UNESP - UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE ARARAQUARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Catecolaminas do aparelho reprodutor de ratos após simpatectomia química: metodologia analítica e comparação entre as variedades Wistar e Sprague-Dawley

DANIELA ALESSANDRA FOSSATO DA SILVA

Tese de Doutorado
2007

Livros Grátis

http://www.livrosgratis.com.br

Milhares de livros grátis para download.

DANIELA ALESSANDRA FOSSATO DA SILVA

Catecolaminas do aparelho reprodutor de ratos após simpatectomia química: metodologia analítica e comparação entre as variedades Wistar e Sprague-Dawley

Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Química, na Área de Concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes

Co-orientadora: Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas

ARARAQUARA
2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva, Daniela Alessandra Fossato da
S586c Catecolaminas do aparelho reprodutor de ratos após simpatectomia química : metodologia analítica e comparação entre as variedades Wistar e Sprague-Dawley / Daniela Alessandra Fossato da Silva. -- Araraquara : [s.n], 2007
152 f. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química
Orientador: Manoel Lima de Menezes
Co-orientador : Wilma De Grava Kempinas

1. Cromatografia líquida de alta eficiência. 2. Química analítica. 3. Tecidos. I. Título.

Elaboração: Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação do Instituto de Química de Araraquara
Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação

CURRICULUM VITAE

DADOS PESSOAIS

Nome	Daniela Alessandra Fossato da Silva
Nascimento	27/04/1974 - Bauru/SP - Brasil
CPF	17027172836
Telefone	(14) 3281 1986 / 8121 5591
e-mail	dfossato@yahoo.com

FORMAÇÃO ACADÊMICA/TITULAÇÃO

2003 - 2007 Doutorado em Química.
Universidade Estadual Paulista Instituto de Química Araraquara, UNESP, Brasil.
Título: Catecolaminas do aparelho reprodutor de ratos após simpatectomia química: metodologia analítica e comparação entre as variedades Wistar e Sprague-Dawley
Orientador: Prof. Dr.Manoel Lima de Menezes
Co-orientador: Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

2000 - 2002 Mestrado em Farmacologia.
Universidade Estadual Paulista Instituto de Biociências Botucatu, UNESP, Brasil.
Título: Simpatectomia química pela guanetidina: estudo de parâmetros farmacológicos e da reversibilidade em parâmetros reprodutivos
Orientador: Prof. Dra. Wilma De Grava Kempinas
Bolsista do (a): Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo

1994 – 1998 Graduação em Ciências Biológicas.
Universidade do Sagrado Coração, USC, Bauru, Brasil.

FORMAÇÃO COMPLEMENTAR

2000 - 2000 Extensão universitária em Desreguladores Endócrinos e Diferenciação Sexual.
Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, UNESP, Sao Paulo, Brasil.

ATUAÇÃO PROFISSIONAL

1995 - 1995 Instituto Lauro de Souza Lima - HOSPITAL
Enquadramento funcional: Estagiária
Carga horária: 20h
Estágio: Rotina em laboratório de Patologia clínica

1997 - 1998 Secretaria Municipal do Meio Ambiente - Bauru - SEMMA
Enquadramento funcional: Estagiária
Carga horária: 40hEstágio: Desenvolvimento de projetos voltados ao meio-ambiente, monitoria como educadora ambiental no Jardim Zoológico municipal e no Núcleo de educação ambiental do núcleo habitacional José Regino, estágio no Viveiro de plantas Municipal.

1999 - 1999 Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho - UNESP
Enquadramento funcional: Estagiária
Carga horária: 40h
Estágio: Estágio de Iniciação Científica no CEATOX, "Centro de Atendimento Toxicológico", des0.0027 4R3zc2 0 0 uquisleo de

ARTIGOS COMPLETOS PUBLICADOS EM PERIÓDICOS

1. SILVA, D. A. F., MESSIAS, A. G., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G., PEREIRA, O. C. M., GERARDIN, D. C. C.
   Impairment of adult male reproductive function in rats exposed to ethanol since puberty. Reproductive Toxicology, v.22, n.4, 2006.

2. SILVA, D. A. F., GODINHO, A. F.
   Neonatal rat exposure to pyrethoid and organophosphate insecticides: a physiological and biochemical trial of progeny. Revista de Ciências Farmacêuticas. Araraquara: v.24, n.2, p.159 - 167, 2003.

TRABALHOS COMPLETOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTO

1. SILVA, D. A. F., KEMPINAS, W. G., MESSIAS, A. G., OLIVA, S. U., PORTO, E. M., FERNANDEZ, C. D. B.
   Aspectos da biologia epididimária do rato após a exposição à cimetidina In: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução, 2003, Ribeirão Preto.

2. SILVA, D. A. F., KEMPINAS, W. G., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., PORTO, E. M., FERNANDEZ, C. D. B.
   Performance reprodutiva de ratos adultos expostos ao Diethylstilbestrol (DES) In: Congresso de Integração em Biologia da Reprodução, 2003, Ribeirão Preto.

TRABALHOS RESUMIDOS PUBLICADOS EM ANAIS DE EVENTO

1. SILVA, D. A. F., MENEZES, M. L., KEMPINAS, W. G, ARENA, A. C., FERNANDES, G. S., FERNANDEZ, C. D. B.
   Desenvolvimento de um método analítico para determinação de noradrenalina e adrenalina no aparelho reprodutor de ratos Wistar empregando HPLC com detecção eletroquímica In: II Simpósio de Cromatografia (SIMCRO), 2006, São Pedro.

2. SILVA, D. A. F., KEMPINAS, W. G., MESSIAS, A. G., OLIVA, S.U.
Aspects of rat epididymal biology after cimetidine exposure In: Congresso de Andrologia, 2003, Phoenix, Arizona.
American Society of Andrology, 2003. v.28.

3. SILVA, D. A. F., KEMPINAS, W. G., PEREIRA, O. C. M., OLIVA, S. U., GERARDIN, D. C. C., MESSIAS, A. G.
Pharmacological reactivity of ducts and glands of rats sympathectomized by guanethidine In: Congresso de Andrologia, 2003, Phoenix, Arizona.
American Society of Andrology, 2003. v.28.

4. SILVA, D. A. F., KEMPINAS, W. G., OLIVA, S. U., PORTO, E. M., FERNANDEZ, C. D. B., MESSIAS, A. G.
Reproductive performance of adult rats exposed to diethylstilbestrol (DES) In: Congresso de Andrologia, 2003, Phoenix, Arizona.
American Society of Andrology, 2003. v.28.

5. SILVA, D. A. F., GERARDIN, D. C. C., PEREIRA, O. C. M., KEMPINAS, W. G.
Desnervação química pela guanetidina: estudo de parâmetros farmacológicos e da reversibilidade de parâmetros reprodutivos In: XXXIV Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Farmacologia Terapêutica Experimental, 2002, Águas de Lindóia - SP.

6. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G., MESSIAS, A. G., FERNANDEZ, C. D. B., PORTO, E. M.
Distúrbios reprodutivos em ratos expostos ao Diethylstil bestrol In: IV Seminário de Iniciação Científica, 2002, Botucatu.

7. SILVA, D. A. F., PEREIRA, O. C. M., GERARDIN, D. C. C., KEMPINAS, W. G.
Simpatectomia química pela guanetidina: estudo de parâmetros farmacológicos e da reversibilidade em parâmetros reprodutivos In: Workshop da Pós-graduação e VI Semana da Bio, 2002, Botucatu.

8. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., KEMPINAS, W. G.
Diferenças na fertilidade de ratos machos das variedades Wistar e Sprague-Dawley após simpatectomia induzida pela guanetidina In: Congresso de integração em Biologia da Reprodução, 2001, Ribeirão Preto-SP.
Congresso de integração em Biologia da Reprodução, 2001. p.68.

9. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G., MESSIAS, A. G.
Eficiência reprodutiva de ratos machos após exposição crônica ao etanol In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001, Caxambú-MG.
Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001. p.233.

10. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G., MESSIAS, A. G.
Fertilidade de ratos expostos cronicamente ao etanol In: XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001, Porto Alegre-RS.
XII Congresso Brasileiro de Toxicologia, 2001. v.14. p.88.

11. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., KEMPINAS, W. G.
Fertilidade de ratos machos das variedades Wistar e Sprague-Dawley simpatectomizados pela guanetidina In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001, Caxambú-MG.
XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia, 2001. p.233.

12. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G.
Fertility of different strains of rats sympathectomized with guanethidine In: VII Congresso internacional de Andrologia, 2001, Montreal.
Journal of Andrology, 2001. v.suppl. p.84.

13. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., KEMPINAS, W. G.
Parâmetros espermáticos de ratos machos expostos cronicamente ao etanol desde a puberdade In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia, 2001, Ribeirão Preto-SP.

14. SILVA, D. A. F., MESSIAS, A. G., OLIVA, S. U., KEMPINAS, W. G.
Parâmetros reprodutivos do rato após exposição crônica à cimetidina In: 4 Encontro Regional de Biomedicina, 2001, Botucatu-SP.
4 Encontro Regional de Biomedicina, 2001. p.12.

15. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., KEMPINAS, W. G.
Performance sexual do rato após tratamento crônico com cimetidina In: XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001, Caxambú-MG.
XVI Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental - FeSBE, 2001. p.450.

16. SILVA, D. A. F., OLIVA, S. U., MESSIAS, A. G., KEMPINAS, W. G.
Reproductive toxicology of ethanol in male rats In: VII Congresso internacional de Andrologia, 2001, Canadá.
Journal of Andrology, 2001. v.suppl. p.177.

17. SILVA, D. A. F., TROMBINE, T. V., GODINHO, A. F.
Avaliação do desenvolvimento geral e da atividade neurocomportamental da prole juvenil de ratas expostas ao inseticida ectoplus In: XI Congresso Latino Americano de Toxicologia ALATOX, 2000, Campinas-SP.
Revista Brasileira de Toxicologia, 2000. v.13. p.66.

OUTRAS PRODUÇÕES TÉCNICAS

1. SILVA, D. A. F.
Exame geral de Qualificação intitulado: Otimização de um método analítico para determinação de catecolaminas do aparelho reprodutor de ratos Wistar e Sprague-Dawley simpatectomizados pela guanetidina, empregando HPLC, junto ao programa de Pós-graduação em Química, Área de concentração: Química Analítica, 2006.

2. SILVA, D. A. F.
   Regência do Seminário: Catecolaminas e métodos para sua identificação e quantificação em tecidos e fluídos biológicos, junto ao programa de Pós-graduação em Química, Área de concentração: Química Analítica, 2005.

3. SILVA, D. A. F.
   Exame geral de Qualificação intitulado: Histamina e anti-histamínicos, junto ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Farmacologia, 2002.

4. SILVA, D. A. F.
   Monitoria na disciplina: Métodos Experimentais para a Detecção de alterações nos Aparelhos reprodutores masculino e feminino, junto ao programa de pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Farmacologia, 2001.

5. SILVA, D. A. F.
   Regência da palestra: Fertilidade de ratos simpatectomizados pela guanetidina antes e após período de recuperação da inervação, junto ao programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas, Área de concentração: Farmacologia, 2001.

6. SILVA, D. A. F., GODINHO, A. F.
   Regência da palestra:Toxicidade Neonatal por metais pesados e pesticidas, junto a II Jornada Farmacêutica, realizada na Universidade do Sagrado Coração, 2000.

7. SILVA, D. A. F.
   Monitoria na área de Educação Ambiental, desenvolvendo curso intitulado: Despertando para o meio ambiente, junto à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Bauru, 1996.

8. SILVA, D. A. F.
   Monitoria na área de Educação Ambiental, desenvolvendo curso intitulado: Discutindo Bauru, junto à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Bauru, 1996.

9. SILVA, D. A. F.

Monitoria na área de Educação Ambiental, desenvolvendo curso intitulado: Monitorando nossas águas, junto à Secretaria Municipal do Meio Ambiente de Bauru, 1996.

À Deus,

que me fortalece e me faz acreditar que posso seguir em frente, sempre!

“Teus esforços são indispensáveis, mas o apoio de Deus é imprescindível”.

“Brindo à casa
Brindo à vida
Meus amores
Minha família...
...Essa é a luz que eu preciso
Luz que ilumina a cria e nos dá juízo... ”

(Mar de gente – O Rappa)

“Dedico esta tese às pessoas mais importantes e especiais da minha vida: Valdinéia e Gerson, meus pais; Luciana, minha irmã; Fabrício (in memorian), meu irmão; Aparecida, minha avó; Cauã, meu sobrinho.”

Ao Prof. Dr. Manoel Lima de Menezes,

pela orientação, apoio e dedicação a este trabalho, pelo carinho e amizade.

A Profa. Dra. Wilma De Grava Kempinas,

por mais uma vez acompanhar o meu trabalho, me orientando e apoiando sempre, e pela sua grande amizade.

Aos animais,

“Aqueles animais que com os olhos humildes
me falaram de sua vontade de viver,
aqueles animais, vítimas solicitadas pela ciência
para o benefício da humanidade,
o meu respeito e eterna gratidão”.

Agradecimentos

Às amigas e companheiras de trabalho do "Laboratório de Cromatografia Líquida" em Bauru, Profa. Dra. Eliane Maria Ravasi Stéfano Simionato, Profa. Dra. Márcia Aparecida Zeferino e Profa. Dra. Eliane Aparecida Toledo Pinto, pelo carinho e contribuição para a realização deste trabalho.

À grande amiga e companheira Carina Momesso pelo carinho e apoio, e por todo o tempo de convivência em Bauru.

Ao meu primo Márcio Henrique Andrade pela formatação e impressão desta tese, bem como pela sua dedicação e carinho.

À minha prima Aline Capasso e sua família pelo apoio e carinho dispensados.

Ao amigo Gustavo Takeda, pela contribuição neste trabalho.

À amiga do coração Renata Bircol, pelo carinho e apoio dispensados sempre.

A secretária do Departamento de Química da Faculdade de Ciências da Unesp de Bauru,

Viviane Fernandez Repullio, pela sua atenção e dedicação.

Ao amigo Antônio Carlos Feitoza pelo auxílio prestado a este trabalho.

A todos os funcionários do Centro de Referência em Saúde do Trabalhador, da Prefeitura Municipal de Bauru, especialmente à Letícia e Marcos, que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Ao "Laboratório de Catálise e Eletrocatálise" da Unesp de Bauru, em nome da Profa. Dra. Margarida Juri Saeki.

Aos meus mais novos amigos do "Laboratório de Catálise e Eletrocatálise" da Unesp de Bauru, Thiago, Sidney, Rafael e Daniele, pelo apoio, carinho e atenção.

À Universidade do Sagrado Coração – Bauru, em nome de Sérgio Henrique Pereira Moura.

Às amigas e companheiras de trabalho do "Laboratório de Biologia da Reprodução" da Unesp de Botucatu, Arielle Cristina Arena, Carla Dal Bianco Fernandez e Glaura Scantamburlo Fernandes, pela dedicação e auxílio dispensados para a realização deste trabalho.

Às amigas e companheiras do "Laboratório de Biologia da Reprodução" da Unesp de Botucatu, Elaine, Marina, Juliana, Ana Paula, Raquel, Fabíola, Tayane, Cibele, e ao amigo Davi, pelo auxílio dispensado para a realização deste trabalho.

Ao técnico do "Laboratório de Biologia da Reprodução" da Unesp de Botucatu, José Eduardo.

À amiga Juliana Simon e sua família, pelo carinho e apoio em Botucatu.

Ao eterno amigo Prof. Dr. Antônio Francisco Godinho, do Centro de Assistência Toxicológica (CEATOX), da Unesp de Botucatu.

À Profa. Dra. Maria Lúcia Ribeiro do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, pela valiosa colaboração no Exame Geral de qualificação.
À grande amiga Mara Gotardo, pelo carinho e apoio em Araraquara.
À Seção de Pós-graduação do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, em nome de Sandra, Célia e Patrícia, por toda a atenção e dedicação durante todos esses anos.

À Biblioteca do Instituto de Química da Unesp de Araraquara, em nome de Camila e Cidinha, pela revisão das referências bibliográficas e confecção da ficha catalográfica, respectivamente.

À FAPESP - Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela bolsa concedida.

“Através de ti mesmo
a lei de Deus se exprime.
Por teus gestos e ações,
a vida te responde.
A própria natureza
é o grande exemplo disso.
O fruto que consomes
surge através das plantas.
Pela bênção da flor
o perfume aparece.
Recorda: o que tivermos
chega através de nós”.

(Francisco Cândido Xavier – Emmanuel)

RESUMO

O tratamento com baixas doses de guanetidina provoca desnervação seletiva em órgãos sexuais acessórios de ratos Wistar e Sprague-Dawley, devido à depleção da noradrenalina nas terminações nervosas autonômicas simpáticas. O modelo experimental proposto possui semelhanças com casos de homens acometidos por lesão na medula espinhal. O objetivo deste trabalho foi investigar as concentrações de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley, após simpatectomia química por guanetidina e período de suspensão do tratamento, através do desenvolvimento e validação de um método analítico para a determinação simultânea de noradrenalina e adrenalina, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquími

significativa nos níveis de noradrenalina na vesícula seminal e de adrenalina na cauda do epidídimo dos ratos Wistar tratados com 10mg/kg de guanetidina, durante 30 dias. Nos ratos Sprague-Dawley, tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias, houve diminuição de noradrenalina nos três órgãos avaliados, embora a diferença tenha sido significativa apenas para o ducto deferente. As concentrações de noradrenalina no ducto deferente dos ratos Sprague-Dawley foram menores quando comparadas aos valores obtidos em ratos Wistar, após tratamento com guanetidina. A comparação entre ratos controles mostrou que a variedade Sprague-Dawley possui menor quantidade de noradrenalina. Após o período de suspensão do tratamento por 90 dias pôde-se constatar a reversão dos efeitos da guanetidina sobre o peso dos órgãos reprodutores tanto em ratos Wistar quanto em Sprague-Dawley, e sobre a concentração de noradrenalina na vesícula seminal dos ratos Wistar, embora as concentrações de noradrenalina no ducto deferente, na variedade Sprague-Dawley, e de adrenalina na cauda do epidídimo dos ratos Wistar, permanecessem reduzidas. Concluiu-se que a administração de guanetidina foi efetiva em promover a simpatectomia química seletiva dos órgãos reprodutores de ratos, o que ficou evidenciado pelo aumento dos pesos da cauda do epidídimo e vesícula seminal e pela diminuição das concentrações de noradrenalina na vesícula seminal dos ratos Wistar e no ducto deferente dos ratos Sprague-Dawley. A variedade Sprague-Dawley mostrou-se mais sensível aos efeitos da simpatectomia química que a variedade Wistar, e isso se explica, pelo menos em parte, à menor concentração de noradrenalina nos ratos da primeira variedade, o que também poderia explicar a ocorrência de desnervação mais rapidamente e com dose menor de guanetidina. A suspensão do tratamento por 90 dias foi efetiva em recuperar, comparativamente ao grupo controle, o peso de órgãos reprodutores nas duas variedades de ratos e a concentração de noradrenalina na vesícula seminal da variedade Wistar, mas não foi suficiente para reverter, a valores normais, as concentrações de noradrenalina no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley.

Palavras-chaves: catecolaminas, tecido, CLAE, guanetidina, simpatectomia química.

