicine conditions and pathologies. **J Ethnopharmacol**, v. 107, n. 1, p. 134-142, ago 2006.

CONFORTI, F.; SOSA, S.; MARRELLI, M.; MENICHINI, F.; STATTI, G. A.; UZUNOV, D.; TUBARO, A. *In vivo* anti-inflammatory and in vitro antioxidant activities of Mediterranean dietary plants. **J Ethnopharmacol**, v. 116, n. 1, p. 144-151, fev. 2008.

CUTOLO, M.; CARRUBA, G.; VILLAGGIO, B.; COVIELLO D. A.; DAYER, J. M.; CAMPISI, I.; MIELE, M.; STEFANO, R.; CASTAGNETTA, L. A. M. Phorbol diester 12-Otetradecanolyphorbol 13-acetate (TPA) up-regulates the expression of estrogen receptors in human THP-1 leukemia cells. **J Cell Biochem**, v. 83, p. 390-400, 2001

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacol Res**, v. 52, n. 1, p. 72-82, jul. 2005.

DEEMS, R.; BUCZYNSKI, M. W.; BOWERS-GENTRY, R.; HARKEWICS, R.; DENNIS, E. A. Detection and Quantitation of Eicosanoids via High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization-Mass Spectrometry. **Method Enzymol**, v. 432, p. 59-82, 2007.

DEGANI, A. L. G.; CASS, Q. B.; VIERA, P. C. Cromatografia: Um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, p. 21-25, maio 1998.

DEL BUFALO, A.; BERNAD, J.; DARDENNE, C.; VERDA, D.; MEUNIER, J. R.; ROUSSET, F.; MARTINOZZI-TEISSIER, S.; PIPY, B. Contact sensitizers modulate the arachidonic acid metabolism of PMA-differentiated U-937 monocytic cells activated by LPS. **Toxicol Applied Pharmacol**, v. 256, n. 1, p. 35-43, out. 2011.

DENTINO, A. R.; KASSAB, M. M.; RENNER, E. J. Prevention of Periodontal Diseases. **Dent Clin N Am**, v. 49, n. 3, p. 573-594, jul. 2005.

DE SOUZA, L. M. **Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa**

**molecular.** Curitiba, 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

DLASKA, M.; WEISS, G. Central role of transcription factor NF-IL6 for cytokine and iron-mediated regulation of murine inducible nitric oxide synthase expression, **J. Immunol**, v. 162, p. 6171-6177, 1999.

ESTEVEZ, P. F.; SATO, A.; ESQUIBEL, M. A.; CAMPOS-BUZZI, F.; MEIRA, A. V.; CECHINEL-FILHO, V. Antinociceptive activity of *Malva sylvestris* L. **Lat Am J Pharm**, v. 28, n. 3 p. 454-456, 2009.

FENG, Z.; WEINBERG A. Role of bacteria in health and disease of periodontal tissues. **Periodontol 2000**, v. 40, n. 1, p. 50-76, jan 2006.

FRANCISCO, K. S. F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**. v. 1, n. 4, p. 18-24, 2010.

FRESHNEY, R. I. Introduction. In: **Culture of animal cells: A manual of basic technique**. 4. ed. New York: Wiley-Liss, 2000.

FRESHNEY, I. R. Basic Principles of Cell Culture. In:\_\_\_\_\_ **Culture of Cells for Tissue Engineering**. John Wiley & Sons, 1996. Disponível em: [http://media.wiley.com/product\\_data/excerpt/59/04716293/0471629359.pdf](http://media.wiley.com/product_data/excerpt/59/04716293/0471629359.pdf)> Acesso em: 30 jun 2010

GAO, H. M.; LIU B.; WANGGIN, Z.; JAU-SHYONG, H. Novel anti-inflammatory therapy for Parkinson's disease. **Trends Pharmacol Sci**, v. 24, n. 8, p. 395-401, ago. 2003.

GASPARETTO, J. C.; MARTINS, C. A. F.; HAYASHI, S. S.; OTUKY, M. F.; PONTAROLO, R. Ethnobotanical and scientific aspects of *Malva sylvestris* L.: a millennial herbal medicine. **J Pharm Pharmacol**, v. 64, n. 2, p.172-189, fev 2012.

GLISH, G. L.; VACHET, R. W. The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. **Nat Rev Drug Discov**, v. 2, n. 2, p. 140-50, fev. 2003.

GRAVES, D. T.; COCHRAN, D. The Contribution of Interleukin-1 and Tumor Necrosis Factor to Periodontal Tissue Destruction. **J Periodontol**, v. 74, n. 3, p. 391-401, mar 2003.

GREENE, E. R.; HUANG, S.; SERHAN, C. N.; PANIGRAHY, D. Regulation of inflammation in cancer by eicosanoids. **Prost Lipid Med**, v. 96, n. 1-4, p. 27-36, nov. 2011.

GUARRERA, P. M. Traditional phytotherapy in central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). **Fitoterapia**, v. 76, n. 1, p. 1-25, jan. 2005.

GUTIÉRREZ-VENEGAS, G.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; MALDONADO, S. The effect of flavonoids on transduction mechanisms in lipopolysaccharide-treated human gingival fibroblasts. **Int Immunopharmacol**, v. 7, n. 9, p. 1199-1210, set 2007.

