

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DO NEURO PRECURSOR L-DOPA EM FOLHAS DE CAFÉ POR UHPLC-DAD

Giovanna V. Vieira^{1*} (PG), Adelir A. Sackz² (PQ), Antonio Chalfun³ (PQ)

¹Universidade Federal de Lavras, Departamento de Química, Lavras, Minas Gerais, Brazil, 37202-870

²Universidade Federal de Lavras, Setor de Fisiologia Vegetal, Lavras, Minas Gerais, Brazil, 37202-870

*giovanna.vieira3@estudante.ufla.br

RESUMO

A L-dopa é um aminoácido fenólico precursor do neurotransmissor dopamina, que, por sua vez, é responsável principalmente pelas funções motoras e cognitivas no corpo humano. A molécula de L-dopa tem grande importância no tratamento da Doença de Parkinson, uma síndrome neurodegenerativa que afeta justamente a região do cérebro responsável pela síntese do neurotransmissor dopamina. O tratamento da patologia é realizado por meio de fármacos cujo princípio ativo é a L-dopa. Dessa forma, a partir de análises *in silico*, as vias metabólicas das folhas de *Coffea arabica* foram reconstruídas e a partir destas, foi inferida a ocorrência natural da L-dopa como um metabólito na espécie vegetal referida. Portanto, neste trabalho, foi desenvolvida e validada uma metodologia para a extração e identificação da L-dopa em folhas de *Coffea arabica* utilizando a técnica de cromatografia líquida acoplada ao detector de arranjo de diodos (UHPLC-DAD). O estudo foi conduzido realizando-se um planejamento experimental afim de se obter as melhores condições de extração da L-dopa nas folhas de café. A metodologia foi validada em termos de linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão e exatidão. Foi realizada a extensão de escopo para a quantificação de L-dopa em folhas de outras duas espécies de folhas de café, *Coffea eugenioides* e *Coffea canephora*.

Palavras-chave: Coffea arabica, Coffea eugenioides, Coffea canephora, Aminoácido fenólico, Análise traço

Introdução

A doença de Parkinson é uma condição neurodegenerativa crônica caracterizada pela morte de neurônios na substância negra do cérebro, o que leva à diminuição da produção de dopamina, um neurotransmissor essencial para funções motoras, cognitivas e do sono.¹ Seus sintomas incluem tremores, rigidez muscular, distúrbios do sono, demência e psicose, afetando principalmente pessoas acima dos cinquenta anos de idade.²⁻³ O tratamento atual baseia-se na administração de L-dopa, um precursor da dopamina, que é metabolizado no cérebro para aliviar os sintomas causados pela doença.⁴ Recentemente, a presença de L-dopa foi identificada em folhas de café⁵, o que abre novas possibilidades para fontes naturais da substância e aproveitamento de resíduos agrícolas. Nesse contexto, considerando a importância econômica do café no sul de Minas Gerais e o potencial terapêutico da L-dopa, este trabalho propõe uma metodologia para extração e quantificação da L-dopa em folhas de três espécies de cafeeiro, utilizando técnicas analíticas sensíveis como a cromatografia líquida.

Experimental

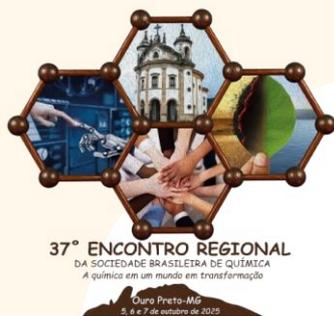
Instrumentação

As análises foram realizadas em um UHPLC-DAD (Agilent, 1290 Infinity) e coluna cromatográfica de fase reversa Luna C18 (Phenomenex) de dimensões 250 mm x 4,60mm x 5µm). O amostrador automático foi mantido a 4°C. A eluição da fase móvel ocorreu no modo gradiente, sendo a fase móvel A composta por solução aquosa de ácido acético 3% e a fase móvel B sendo composta por metanol. O gradiente estabelecido foi: 0 min 5% B; 0-3 min, 10% B; 3-6 min, 15% B; 6-9 min, 30% B;

9-10 min, 35% B; 10-11 min, 30%B; 11-13 min, 15% B; 13-14min, 5% B; 15 min, 5% B. O fluxo otimizado do gradiente foi de 0,5 mL min⁻¹ e o volume de injeção das amostras foi de 20 µL. O comprimento de onda utilizado no detector foi de 280 nm. As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Análises Instrumentais da UFLA.