ABSTRACT

The treatment with low doses of guanethidine provokes selective denervation in accessory sexual organs of Wistar and Sprague-Dawley rats due to depletion of noradrenaline in the autonomic sympathetic nervous termination. The experimental model proposed has similarities with cases of men with spinal cord injury. The objective of this work was to investigate in the concentrations of catecholamines in reproductive organs of Wistar and Sprague-Dawley rats, after chemical sympathectomy with guanethidine and a period of suspension of the treatment, through the development and validation of an analytical method for the simultaneous determination of noradrenaline and adrenaline, by High Performance Liquid Chromatography with electrochemical detection. The samples were obtained from male rats of the varieties Wistar and Sprague-Dawley, control and those submitted to a treatment (intraperitonially) with guanethidine sulfate, at the doses of 10mg/kg, for 30 days and 6.25mg/kg for 21 days, respectively. Percloric acid 0.4 mol L^{-1} was used in the procedure of catecholamine extraction. Next, the following steps were performed: evaluation of the extraction time, assays of recovery (using the standard addition calibration method) and determination of noradrenaline and adrenaline in real samples. The best noradrenaline extraction yield was at 90 minutes for the cauda epididymis and 60 minutes for the vas deferens. The extraction was kept constant starting at 30 minutes for adrenaline in both tissue samples. The use of percloric acid 0.4 mol L^{-1} and the chromatographic method with eletrochemical detection allowed a good extraction and quantification. The extraction of the analyte resulted in recovery values between 56% and 114%, and coefficient of variation between 3.8% and 23%. The quantification limit of the method was between 0.008 and 0.030ng/mg for noradrenaline, and 0.009 and 0.051ng/mg for adrenaline. The analytical method was validated and applied to the real samples of the two varieties of rats, allowing the determination of low concentrations of the catecholamines studied, especially noradrenaline, that significantly diminishes after chemical denervation of reproductive organs. Chronic exposure to guanethidine at the doses of 6.25mg/kg (Sprague-Dawley rats) and 10mg/kg (Wistar rats) caused an increase in the weights of seminal vesicle and cauda epididymis. There was a reduction in noradrenaline levels in seminal vesicle and adrenaline in the cauda epididymis of

Wistar rats treated with 10mg/kg of guanethidine sulfate, for 30 days. In Sprague-Dawley rats, treated with 6.25 mg/kg for 21 days, there was a reduction of noradrenaline in the three organs evaluated, but the difference was significant only for the vas deferens. The noradrenaline concentrations in the vas deferens of Sprague-Dawley rats were lower than those in Wistar rats, after treatment with guanethidine. The comparison between control rats showed that Sprague-Dawley variety has less noradrenaline than the Wistar variety. After the period of suspension of the treatment for 90 days there was a reversal of the effect of guanethidine on the weight of the reproductive organs both in Wistar and Sprague-Dawley rats, and in the concentration of noradrenaline in seminal vesicle of the Wistar rats, although the concentration of noradrenaline in the vas deferens of the variety Sprague-Dawley, and adrenaline in the cauda epididymis of Wistar rats remained reduced. It was concluded that the guanethidine sulfate administration was effective in promoting selective chemical sympathectomy of reproductive organs of rats, as shown by the increase of cauda epididymis and seminal vesicle weights and by the reduction of the concentration of noradrenaline in the seminal vesicle of Wistar rats and in the vas deferens of the Sprague-Dawley rats. The Sprague-Dawley variety was found to be more sensitive to the effects of the chemical sympathectomy than the Wistar variety, and this can be explained, at least in part, by the lower concentration of noradrenaline in the rats of the first variety, which also could explain the occurrence of denervation sooner and with a smaller dose of guanethidine sulfate. The suspension of the treatment for 90 days was effective in recovering, compared to the control group, reproductive organ weights in the two varieties of rats and the concentration of noradrenaline in seminal vesicle of the Wistar variety, but was not enough to revert the concentrations of noradrenaline in the vas deferens of Sprague-Dawley rats to normal values.

Key-words: catecholamines, tissue, HPLC, guanethidine, chemical sympathectomy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diagrama de um neurônio **32**

Figura 2. Direção do impulso nervoso no neurônio **33**

Figura 3. Neurônios com vesículas contendo grânulos de neurotransmissor **34**

Figura 4. Formação e propagação do impulso nervoso **35**

Figura 5. Estrutura química da acetilcolina **35**

Figura 6. Estrutura química da noradrenalina e adrenalina **36**

Figura 7. Estrutura química da dopamina **36**

Figura 8. Estrutura química da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT) **37**

Figura 9. Estrutura química das principais catecolaminas **38**

Figura 10. Biossíntese das catecolaminas **40**

Figura 11. Metabolismo da noradrenalina e adrenalina **41**

Figura 12. Mecanismo de ação da guanetidina. Em A: Efeitos imediatos da guanetidina sobre a terminação nervosa noradrenérgica. Em B: Efeitos após a administração em longo prazo. GUA: guanetidina, NA: noradrenalina, MAO: enzima monoamina oxidase **43**

Figura 13. Órgãos do sistema reprodutor masculino **46**

Figura 14. Mecanismo cromatográfico das fases RAM, P: proteínas; FH: fase hidrofóbica **50**

Figura 15. Classificação das fases RAM. *Topoquímica: mecanismo de adsorção **53**

Figura 16. Partícula de fase estacionária ISRP (PINKERTON, 1991) **60**

Figura 17. Etapas do preparo da coluna ISRP-C_{18} – HSA **68**

Figura 18. Estabilização da camada de HSA imobilizada em fases hidrofóbicas; (1) intercruzamento da HSA com glutaraldeído; (2) redução de grupamentos aldeídos residuais (a) e das bases de Schiff (b) com borohidreto de sódio **68**

Figura 19. Administração de guanetidina em rato Wistar **73**

Figura 20. Órgãos reprodutores de ratos wistar. Epidídimo (1), ducto deferente (2) e vesícula seminal (3) **74**

Figura 21. Esquema do sistema utilizado para a determinação das catecolaminas em cauda de epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de rato, empregando a válvula FCV – 12AH e as bombas A e B **76**

Figura 22. Cromatograma de solução padrão (1,0μg mL^{-1}) **81**

Figura 23. Cromatograma de solução padrão (1,0μg mL^{-1}) **83**

Figura 24. Voltamograma obtido para a noradrenalina após estudo de vários potenciais empregando detector eletroquímico **84**

Figura 25. Voltamograma obtido para a adrenalina após estudo de vários potenciais empregando detector eletroquímico..... **84**

Figura 26. Curva analítica para a noradrenalina **86**

Figura 27. Curva analítica para a adrenalina **86**

Figura 28. Cromatograma obtido com amostra testemunha de cauda de epidídimo..... **89**

Figura 29. Cromatograma obtido com amostra fortificada de cauda de epidídimo adicionada dos padrões (0,5μg L^{-1}) **89**

Figura 30. Curva analítica para a noradrenalina **91**

Figura 31. Curva analítica para a adrenalina **91**

Figura 32. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de cauda de epidídimo de rato Wistar tratados com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 0,5μg L^{-1}..... **98**

Figura 33. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de ducto deferente de rato Wistar tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 0,5μg L^{-1}..... **98**

Figura 34. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de vesícula seminal de rato Wistar tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0μg L^{-1} **99**

Figura 35. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de cauda de epidídimo de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0μg L^{-1} **99**

Figura 36. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de ducto deferente de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0μg L^{-1} **100**

Figura 37. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de vesícula seminal de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0μg L^{-1} **100**

Figura 38. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **108**

Figura 39. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5) **109**

Figura 40. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *p < 0,05 (n = 5)..... **110**

Figura 41. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *p < 0,05 (n = 5)..... **111**

Figura 42. Concentração de adrenalina no ducto deferente de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **112**

Figura 43. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **113**

Figura 44. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **114**

Figura 45. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *p < 0,05 (n = 5) **115**

Figura 46. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **116**

Figura 47. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5)..... **117**

Figura 48. Concentração de adrenalina no ducto deferente de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5) **118**

Figura 49. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5) **119**

Figura 50. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5). **123**

Figura 51. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg, de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5) **123**

Figura 52. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5). **124**

Figura 53. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley do grupo controle. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5) **124**

Figura 54. Concentração de adrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5) **125**

Figura 55. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5) **125**

Figura 56. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5) **126**

Figura 57. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5) **126**

Figura 58. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5) **127**

Figura 59. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5)..... **127**

Figura 60. Concentração de adrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5)..... **128**

Figura 61. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5)..... **128**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação das fases RAM desenvolvidas **53**

Tabela 2. Características da sílica **56**

Tabela 3. Tempo de retenção (TR), Número de pratos (N), Fator de capacidade (k) e Assimetria de pico ($As_{0,1}$) da noradrenalina e adrenalina empregando a coluna cromatográfica ISRP – C_{18}..... **80**

Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina. **85**

Tabela 5. Avaliação do tempo de extração da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) em uma amostra de cauda do epidídimo (CE) e uma amostra de ducto deferente (DD) de rato Wistar..... **88**

Tabela 6. Peso da cauda do epidídimo (CE) e ducto deferente (DD) de rato Wistar e volume de ácido perclórico 0,4 mol L adicionado..... **88**

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina. **90**

Tabela 8. Limite de quantificação para a noradrenalina e adrenalina nas amostras de tecidos de órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley..... **92**

Tabela 9. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) na cauda do epidídimo (CE) de ratos Wistar..... **95**

Tabela 10. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) no ducto deferente (DD) de ratos Wistar..... **96**

Tabela 11. Peso dos órgãos reprodutores dos animais Wistar dos grupos controle e tratados com 10 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 30 dias. **104**

Tabela 12. Peso dos órgãos reprodutores dos animais Wistar dos grupos controle e tratados com 10 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 30 dias, que permaneceram 90 dias em recuperação após a suspensão do tratamento. **104**

Tabela 13. Peso dos órgãos reprodutores dos animais Sprague-Dawley dos grupos controle e tratados com 6,25 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 21 dias. **105**

Tabela 14. Peso dos órgãos reprodutores dos animais Sprague-Dawley dos grupos controle e tratados com 6,25 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 21 dias, que permaneceram 90 dias em recuperação após a suspensão do tratamento. **105**

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP – Adenosina trifosfato
Ach - Acetilcolina
5-HT – Serotonina (5-hidroxitriptamina)
GABA – Ácido Gamaaminobutírico
DOPA – Dopa-3,4-diidroxifenilalanina
MAO – Monoaminaoxidase
COMT – Catecol-o-metiltransferase
LC/MS – Cromatografia Líquida com Espectrofotômetro de Massa
C_8 – n-octil
C_{18} – n-octadecil
-NH2 - Amino
-CN - Ciano
RAM – Restricted-Access Media
SPE – Solid-phase extraction
LLE – Liquid-liquid extraction
ISRP – Internal Surface Reverse Phase
ADS – Alkyl-Diol Sílica
SPS – Semi-Permeable Surface
MMP – Mixed-Function Phases
MFP – Mixed-Mode Phases
SHP – Shielded Hydrophobic Phases
CV – Coeficiente de variação
LD – Limite de detecção
LQ – Limite de quantificação
EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético
UV – Ultravioleta
HSA – Albumina do soro humano
HPLC/ECD – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detecção Eletroquímica
BSA – Albumina do soro bovino
AGP - α-1-glicoproteína
GUA – Guanetidina
P – Proteína
FH – Fase hidrofóbica
FM – Fase móvel
NA – Noradrenalina
ADR – Adrenalina
CE – Cauda do epidídimo
DD – Ducto deferente
i.p. - Intraperitonial
SNA – Sistema nervoso autônomo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **31**

1.1 Considerações sobre o sistema nervoso **32**
1.2 Neurotransmissores **35**
1.3 Catecolaminas **38**
1.4 Considerações sobre a guanetidina **42**
1.5 Ductos e glândulas do aparelho reprodutor masculino **44**
1.5.1 Epidídimo **44**
1.5.2 Ducto deferente **44**
1.5.3 Glândulasacessórias **45**
1.5.3.1 Vesícula seminal **45**
1.6 Efeitos da guanetidina no controle nervoso autônomo do aparelho reprodutor masculino **47**
1.7 Considerações gerais sobre cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) **49**
1.8 Desenvolvimento de diferentes colunas cromatográficas empregadas na extração “on line”, para determinações de analitos por HPLC em matrizes complexas **48**
1.9 Sílica gel **56**
1.10 Aplicações da coluna cromatográfica ISRP (Superfície Interna de Fase Reversa) em determinações de analitos por HPLC em matrizes complexas **58**
1.11 Análise de amostras biológicas por HPLC **60**
1.12 Considerações sobre análise de catecolaminas em amostras biológicas por HPLC com detecção eletroquímica **61**
1.12.1 Sistemas de detecção - detector eletroquímico **62**

2 OBJETIVO **63**

2.1. Objetivo Geral **64**
2.2 Objetivos Específicos **64**

3 MATERIAL E MÉTODOS **65**

A- Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação simultânea de noradrenalina e adrenalina em amostras biológicas **66**
A 1- Droga, padrões, reagentes e solventes **66**
A 2- Coluna cromatográfica **66**
A 3- Equipamentos eletrônicos **67**
A 4- Preparo das soluções padrão **67**
A 5- Preparo da coluna ISRP C_{18} – HSA **67**
A 6- Avaliação da coluna cromatográfica após a imobilização da proteína albumina do soro humano (HSA) **69**
A 7- Otimização das condições cromatográficas **69**
A 8 - Otimização da fase móvel **70**
A 9 - Otimização do potencial eletroquímico **70**
A 10 - Determinação da linearidade de resposta do detector **70**
A 11 - Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do sistema analítico utilizado **71**

B- Avaliação da concentração de noradrenalina e adrenalina em órgãos reprodutores masculinos de ratos após simpatectomia química por guanetidina e suspensão do tratamento **71**
B 1- Tratamento dos animais e coleta dos órgãos reprodutores **71**
B 2- Tratamento das amostras de tecido **75**
B 3- Avaliação do método **77**
B 4- Amostra real **78**
C- Análise estatística **78**

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO **79**

A- Desenvolvimento, validação e aplicação do método **80**
A 1- Avaliação dos parâmetros cromatográficos após imobilização da proteína albumina do soro humano (HSA) **80**
A 2- Otimização da fase móvel **82**
A 3- Otimização do potencial eletroquímico **83**
A 4- Linearidade de resposta do detector e determinação do limite de detecção e limite de quantificação do sistema analítico utilizado **85**
A 5- Tratamento das amostras **87**
A 6- Validação do método **89**
A 6.1- Seletividade **89**
A 6.2- Linearidade do método **90**
A 6.3- Determinação do limite de quantificação do método **92**
A 6.4- Estudo de recuperação **93**
A 7- Amostra real **97**
A 8- Comparação do método analítico desenvolvido com outras técnicas analíticas empregando HPLC para a determinação de noradrenalina e adrenalina em tecidos biológicos **101**
B- Efeitos da simpatectomia química por guanetidina sobre os órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley **103**
B1- Peso dos órgãos reprodutores **104**
B2- Concentração de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores **107**
B3- Comparação das concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley **122**
B3.1- Concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos tratados com guanetidina **123**
B3.2- Concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos controles **126**
B4- Aplicabilidade do estudo com guanetidina e sua relação com o significado clínico da inervação autonômica no aparelho reprodutor masculino **130**

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS **132**

REFERÊNCIAS **135**

ANEXO

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre o sistema nervoso

O sistema nervoso, juntamente com o sistema endócrino, possui a função de perceber as variações do meio (externo e interno), difundir as modificações que essas variações produzem e executar as respostas adequadas para a manutenção do equilíbrio interno do corpo (homeostase). É responsável pela coordenação e regulação das funções corporais. As células que comandam essas funções são os neurônios (Figura 1). O modo de transmissão entre os neurônios é carreado por neurotransmissores, que são substâncias químicas neuroativas liberadas no lado pré-sináptico da junção entre dois neurônios. A este evento denominamos sinapse.

A sinapse é o ponto de contato entre um neurônio e outro, sendo um local próprio para a transmissão de sinais. Na sinapse, um neurônio (o pré-sináptico) libera neurotransmissores, que "viajam" pelo meio intercelular, até os receptores sinápticos do neurônio seguinte (o pós-sináptico), desencadeando um potencial de ação no segundo neurônio (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

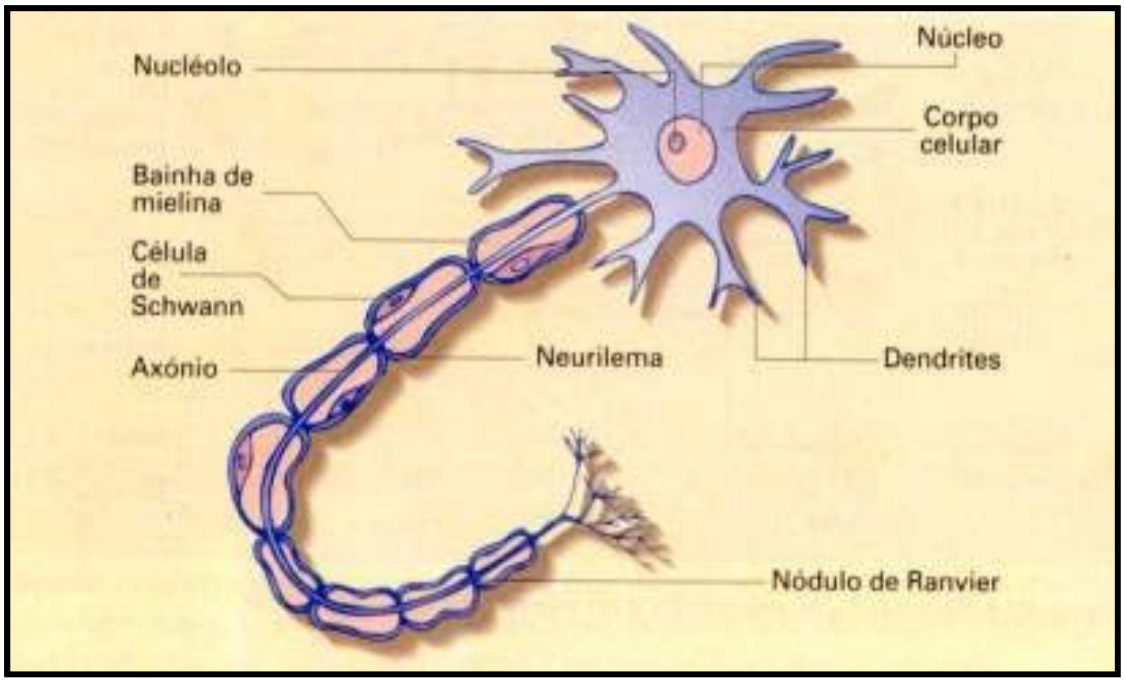


Figura 1. Diagrama de um neurônio. Fonte: www.guia.heu.nom.br/neurônios.htlm

Os receptores são, na verdade, proteínas situadas na membrana celular do neurônio, que interagem com o neurotransmissor, provocando uma alteração conformacional em algumas regiões da membrana (como canais de sódio ou cloro). Isto produz uma polarização ou despolarização da membrana celular deste neurônio, que é o impulso elétrico gerado por uma sinapse química (BRUNTON et al., 2007). A Figura 2 ilustra a direção do impulso nervoso em um neurônio.

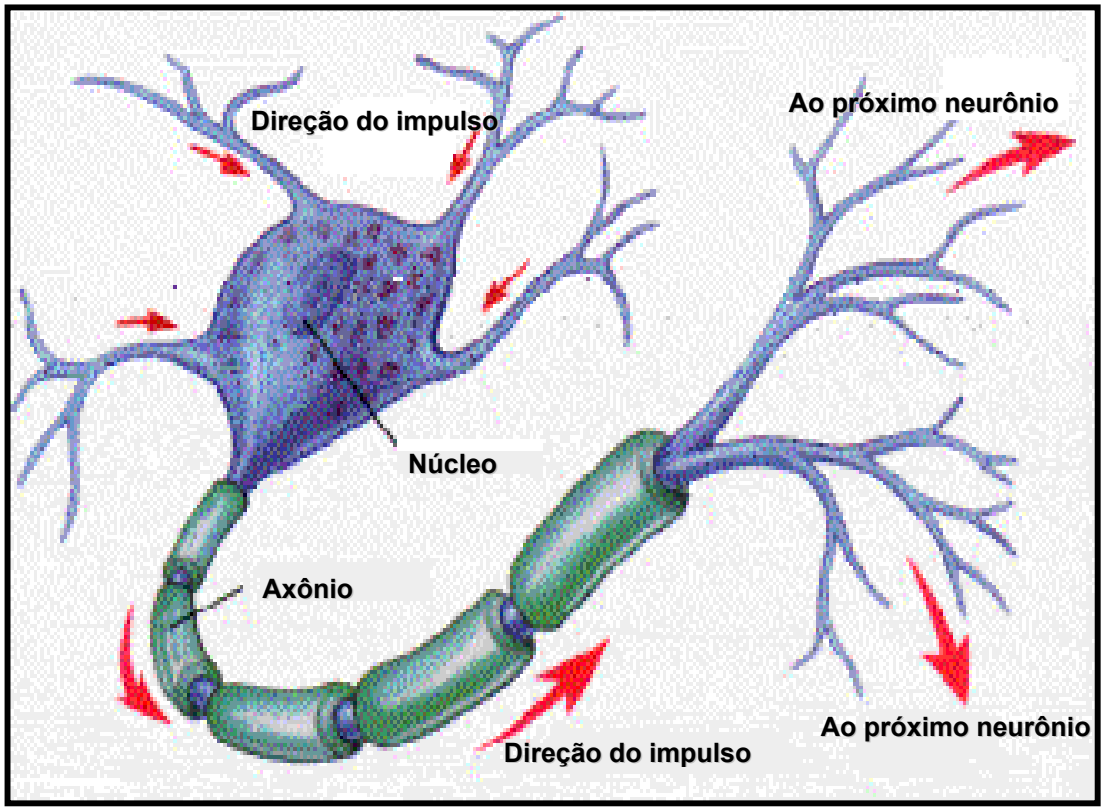


Figura 2. Direção do impulso nervoso no neurônio.
Fonte: www.guia.heu.nom.br/neurônios.htlm.

A fenda sináptica tem, em geral, cerca de 250 nm. Os terminais pré-sinápticos são regiões do neurônio ricas em duas estruturas internas importantes: as mitocôndrias e as vesículas sinápticas (Figura 3). As vesículas são pequenas "bolsas" que carregam os neurotransmissores. Um estímulo químico ou elétrico pode causar a migração das vesículas para a membrana e conseqüente liberação dos neurotransmissores na fenda sináptica.

O transmissor tem que ser sintetizado com extrema rapidez, porque a quantidade armazenada pelas vesículas só é suficiente para durar alguns minutos. A produção de neurotransmissores a partir de seus precursores torna-se possível pela

presença de enzimas específicas, a custa de um dispêndio de energia, fornecida pelo ATP. Daí a importância das mitocôndrias, responsáveis pela produção do ATP.