HAMILTON, J. G.; KAROL, R. J. High performance Liquid Chromatography (HPLC) of arachidonic acid metabolites. **Prog Lipid Res**, v. 21, n. 3, p. 155-170, 1982

HARA, S.; KAMEI, D.; SASAKI, Y.; TANEMOTO, A.; NAKATANI, Y.; MURAKAMI, M. Prostaglandin E synthases: Understanding their pathophysiological roles through mouse genetic models. **Biochimie**, v. 92, n. 6, p. 651-659, jun 2010.

HARRIS, G. S.; PADILLA, J.; KOUMAS, L.; RAY, D.; PHIPPS, R. P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol**, v. 23, n. 3, p. 144-150, mar. 2002.

HAYES, M. M.; LANE, B. R.; KING, S. R.; MARKOVITZ, D. M.; COFFEY, M. J. Prostaglandin E<sub>2</sub> inhibits replication of HIV-1 in macrophages through activation of protein kinase A. **Cell Immunol**, v. 215, n. 1, p. 61-71, jan. 2002.

HAYASHI, S. S. **Determinação qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários da *Malva sylvestris* em extrato e especialidades farmacêuticas.** Curitiba, 2012. 77 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

HIKIJI, H.; TAKATO, T.; SHIMIZU, T.; ISHII, S. The roles of prostanoids, leukotrienes, and platelet-activating factor in bone metabolism and disease. **Prog Lipid Res**, v. 47, n. 2, p. 107-126, mar 2008.

HISHINUMA, T. SUZUKI, K.; MASAYOSHI, S.; YAMAGUCHI, H; SUZUKI, N.; YOSHIHISA T.; KANEKO, I.; ONO, M.; GOTO, J. Simultaneous quantification of seven prostanoids using liquid chromatography/tandem mass spectrometry: The effects of arachidonic acid on prostanoid production in mouse bone marrow-derived mast cells. **Prostag Leukotr Ess**, v. 76, n. 6, p. 321-329, jun. 2007.

HOOZEMANS, J. J. M.; VEERHUIS, R.; JANSSEN, I.; van ELK, E. J.; ROZEMULLER, A. J. M.; EIKELENBOOM, P. The role of cyclo-oxygenase 1 and 2 activity in prostaglandin E<sub>2</sub> secretion by cultured human adult microglia: Implications for Alzheimer's disease. **Brain Res**, v. 951, n. 2, p. 218-226, out. 2002.

JARDIM, I. C. S. F.; COLLINS, C. H.; GUIMARÃES, L. F. L. Cromatografia Líquida de alta eficiência. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas: Editora Unicamp, 2007.

JIAO, J.; CARELLA, A. J.; STEENO, G. S.; DARRINGTON, R. T. Optimization of triple quadrupole mass spectrometer for quantitation of trace degradants of pharmaceutical compounds. **Int J Mass Spectrom**, v. 216, n. 2, p. 209-218, maio 2002.

KIM, J. H.; JANG, S. I.; KIM, Y. J.; CHUNG, H. T.; YUN, Y. G.; KANG, T. H.; JEONG, O. S.; KIM, Y. C. Scopoletin suppresses pro-inflammatory cytokines and PGE<sub>2</sub> from LPS-stimulated cell line, RAW 264.7 cells. **Fitoterapia**, v. 75, n. 3-4, p. 261-266, jun. 2004.

KORFMACHER, W. A. Foundation review: Principles and applications of LC-MS in new drug discovery. **Drug Discov Today**, v. 10, n. 20, p. 1357-136, out. 2005.

KRAMER, P.; WRAY, S. 17-beta-estradiol regulates expression of genes that function in macrophage activation and cholesterol homeostasis. **J Steroid Biochem Mol Biol**, v. 81, p. 203–216, 2002.

LEE, J. H.; KANG, N. S.; SHIN, S. O.; SHIN, S. H.; LIM, S. G.; SUH, D. Y.; BAEK, I. Y.; PARK, K. Y.; HA, T. J. Characterisation of anthocyanins in the black soybean (*Glycine max L.*) by HPLC-DAD-ESI/MS analysis. **Food Chem**, v. 112, n. 1, p. 226-231, jan. 2009.

LEE, M. S.; KERNS, E. H. LC/MS applications in drug development. **Mass Spectrom Rev**, v. 18, p. 187-279, jul. 1999.

LEGRAND-PEELS, S.; MANIGLIA, S.; BOELAERTF, J. R.; PIETTE, J. Activation of the Transcription Factor NF-KB in Lipopolysaccharide-Stimulated U937 Cells. **Biochem Pharmacol**, v. 53, p. 339-346, 1997.

LIMA JR, J. F.; DIMENSTEIN, M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: Visão do odontólogo. **Saúde em Revista**, v.19, n. 8, p. 37-44, 2006.

LIMA, V.; BEZERRA, M. M.; LEITÃO, R. F. C.; BRITO, G. A. C.; ROCHA, F. A. C.; RIBEIRO, R. A. Principais mediadores inflamatórios envolvidos na fisiopatologia da periodontite – papel dos moduladores farmacológicos. **Revista Periodontia**, v. 18, n. 3, p. 7-19, set. 2008.