Preparo da amostra

A metodologia descrita foi uma adaptação de Cherubino Ribeiro, de Oliveira et al. (2023)⁵. As folhas de café foram maceradas com nitrogênio líquido até textura de um pó fino e homogêneo. Em seguida, 0,2g desse material foi pesado e transferido a um tubo falcon de 50mL. Ao tubo foram adicionados 5 mL de uma solução de ácido acético 0,3% (v/v). O tubo foi selado e levado ao shaker com agitação de 240 rpm e temperatura controlada em 20°C por 15 minutos. Em seguida, a amostra foi centrifugada em 13.000 rpm por 10 minutos e 4°C. O sobrenadante obtido foi transferido a outro tubo falcon e mantido em banho de gelo. Ao material vegetal restante foram adicionados mais 5 mL da solução de ácido acético 0,3% (v/v), que novamente submetido a etapa de extração. O sobrenadante final foi agregado ao sobrenadante anterior, formando um *pool*, que foi submetido a filtração com uma membrana de poro de 0,45µm. O conteúdo filtrado foi transferido a um vial de 1,5mL e conduzido a análise por UHPLC-DAD. Foi empregado um planejamento experimental univariado para a avaliação de três parâmetros afim de se obter a maior eficiência na extração. Os parâmetros avaliados foram proporção entre massa seca do material vegetal e volume de solvente, concentração do solvente extrator e tempo de extração.



Resultados e Discussão

A melhor condição para a corrida cromatográfica na análise da L-dopa foi a rampa de gradiente com tempo total de 15 minutos. O tempo médio de retenção verificado para a L-dopa foi de 8 minutos, conforme pode ser visto na Figura 1 (pico cromatográfico destacado).

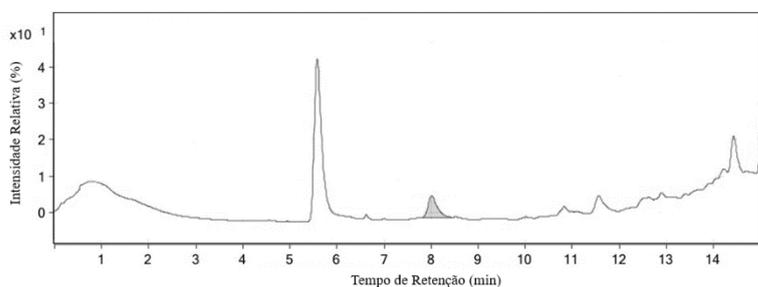


Figura 1. Cromatograma da análise de folhas jovens de *C. arabica*

A Figura 02 mostra o cromatograma com o pico da L-dopa na amostra de folhas de café (*C. arabica*) enriquecido com o padrão afim de se verificar a presença de algum interferente ou efeito matriz das amostras. Pelo cromatograma é possível notar a boa separação entre os picos na análise do tecido vegetal, o que evidencia a seletividade do método proposto.

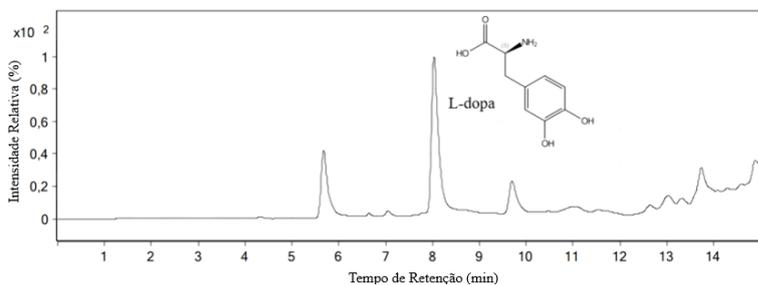


Figura 2. Cromatograma da análise da *C. arabica* fortificada com padrão $11,83 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As condições ótimas de extração consideradas para essa metodologia foram 0,2g de massa de material vegetal para 0,5mL de solvente (proporção 1:25), com a utilização de uma solução de ácido acético 0,3% (v/v) como solvente extrator e 15 minutos de extração, empregando-se também uma extração dupla afim de se obter exaustivamente a espécie química de interesse.