Uma vez na fenda sináptica, as moléculas do neurotransmissor têm acesso aos sítios receptores, situados em moléculas da membrana pós-sináptica e também da pré-sináptica. Tais sítios têm uma estrutura molecular particular que permite reconhecer a molécula do transmissor, assim como uma fechadura reconhece sua chave (o modelo é chamado de "lock and key").

A combinação do neurotransmissor com receptores da membrana pós-sináptica produz uma alteração na configuração espacial ou deformação do receptor. Essa alteração conformacional faz com que o receptor abra canais iônicos específicos, modificando rapidamente a polaridade elétrica da membrana; alternativamente, ativam enzimas formadoras de mensageiros químicos no citoplasma do neurônio pós-sináptico, que por sua vez provocam alterações mais lentas e persistentes das propriedades elétricas da membrana neuronal ou, ainda, modificam a velocidade de reações químicas no citoplasma desse neurônio, alterando o seu funcionamento (BRUNTON et al., 2007).

A Figura 4 ilustra a formação e propagação do impulso nervoso.

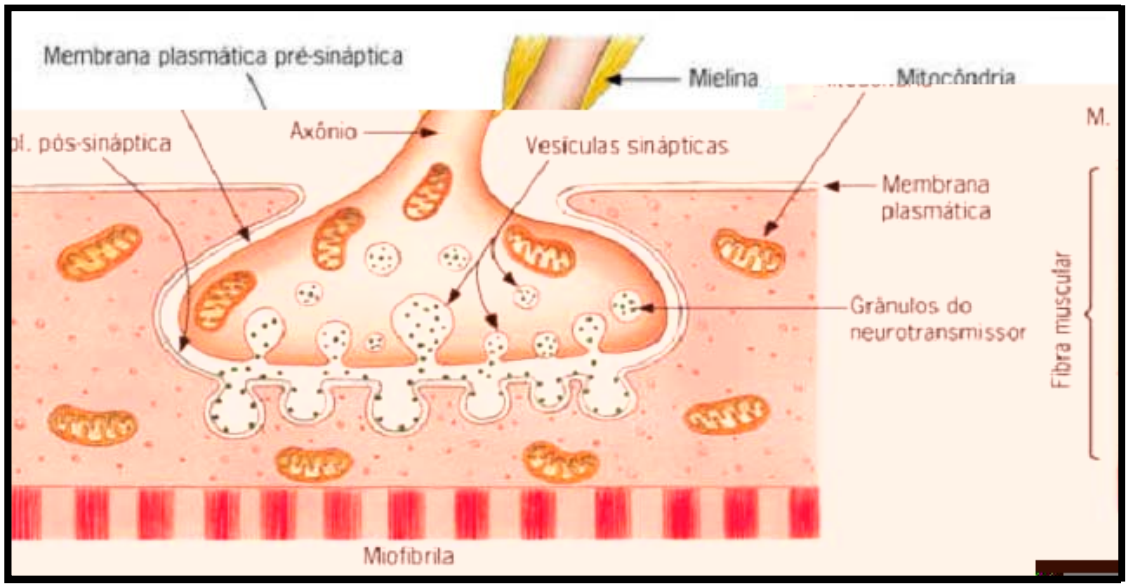


Figura 3. Neurônios com vesículas contendo grânulos de neurotransmissor. Fonte: www. giovannichetta.it/sistema nervoso.htlm

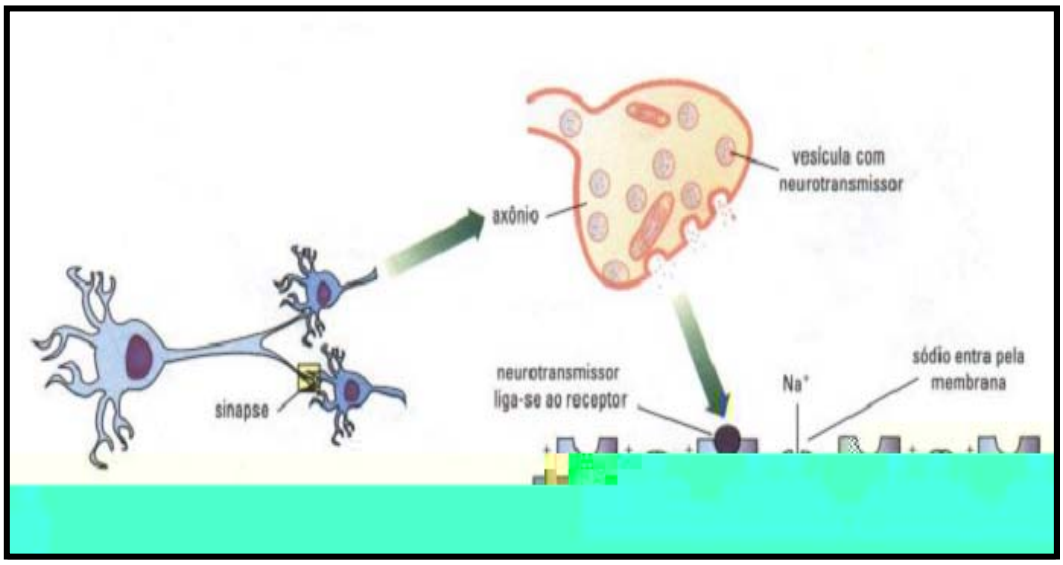


Figura 4. Formação e propagação do impulso nervoso. Fonte: www. giovannichetta.it/sistema nervoso.htlm

1.2 Neurotransmissores

São substâncias liberadas quando o terminal do axônio de um neurônio pré-sináptico é excitado. Estas substâncias, então, deslocam-se pela sinapse até a célula alvo, inibindo-a ou excitando-a. Existem cerca de 30 neurotransmissores conhecidos, que se dividem em 4 classes:

Classe 1: Acetilcolina (Ach)

A acetilcolina (Figura 5) é o único neurotransmissor desta classe. A Ach foi primeiramente isolada em 1914, por Otto Loewi. Ele demonstrou que a Ach é a substância liberada quando o nervo vago é estimulado, causando a diminuição dos batimentos cardíacos. Esse neurotransmissor, no sistema nervo central dos humanos, está também associado com os processos de memória e aprendizagem (BRUNTON et al., 2007).

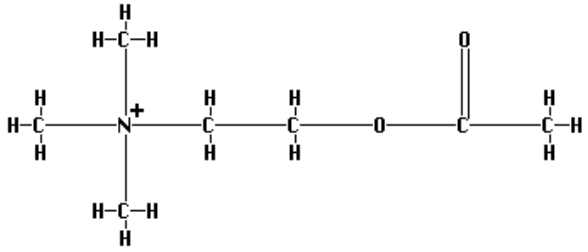


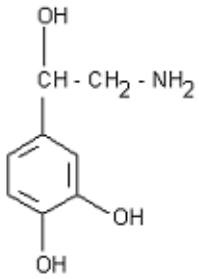
Figura 5. Estrutura química da acetilcolina. Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

Classe 2: Aminas

A noradrenalina (Figura 6) é uma molécula sintetizada no cérebro, sistema límbico e nos órgãos da reprodução. Esta molécula é um neurotransmissor, que está relacionado com o raciocino e emoções. Uma de suas funções, no corpo, é manter a tonicidade muscular nos vasos sanguíneos, controlando a pressão sanguínea.

A adrenalina (Figura 6), além de ser um hormônio, também é um neurotransmissor, e têm efeito sobre o sistema nervoso simpático, no coração, pulmões, vasos sanguíneos, órgãos reprodutores, etc. É liberada em resposta ao stress físico ou mental. Seus principais efeitos são: aumento dos batimentos cardíacos, dilatação dos brônquios e pupilas, vasoconstrição, suor, entre outros (BRUNTON et al., 2007).

Noradrenalina



Adrenalina

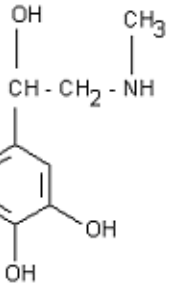


Figura 6. Estrutura química da noradrenalina e adrenalina.
Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

Dopamina

A Dopamina (Figura 7) além de ser um precursor para a síntese de noradrenalina atua como um neurotransmissor em certas sinapses, regulando canais de potássio e cálcio na membrana pós-sináptica. Distúrbios nestas sinapses estão relacionados com o mal de Parkinson e a esquizofrenia (BRUNTON et al., 2007).

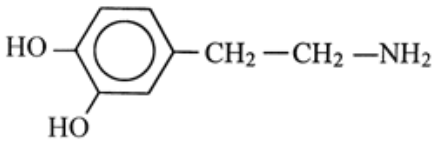


Figura 7. Estrutura química da dopamina.
Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

Serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT)

A serotonina (5-HT) (Figura 8) está relacionada com variações no padrão de comportamento, como o sono, os impulsos sexuais, o humor, entre outros. Além do cérebro, está presente em vários órgãos no corpo humano, e é um potente vasoconstrictor (BRUNTON et al., 2007).

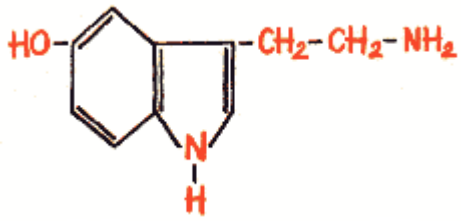


Figura 8. Estrutura química da serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5HT).
Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

Classe 3: Aminoácidos

Vários aminoácidos existem em grandes concentrações no cérebro. Como muitos são precursores e/ou metabólitos de muitas reações no cérebro, fica difícil saber se são ou não neurotransmissores. Alguns, entretanto, comprovadamente possuem neuroatividade, inibindo ou excitando a membrana pós-sináptica. Entre eles, o ácido Gamaaminobutírico (GABA), a glicina e o glutamato (BRUNTON et al., 2007).

Classe 4: Peptídeos

Alguns peptídeos são, também, neurotransmissores. Entre estes a insulina, que além de ser um hormônio também é um neurotransmissor. E outros peptídeos, como a endorfina e a oxitocina (BRUNTON et al., 2007).

1.3 Catecolaminas

As catecolaminas são importantes neurotransmissores e hormônios circulantes, controladoras do sistema nervoso central e autônomo (BENEDICT, 1987, PEREIRA et al., 1998). São responsáveis pelas funções de uma variedade de sistemas, como por exemplo, regulação da resposta ao stress, atividade psicomotora, processo emocional, sono e memória (PYTHON et al., 1996, DURSTEWITZ et al., 1999, FERRY et al., 1999, ROMANIDES et al., 1999, SOUTHWICK et al., 1999). Estão envolvidas no controle de muitos processos metabólicos, como a liberação de ácidos do tecido adiposo e secreção de hormônios (BREINDENBACH et al., 1998, KNIGGE et al., 1999, VALET e SOULNIER-BLACHE, 1999, DEMARIA et al., 2000). Possuem importante função na regulação do sistema imune, controlando a apoptose de linfócitos (BERQUIST et al., 1998).

Essas monoaminas apresentam em sua estrutura químca (Figura 9) um anel benzeno, grupos hidroxila fenólicos e alcóolicos e grupo amino. O anel benzeno, e dois grupos hidroxilas formam o anel catecol, o qual confere o nome de catecolamina a estes compostos.

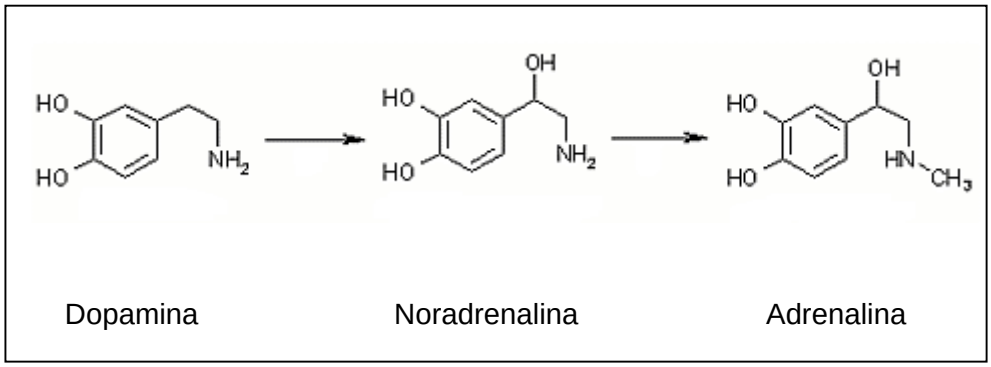


Figura 9. Estrutura química das principais catecolaminas. Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

A adrenalina e a noradrenalina são as catecolaminas mais importantes e originalmente reconhecidas como produtos da medula da glândula adrenal e das terminações nervosas adrenérgicas. A adrenalina é sintetizada e liberada no sangue pela medula adrenal, que tem uma origem comum com os neurônios do sistema nervoso simpático. A adrenalina proveniente das adrenais modula a liberação das

catecolaminas a partir das terminações nervosas adrenérgicas, via adrenoceptores pré-sinápticos. Nessas terminações, a adrenalina pode ainda ser capturada e posteriormente ser liberada como co-transmissor (SCHEURINK et al., 1989, FERRARESE, 1993). Depois de capturada pelo neurônio adrenérgico a noradrenalina permanece nas vesículas adrenérgicas, via sistema amino transporte, podendo ser liberada para uma outra ação potencial.

As catecolaminas são sintetizadas a partir da tirosina, a qual é um aminoácido aromático encontrado nos líquidos corporais, capturado pelos neurônios noradrenérgicos. A tirosina é oxidada a 3,4-diidroxifenilalanina (dopa), a qual é descarboxilada por aminoácido aromático descarboxilase para produzir dopamina na medula supra-renal. Esta é hidroxilada para originar noradrenalina. A seguir ocorre metilação deste composto para produzir a adrenalina (LODISK et al., 1995). Quatro enzimas estão envolvidas na biossíntese da noradrenalina e adrenalina, a qual ocorre na medula adrenal, como mostra a Figura 10.

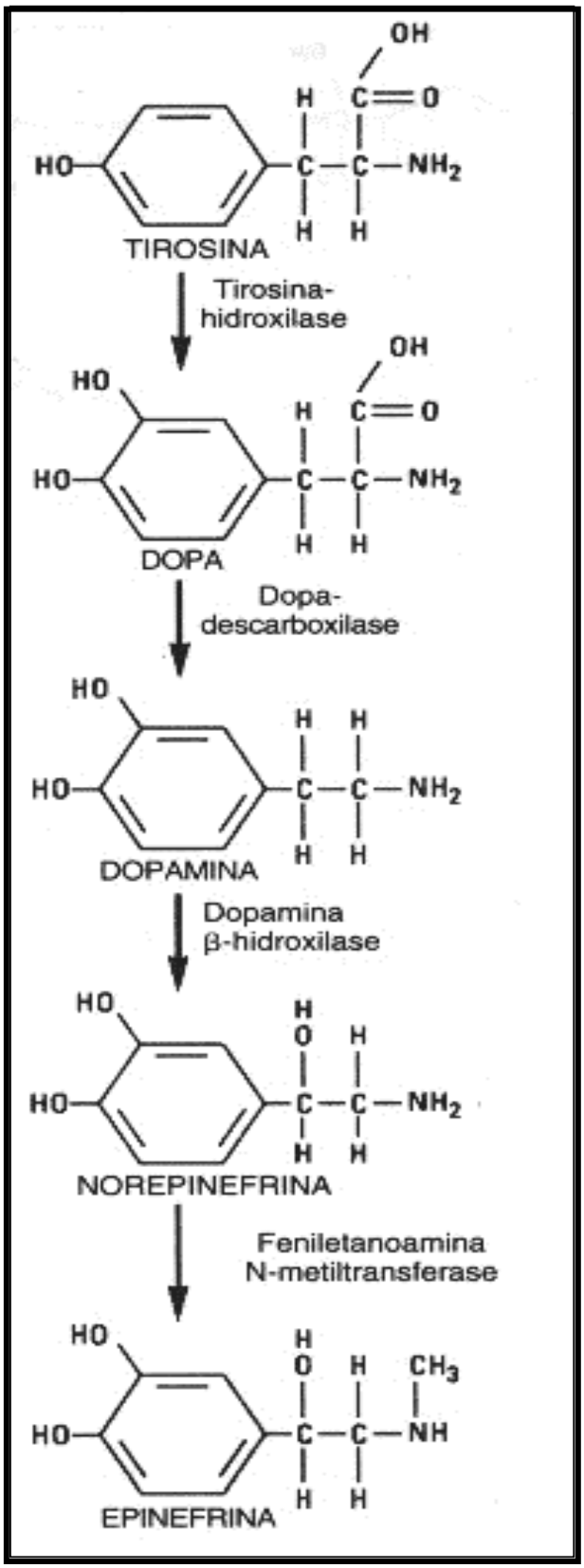


Figura 10. Biossíntese das catecolaminas. Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

O metabolismo (Figura 11) das catecolaminas ocorre pela ação de duas enzimas: a monoamina-oxidase (MAO) e a catecol-o-metitransferase (COMT). A MAO controla o teor de noradrenalina e dopamina. Quando inibida, ocorre aumento da liberação de noradrenalina. É encontrada nas células, ligada a membrana da mitocôndria. A MAO ocorre em duas formas: MAO A e MAO B. A primeira metaboliza noradrenalina e 5-HT (serotonina), a segunda metaboliza dopamina. A COMT está amplamente distribuída no organismo. É a segunda principal via do metabolismo das catecolaminas. Promove a metilação da noradrenalina no metabólito normetanefrina e de um dos grupamentos catecol-OH no derivado metoxi. Os produtos inativos do metabolismo da noradrenalina são excretados na urina como ácido vanilimandélico (VMA), metanefrina e normetanefrina.

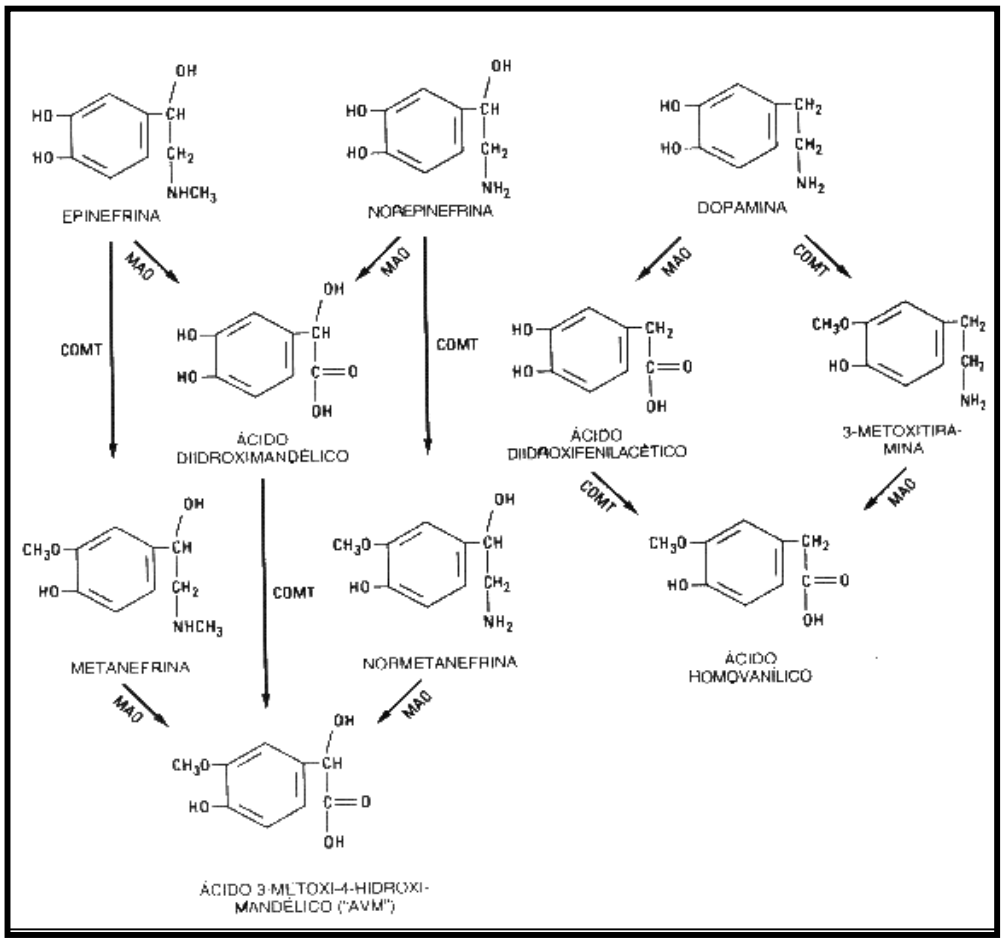


Figura 11. Metabolismo da noradrenalina e adrenalina.
Fonte: www.javeriana.edu.co/facultades

1.4 Considerações sobre a guanetidina

A guanetidina é uma droga clássica bloqueadora de neurônios noradrenérgicos. Foi muito utilizada a partir da metade da década de 50, enquanto eram pesquisadas alternativas às drogas bloqueadoras ganglionares para uso no tratamento da hipertensão.