LINDHE, J.; LANG, N. P.; KARRING, T. **Tratado de periodontia Clínica e implantologia Oral**. Guanabara Koogan, quinta edição, Rio de Janeiro, 2010.

LITTLE, J. W. Complementary and alternative medicine: impact on dentistry. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 98, n. 2, p. 137-145, ago. 2004.

LODDI, A. M. V. **Avaliação pré-clínica do potencial anti-inflamatório e cicatrizante da *Malva sylvestris* Linn. em alterações bucais**. Curitiba, 2008. 122 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

LUNDSTRÖM, S. L.; D'ALEXANDRI, F. L.; NITHIPATIKOM, K.; HAEGGSTRÖM, J. Z.; WHEELLOCK, A. M.; WHEELLOCK, C. E. HPLC/MS/MS-Based Approaches for Detection and Quantification of Eicosanoids. **Lipidomics**, v. 579, p. 161-187, 2009.

LUO, M.; FLAMAND, N.; BROCK, T. G. Metabolism of arachidonic acid to eicosanoids within the nucleous. **BBA-Mol Cell Biol L**, v. 1761, n. 5-6, p. 618-625, maio/jun. 2006.

LU, B.; JIANG, Y. J.; CHOY, P. C. 17- $\beta$  estradiol enhances prostaglandin E2 production in human U937-derived macrophages. **Mol Cell Biochem**, v. 262, p. 101-110, 2004.

MALTA, J. B. N. S.; FELBERG, S.; MURÇA, M. A. S.; BARROS, M. A. C.; MIMICA, L. M. G. Risco de contaminação do corante azul de tripano após primeira utilização. **Arq Bras Oftalmol**, v. 69, n. 1, p. 27-31, 2006.



MASOODI, M.; NICOLAOU, A. Lipidomic analysis of twenty-seven prostanoids and isoprostanes by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **Rapid Commun Mass Sp**, v. 20, n. 20, p. 3023-3029, 2006.

MESAROS, C.; LEE, S. H.; BLAIR, I A. Targeted quantitative analysis of eicosanoid lipids in biological samples using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **J Chromatogr B**, v. 877, p. 2736–2745, 2009.

MILLER, B. S. Prostaglandins in Health and Disease: An Overview. **Semin Arthritis Rheum**, v. 36, p. 37-49, 2006.

MINAMI, T.; MATSUMURA, S.; MABUCHI, T.; KOBAYASHI, T.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S.; ITO, S. Functional evidence for interaction between prostaglandin EP3 and  $\kappa$ -opioid receptor pathways in tactile pain induced by human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) glycoprotein gp120. **Neuropharmacol**, v. 45, n. 1, p. 96-105, jul. 2003.

MUBARAK, K. K. A review of prostaglandin analogs in the management of patients with pulmonary arterial hypertension. **Resp Med**, v. 104, n. 1, p. 9-21, jan. 2010.

MURPHY, R. C.; BARKLEY, R. M.; BERRY, K. Z.; HANKIN, J.; HARRISON, K.; JOHNSON, C.; KRANK, J.; McANOY, A.; UHLSON, C.; ZARINI, S. Electrospray ionization and tandem mass spectrometry of eicosanoids. **Anal Biochem**, v. 346, n. 1, p. 1-42, nov. 2005.

NAKAHATA, N. Thromboxane A<sub>2</sub>: Physiology/pathophysiology, cellular signal transduction and pharmacology. **Pharmacol Therapeut**, v. 118, n. 1, p. 18-35, abr. 2008,

NEWBY, C. S.; MALLET, A, I. Rapid Simultaneous Analysis of Prostaglandin E2, 12-Hydroxyeicosatetraenoic Acid and Arachidonic Acid Using High Performance Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Rapid Commun Mass Sp**, v. 11, p. 1723-1727, 1997.

NIESSEN, W. M. A. Progress in liquid chromatography–mass spectrometry instrumentation and its impact on high-throughput screening. **J Chromatogr A**, v. 1000, n. 1-2, p. 413-436, jun. 2003.

NITHIPATIKOM, K.; LAABS, N. D.; ISBELL, M. A.; CAMPBELL, W. B. Liquid chromatographic-mass spectrometric determination of cyclooxygenase metabolites of arachidonic acid in cultured cells. **J Chromatogr B**, v. 785, n. 1, p. 135-145, fev. 2003.

NUTO, S. A. S.; NATIONS, M. K.; COSTA, I. C. C. Aspectos culturais na compreensão da periodontite crônica: um estudo qualitativo. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 3, p. 681-690, 2007.

OKAMURA, H.; YAMAGUCHI, M.; ABIKO, Y. Enhancement of lipopolysaccharide-stimulated PGE2 and IL-1 $\beta$  production in gingival fibroblast cells from old rats . **Exp Gerontol**, v. 34, n. 3, p. 379-392, jun. 1999.

OLIVEIRA, F. Q.; GOBIRA, B.; GUIMARÃES, C.; BATISTA, J.; BARRETO, M. SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 466-476, 2007.

PAIXÃO, C. C. B.; SANTOS, A. A.; OLIVEIRA, C. C. C.; SILVA, L. G. NUNES, M. A. R. Uso de plantas medicinais em pacientes portadores de afecções bucais. **Odontologia Clínico-Científica**, v. 1, n. 1, p. 23-27, 2002.