A linearidade do método desenvolvido para a quantificação da L-dopa em folhas de café foi realizado pelo método de superposição de matriz. Para tanto, foi construída uma curva analítica a partir da adição de quantidades conhecidas e crescentes de padrão sobre um pool das amostras de folhas senescentes de *C. arabica*. A curva obtida foi comparada a curva obtida pelo método de calibração externa, com a mesma faixa linear e pontos de concentração. Foi observado uma elevada confluência dos sinais obtidos entre os dois métodos, bem como um coeficiente de correlação (R^2), similares. Portanto, devido a ausência do efeito matriz e para uma maior correspondência para com as amostras reais, a quantificação dos extratos foi realizada pela curva matrizada.

A faixa de trabalho linear utilizada na construção das curvas analíticas foi de $0,19$ a $15,77 \mu\text{g mL}^{-1}$. O coeficiente de correlação,

R^2 , obtido foi de 0,9997, indicando um elevado grau de correlação linear entre as medidas adquiridas. Os valores obtidos para os limites de detecção e de quantificação foram $0,12$ e $0,37 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, estimados pelo s da curva. Para os três níveis de concentração ($0,78$; $1,51$ e $3,94 \mu\text{g mL}^{-1}$) valores recuperados foram, $101,76\%$, $115,53\%$ e $80,25\%$, respectivamente.

Os estudos de linearidade serviram como base para a quantificação da L-dopa em folhas jovens, maduras e de três espécies de café *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora*. Figura 3 reproduz as concentrações médias obtidas pela análise cromatográfica.

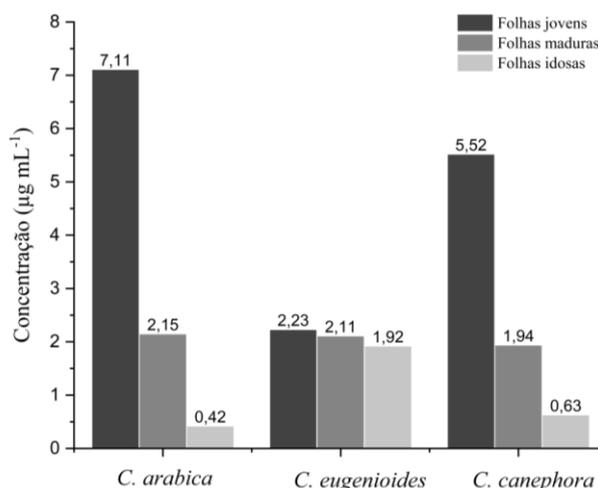


Figura 3. Gráfico ilustrando as concentrações de L-dopa encontradas em folhas de *C. arabica*, *C. eugenioides* e *C. canephora*

Conclusões

A metodologia desenvolvida possibilitou a extração e quantificação da L-dopa em amostras de folhas de café, mesmo se tratando de uma amostra tão complexa. O estudo abre portas para futuras pesquisas acerca da utilização e aplicação da L-dopa extraídas dos tecidos vegetais do cafeeiro, tanto como matéria prima para a fabricação de fármacos, quanto como um possível auxílio na prevenção e ou tratamento de doenças neurodegenerativas, como a Doença de Parkinson.

Agradecimentos

Os autores agradecem ao DQI (UFLA), LabMAI (UFLA), LFMP (UFLA), LCBM (UFLA), CAPES, FAPEMIG, CNPq e FINEP

Referências

- Seiler, J. L., X. Zhuang, A. B. Nelson and T. N. Lerner *Experimental Neurology*. **2024** 374, 114693.
- Schepici, G., Silvestro, S., Bramanti, P., Mazzon, E. *Journal of Molecular Sciences*. **2020**, 21, 4766
- Rajan, S. and B. Kaas. *Seminars in Neurology*. **2022**, 42, 626-638.
- McDonald, C., Gordon, G., Hand, A., Walker, R. W., Fisher, J. M. *Age and Ageing* **2018** 47, 209-214.
- Cherubino Ribeiro, TH; de Oliveira, RR; das Neves, TT; Santiago, WD; Mansur, BL; Saczk, AA; Vilela de Resende, ML; Chalfun-Junior, A. *International Journal of Molecular Sciences*. **2023**, 24, 12466.