O principal efeito da guanetidina é inibir a liberação da noradrenalina das terminações nervosas simpáticas, reduzindo ou abolindo a resposta dos tecidos à essa estimulação (RANG et al., 2004). Devido aos seus efeitos colaterais graves, a guanetidina não é mais utilizada clinicamente. Após longos períodos de tratamento, observou-se disfunção erétil e dificuldade de ejaculação, o que levou a sua retirada do mercado consumidor inicialmente em países da Europa e América do Norte e depois no Brasil (BAUER et al., 1961; ROSENBLOON et al., 1963; VEJLSGAARD et al., 1967; KEDIA e MARKLAND, 1975; RANG et al., 2004).

A guanetidina é seletivamente acumulada pelas terminações nervosas noradrenérgicas, constituindo um substrato para a captura neuronal, como também é denominada. Sua atividade bloqueadora inicial depende do comprometimento da condução do impulso nas terminações nervosas em virtude desse acúmulo seletivo (BROCK e CUNNANE, 1988). Sua ação é impedida por drogas como a anfetamina, que bloqueiam a captura neuronal. A guanetidina capturada também é encontrada nas vesículas sinápticas e possivelmente interfere na capacidade da noradrenalina sofrer exocitose, além de deslocá-la de seus locais de armazenamento nas vesículas. Dessa maneira, provoca depleção gradual e prolongada de noradrenalina nas terminações nervosas simpáticas, semelhante ao efeito da reserpina (Figura 12).

Quando administrada em altas doses, a guanetidina produz lesão estrutural dos neurônios, provavelmente devido ao acúmulo de altas concentrações da droga nas terminações nervosas. Por conseguinte, a guanetidina pode ser utilizada como neurotoxina seletiva (RANG et al., 2004).

1.5 Ductos e glândulas do aparelho reprodutor masculino

1.5.1 Epidídimo

O epidídimo consiste em um longo ducto enovelado. Macroscopicamente, o epidídimo é dividido em cabeça, corpo e cauda. Os dois primeiros segmentos estão relacionados com a maturação espermática, enquanto o segmento terminal destina-se ao armazenamento de esperma. A cauda do epidídimo é o principal órgão de armazenamento e contém cerca de 75% do total dos espermatozóides epididimários. A maturação dos espermatozóides ocorre durante a passagem pelo epidídimo e a sua motilidade aumenta quando eles entram no corpo do epidídimo (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

O interstício epididimário apresenta fibras nervosas adrenérgicas e colinérgicas, associadas com elementos musculares e vasculares (RISLEY e SKREPETOS, 1964, EL BADAWI e SCHENK, 1967, NORBERG et al., 1967, BAUMGARTEN et al., 1968). A distribuição dessas fibras varia conforme as regiões do epidídimo. Na cabeça e no corpo a inervação é mais escassa, ao passo que a cauda é muito irrigada por vasos sanguíneos e contém uma alta concentração de neurotransmissores adrenérgicos, noradrenalina e adrenalina (ELIASSON & RISLEY, 1968). Uma das funções consideradas importantes, desempenhada pela inervação autonômica simpática no epidídimo, é a de mediar eventos neuromusculares requeridos para o transporte de espermatozóides até o ducto deferente (HIB et al., 1979, TALO et al., 1979).

1.5.2 Ducto deferente

O ducto deferente é a continuação do ducto epididimário, terminando na uretra prostática, onde esvazia seu conteúdo. Antes de entrar na próstata, o ducto deferente se dilata formando uma região chamada ampola, onde o epitélio é mais espesso e muito pregueado. Na porção final da ampola desembocam as vesículas seminais. O segmento que entra na próstata é chamado ducto ejaculatório, cuja mucosa é semelhante a do deferente, porém não é envolvida por músculo liso. O

ducto deferente é caracterizado por um lúmen estreito e uma espessa camada de músculo liso, o qual sofre fortes contrações peristálticas que participam da expulsão do sêmen durante a ejaculação (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

1.5.3 Glândulas acessórias

As glândulas genitais acessórias são as vesículas seminais, a próstata e as glândulas bulbouretrais, produtora de secreções essenciais para a função reprodutiva do homem (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

Neste trabalho daremos importância apenas à vesícula seminal.

1.5.3.1 Vesícula seminal

As vesículas seminais se posicionam lateralmente às porções terminais de cada ducto deferente. Apresenta mucosa pregueada e forrada com epitélio cubóide ou pseudo-estratificado colunar, rico em grânulos de secreção. A lâmina própria é rica em fibras elásticas e é envolvida por uma delgada camada de músculo liso. As vesículas seminais não são reservatórios para espermatozóides. Elas são glândulas que produzem uma secreção amarelada que contém substâncias importantes para os espermatozóides, como frutose, citrato, inositol, prostaglandinas e várias proteínas. Carboidratos produzidos pelas glândulas acessórias do sistema reprodutor masculino e secretados no líquido seminal constituem fonte energética para a motilidade dos espermatozóides. O monossacarídeo frutose é o mais abundante desses carboidratos. Setenta por cento do volume de ejaculado humano se origina nas vesículas seminais. O grau da atividade secretora da glândula é dependente dos níveis circulantes de testosterona (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2004).

A Figura 13 ilustra os órgãos do sistema reprodutor masculino.

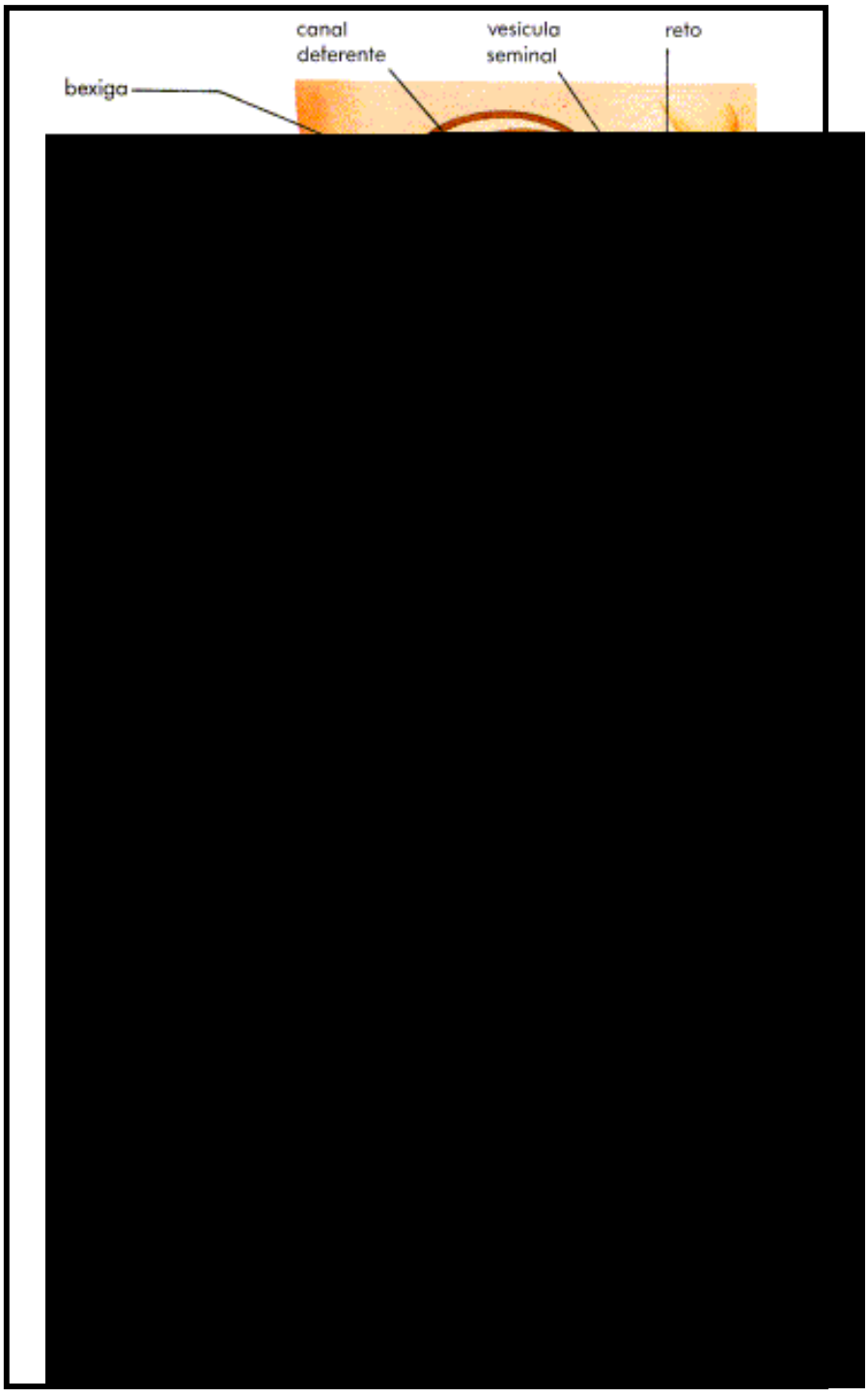


Figura 13. Órgãos do sistema reprodutor masculino. Fonte: www.rbp.fmp.usp.br/gametogenese.htlm

1.6 Efeitos da guanetidina no controle nervoso autônomo do aparelho reprodutor masculino

O aparelho reprodutor masculino recebe abundante inervação do sistema nervoso autônomo. A inervação autonômica participa do controle da vasoatividade testicular, do transporte de espermatozóides através do sistema de ductos (HODSON, 1965) e das secreções produzidas pelas glândulas sexuais acessórias (WANG et al., 1991). Esses órgãos apresentam uma grande quantidade de neurônios ao redor das células da musculatura lisa (SJOSTRAND, 1965, NORBERG et al., 1967).

Estudos farmacológicos e microcirúrgicos de desnervação vêm mostrando a grande importância da inervação simpática sobre a regulação da maturação, transporte e armazenamento de espermatozóides no epidídimo (para referências vide RICKER, 1998).

Sabe-se que a desnervação química pela guanetidina depleta a noradrenalina, que é um dos neurotransmissores responsáveis pela contratilidade da musculatura lisa no aparelho reprodutor, o que acarreta acúmulo e retenção de espermatozóides e secreções nos ductos e glândulas, levando ao aumento do peso dos órgãos reprodutores. Experimentos de desnervação simpática por guanetidina no sistema reprodutor masculino mostram a dilatação de algumas estruturas, refletindo distúrbio na contratilidade ductular com a conseqüente retenção do esperma e produtos de secreção (HODSON, 1964, 1965; EVANS et al., 1972, 1979; LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993b).

Sabe-se que a perda da inervação autonômica simpática está relacionada com alterações na fertilidade e na capacidade reprodutiva de animais experimentais. Assim, melhor explorar o modelo experimental de desnervação química por guanetidina é muito importante em pesquisas, pois possui também semelhanças com o que ocorre nos casos de homens acometidos por lesão na medula espinhal.

Experimentos demonstraram ausência de espermatozóides nas vaginas de fêmeas acasaladas com ratos tratados cronicamente com guanetidina, e que após um período de 4 semanas, da suspensão do tratamento, parte desses ratos havia recuperado a fertilidade, sugerindo que se os mesmos fossem mantidos por um período adicional de tempo, melhores resultados poderiam ser obtidos (HEPP & KREYE, 1973; STEFANICK et al., 1985). Seguindo esse contexto, SILVA (2002),

mostrou que a suspensão do tratamento por 8 semanas em ratos Wistar tratados com 10 mg/kg de guanetidina, foi efetiva para recuperar o peso dos órgãos reprodutores e a contagem de células germinativas, mas não foi suficiente para reverter, a valores normais, o número de espermatozóides ejaculados.

Ratos Wistar (SILVA, 2002) e Sprague-Dawley (KEMPINAS et al., 1998b) tratados com a mesma dose de guanetidina durante mesmo período de tempo (6,25 mg/kg, por 21dias), apresentaram diferentes respostas quanto ao desempenho reprodutivo. A variedade Sprague-Dawley se mostrou mais sensível, sendo incapaz de ejacular, enquanto que a Wistar ejaculou um número menor de espermatozóides. A análise de parâmetros farmacológicos da vesícula seminal (SILVA, 2002), poderia explicar o aumento do peso deste órgão, devido à diminuição de sensibilidade a acetilcolina, mediador também responsável pela contratilidade do órgão. A reatividade farmacológica também explicou que a presença de ejaculação na variedade Wistar foi decorrente, pelo menos em parte, ao aumento de sensibilidade à noradrenalina no ducto deferente, o que promoveu a contratilidade do órgão, e garantiu a ejaculação do macho desnervado. Esse aumento de sensibilidade foi conseqüência da atuação da noradrenalina endógena (considerando que catecolaminas são liberadas durante o processo fisiológico normal de comportamento sexual) em receptores α_1, o que foi evidenciado pelo uso da droga fenilefrina. Sabe-se que populações de adrenoceptores atuam em órgãos reprodutores, participando de importantes funções relacionadas à contratilidade, a qual garante a ejaculação.

Apesar dessas alterações observadas com o emprego da guanetidina, não se pode afirmar que os animais estão totalmente desnervados, e desta forma, não é garantido exatamente o impacto da desnervação sobre a contratilidade, afetando conseqüentemente, parâmetros reprodutivos e fertilidade dessas diferentes variedades de ratos.

1.7 Considerações gerais sobre cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

A cromatografia é definida como um método físico-químico de separação dos componentes de uma mistura, realizada através da distribuição destes entre duas fases. Uma das fases permanece estacionária, enquanto a outra se move através dela. O desenvolvimento cromatográfico se dá pelas diferentes interações dos componentes das amostras com a fase móvel e a fase estacionária, resultando em migrações diferenciais destes componentes (COLLINS et al., 1998).

1.8 Desenvolvimento de diferentes colunas cromatográficas empregadas na extração "on line", para determinações de analitos por HPLC em matrizes complexas

A cromatografia liquida de alta eficiência (HPLC) é uma técnica analítica extremamente importante para a análise de amostras com as mais variadas estruturas e propriedades físico-químicas. Contudo, o sucesso de uma análise depende da qualidade do pré-tratamento da amostra que visa à obtenção de soluções homogêneas, reprodutíveis e compatíveis com o método de HPLC escolhido, tornando o método de análise robusto e preciso.

Materiais biológicos são complexos e freqüentemente contêm proteínas, sais, ácidos, bases e compostos orgânicos com propriedades similares ao analito. Portanto, o pré-tratamento dessas amostras tem como objetivo: a) remover os interferentes, aumentando a seletividade do método; b) concentrar o analito, tornando o método mais sensível; c) converter a amostra, se necessário, em analito mais adequado para detecção ou separação; e d) fornecer um método robusto e reprodutível que seja independente de variações da matriz da amostra. Além disso, o procedimento de preparo da amostra deve ser rápido e conveniente, com perdas mínimas de analito, e baixo custo de análise (KATAOKA, 2003).

Há várias técnicas ditas "*off-line"* para o pré-tratamento de amostras biológicas, por exemplo, a extração em fase sólida (*solid-phase extraction,* SPE) e extração líquido-líquido (*liquid-liquid extraction,* LLE) são as mais clássicas. No entanto, apesar destas técnicas serem mais seletivas e modernas, alguns problemas

ainda persistem: o tempo gasto no preparo das amostras, o manuseio laborioso nesta etapa ainda existe e os materiais usados no desenvolvimento de um método, ou são descartáveis, ou têm tempo de vida curto. Assim, o uso de procedimentos de extração "*on-line"* é particularmente atrativo em situações onde um grande número de amostras deva ser analisado rotineiramente e/ou materiais perigosos (tóxicos), ou altamente infecciosos devam ser processados.

Dentre as técnicas de injeção direta e repetitiva de amostras biológicas não tratadas no sistema de HPLC, a que utiliza fases RAM (*Restricted-Access Media)* têm um enorme destaque, sendo extremamente vantajosa em pesquisas e análises clínicas, toxicológicas e farmacêuticas, entre outras, devido a sua capacidade de reduzir o tempo e a mão-de-obra empregada no procedimento analítico.

O mecanismo das fases RAM baseia-se na cromatografia de exclusão não adsortiva de macromoléculas (proteínas, ácidos nucléicos), que possuem uma região hidrofílica, e na cromatografia de fase-reversa, que promove a retenção do analito de interesse na superfície hidrofóbica da coluna, (OERTEL et al., 1998; HAGESTAM e PINKERTON, 1985) Assim, macromoléculas como as proteínas, eluem no volume morto da coluna sem acumulação destrutiva, porém as pequenas moléculas (por exemplo, fármacos e seus metabólitos) se ligam aos sítios hidrofóbicos e são separadas (Figura 14), (BOSS e RUDOLPHI, 1997, HAGINAKA, 1991).

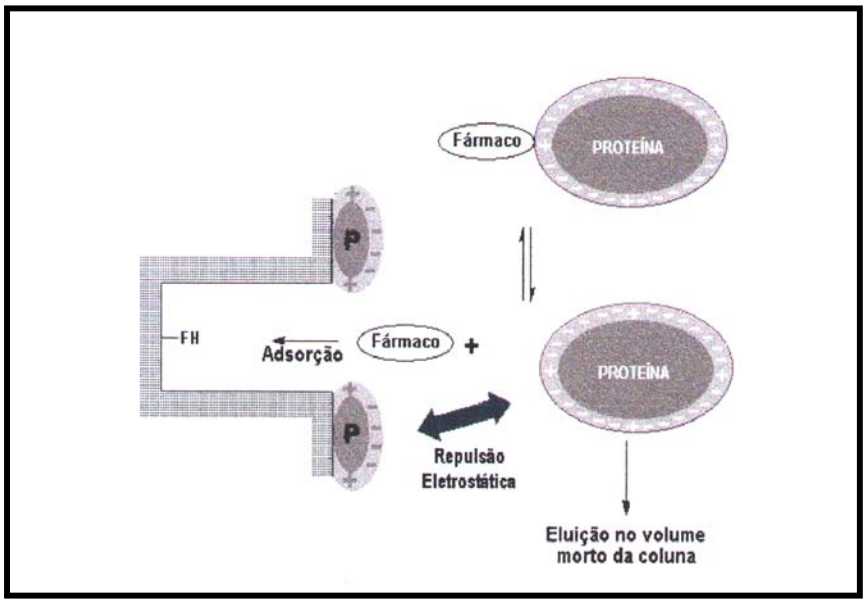


Figura 14. Mecanismo cromatográfico das fases RAM, P: proteínas; FH: fase hidrofóbica. Fonte: SIMIONATO (2005).

A separação de compostos macromoleculares por exclusão não adsortiva pode ser realizada usando-se os mecanismos das barreiras de difusão física ou química (BOSS e RUDOLPHI, 1997). Na barreira de difusão física, a limitação da acessibilidade macromolecular se deve à estrutura do poro da fase cromatográfica, por exemplo, poros com diâmetros de 6 nm promovem uma exclusão completa das proteínas séricas e plasmáticas. Por outro lado, no mecanismo da barreira de difusão química, a superfície da sílica é quimicamente ligada a estruturas que previnem a adsorção de macromoléculas sobre a fase, bem como previnem sua desnaturação. Neste mecanismo, polímeros naturais ou sintéticos, bem como proteínas, são ligados adsortiva ou covalentemente à superfície da sílica.

Com relação ao mecanismo cromatográfico da superfície quimicamente ligada, as fases RAM são classificadas em dois grupos: fases de superfície bimodal e fases de superfície unimodal (HAGINAKA, 1991, PINKERTON, 1991, BOSS e RUDOLPHI, 1997).

As fases de superfície bimodal apresentam duas classes de substâncias orgânicas, ligadas quimicamente sobre a superfície da sílica, originando dois mecanismos de separação, caracterizada pela presença de uma região externa hidrofílica e outra interna hidrofóbica. Aqui estão agrupadas, entre outras, as fases reversas proteína-mobilizadas, as fases ISRP, ADS e SPS. Em relação às fases de superfície unimodal, elas também podem apresentar uma ou duas substâncias orgânicas ligadas quimicamente de forma uniforme, apresentando uma cobertura homogênea, ou melhor, ambas as superfícies externa e interna têm simultaneamente características hidrofílicas e hidrofóbicas. Neste grupo estão incluídas, por exemplo, as fases MMP (Mixed Mode Phases), MFP (Mixed-function Phases) e SHP (Shielded Hydrophobic Phases).

Outra classificação mais ampla para as fases RAM foi sugerida por BOOS e RUDOLPHI (1997) e BOSS e GRIMM (1999). Segundo esta classificação, as fases RAM são agrupadas em quatro tipos, de acordo com os mecanismos de exclusão e com a característica da superfície do suporte (Figura 15).

Dentre essas diversas fases, apresentadas na Tabela 1, algumas delas obtiveram enorme sucesso quando do desenvolvimento de métodos para análises de amostras biológicas, sendo comercialmente disponíveis ou de fácil preparo em laboratório.

YOSHIDA et al. (1984) descreveram a preparação de uma fase C_{18} imobilizada com proteína. A superfície externa desta fase era hidrofílica, permitindo a exclusão de proteínas e os poros eram hidrofóbicos o suficiente para reter xenobióticos e seus metabólitos. Fases proteína-imobilizadas têm sido empregadas com bastante sucesso na análise direta de xenobióticos em diversos fluídos biológicos, tais como leite (MENEZES e FÈLIX, 1996), plasma (CASS et al., 2002) e saliva (GOMES et al., 2003).