PARK, J. Y.; PILLINGER, M. H.; ABRAMSON, S. B. Prostaglandin E2 synthesis and secretion: The role of PGE2 synthases. **Clinical Immunology**, v. 119, n. 3, p. 229—240, jun 2006.

PASSALACQUA, N. G.; GUARRERA, P. M.; De FINE, G. Contribution to the knowledge of the folk plant medicine in Calabria region (Southern Italy). **Fitoterapia**, v. 78, n. 1, p. 52-68, jan. 2007.

PEREIRA-SMITH, O. M.; SMITH, J. R. Genetic analysis of indefinite division in human cells: identification of four complementation groups. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 85, n. 16, p. 6042-6046, 1988.

PERES, C. M.; CURI, R. **Como cultivar células**. 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

PÉREZ-CHACÓN, G.; ASTUDILLO, A. M.; BALGOMA, D.; BALBOA, M. A.; BALSINDE, J. Control of free arachidonic acid levels by phospholipases A<sub>2</sub> and lysophospholipid acyltransferases. **BBA-Mol Cell Biol L**, v. 1791, n. 12, p. 1103-1113, dez. 2009.

PETRONELLA, P.; FREDA, F.; NUNZIATA, L.; ANTROPOLI, M.; MANGANIELLO, A.; CUTOLO, P. P.; D'AMODIO, A. S. Prostaglandin E<sub>1</sub> versus lumbar sympathectomy in the treatment of peripheral arterial occlusive disease: randomised study of 86 patients. **Nutr Metab Cardiovas**, v. 14, n. 4, p. 186-192, ago. 2004.

PIERONI, A.; *et al.* Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. **J Ethnopharmacol**, v. 91, n. 2-3, p. 331-344, abr. 2004.

PIHLSTROM, B. L.; MICHALOWICZ, B. S.; JOHNSON, N. W. Periodontal diseases. **Lancet**, v. 366, n. 9499, p. 1809-1820, nov. 2005.

PILBEAM, C. C.; CHOUDHARY, S.; BLACKWELL, K.; RAISZ, L. G. Prostaglandins and bone metabolism. In: BILEZIKIAN, J. P.; RAISZ, L. G.; JOHN MARTIN, T. **Principles of bone biology**. AP, 2007. p. 1235-1271

PINHEIRO, M. L. P.; ANDRADE, E. D. Fitoterápicos como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. **Revista ABO Nacional**, v. 12, nº 2008. p. 107-110.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J **Farmacologia**. 6ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RIBANI, M.; BOTOLLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RICHTER, S.; GOLDBERG, S. A.; MASON, P. B. TRAINA, A. J., SCWIETERS, J. B. Linearity tests for secondary electron multipliers used in isotope ratio mass spectrometry. **Int J Mass Spectrom**, v. 206, n. 1-2, p 105-127, fev. 2001.

RINNE, S.; KLEIVELAND, C. R.; KASSEM, M.; LEA, T.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Fast and simple online sample preparation coupled with capillary LC-MS/MS for determination of prostaglandins in cell culture supernatants. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 1860 – 1869, 2007.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual review of pathology**, v. 3, p. 99-126, 2008.

ROGUET, R.; SCHAEFER, H. Overview of in vitro cell culture technologies and pharmaco-toxicological applications. **Toxicol in Vitro**, v. 11, n. 5, p. 591-599, out. 1997.

ROUX, S.; ORCEL, P. Bone loss: Factors that regulate osteoclast differentiation - an update. **Arthritis Res**, v. 2, n. 6, p. 451-456, set. 2000.

SCHAEFFER, W. I. Terminology association with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. **In Vitro Cell Dev Biol**, v. 26, n. 1, p. 97-101, jan. 1990.

SCHERRER, A. M.; MOTTI, R.; WECKERLE, C. S. 2005. Traditional plant use in teh areas of Monte Vesole and Ascea, Cilento National Park (Campania, Southern Italy). **J Ethnopharmacol**, v. 97, n. 10, p. 129-143, fev. 2005.

SCHMIDT, R.; COSTE, O.; GEISSLINGER, G. LC-MS/MS-analysis of prostaglandin E<sub>2</sub> and D<sub>2</sub> in microdialysis samples of rats. **J Chromatogr B**. v. 826, n. 1-2, p. 188-197, nov. 2005.

SHABIR, G. A. Validation of high-performance liquid chromatography methods for pharmaceutical analysis. Understanding the differences and similarities between validation requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. **J Chromatogr A**, v.987, n.1-2, p.57-66, 2003.

SHALE, T. L.; STIRK, W A.; STADEN, J Variation in antibacterial and anti-inflammatory activity of different growth forms of *Malva parviflora* and evidence for synergism of the anti-inflammatory compounds. **J Ethnopharmacol**, v. 96, n. 1-2, p. 325-330, jan. 2005.

SIKORSKA, M. MATLAWSKA, I.; FRANSKI, R. 8-Hydroxyflavonoid glucuronides of *Malope trifida*. **Acta Physiol Plant**, v. 26, p. 291-297, 2004.