A primeira fase ISRP (*Internal Surface Reverse Phase)* introduzida em 1985 apresenta a superfície interna coberta com o oligopeptídeo glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina e a superfície externa coberta com o ligante glicil (HAGESTAM e PINKERTON, 1985).

As fases chamadas de ADS (*Alkyl-Diol Sílica*) foram preparadas por BOSS e RUDOLPHI (1997) e apresentam uma superfície externa com características hidrofílicas contendo grupos diol e superfície interna com características hidrofóbicas contendo grupos alquílicos (butil, octil ou octadecil) ligados à sílica. Essas fases são comercialmente conhecidas como LiChrospher® ADS (Merck Alemã).

DESILETS et al. (1991) prepararam fases SPS (*Semi-Permeable Surface*), através do recobrimento de uma superfície de fase hidrofóbica (C_8 ou C_{18}) com uma camada de um polímero hidrofílico (o polioxietileno) que limita o acesso das proteínas à fase estacionária hidrofóbica adjacente. Na primeira geração destas fases, o polímero é ligado adsortivamente à sílica, mas na segunda geração, a ligação é covalente.

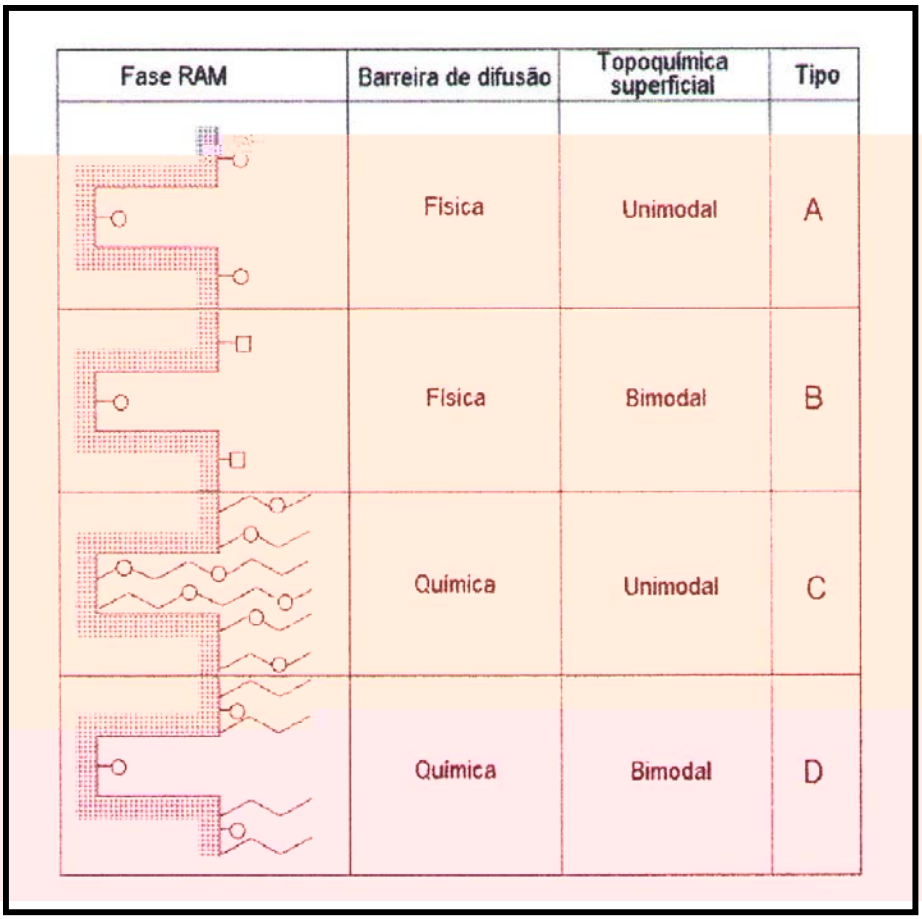


Figura 15. Classificação das fases RAM. *Topoquímica: mecanismo de adsorção. Fonte: SIMIONATO (2005).

As fases RAM que combinam diferentes modos cromatográficos (por exemplo, cromatografia de exclusão e de afinidade) ou diferentes funcionalidades (ligantes hidrofílicos e hidrofóbicos) sobre uma superfície uniforme de sílica, são denominadas de fases MMP (*Mixed-Mode Phases*) e MFP *(Mixed-Function Phases*), (BOSS e RUDOLPHI, 1997, HAGINAKA et al., 1990).

As fases chamadas de SHP (*Shielded Hydrophobic Phases*), comercialmente disponíveis sob o nome de Hisep® (Supelco), consistem de uma rede hidrofílica (polímeros de polioxietileno) contendo regiões hidrofóbicas (aromáticos substituídos) ligadas à superfície da sílica (GISCH et al., 1988).

Analiticamente, as fases RAM têm aplicação versátil, podendo ser utilizadas no modo simples de análise, ou seja, a amostra não é tratada, sendo diretemente injetada na coluna, onde a matriz complexa é excluída e analitos e seus metabólitos ficam retidos, sendo posteriormente analisados por eluição gradiente (BOSS e

RUDOLPHI, 1997). Desta forma, a coluna funciona simultaneamente como coluna de exclusão e coluna analítica. Essas colunas também são amplamente empregadas em análise cromatog'ráfica multidimensional, que é uma técnica de acoplamento de duas ou mais colunas para a extração de interferentes e análise de amostras complexas contendo muitos componentes. O objetivo básico da técnica da cromatografia multidimensional é maximizar a injeção da banda do analito da segunda coluna enquanto minimiza a injeção dos compostos interferentes. Neste caso, uma coluna RAM curta é usada como pré-coluna e os analitos são transferidos através de uma válvula de desvio, para uma coluna analítica após eluição da matriz (BOOS e RUDOLPHI, 1997, GIDDINGS, 1990, CORTES e ROTHMAN, 1990, MAJORS et al., 1996, FRIED e WAINER, 1997 e ANDERSON, 1999).

Tabela 1. Classificação das fases RAM desenvolvidas.

ANO	**FASES RAM**	**TIPO**
		A
1987- Suportes de sílica porosa modificada por ligantes diol e suportes poliméricos porosos modificados com caráter hidrofílico (BioPak®, Walfort e Partnes) (BOSS et al. 1987).		
1990- Fases de β-ciclodextrina-diol e ligantes hidrofóbicos (fenil,butil ou octil)-diol para injeção direta de soro em análise de fármacos quirais e aquirais (HAGINAKA et al. , 1990). **1991-** Fases micelares supotadas: sílica 10 nm de poro recoberta com camada de sufarctante (N,N-bis[2-metóxietil]-11-sililundecamida) adsorvida (FEIBUSH e SANTASANIA, 1991). **1993-** Fase biomatrix (ChroSpher® 5 Biomatrix): sílica porosa 13 nm ligada com estruturas hidrofóbicas (fenil e alquil) e hidrofílicas (hidroxilas) (BOSS e RUDOLPHI, 1997). **1994**- Suportes de sílica com glicerilalquilsilano (WS GP-N6®, Waco Co. Japonesa) (SUDO et al., 1994). **1995-** Fases de camada binária: sílica 10 nm de poro modificada com 3-(2,3-dihidroipropoxi) propilsilano (NIMURA et al. 1995).		
		B
1985- Fase ISRP: sílica 8 nm de poro modificada, superfície interna recoberta com glicil-L-fenilalanil-L-fenilalanina e superfície externa com ligantes glicil (GFF® Regis Technolgies, Illinois) (HAGESTAM e PINKERTON, 1985).		

1986- Fases ISRP: sílica 8 nm de poro com superfície interna recoberta com glicil-L-fenilalanina (GF), glicil-L- fenilalanil-L-fenilalanil-L-fenilalanina (GFF) e superfície externa com glicil:sílica APS 8 nm de poro recoberta internamente com (1) N-tert-butoxicarbonil-L-fenilalanina, (2)N-carbobenzóxi-L-valil-L-fenilalanina, (3)N-acetil-L-fenilalanina, (4)N-benzoil-L-fenilalanina, (5)ácidofenilpropiônico e externamente com glicidol (COOK e PINKERTON, 1986).

1989- ISRP diol: sílica 9 nm de poro modificada com superfície interna N-octanoilaminopropil-ligantes e superfície externa diol (HAGINAKA et al., 1989).

1989- Fase Styrisorb tris-modificada: poliestireno hidrofóbico com superfície externa modificada com tris-(hidroximetil)metilamina) (DAVANKOV e TSYURUPA, 1989).

1990- ISRP diol: sílica 5-6 nm de poro modificada-superfície interna com ligantes C_1, C_8, C_{18} ou fenil etil-ligantes e superfície externac om ligantes diol (KIMATA et al., 1990).

1991- Fase ADS (alkyl-diol sílica): sílica 6 nm de poro com superfície interna ligada com grupos hidrofóbicos (butil, octil ou octadecil) e superfície externa com diol (LiChrospher ADS, Meck, Alemã) (BOOS et al., 1995).

1992- ISRP de Pinkerton (GFF) mais homogêneo e reprodutível (GFFII, Regis Technoligies, Illinois) (PERRY et al., 1992).

1994- Suporte polimetacrílico hidrofílico com superfície interna C_{18} ou fenil-ligada (SMIGOL et al., 1994).

2000- Fase LiChrospher XDS (Merck): sílica 6 nm de poro com superfície interna com ligantes de troca catiônica (ácidosulfônico–SO3) e superfície externa com ligantes diol (RACAITYTE et al. , 2000).

2001- Fase reversa imobilizada com metilcelulose imobilizada (YAMAMOTO et al., 2001).

C

1988- Fases SHP (Hisep, Supelco): sílica 10 nm de poro modificada, polímeros de polioxietileno, com regiões hidrofóbicas ligadas à superfície da sílica (GISCH et al., 1988).

1994- Fases com ligantes poliglicol com resíduos hidrofóbicos (C_8, C_{18}, ciano e fenil) (ZHANG et al., 2000).

1996- Fase MFP capeada com polímero: sílica 9 nm de poro adsorvida com camadas de materiais hidrofílicos e hidrofóbicos- uma camada de poímero de silicone e uma camada de ligantes biocompatíveis (por exemplo, polioxietileno). Variações desta coluna contendo polioxietileno com resíduos fenil, C_1 ou C_8 são disponíveis sob o nome de Capcell Pak (Shiseido Co. Japonesa) (KANDA et al., 1996).

1991- Fases SPS (Regis Technolgies, Illinois):sílica C_8 ou C_{18} recoberta com surfactantes não-aniônicos de polímeros hidrofílicos (por exemplo, polioxietileno). Atualmente: versões C_8, C_{18}, ciano e fenil recobertas com polímeros hidrofílicos covalentemente ligados (DESILETS et al., 1991).

1991- Fase Bioptic AV (GL Sciences, Japão): fase APS conjugada com avidina para injeção direta de plasma em análise quiral (ODA et al., 1991).

1992- Fases difilicas: sílica C_8, C_{16}, C_{18}, 5-6 nm de poro imobilizada com uma camada de albumina estabilizada com glutaraldeído (BOGOSLOVSKII et al., 1992).

1993- Fase Ultrabiosep. A estrutura exata desta fase não é descrita na literatura, mas o suporte base é sílica hidrofóbica (C_4, C_8 e C_{18}) recoberta com um polímero biológico (GONZALEZ et al., 1993).

1994- Fase Bio Trap (Chrom Tech, Suécia): sílica C_{18} imobilizada com ácido -L-glicoproteína (HERMANSSON e GRAHN, 1994).

1995- Fase de poliestirenodivinilbenzeno recoberta covalentemente com uma camada de metacrilato hidrofílico (HOSOYA et al., 1995).

1996- Fases RAM-BSA: sílica C_{18} 6 nm de poro imobilizada com uma camada de albumina sérica bovina estabilizada com glutaraldeído (MENEZES e FÈLIX, 1996).

1.9 Sílica gel

A sílica empregada como fase estacionária foi muito estudada devido à sua adsorção, estabilidades mecânica e térmica, eficiência, rigidez, grande área superficial e pelo seu bom desempenho (COLLINS et al., 1998).

A sílica gel, classificada geralmente como um óxido de silício (SiO_2) é um sólido amorfo, fabricada em várias industriais por diferentes rotas cinéticas (BIDLINGEMEYER, 1992, COLLINS et al., 1998).

O conhecimento da estrutura química da sílica é de grande relevância para a compreensão do comportamento e da reatividade deste óxido inorgânico em vários processos cromatográficos (BIDLINGEMEYER, 1992).

A sílica gel pode ser considerada como um polímero inorgânico formado por unidades tetraédricas de SiO_4. Os átomos de silício internos tendem a manter sua coordenação tetraédrica com o oxigênio formando a ligação siloxano (Si - O – Si). Os átomos de silício externos completam seu número de coordenação através da ligação com grupos hidroxilas formando os chamados grupos silanóis (Si – OH).

Sob o ponto de vista cromatográfico, os grupos silanóis são os mais importantes devido à sua polaridade, fácil capacidade de fazer pontes de hidrogênio e de induzir dipolos em outras moléculas, sendo considerados como fortes sítios de adsorção, enquanto que os grupos siloxanos são considerados hidrofóbicos (MELANDER et al., 1981). Portanto, os silanóis são os grupos ativos da superfície da sílica gel através dos quais se podem ligar grupos organofuncionais por meio de reações químicas (NAWROCKI, 1997). A ligação siloxano é relativamente estável, entretanto o seu caráter hidrofóbico torna possível a retenção de moléculas apolares. O sítio hidrofóbico do grupo siloxano pode ser considerado como um centro de interações do tipo fase reversa, quando fases móveis aquosas são empregadas (MELANDER et al., 1981).

Para se obter um aumento na reatividade dos grupos silanóis na superfície da sílica, é necessário que se remova a água fisicamente sorvida ou ligada por pontes de hidrogênio às hidroxilas destes grupos silanóis, submetendo o material a um aquecimento controlado, 100 a 150°C, de 12 a 15 horas (NAWROCKI, 1997, CIOLA, 1998). De um modo geral as propriedades da sílica dependem das condições de fabricação, que normalmente podem ser fixadas entre 25 a 40 variáveis experimentais, a fim de se obter um produto reprodutível, isto é, com as mesmas características físico-químicas (CIOLA, 1998). Por esta razão, colunas cromatográficas de diferentes fabricantes ou do mesmo fabricante possuem comportamentos diferentes.

As propriedades relacionadas ao processo de adsorção que dependem da estrutura física da sílica gel são: áreas superficiais específicas, tamanhos das partículas, diâmetro médio das partículas, diâmetro médio dos poros e volume específico dos poros. A área superficial específica indica a extensão da superfície da sílica disponível a interações físicas e químicas.

A Tabela 2 apresenta as características das sílicas disponíveis comercialmente e empregadas em cromatografia (CIOLA, 1998).

Tabela 2. Características da sílica.

CARACTERÍSTICAS	SÍLICA
Área específica	Entre 1 e 800 m^2 g
Volume do poro	Entre 0,5 e 1,0 cm^3 g
Diâmetro médio dos poros	Entre 50 e 4000 angstrons

1.10 Aplicações da coluna cromatográfica ISRP (Superfície Interna de Fase Reversa) em determinações de analitos por HPLC em matrizes complexas

A separação e quantificação de moléculas de matrizes complexas têm apresentado um desafio importante no campo da cromatografia líquida. Em particular, as análises de drogas, metabólitos e pesticidas em fluídos biológicos, tem sido historicamente problemática. Isto se deve a necessidade de remover primeiro às proteínas, para evitar que danifiquem as colunas cromatográficas. A preparação convencional da amostra envolve procedimentos de precipitação, seguida por extração e pré-concentração dos analitos.

HAGESTAM e PINKERTON (1985) e PINKERTON et al. (1991), desenvolveram e patentearam a fase estacionária com Superfície Interna de Fase Reversa – ISRP. Este conceito foi inovador para as determinações de drogas e metabólitos em matrizes biológicas por HPLC. Esta fase estacionária foi sintetizada a partir de uma sílica, com diâmetro de poro apropriado, quimicamente ligado a um glicerilpropil, imobilizada com um polipeptídio e finalmente ativada com uma enzima carboxipepdase A, que atua principalmente nos grupos carboxilas livres. Estas enzimas têm um diâmetro aproximado de 3,1 nm, e a albumina, principal proteína dos fluídos biológicos, um diâmetro de 4,0 nm. Portanto, as proteínas do soro, plasma ou urina não podem alcançar a superfície interna desta fase estacionária após tratamento enzimático. A fase estacionária ISRP possui características hidrofóbicas na superfície interna da sílica e mantém a superfície externa da sílica com propriedades hidrofílicas não adsorvidas para as proteínas.

Na coluna cromatográfica ISRP a extração das catecolaminas presentes em amostras de fluídos biológicos, ocorrem por dois mecanismos:

A - A fase estacionária com distribuição de diâmetro de poro controla a separação. Em geral as proteínas presentes em amostras de fluídos biológicos, possuem moléculas com dimensões médias de 144 nm, sendo denominadas de macromoléculas. Isto impede que as mesmas penetrem nos poros da sílica, que possuem diâmetro médio de 100 nm. Após a imobilização da albumina humana sobre a superfície da fase estacionária, esta passa a possuir propriedades hidrofílicas. Desta forma, as proteínas presentes na amostra de fluído biológico não são adsorvidas, por possuírem propriedades hidrófobas.

B - As catecolaminas possuem pequenas moléculas, capazes de penetrarem nos poros da sílica e serem adsorvidas pela fase estacionária, octadecilsilano possibilitando a extração da amostra de fluído biológico.

Estas colunas cromatográficas foram empregadas nas determinações de drogas presentes em soro sangüíneo, leite e urina por injeção direta em HPLC (PINKERTON et al., 1991). Os resultados apresentados foram extraordinários no campo da análise de fluídos biológicos.

Vários métodos analíticos, empregando a técnica de injeção direta da amostra utilizando colunas ISRP têm sido desenvolvidos e avaliados para aplicações como: determinação de fenilalanina em plasma humano, diagnóstico e tratamento de fenilcetonúria (ATHERTON, 1989), determinação de drogas enantioméricas em soro (HAGINAKA e MURASHIMA, 1993, HAGINAKA, SEYAMA e MURASHIMA, 1994), extração e identificação de carbamazepina em soro humano (DARYL et al., 1988), extração e separação de pesticidas sor5 476.7794 Tm(extra 476.gcH316.2 57 12 85.0798 476

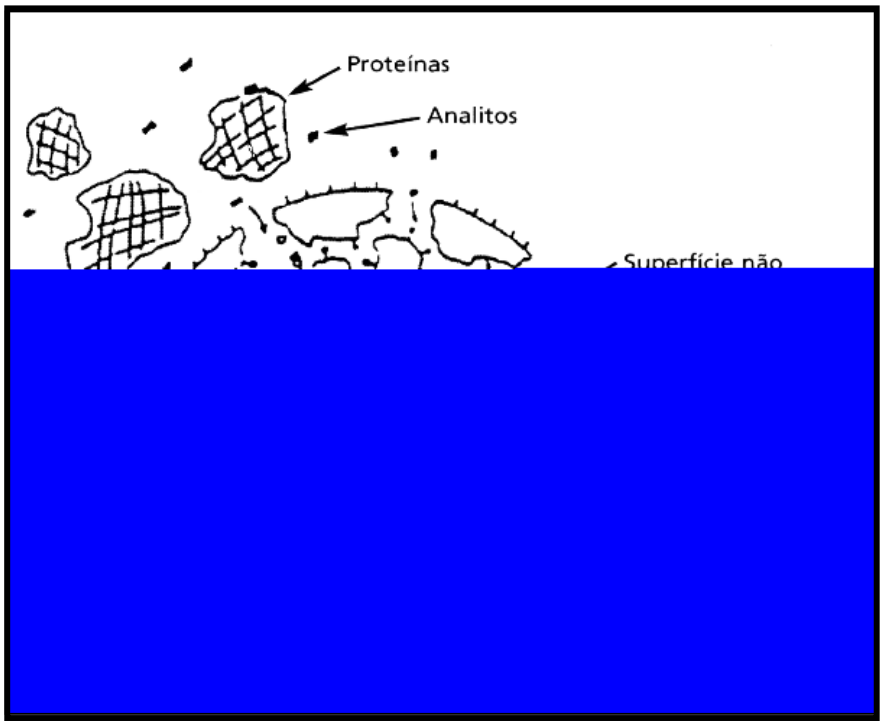


Figura 16. Partícula de fase estacionária ISRP (PINKERTON, 1991).

1.11 Análise de amostras biológicas por HPLC

As análises de tecidos e fluídos biológicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência apresentam algumas dificuldades na separacão dos metabólitos e proteínas presentes nas matrizes. As numerosas combinações de endógenos muitas vezes apresentam concentrações maiores do que as do analito a ser determinado, que freqüentemente são baixas. No caso de drogas, as combinações de endógenos podem apresentar estruturas semelhantes à do analito (ANNINO, 1978), o que dificulta mais a separação.