SILVA, A. de P.; ALVES, M. C. C. Como iniciar a validação de métodos analíticos. Enqualab, 2006. **Congresso e Feira da Qualidade em Metrologia Rede Metrológica do Estado de São Paulo – REMESP**, p. 8-15, jun. 2006.

SLEIMAN, N. H.; DAHER, C.F. 2009. *Malva sylvestris* water extract: A potencial anti inflammatory and anti-ulcerogenic remedy. **57 th International Congress and Annual Meeting of the GA**. August 16-20. Geneva, Switzerland.

SMITH, W. L.; MURPHY, R. C. The eicosanoids: Cyclooxygenase, lipoxygenase, and epoxygenase pathways. **Biochem Lipids, Lipoprot Memb**. v. 5, p. 331-362, 2008.

SOCRANSKY, S. S. R.; HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: Current concepts. **Periodontol**, v. 63, p. 322-331, 1992.

SOMMERFELDT, D. W.; RUBIN, C. T. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. **Eur Spine J**, v. 10, n. 2, p. 86-95, out 2001.

SOUZA, W. **O cultivo de células e seu impacto na medicina**. Jornal da Ciência, Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. 22 fevereiro de 2006. Disponível em < <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detail.jsp?id=35493>> Acesso em: 25 mai 2010.

SUZAWA, T.; MIYAURA, C.; INADA, M.; MARUYAMA, T.; SUGIMOTO, Y.; USHIKUBI, F.; ICHIKAWA, A.; NARUMIYA, S.; SUDA, T. The role of prostaglandin E receptor subtypes (EP1, EP2, EP3, and EP4) in bone resorption: an analysis using specific agonists for the respective EPs. **Endocrinol**, v. 141, n. 4, p. 1554-1559, abr 2000.

TAKABATAKE, M.; HISHINUMA, T.; SUZUKI, N.; CHIBA, S.; TSUKAMOTO, H.; NAKAMURA H.; SAGA, T.; TOMIOKA, Y.; KUROSE, A.; SAWAY, T. MIZUGAKI, M. Simultaneous quantification of prostaglandins in human synovial cell-cultured medium using liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Prostag Leukotr Ess**, v. 67, n. 1, p. 51-56, jul. 2002.

TAKEMIYA, T.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Roles of prostaglandin synthesis in excitotoxic brain diseases. **Neurochem Int**, v. 51, n. 2-4, p. 112-120, jul/set. 2007

TANJI, K.; IMAIZUMI, T.; MATSUMIA, T.; ITAYA, H.; FUJIMOTO, K.; CUI, X.; TOKI, T.; ITO, E.; YOSHIDA, H.; WAKABAYASHI, K.; SATOH, K. Desferrioxamine, an iron chelator, upregulates cyclooxygenase-2 expression and prostaglandin production in a human macrophage cell line. **Bioch Bioph acta**, v. 1530, n. 2-3, p. 227-235, fev. 2001.

TATAKIS, D. N.; KUMAR, P. S. Etiology and Pathogenesis of Periodontal Diseases. **Dent Clin N Am**, v. 49, n. 3, p. 491-516, jul. 2005.

TIPTON, D. A.; LYLE, B.; BABICH, H.; DABBOUS, M. Kh. In vitro cytotoxic and anti-inflammatory effects of myrrh oil on human gingival fibroblasts and epithelial cells. **Toxicol in Vitro**, v. 17, n. 3, p. 301-310, jun. 2003.

TOMODA, M.; GONDA, R.; SHIMIZU, N.; YAMADA, H. Plant mucilages. XLII. Na Anti-complementary mucilage from the leaves of *Malva sylvestris* var. *mauritiana*. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 37, n. 11, p. 3029-3032, nov. 1989.

VITA RODRIGUEZ, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine Growth F R**, v. 21, n. 1, p. 61-65, fev. 2010.

ZHANG, F. H. Effects of Acupuncture at 7-9 am and 3-5 pm on Plasma Thromboxane and Prostaglandin in Patients with Ischemic Cerebrovascular Disease. **J Traditional Chinese Medicine**, v. 30, n. 1, p. 9-12, mar. 2010.

ZHAO, Z.; MOGHADASIAN, M. H. Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. **Food Chemistry**, v. 109, n. 4, p. 691-702, ago. 2008.

WANG, D.; DuBOIS, R. N. Pro-inflammatory prostaglandins and progression of colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 267, n. 2, p. 197-203, ago. 2008.

WATERS Corporation. **Oasis HLB Disks, Care and Use Manual**. Nov, 2008. Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/category/docs/720002816EN%20care%20and%20use%20manual.pdf>>, Acesso em 12 jun 2011.

YANG, P.; FELIX, E.; MADDSEN, T.; FISCHER, S. M.; NEWMAN, R. A. Quantitative high-performance liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometric analysis of 2- and 3-series prostaglandins in cultured tumor cells. **Anal Biochem**, v. 308, n. 1, p. 168-177, set. 2002.

YOUNES, R.; GHORRA, C.; KHALIFE, S.; INGONDJO-TCHEN-CHANGOTADE, S.; YOUSFI, M.; WILLIG, C.; SENNI, K.; GODEAU, G.; NAAMAN, N. Pertinent cell population to characterize periodontal disease. **Tissue Cell**, v. 41, n. 2, p. 141-150, abr 2009.