A alta concentração de proteínas no sangue, no plasma e no soro é uma característica relevante. Assim, nos métodos anteriormente descritos na literatura para a análise de drogas nestas matrizes, as proteínas são primeiramente precipitadas e, após centrifugação, separadas. O analito do sobrenadante, livre da proteína é então extraído com uma fase sólida ou líquida. Uma segunda extração, utilizando solução aquosa ácida ou básica pode ser necessária (SHERMA e BEROSA, 1982).

A urina, outro fluído biológico, tem baixa concentração de proteínas não sendo necessária à precipitação das mesmas. A composição da urina varia amplamente, de indivíduo para indivíduo, sendo que o problema principal para a análise deste fluído é o grande número de compostos orgânicos ou metabólitos. A extração líquido-líquido é o procedimento freqüentemente utilizado para a preparação da amostra a ser analisada (SHERMA e BEROSA, 1982).

Existem outras amostras biológicas utilizadas com menor freqüência, como bílis, suor, pulmão, fezes, saliva e osso. Destas amostras, a análise de saliva ganhou popularidade, principalmente porque este fluído é facilmente coletado mesmo que em pequenos volumes. Normalmente a concentração do analito na saliva é próxima do valor encontrado no plasma. Do ponto de vista de preparação da amostra, a saliva pode ser comparada com um sangue filtrado, isto é, a concentração de proteína é muito baixa, portanto a preparação dessa amostra não requer a etapa de precipitação.

1.12 Considerações sobre análise de catecolaminas em amostras biológicas por HPLC com detecção eletroquímica

A literatura relata que o emprego da técnica de HPLC com detecção eletroquímica é muito utilizado para a determinação de catecolaminas em amostras biológicas.

Em plasma ou urina, por exemplo, a técnica consiste em extração e purificação das catecolaminas antes da determinação por HPLC. Vários métodos para extração e purificação desses neurotransmissores em amostras de tecido ou fluídos biológicos são empregados. A alumina na forma ácida é o mais utilizado, onde pequenas porções são adicionadas em um determinado volume da amostra, seguido por agitação, centrifugação e filtração. As catecolaminas adsorvidas na alumina são eluidas com auxílio de ácidos diluídos. Desta forma as amostras são purificadas e monitoradas por detector eletroquímico (JAVIDAN e CWIK, 1996; NAFFAH-MAZZACORATTI et al., 1992; KVETNANSKY, et al., 1993).

NI et al. (1989) efetuaram a extração de catecolaminas empregando a técnica "*on column*", utilizando difenilboratos, seguido pela eluição dos complexos catecolamínicos, em coluna cromatográfica C_{18}. CHI et al. (1999) realizaram a

extração de catecolaminas em tecido de cérebro de rato, empregando tampão fosfato com pH ajustado em 5,0 seguido por centrifugação a 4 C e por filtração. PAPPA-LOUISI et al. (1997), determinaram as concentrações de dopamina e noradrenalina em coração de “Snail Helix Lucorum L”. A extração das catecolaminas foi realizada após a homogeneização das amostras de tecido em solução tampão com pH ajustado em 3,3 contendo padrão interno. Em seguida as amostras foram centrifugadas.

OISHI et al. (1983) obtiveram as concentrações de noradrenalina e seus metabólitos em ducto deferente de ratos a partir da purificação dos extratos, a qual foi realizada utilizando colunas de alumina e colunas de borato. SANCHEZ et al. (2004) determinaram catecolaminas em plasma e glândula adrenal de ratos através de injeção direta da amostra, empregando coluna cromatográfica ISRP-C_{18} imobilizada com a proteína albumina (HSA) do soro humano (MENEZES e FÉLIX, 1996).

Outras técnicas analíticas como LC/MS e eletroforese capilar foram utilizadas para a determinação de catecolaminas em amostras biológicas (BERGQUIST et al., 2002).

Na técnica de análise de catecolaminas por HPLC com monitoramento por detector eletroquímico, independentemente dos métodos de extração empregados, são freqüentemente utilizadas colunas cromatográficas C_{18}.

1.12.1 Sistemas de detecção - detector eletroquímico

Os detectores eletroquímicos se baseiam na possibilidade de muitos compostos serem oxidados ou reduzidos quando estiverem na presença de um potencial elétrico.

A reação eletroquímica tem lugar no eletrodo ativo. É necessário o emprego de um potenciostato para manter um potencial constante através da célula.

Devido ao fato do potencial entre o eletrodo ativo e o eletrodo auxiliar permanecerem constantes, esses detectores são também chamados de detectores amperométricos (CIOLA, 1998).

OBJETIVO

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar as concentrações de catecolaminas em órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley, após a simpatectomia química por guanetidina e após 90 dias da suspensão do tratamento.

2.2 Objetivos Específicos

· Desenvolver e validar metodologia para a determinação simultânea de noradrenalina e adrenalina em amostras biológicas;

· Aplicar a metodologia validada em amostras reais de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal dos animais dos diferentes grupos experimentais;

· Avaliar a possível a reversão dos efeitos da desnervação simpática 90 dias após a suspensão do tratamento com guanetidina.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

A- Desenvolvimento e validação de metodologia para determinação simultânea de noradrenalina e adrenalina em amostras biológicas

A 1- Droga, padrões, reagentes e solventes

- Sulfato de guanetidina – Sigma Aldrich Chemical Company (USA);
- Padrões noradrenalina e adrenalina - Sigma Aldrich Chemical Company (USA);
- Ácidos heptanosulfônico e metanosulfônico - Aldrich Chemical Company (USA);
- Albumina do soro humano - Aldrich Chemical Company (USA);
- EDTA - Carlo Erba, Milan, Italy;
- Acetonitrila grau HPLC - Carlo Erba, Milan, Italy;
- Água ultrapura - Milli-Q, sistema Millipore (Millipore, Bedford, MA, USA).

A 2- Coluna cromatográfica

Coluna cromatográfica ISRP - C_{18} Luna-Phenomenex (250 mm x 2,0 mm DI), com diâmetro de partícula 5μ, adquirida pela Labtron e Comércio Ltda, imobilizada com a proteína albumina do soro humano (HSA), de acordo com protocolo de MENEZES e FÉLIX (MENEZES e FÉLIX, 1996) Essa coluna foi anteriormente utilizada em nosso laboratório (Laboratório de Cromatografia Líquida) para determinação de catecolaminas em plasma e glândula adrenal de ratos (SANCHEZ et al., 2004).

A 3- Equipamentos eletrônicos

- ü Balança analítica;
- ü Balança Micronal B 160;
- ü Ultrasson Intralab;
- ü Agitador-Aquecedor Fanem, 258;
- ü HPLC Shimadzu Modelo LC-10VP, equipado com duas bombas recíprocas Shimadzu Modelo LC-10ADVP e válvula Switching FCV-12AH;
- ü Detector eletroquímico Shimadzu L-ECD-6A, ajustado à estação de tratamento de dados Work Station-Computador Pentiun 233 - Metron;
- ü Válvula manual de injeção Rheodyne 7125, Cotati, CA, USA;
- ü Detector Ultravioleta Varian modelo 2550 e integrador SP 4400 Chromaject (Varian Associates, Inc; Sunnyvale, CA, USA).

A 4- Preparo das soluções padrão

As soluções padrão foram preparadas dissolvendo-se uma massa de 0,001g de cada catecolamina (noradrenalina e adrenalina) em 10 mL de uma solução de ácido clorídrico 0,1mol L^{-1} . A partir desta solução estoque foram realizadas diluições em ácido perclórico 0,01 mol L^{-1}, obtendo-se concentrações de catecolaminas para a construção de curvas analíticas e determinação do limite de detecção.

A 5- Preparo da coluna ISRP-C_{18} – HSA

A coluna cromatográfica ISRP C_{18} - HSA foi preparada de acordo com método descrito por MENEZES e FÉLIX (1996). Na fase hidrofóbica foi empregada a coluna cromatográfica octadecil Luna-Phenomenex e a imobilização da HSA foi realizada "*in situ"*, eluindo-se a coluna cromatográfica com uma solução de HSA (2mg mL^{-1}, pH 6,0) como mostra a Figura 17.

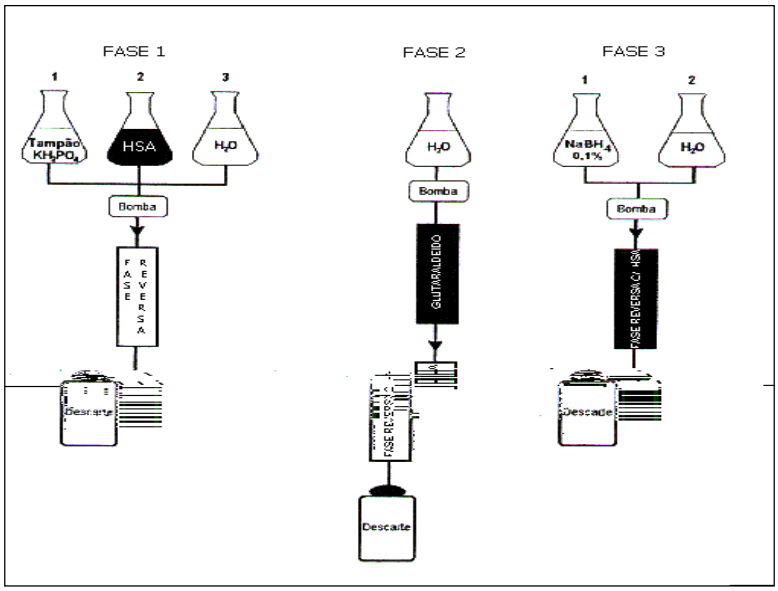


Figura 17. Etapas do preparo da coluna ISRP-C_{18} - HSA. Fonte: SIMIONATO (2005).

Para estabilizar a proteína, foi realizada a reação com glutaraldeído 25% (v/v) para evitar possível hidrólise da dupla ligação das bases de Schiff formadas e reações posteriores com os grupos aldeído residuais. Esses grupamentos foram reduzidos com uma solução de 0,1% (m/v) de borohidreto de sódio, de acordo com esquema mostrado na Figura 18.

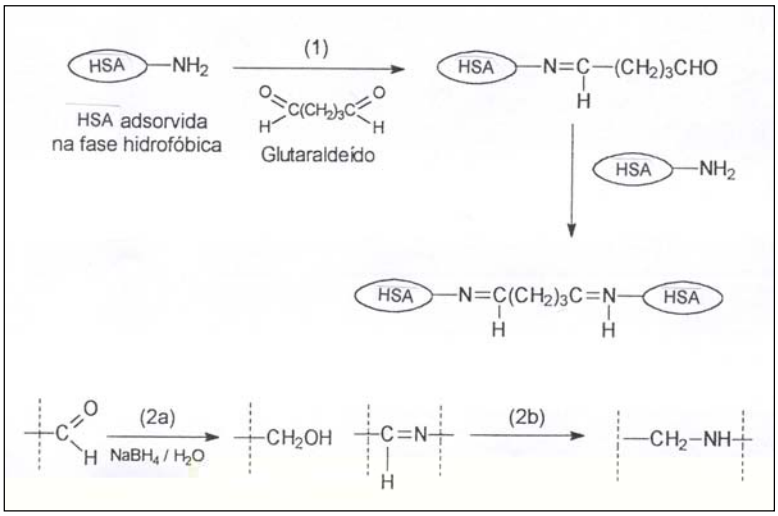


Figura 18. Estabilização da camada de HSA imobilizada em fases hidrofóbicas; (1) intercruzamento da HSA com glutaraldeído; (2) redução de grupamentos aldeídos residuais (a) e das bases de Schiff (b) com borohidreto de sódio. Fonte: SIMIONATO (2005).

Após duas horas, a coluna foi eluída com água durante uma hora, seguida pela fase móvel composta por solução de ácido metanosulfônico 0,013mol L^{-1}, com pH ajustado em 3,0 e acetonitrila (96:4 v/v), 0,033g de ácido heptanosulfônico e 0,01g de EDTA, por 30 minutos.

Após este procedimento, a referida coluna cromatográfica encontra-se preparada para ser utilizada, sendo caracterizada como ISRP.

A 6- Avaliação da coluna cromatográfica após a imobilização da proteína albumina do soro humano (HSA)

A avaliação da imobilização da proteína albumina sobre a superfície da fase estacionária foi efetuada injetando-se uma amostra de tecido de ducto deferente, fortificado com catecolaminas na concentração de 1mg mL^{-1}, empregando a fase móvel composta por solução de ácido metanosulfônico 0,013 mol L^{-1}, pH ajustado em 3,0 e acetonitrila (96:4 v/v), 0,01g de EDTA e 0,033g de ácido heptanosulfônico. Foi utilizado "loop" de 1000μL e potencial de + 85mV.

O número de pratos (N), fator de capacidade (k), assimetria de pico ($A_{s\ 0,1}$) e Resolução (Rs) foram calcul2 82 Tm(Foi a de tecido0Spa0 00 01cido met)Tj40 0 12 127.6

A 8 - Otimização da fase móvel

Para a escolha da melhor fase móvel, após estudos avaliativos foram selecionadas as concentrações adequadas dos compostos orgânicos que a compõem.

A solução de ácido metanosulfônico foi selecionada após ensaios avaliativos empregando concentrações de 0,005 a 0,02 mol L^{-1}deste ácido, sempre em 250 mL de água destilada;

A acetonitrila foi avaliada testando-se concentrações de 2 a 4%, sempre em 100mL de água destilada;

As concentrações do ácido heptanosulfônico foram avaliadas de 0,01g a 0,10g em 100mL de solução de ácido metanosulfônico 0,013 mol L^{-1}, com pH ajustado em 3,0;

Foram avaliadas concentrações de EDTA a partir de 0,0025g, (concentração utilizada por SANCHEZ et al., 2004), até 0,02 g. A concentração selecionada foi 0,01g.

Todos os ensaios foram efetuados através de injeções em triplicata de 1.000 µL de solução padrão contendo 1μg mL^{-1} de catecolaminas.

A 9 - Otimização do potencial eletroquímico

O estudo do potencial eletroquímico adequado foi avaliado testando-se potenciais entre + 30mV e + 100mV. Para cada potencial eletroquímico foram feitas injeções em triplicata de 1.000µL de solução padrão contendo 1μg mL^{-1} de catecolaminas.

A 10 - Determinação da linearidade de resposta do detector

A região linear de resposta do detector foi determinada por injeções no HPLC/ECD, com condições operacionais já otimizadas. Soluções padrão nas concentrações de 1µg L^{-1} a 0,015µg L^{-1} foram injetadas em triplicata. Deste modo, se obtive as curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina.

A 11 - Determinação do limite de detecção e limite de quantificação do sistema analítico utilizado

Neste trabalho, o critério adotado para a determinação dos limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) do sistema analítico utilizado, foi a relação sinal-ruído, onde valores de LD (3:1) e LQ (10:1), baseando-se na revisão de RIBANI et al. (2004). Foram construídas curvas analíticas com soluções nas concentrações de 1µg L^{-1} a 0,015µg L^{-1}, sendo obtidos os parâmetros da equação da reta.

As amostras foram injetadas em triplicatas, diretamente ao sistema de cromatografia líquida.

B- Avaliação da concentração de noradrenalina e adrenalina em órgãos reprodutores masculinos de ratos após simpatectomia química e suspensão do tratamento

B 1- Tratamento dos animais e coleta dos órgãos reprodutores

Foram utilizados 20 ratos machos da variedade Wistar provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, e 20 ratos machos da variedade Sprague-Dawley provenientes da Universidade de Campinas, UNICAMP, submetidos à avaliação das concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores, e 9 ratos machos controles da variedade Wistar provenientes do Biotério Central da UNESP, Campus de Botucatu, submetidos ao estudo de recuperação, totalizando 49 ratos. Os animais foram mantidos durante os experimentos no Biotério de Pequenos Mamíferos do Departamento de Morfologia do Instituto de Biociências da UNESP, em gaiolas de polietileno medindo 40x30x15cm, com substrato de maravalha, em condições controladas de luminosidade (12 horas de luz/ 12 horas de escuro, luzes apagando-se as 21:00h) e temperatura média de 23°C, recebendo água e ração a vontade.

Os animais submetidos à avaliação das concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: 5 ratos Wistar receberam guanetidina na dose de 10 mg/kg, via intraperitonial (i.p.), durante 30 dias (LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993, 1996, ROSA e SILVA et al., 1995, GUIMARÃES et al., 1997); 5 ratos Sprague-Dawley receberam guanetidina na dose de 6,25 mg/kg, via intraperitonial (i.p.), durante 21 dias (KEMPINAS et al., 1998ab). Os respectivos controles (10 ratos) receberam injeções de solução salina, seguindo o mesmo protocolo experimental.

Grupo 2: 5 ratos Wistar receberam guanetidina na dose de 10 mg/kg, via intraperitonial (i.p.), durante 30 dias (LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993, 1996, ROSA e SILVA et al., 1995, GUIMARÃES et al., 1997) e permaneceram 90 dias em período de recuperação após suspensão do tratamento; 5 ratos Sprague-Dawley receberam guanetidina na dose de 6,25 mg/kg, via intraperitonial (i.p.), durante 21 dias (KEMPINAS et al., 1998ab) e permaneceram 90 dias em período de recuperação após suspensão do tratamento. Os respectivos controles (10 ratos) receberam injeções de solução salina, seguindo o mesmo protocolo experimental.

A fim de possibilitar o cálculo da quantidade de guanetidina administrada, os animais foram pesados a cada dois dias.

A administração de guanetidina é mostrada na Figura 19.

Figura 19. Administração de guanetidina em rato Wistar.

Os animais de todos os grupos experimentais foram sedados com éter etílico e mortos por decapitação, procedendo-se à coleta da cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal (Figura 20). Os órgãos foram pesados, obtendo-se primeiramente o peso “cheio” e depois o “vazio” (sem a secreção) do ducto deferente e vesícula seminal, sendo posteriormente congelados para as análises químicas.

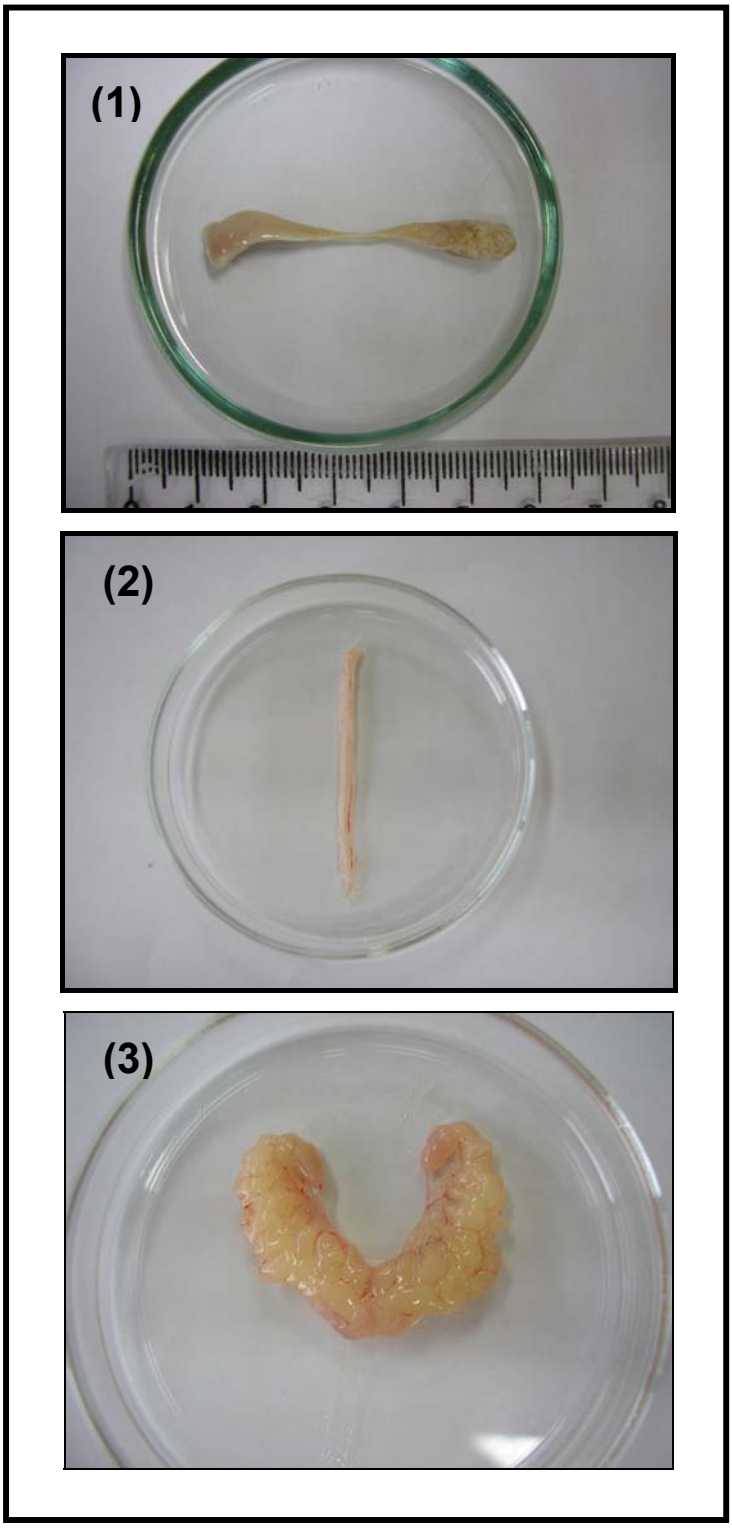


Figura 20. Órgãos reprodutores de rato Wistar. Epidídimo (1), ducto deferente (2) e vesícula seminal (3).