# **ANEXO 1**

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Sobrenadante de cultivo de sinoviócitos humanos estimulados com LPS.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 10 µL, em coluna C18 (a 40°C), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AcOH (40:60:0,02), eluída a 100 µL/min em modo isocrático. Voltagem do capilar: -3500V; voltagem do cone: -20V a -40V; energias de colisão: 15eV a 25eV; temperatura da fonte: 150°C.	PGE <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> e TXB <sub>2</sub>	Para cada analito foi utilizado um padrão interno deuterado.	TAKABATAKE <i>et al.</i> , 2002.
Cérebro, fígado, plasma e urina de ratos.	Homogeneização em água, centrifugação e aplicação do sobrenadante em cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 5 µL, em coluna C18 (a temperatura ambiente), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AcOH, eluída a 200 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -3500V; voltagem do cone: -35V; energias de colisão: 12eV a 38eV; temperatura da fonte: 120°C.	PGD <sub>1</sub> ; PGE <sub>1</sub> ; PGF <sub>1α</sub> ; 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; PGB <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; PGJ <sub>2</sub> ; Δ <sup>12</sup> -PGJ <sub>2</sub> ; 15-desoxi-Δ <sup>12,14</sup> PGJ <sub>2</sub> ; PGD <sub>3</sub> ; PGE <sub>3</sub> ; PGF <sub>3α</sub> ; TXB <sub>2</sub> ; TXB <sub>3</sub> ; 8- <i>iso</i> -PGE <sub>2</sub> ; 8- <i>iso</i> -15-ceto-PGE <sub>2</sub> ; 8- <i>iso</i> -PGF <sub>2α</sub> ; 8- <i>iso</i> -15-ceto-PGF <sub>2α</sub> ; 13,14-diidro-PGE <sub>1</sub> ; 13,14-diidro-15-ceto-PGE <sub>1</sub> ; 13,14-diidro-PGF <sub>1α</sub> ; 13,14-diidro-15-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; 13,14-diidro-15-ceto-PGE <sub>2</sub> ; 13,14-diidro-PGF <sub>2α</sub> ; 13,14-diidro-15-ceto-PGF <sub>2α</sub>	Foi utilizado somente um padrão interno (PGB <sub>2-d4</sub> ) para todos os analitos.	MASSOUDI; NICOLAOU, 2006.

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Rins de ratos hipertensos.	Homogenização em metanol, centrifugação e aplicação do sobrenadante em cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 20 µL, em coluna C18, com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO, eluída a 1 mL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -3000V; voltagem de fragmentação: 120V; fluxo de nitrogênio: 12 L/min; pressão de nebulização: 35 psi; temperatura do gás: 350°C.	Ácido Araquidônico; 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; 11-desidro-TXB <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; LTB <sub>4</sub> ; LTC <sub>4</sub> ; LTD <sub>4</sub> ; LTE <sub>4</sub> ; 14,15-DiHETE; 11,12-DiHETE; 8,9-DiHETE; 5,6-DiHETE; 20-HETE; 15-HETE; 12-HETE; 9-HETE; 5-HETE; 14,15-EET; 11,12-EET; 8,9-EET; 5,6-EET	Antioxidante BHT foi adicionado em todas as amostras para evitar degradação.	BLEWETT <i>et al.</i> , 2008.
Sobrenadantes de cultivo de células cancerosas de pulmão e de cólon.	Extração líquido-líquido com hexano:acetato de etila (1:1).	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, operando em modo negativo. Injeção de 25 µL, em coluna fenil-hexil (a 50°C), com fase móvel MeOH:Tampão acetato de amônio, eluída a 300 µL/min em modo gradiente. Energia de colisão: 19V.	Ácido Araquidônico; PGE <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; PGE <sub>3</sub> ; PGD <sub>3</sub> ; 13,14-diidro-15-ceto-PGE <sub>2</sub> ; 15-ceto-PGE <sub>2</sub> ; PGF <sub>3α</sub> ; 8-iso-PGF <sub>3α</sub> ; 8-iso-15-ceto-PGF <sub>2α</sub> ; 8-iso-PGE <sub>2</sub>	O processo extrativo foi realizado sob baixas temperatura e intensidade luminosa, evitando foto e termo-oxidação.	YANG <i>et al.</i> , 2002.
Sobrenadante de cultivo de células mesenquimais de medula óssea modificadas geneticamente, estimuladas por citocinas de Linfócitos T.	Passagem por coluna de troca iônica SCX e coluna Kromasil C18 (1 mm x 5 mm, 5µm)	CLC-EM/EM (Cromatografia líquida capilar)	CLC-ESI-IT-EM/EM, operando em modo negativo. Injeção em coluna C18, com fase móvel 30 mM NH <sub>4</sub> FA (A) e ACN/MeOH (B) (95:5), eluída a 5 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -2800V; voltagem do prato: -500V; pressão do gás nebulizador: 15,0 psi; gás de arraste: 6 L/min.	PGA <sub>1</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; PGE <sub>1</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; Δ <sup>15</sup> -PGJ <sub>2</sub>	O método <i>online</i> de preparo de amostra (coluna SCX) permite menor perda de analitos do que métodos <i>offline</i> tradicionais.	RINNE <i>et al.</i> , 2007.



TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Fluído da medula espinhal de ratos (coletado por microdiálise), estimulados com formalina.	Extração líquido-líquido com acetato de etila.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 35 µL, em coluna Phenomenex Synergi Hydro-RP, com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO (A) e MeOH (B), eluída a 0,5 mL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -3400V; energia de colisão: -24V; temperatura da fonte: 550°C.	PGE <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub>	Metanol mostrou-se mais sensível na homogeneização de prostaglandinas do que a acetoneitrila.	SCHMIDT; COSTE; GEISLINGER, 2005.
Sobrenadante de cultivo células epiteliais de pulmão humano e de macrófagos de rato, estimuladas com LPS e IL-β, respectivamente.	Extração líquido-líquido com acetato de etila:hexano (1:1).	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 10 µL, em coluna fenil-hexil, com fase móvel ACN/Tampão Acetato de amônia, eluída a 200 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -4200V; voltagem do cone: -55V; energias de colisão: -22eV; temperatura da fonte: 350°C.	PGE <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub>	PGD <sub>2</sub> apresentou baixa recuperação (77%) em função da sua degradabilidade.	CAO <i>et al.</i> , 2008.
Urina humana de pacientes com câncer de pulmão	Acidificação, transformação em derivado O-metiloxímico e passagem por coluna C-18.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Coluna C18 com fase móvel ACN/AcOH/ Tampão Acetato de amônia, eluída a 7 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -3000V; voltagem do cone: 118V; energias de colisão: -22eV a 10eV; temperatura da fonte: 210°C.	PGE-M	Níveis endógenos do metabólito PGE-M estão relacionados à estados patofisiológicos.	MURPHEY <i>et al.</i> , 2004.

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
PGE <sub>1</sub> e PGA <sub>1</sub> encapsulados em veículo lipídico.	Extração por solvente orgânico (acetato de etila) e passagem por cartuxos de EFS.	CLAE	Cromatógrafo líquido equipado com DAD. Injeção de 100 µL em coluna C18 (60°C), com fase móvel ACN/Tampão fosfato.	PGE <sub>1</sub> e PGA <sub>1</sub>	PGE <sub>1</sub> é muito utilizado em terapia intravenosa com veículos lipídicos para tratamento de doenças vasculares oclusivas.	GLIDDEN; GOLDBERG; HELDEBRANT, 2002.
Sobrenadantes de cultivos de células endoteliais de artéria de coração bovino e de câncer de próstata humano.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo positivo. Injeção de 10 µL, em coluna C18, com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AcOH, eluída a 300 µL/min em modo isocrático. Voltagem de fragmentação: 120V; temperatura da fonte: 325°C; pressão do gás de nebulização: 35 psi.	6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; PGJ <sub>2</sub>	Adicionou-se etanol e ácido acético nas amostras antes da EFS, no sentido de aumentar a recuperação.	NITHIPATIKOM <i>et al.</i> , 2003.
Sobrenadante de cultivo de células endoteliais de veia umbilical humana.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com captura de íons, operando em modo negativo. Injeção de 10 µL, em coluna C18, com fase móvel ACN/AcOH, eluída a 200 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -3710V; pressão do nebulizador: 15 psi; energias de colisão: 0,75 V temperatura da fonte: 320°C.	Ácido Araquidônico; 5,6-EET; 8,9-EET; 11,12-EET; 14,15-EET; 5-HETE; 8-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 15-HETE; 20-HETE.	-	ZELINSKI; BORLAK, 2005.

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Sobrenadante de cultivo de macrófagos de ratos leucêmicos.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo positivo. Injeção de 20 µL, em coluna C18 (40°C), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AcNH <sub>4</sub> <sup>+</sup> , eluída a 230 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: +4300V; energias de colisão: 12eV a 20 eV; temperatura da fonte: 300°C.	PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> , 1(3)-PGE <sub>2</sub> -gliceril-ester, 1(3)-PGF <sub>2</sub> α-gliceril-ester, PGE <sub>2</sub> -gliceril-ester, PGD <sub>2</sub> -gliceril-ester, PGF <sub>2α</sub> -gliceril-ester.	O modo de ionização utilizado foi positivo, com acetato de amônio como aditivo.	KINGSLEY <i>et al.</i> , 2005.
Fluído de lavagem broncoalveolar	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com íon trap, operando em modo negativo. Injeção de , em coluna C18 (40°C), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/MeOH, eluída a 350 µL/min em modo gradiente. Temperatura da fonte: 300°C; energias de colisão 5V; voltagem do capilar: -4000 V;	6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; 20-hidroxi-LTB <sub>4</sub> ; 20-carboxi-LTB <sub>4</sub> ; TXB <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; 11-dehidro-TXB <sub>2</sub> ; LXA <sub>4</sub> ; LTB <sub>5</sub> ; LTD <sub>4</sub> ; LTE <sub>4</sub> ; 20-HETE; 13-HODE; 9-HODE; 15-HETE; 15-KETE; 12-HETE; 5-HETE; 14,15-EET; 11,12-EET; 5-KETE; 8,9-EET; DHA e Ácido araquidônico.	Os picos foram muito melhor resolvidos quando se usou aditivos que acidificaram a fase móvel (0,1% ácido acético).	LUNDSTRÖM <i>et al.</i> , 2009.
Sobrenadante de cultivo celular de macrófagos de rato.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 50 µL, em coluna C18 (46°C), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO, eluída a 120 µL/min em modo gradiente. Temperatura da fonte: 270°C; voltagem do capilar: -3000 V; voltagem das lentes do tubo e energias de colisão foram otimizadas para cada componente.	6-ceto-PGF <sub>1α</sub> ; TXB <sub>2</sub> ; PGF <sub>2α</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; PGD <sub>2</sub> ; LTB <sub>4</sub> ; LTC <sub>4</sub> ; LTD <sub>4</sub> ; 5-HETE; 8-HETE; 11-HETE; 12-HETE; 15-HETE.	Neste estudo também foi detectado PAF (fator de ativação plaquetária) nas amostras.	KITA <i>et al.</i> , 2005.