B 2- Tratamento das amostras de tecido

Para a **extração das catecolaminas**, a metodologia de MOURA et al. (1990) foi adaptada, utilizando-se ácido perclórico na concentração de 0,1 mol L^{-1} em amostras de tecidos para 0,4 mol L^{-1}, obedecendo a relação de 1,0: 100 (ácido: tecido / mL: mg de tecido (SANCHEZ et al., 2004). As amostras foram filtradas e diluídas (1:40 v/v) em água destilada.

Para a **avaliação do tempo de extração**, a cada 30 min foram efetuadas diluições (1:40 v/v) em água destilada, e 1.000 µL de cada uma das amostras foram injetados em triplicata no sistema de cromatografia líquida. Com o objetivo de evitar a perda de sensibilidade do eletrodo de referência, empregou-se uma válvula Switching FCV-12AH, onde o fluxo da fase móvel foi desviado do detector eletroquímico durante o tempo de eluição da amostra na coluna cromatográfica C_{18}, evitando-se a detecção de substâncias como lipídeos, proteínas, metabólitos e co-extraídos. Após 4 minutos, o fluxo da fase móvel foi novamente conectado ao detector eletroquímico e foram determinadas as catecolaminas eluídas na coluna cromatográfica C_{18} (Figura 21).

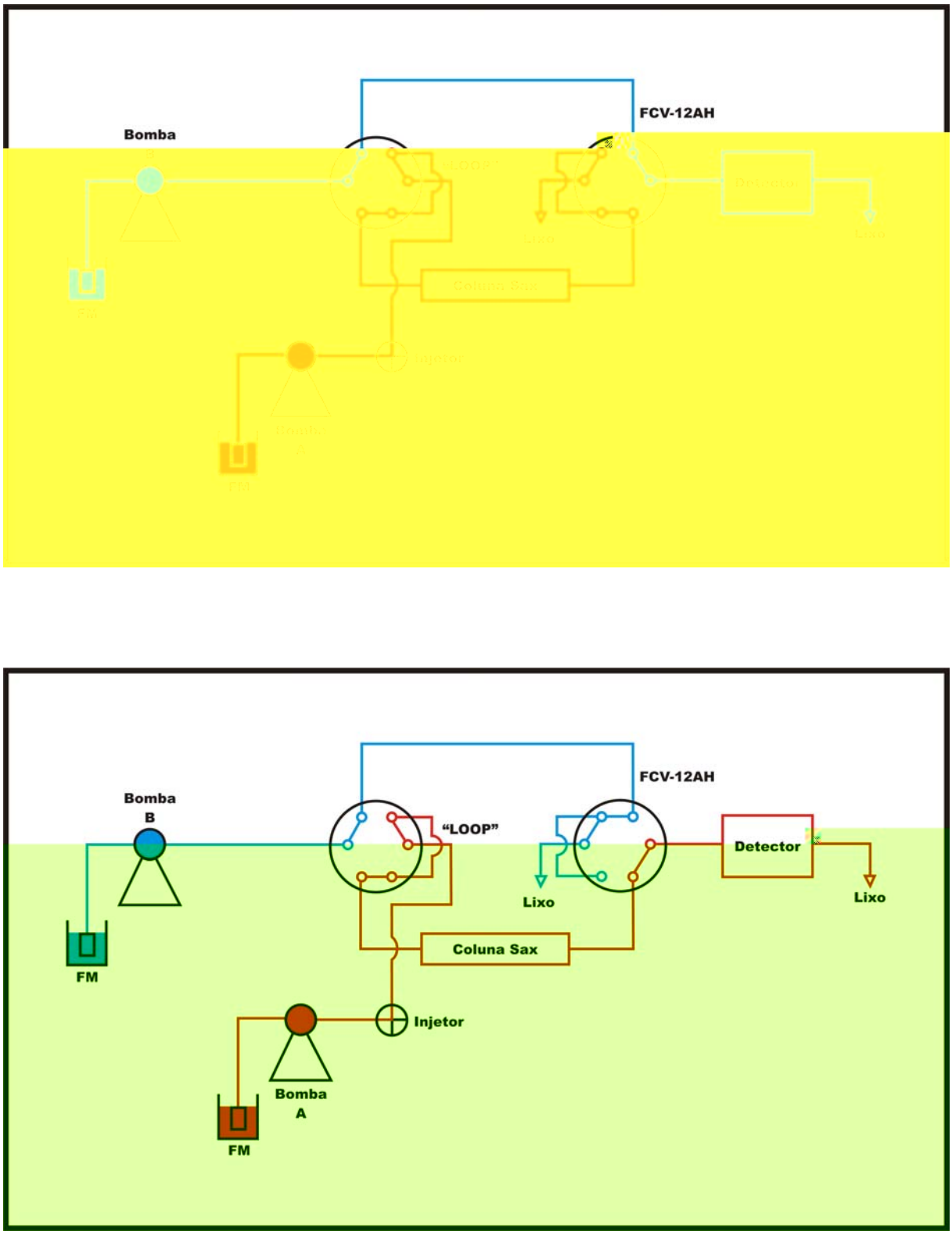


Figura 21. Esquema do sistema utilizado para a determinação das catecolaminas em cauda de epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de ratos, empregando a válvula FCV – 12AH e as bombas A e B, utilizando à mesma fase móvel. Fonte: ZEFERINO (2005).

B 3- Avaliação do método

As **fortificações** foram feitas somente para a cauda do epidídimo e o ducto deferente, empregando o método de calibração de adição padrão.

Considerando que cada animal possui dois epidídimos e dois ductos deferentes (n = 18), e que estes órgãos possuem uma concentração normal de catecolaminas, o protocolo do estudo de recuperação seguiu as seguintes etapas:

- Os órgãos foram divididos em dois grupos denominados de grupo controle (n = 9) e grupo fortificado (n = 9);
- Cada grupo foi dividido em três subgrupos (n = 3 cada subgrupo);
- Foi determinada a concentração de noradrenalina e adrenalina dos subgrupos controle, e a partir dos valores obtidos e da diferença observada entre os tecidos, as amostras de cauda do epidídimo e ducto deferente foram fortificadas:

⇨ As caudas de epidídimo foram fortificadas com 30, 40 e 50 µL, respectivamente, de solução aquosa contendo 2.000µg L^{-1} de noradrenalina e adrenalina;

⇨ Os ductos deferentes foram fortificados com 30, 40 e 50 µL de solução aquosa contendo 2.000 µg L^{-1} de adrenalina, e 60, 70 e 80 µL de solução aquosa contendo 2.000 µg L^{-1} de noradrenalina.

O peso dos órgãos reprodutores e os volumes de ácido perclórico adicionados estão descritos nas Tabelas 1 e 2 do Anexo A.

Para o **estudo de recuperação**, primeiramente fez-se a extração da noradrenalina e adrenalina de acordo com a metodologia adaptada descrita na Seção B2. Para a determinação da noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores foi empregado o método de calibração de adição padrão.

Para cada amostra dos subgrupos (n = 3), controle e fortificado, foram feitas quatro diluições em água destilada (1:40 v/v). A seguir foram adicionados volumes de 1, 2 e 4 µL, respectivamente, de solução padrão (2.000 µg L^{-1}), a partir da segunda diluição, obtendo-se concentrações de 0,5, 1 e 2 µg L^{-1} de noradrenalina e adrenalina. A primeira diluição de cada subgrupo é denominada de amostra testemunha. Deste modo, foram obtidas as curvas analíticas. A exatidão e a precisão dos resultados foram determinadas efetuando-se os cálculos de noradrenalina e adrenalina recuperadas em tecido, e o respectivo coeficiente de variação.

Neste estudo de recuperação, as injeções foram realizadas em triplicata para cada diluição de cada subgrupo.

B 4- Amostra real

A quantificação das catecolaminas nas amostras reais foi realizada pelo método de calibração de adição padrão.

As amostras foram extraídas sem a adição do padrão (amostra testemunha) para a verificação da presença ou não da noradrenalina e adrenalina e com adição do mesmo (n = 3 / concentrações de 0,5, 1 e 2 µg L^{-1}) a fim de verificar o LQ do método. As amostras foram injetadas em triplicata.

C- Análise estatística

Os resultados obtidos para as concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores foram submetidos à análise não paramétrica dos dados, sendo aplicado o teste de Mann-Whitney, considerando o nível de significância menor que 0,05.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A- Desenvolvimento, validação e aplicação do método

A 1- Avaliação dos parâmetros cromatográficos após imobilização da proteína albumina do soro humano (HSA)

A partir da otimização das condições cromatográficas foram obtidos cromatogramas após a injeção de 1000μL de solução padrão de catecolaminas, possibilitando a avaliação dos parâmetros cromatográficos.

A medida da eficiência da coluna, baseada em número de pratos (N) foi calculada a partir de um cromatograma obtido após o condicionamento da coluna.

O número de pratos calculados para a referida coluna cromatográfica ISRP-C_{18} - HSA é considerado satisfatório como mostra a Tabela 3, conforme cromatograma fgigustr22na.

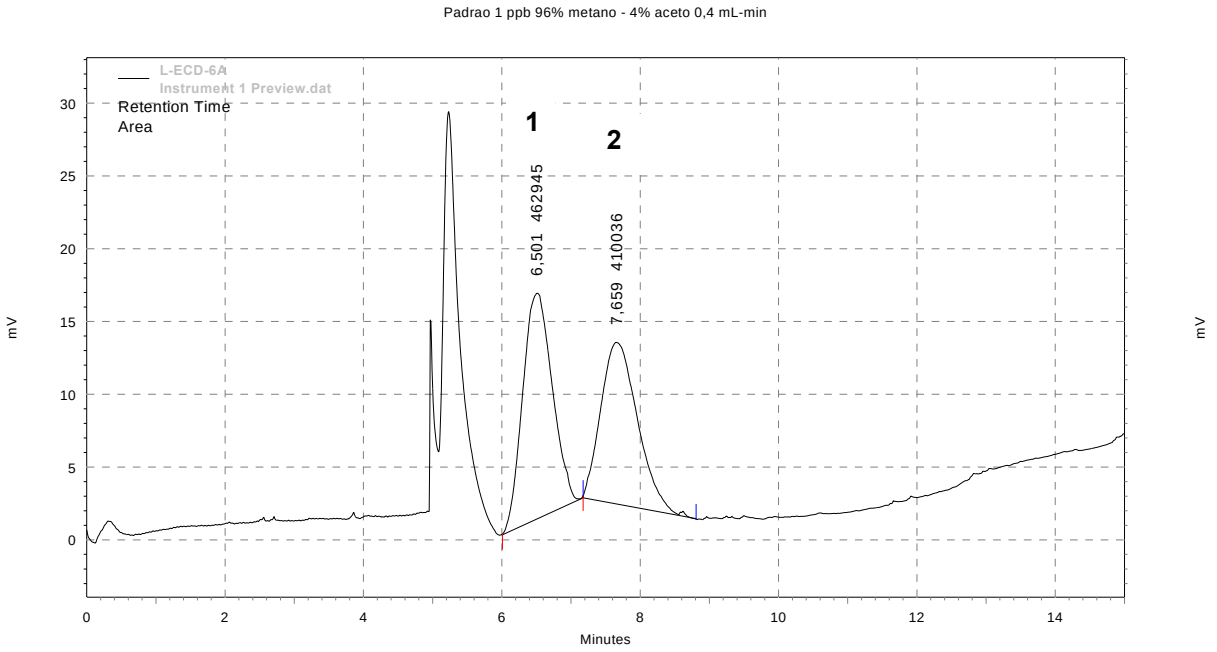


Figura 22. Cromatograma de solução padrão (1,0μg mL^{-1}).
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina).

Após a imobilização da albumina de soro humano sobre a superfície das partículas esféricas da fase estacionária C_{18} ocorre a redução dos sítios ativos da mesma. Assim, justifica-se o valor reduzido de número de pratos da coluna empregada, resultado também encontrado para as catecolaminas estudadas em plasma e glândula adrenal de ratos, por SANCHEZ et al. (2004).

Os valores para o k devem variar entre 2 e 10 para dois componentes. Valores maiores que 10 significam uma forte interação do soluto com a fase estacionária e, consequentemente, um longo tempo de análise. Por outro lado, valores de k menores que 2 implicam em pouca interação com a fase estacionária, o que pode ser prejudicial à análise. Os valores de k obtidos encontram-se entre 1,6 e 2,06.

Salienta-se que são considerados coeficientes de assimetria excelentes os coeficientes com valores entre 1,0 e 1,5 (CIOLA, 1998). Deste modo, de acordo com os valores obtidos, pode-se inferir que a coluna cromatográfica apresentou um excelente desempenho cromatográfico. Os resultados corroboram com SANCHEZ et al. (2004), que utilizando a mesma coluna cromatográfica para avaliar catecolaminas em glândula adrenal e plasma de ratos, encontrou valores de 1,35 para a noradrenalina e 1,07 para a adrenalina.

A 2- Otimização da fase móvel

A avaliação deste parâmetro para a análise cromatográfica é muito importante, uma vez que pequenas variações na composição da fase móvel podem alterar significativamente o desempenho cromatográfico e a separação dos analitos avaliados.

A otimização da fase móvel foi obtida após ensaios de diferentes concentrações dos compostos orgânicos que a compõem, conforme descrito na Seção A8 do item Material e Métodos. A fase móvel mais adequada para a separação das catecolaminas foi composta por um sistema de solventes contendo solução de ácido metanosulfônico 0,013 mol L^{-1}, com pH ajustado em 3,0, acetonitrila (96:4 v/v), 0,033g de ácido heptanosulfônico e 0,01g de EDTA.

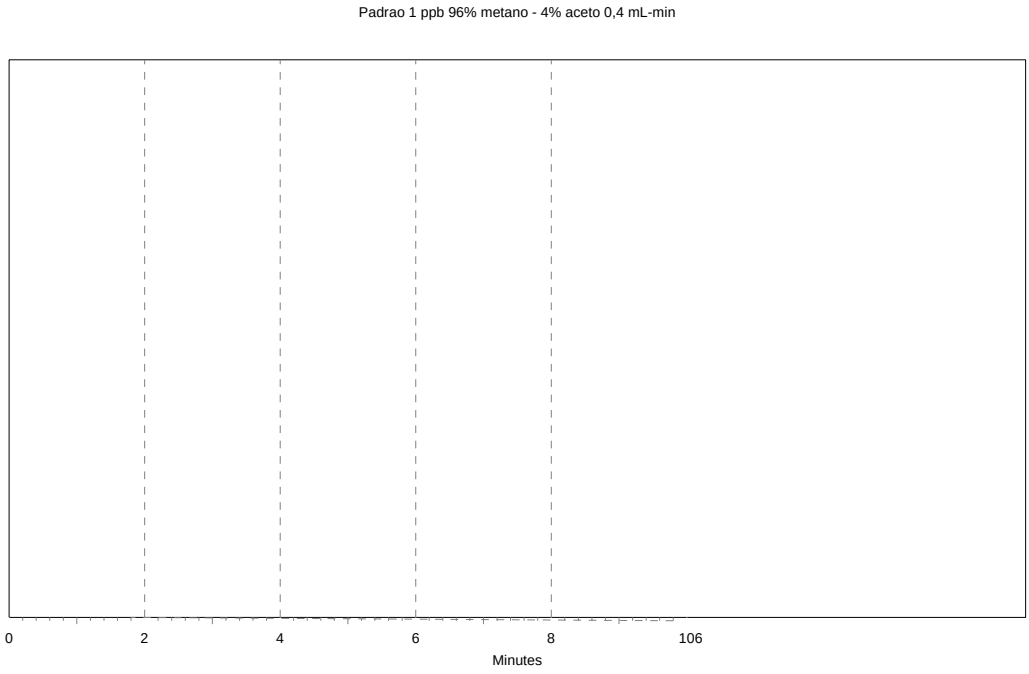
O emprego do ácido metanosulfônico na concentração 0,013 mol L^{-1} melhorou significativamente a estabilização da linha de base do detector eletroquímico.

O ácido heptanosulfônico é necessário para promover a retenção das catecolaminas na fase estacionária ISRP-C_{18}, devido à capacidade de formação de par iônico. Foram testadas diferentes concentrações deste ácido (Seção A8 do item Material e Métodos). A literatura descreve alguns trabalhos que utilizaram 1,5 mM (KEMPINAS et al., 1998) e 556 mg L (NAFFAH-MAZACORATTI et al., 1992). Tendo em vista a necessidade de uma metodologia que apresentasse um baixo limite de detecção e um bom desempenho cromatográfico, optou-se por trabalhar com a concentração de 0,033g de ácido heptanosulfônico em 100 mL de fase móvel. Desta forma, pode-se inferir que este composto contribuiu significativamente para a separação das catecolaminas, bem como para a obtenção de um bom desempenho cromatográfico.

A escolha da quantidade de EDTA, de 0,01g foi adaptada de SANCHEZ et al. (2004), que utilizou 0,0025g. Após a avaliação de concentrações de 0,0025 a 0,02g, constatou-se que a concentração adequada deste composto para as condições cromatográficas estabelecidas neste trabalho é de 0,01g. SANCHEZ et al. (2004) utilizaram fase móvel com metanol para determinar catecolaminas em plasma e glândula adrenal de ratos. Portanto, as condições cromatográficas eram diferentes.

O pH da fase móvel mostrou-se um parâmetro relevante, uma vez que a utilização de pH ácido (pH = 3,0) proporcionou boa resolução dos picos, sem que houvesse alteração significativa na separação e determinação das catecolaminas. O pH não alterou a composição e o comportamento cromatográfico da fase estacionária ISRP-C_{18} bem como a imobilização *"in situ"* da proteína albumina do soro humano (HSA) (MENEZES e FÉLIX, 1996).

A Figura 23 apresenta um cromatograma obtido após a injeção de 1000μL de solução padrão de catecolaminas na concentração de 1,0μg mL^{-1}, diretamente na coluna cromatográfica C_{18} – ISRP, utilizando a fase móvel selecionada.



Neste trabalho, após ensaios para a otimização do potencial eletroquímico, conforme descrito na Seção A9 do item Material e Métodos, constatou-se que o mais adequado para a análise das catecolaminas em tecidos de órgãos reprodutores foi o de +85mV, conforme mostram os gráficos das Figuras 24 e 25.

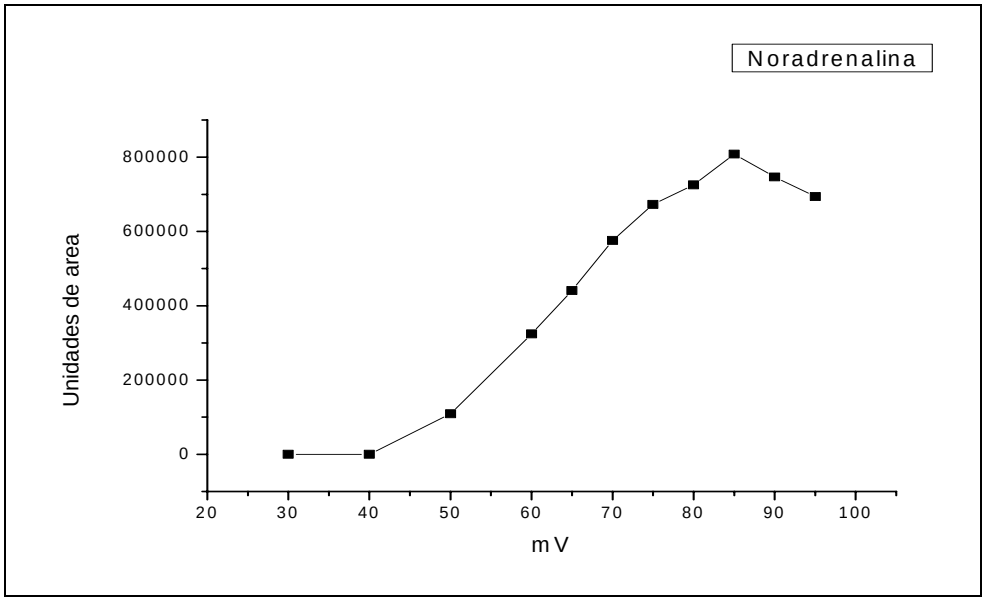


Figura 24. Voltamograma obtido para a noradrenalina após estudo de vários potenciais empregando detector eletroquímico.