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Sobrenadante de cultivo celular de macrófagos de rato.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo híbrido QTRAP, operando em modo negativo. Injeção de 30 µL, em coluna C18 (35°C), com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO/Isopropanol, eluída a 300 µL/min em modo gradiente. Temperatura da fonte: 525°C; voltagem do capilar: -4200 V; DP: -30V; EP: 15V; CXP: 10V; energias de colisão: 20 a 45 V.	Mais de 70 eicosanóides e metabólitos de eicosanóides detectados.	Para separar alguns tipos de Dihomoprostaglandinas foi utilizado coluna de cromatografia quiral.	HARKEWICZ <i>et al.</i> , 2006.
Cérebro, fígado e plasma de ratos.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 5 µL, em coluna C18, com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO/MeOH/AcAcético, eluída a 200 µL/min em modo isocrático. Voltagem do capilar: -3500V; Temperatura da fonte: 120°C, Temperatura de dessolvatação: 360°C; voltagem do cone: 35 V; energias de colisão: 15 a 25 eV.	ResolvinaE1; ResolvinaD1; ProtectinaD1; 9-HODE; 13-HODE; 5-HEPE; 18-HEPE; 9-HEPE; 8-HEPE; 15-HEPE; 12-HEPE; 5-HETE; 8-HETE; 11-HETE; 15-HETE; 12-HETE; 9-HETE; LTB <sub>4</sub> ; 17S-HDHA.	Vários lipídeos bioativos avaliados neste estudo têm relevância patofisiológica e podem no futuro ser utilizados como marcadores.	MASOODI <i>et al.</i> , 2008.
Sangue periférico humano	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	EM/EM e CG-EM	ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Eluição da amostra a 4 µL/min. Voltagem do capilar: -4500V; voltagem do cone: 35 V.	AA, PGE <sub>2</sub> , PGD <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub> , PGE <sub>1</sub> , 6-ceto-PGF <sub>1α</sub> , TXB <sub>2</sub> , HxA <sub>3</sub> , 12-HPETE, 12-HETE, 15-HETE, LTB <sub>4</sub> , LTC <sub>4</sub>		MARGALIT; DUFFIN; ISAKSON, 1996

TABELA A.1 – MÉTODOS ANALÍTICOS APLICADOS SOBRE DIFERENTES MATRIZES NA DETECÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS DERIVADOS DE EICOSANÓIDES (*continuação*)

TIPO DE AMOSTRA	PREPARO DA AMOSTRA	MÉTODO UTILIZADO	CONDIÇÕES DE ANÁLISE	COMPOSTOS ANALISADOS	OBSERVAÇÕES	REFERÊNCIAS
Sobrenadante de cultivo de células.	Extração direta de eicosanóides através de cartuchos de EFS.	CLAE-EM/EM	CLAE-ESI-EM/EM, com triplo quadrupolo, operando em modo negativo. Injeção de 50 µL, em coluna C18, com fase móvel ACN/H <sub>2</sub> O/AFO, eluída a 300 µL/min em modo gradiente. Voltagem do capilar: -4500V; voltagem do cone: -15V a -35V; energias de colisão: 10eV; temperatura da fonte: 525°C.	Mais de 60 eicosanóides detectados, incluindo Ácido Araquidônico, HETE's, DiHETE's, LT, TX e PG, dentre outros.	As amostras foram mantidas em temperatura inferior a 4°C até o momento da análise, para minimizar termodegradação.	DEEMS <i>et al.</i> , 2007.
Biópsias de tecido gengival humano de pacientes com periodontite.	Homogeneização do tecido em PBS/MeOH/H <sub>2</sub> O/TFA e centrifugação.	CLAE	Cromatógrafo líquido equipado com DAD. Injeção de 100 µL em coluna C18 (temperatura ambiente), com fase móvel MeOH/ACN/H <sub>2</sub> O/TFA eluída a 0,5 mL/min. LTB <sub>4</sub> : 280 nm; PGE <sub>2</sub> : 220 nm; 12-HETE e 15-HETE: 237 nm.	LTB <sub>4</sub> ; PGE <sub>2</sub> ; 12-HETE; 15-HETE.	O método utilizado não requer extração das amostras.	EBERHARD <i>et al.</i> , 2000.

# **ANEXO 2**