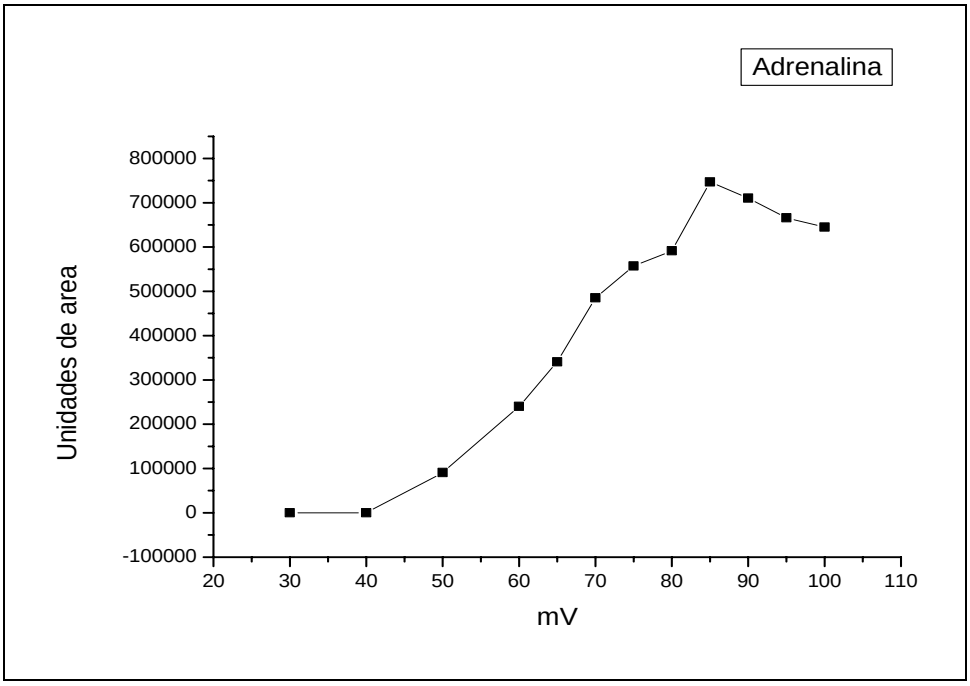


Figura 25. Voltamograma obtido para a adrenalina após estudo de vários potenciais empregando detector eletroquímico.

A 4- Linearidade de resposta do detector e determinação do limite de detecção e limite de quantificação do sistema analítico utilizado

Os limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) determinados foram 0,015 $\mu g\ L^{-1}$ e 0,030 $\mu g\ L^{-1}$, respectivamente.

Os valores encontrados evidenciam linearidade satisfatória na determinação da noradrenalina e adrenalina com o sistema de detecção empregado para o intervalo de concentração avaliado. Analisando as equações das retas obtidas, observou-se que o modelo linear para a determinação das catecolaminas por HPLC com detector eletroquímico é adequado, já que os coeficientes de correlação foram 0,999 para a noradrenalina e 0,998 para a adrenalina. Estes valores expressam a relação entre e as áreas dos picos cromatográficos nos intervalos utilizados (y) e as concentrações das catecolaminas (x). A relação de x e y na curva é expressa como r^2 (coeficiente de correlação), onde os valores ideais esperados são 1 e –1, ou seja, quanto mais próximo da unidade, maior a probabilidade de existir uma relação linear bem definida (LEITE, 1998, CAUSON, 1997).

As curvas analíticas da noradrenalina e adrenalina são mostradas nas Figuras 26 e 27, referentes aos parâmetros descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros das curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina.

Analito	Equação de regressão linear	Coeficiente de correlação
Noradrenalina	y = 6461,99 + 452,52. x	0,999
Adrenalina	y =2372,12 + 385,33. x	0,998

X é expresso em ng mL^{-1} e y é expresso em unidade de área.

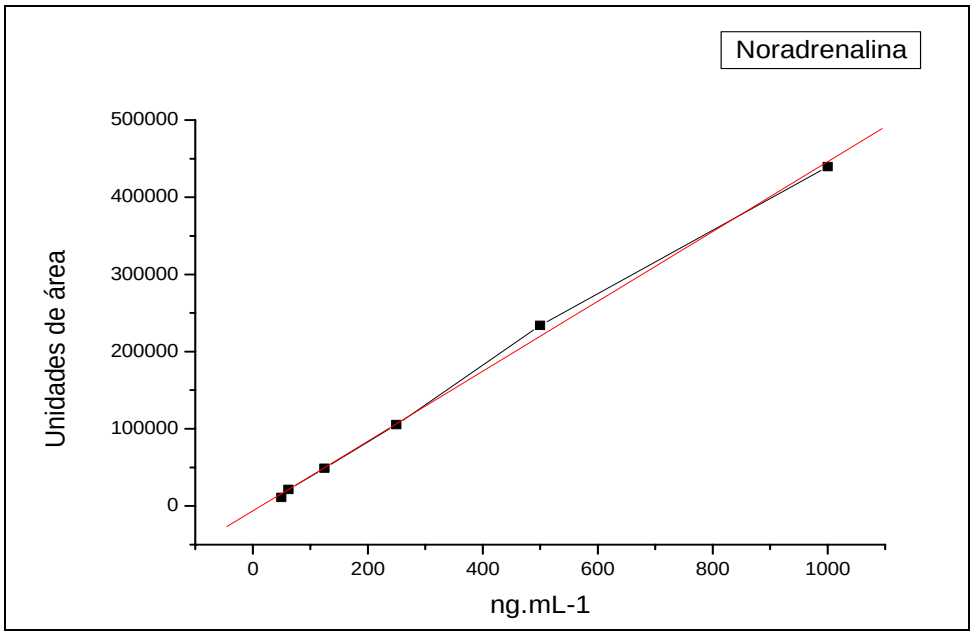


Figura 26. Curva analítica para a noradrenalina.

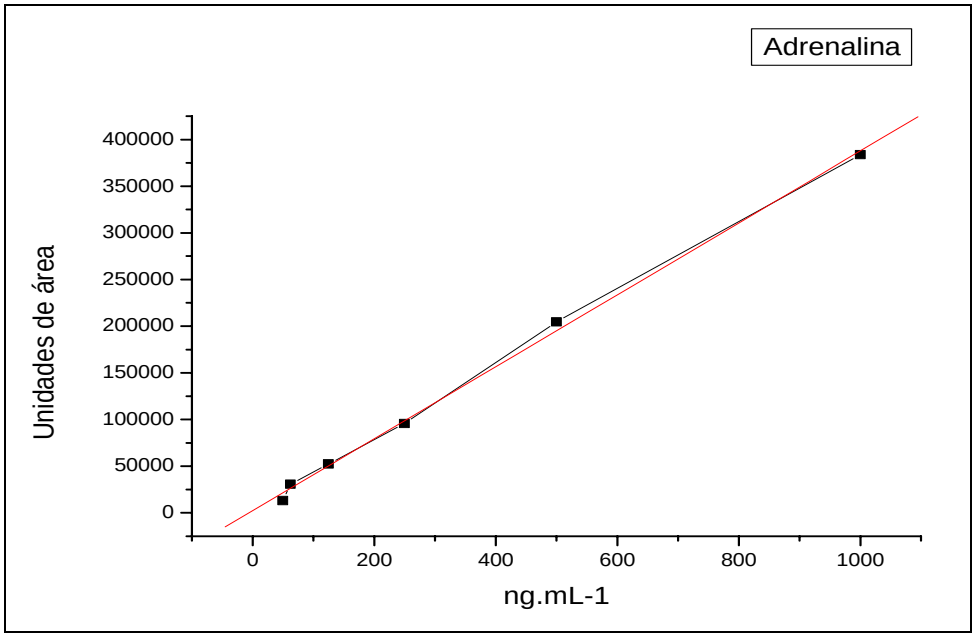


Figura 27. Curva analítica para a adrenalina.

A 5- Tratamento das amostras

O procedimento de **extração das catecolaminas** foi realizado utilizando o órgão inteiro. É importante enfatizar que a relação de 1,0 mL de ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} para cada 100 mg de tecido (SANCHEZ et al., 2004), deve ser considerada importante, uma vez que toda a amostra permanece imersa na solução ácida.

Fez-se necessária **a diluição** dos extratos das amostras de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal em água destilada, na proporção de 1:40 v/v para reduzir a concentração do ácido perclórico para 0,01 mol L^{-1} estabilizando o pH da fase móvel em 3,0, possibilitando a retenção das catecolaminas na coluna cromatográfica C_{18}.

Na avaliação do **tempo de extração**, observou-se que o melhor rendimento de extração para a noradrenalina foi de 90 min para a análise da cauda do epidídimo e 60 min para a análise do ducto deferente. A extração para a adrenalina nas duas matrizes manteve-se constante a partir de 30 min.

Levando-se em consideração que o ducto deferente apresentou concentrações maiores de catecolaminas quando comparado à cauda do epidídimo, era esperado um maior tempo para obter um maior rendimento de extração. Entretanto, isto não ocorreu uma vez que há uma acentuada diferença entre os tecidos desses órgãos.

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos para a avaliação do tempo de extração. Na Tabela 6 estão descritos a massa e o volume de ácido perclórico adicionado nas amostras de tecidos utilizadas.

Tabela 5. Avaliação do tempo de extração da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) em uma amostra de cauda do epidídimo (CE) e uma amostra de ducto deferente (DD) de rato Wistar.

Tempo de extração (CE)	Volume (mL)	NA (ng)	ADR (ng)	Tempo de extração (DD)	Volume (mL)	NA (ng)	ADR (ng)
30 min	1,86	0,78	**0,48**	30 min	0,70	3,94	**5,14**
60 min	1,76	1,06	0,37	60 min	0,60	**3,86**	5,27
90 min	1,66	**1,50**	0,48	90 min	0,50	3,06	4,01
120 min	1,56	1,35	0,31	120 min	0,40	2,54	3,22
150 min	1,46	1,34	0,39	150 min	0,30	1,91	2,42

Tabela 6. Peso da cauda do epidídimo (CE) e ducto deferente (DD) de rato Wistar empregado na avaliação do tempo de extração e volume de ácido perclórico 0,4 mol L adicionado.

Órgão	Massa (mg)	Volume (mL)
CE 1	186,0	1,86
DD 1	70,0	0,70

N = número de animais

A 6- Validação do método

Para a validação do método foram avaliados os parâmetros: seletividade, linearidade, limite de quantificação e estudo de recuperação.

A 6.1- Seletividade

Para avaliar a seletividade do método proposto foram comparados os cromatogramas das amostras testemunhas e das amostras fortificadas. De acordo com as Figuras 28 e 29, nenhum interferente elui no tempo de retenção das substâncias de interesse.

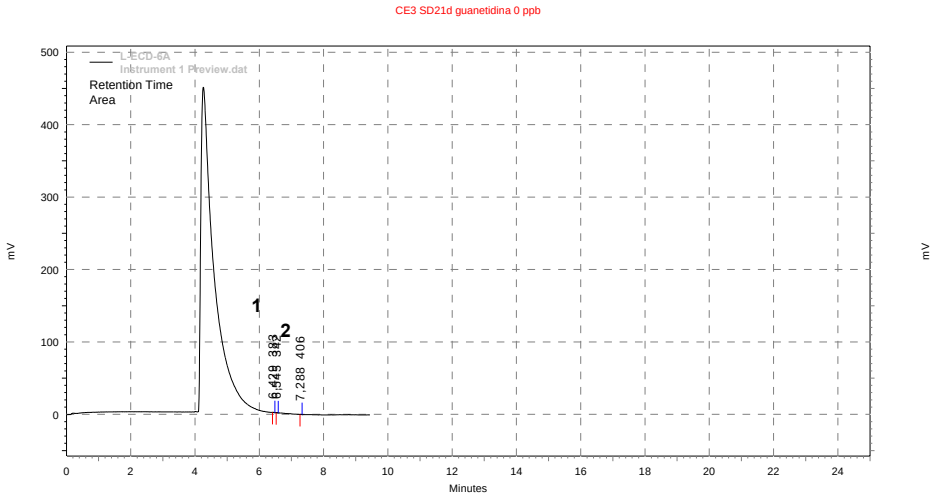


Figura 28. Cromatograma obtido com amostra testemunha de cauda de epidídimo.
(1 = noradrenalina; 2 = adrenalina)

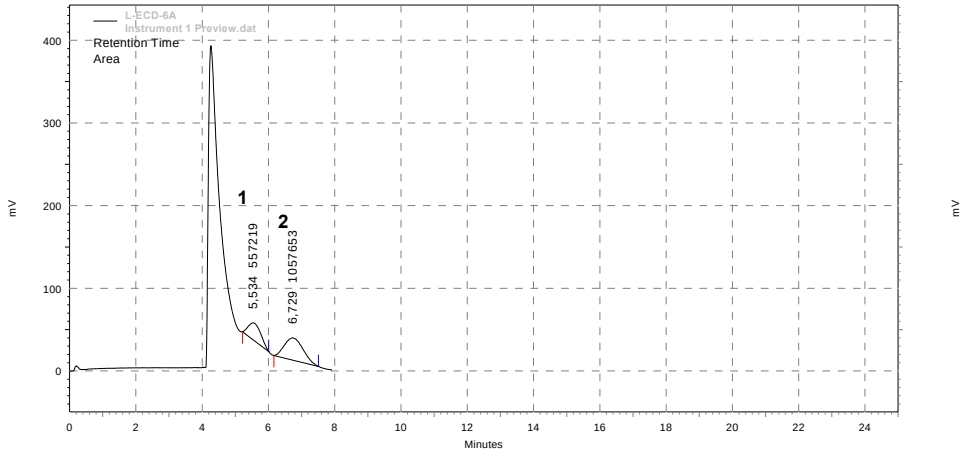


Figura 29. Cromatograma obtido com amostra fortificada de cauda de epidídimo (0,5µg L^{-1}).
(1 = noradrenalina; 2 = adrenalina)

A 6.2- Linearidade do método

A determinação da linearidade está em obter resultados em proporção direta às concentrações das substâncias em estudo dentro de uma determinada faixa de concentração. Portanto, a linearidade está relacionada diretamente com o sistema de emissão analítica. A linearidade determina a região da curva analítica ou de resposta em que há relação direta sinal-concentração (LEITE, 2000).

A linearidade das catecolaminas foi estudada pelos valores obtidos através do método de calibração de adição padrão, conforme descrito na Seção A10 do item Material e Métodos.

Foram obtidos coeficientes de correlação significativos, 1,0 para a noradrenalina e 0,99923 para a adrenalina. Desta forma, pode-se inferir que o método analítico apresenta linearidade satisfatória para as catecolaminas entre as concentrações (x) e as áreas dos picos cromatográficos nos intervalos analisados (y).

Os parâmetros das curvas analíticas obtidas para a noradrenalina e adrenalina estão expressos na Tabela 7, e as respectivas curvas analíticas são mostradas nas Figuras 30 e 31.

Tabela 7. Parâmetros das curvas analíticas para a noradrenalina e adrenalina.

Analito	Equação de regressão linear	Coeficiente de correlação
Noradrenalina	y = - 1685,6 + 999.986,68. x	1,00000
Adrenalina	y = 14125,4 +729.567,82. x	0,99923

X é expresso em ng mg^{-1} e y é expresso em unidade de área.

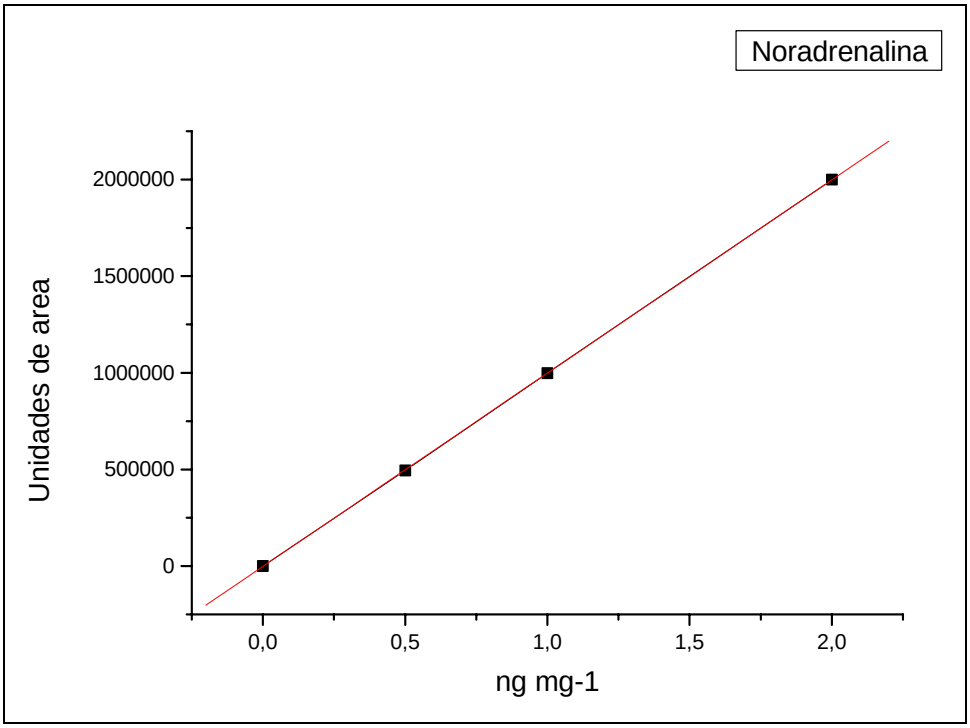


Figura 30. Curva analítica para a noradrenalina.

0,0 0,

A 6.3- Determinação do limite de quantificação do método

Segundo RIBANI et al. (2004), o limite de quantificação (LQ) pode ser determinado de várias formas. O método visual proporcionou os resultados apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Limite de quantificação para a noradrenalina e adrenalina nas amostras de tecidos de órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley.

Órgão do animal	*(LQ) Noradrenalina (μg L^{-1})	*(LQ) Adrenalina (μg L^{-1})
Wistar		
Cauda do epidídimo	0,027	0,051
Ducto deferente	0,030 *= LQ	0,030 *= LQ
Vesícula seminal	0,014 *< LD	0,050
Sprague-Dawley		
Cauda do epidídimo	0,010 *< LD	0,010 *< LD
Ducto deferente	0,010 *< LD	0,009 *< LD
Vesícula seminal	0,008 *< LD	0,010 *< LD

*LQ: concentração visível que permite a quantificação com precisão e exatidão

*<LD: menor que o limite de detecção

*=LQ: igual ao limite de quantificação

O método proposto para este estudo conseguiu atingir valores menores de LQ para a noradrenalina e adrenalina em amostras de tecidos de órgãos reprodutores de ratos, que os descritos pela literatura para vários tecidos e/ou amostras biológicas, mostrando-se bem mais sensível. Com exceção de SASTRE et al. (2004), que analisando córtex cerebral e plasma de rato, obteve para a noradrenalina LD de 0,6 ng mL, e PATEL et al. (2005) que quantificou dopamina, noradrenalina e adrenalina em diferentes tecidos, e encontrou valores de LD de 4,20, 0,47 e 1,47 ng mL, respectivamente, um grande número de trabalhos (PAPPA-LOUISI et al., 1997, CHI et al., 1999, TAVARES et al., 2003) não citam o limite de detecção e quantificação do método.

A maioria dos trabalhos relata o pré-tratamento da amostra, empregando a homogeneização e centrifugação, antes da análise por HPLC. A metodologia proposta não necessita do pré-tratamento da amostra devido ao emprego da coluna cromatográfica ISRP-C_{18} imobilizada com HSA (MENEZES e FÉLIX, 1996), a qual

permite a injeção direta da amostra.

O método proposto apresenta sensibilidade adequada para este tipo de estudo, uma vez que se esperava detectar baixas concentrações das catecolaminas, principalmente de noradrenalina, pelo fato de ocorrer diminuição significativa deste neurotransmissor após simpatectomia química dos órgãos reprodutores (RANG et al., 2004).

A 6.4- Estudo de recuperação

A veracidade do método ou a exatidão, sempre que disponível deve ser avaliada utilizando amostras cuja concentração do analito no material é garantida por instituições normatizadoras (amostras certificadas). Quando este tipo de material não está disponível, é aceitável que a exatidão do método bioanalítico seja avaliada através de amostras testemunhas fortificadas, comparando os valores encontrados com a concentração do padrão adicionado (CAUSON, 1997; CHASIN et al., 1998).

De acordo com o roteiro de validação para amostras biológicas (CHIAP et al., 1999; SWARTZ e KRULL, 1998) os valores de recuperação devem estar entre 70 e 110 %, porém, conforme a complexidade da matriz utilizada e a repetibilidade dos resultados, eles podem apresentar-se entre 60 e 120%, com precisão de $\pm$ 20%.

CHI et al. (1999), demonstraram valores de recuperação de 98,6 $\pm$ 1,2% para a noradrenalina e 98,4 $\pm$ 1,3% para a dopamina. SANCHEZ et al. (2001), determinaram noradrenalina e adrenalina em plasma de rato por injeção direta em HPLC/ECD e obtiveram valores, com a concentração mais alta de fortificação (4,0 $\mu g\ mL^{-1}$), de 82,35% e CV de 8,0% e 89,30% e CV de 4,7%, respectivamente. A análise de dopamina em diferentes tecidos biológicos proporcionou resultados de recuperação entre 104,32 $\pm$ 8,04 e 52,82 $\pm$ 5,08 (PATEL et al., 2005).

Neste trabalho, os valores de recuperação situaram-se entre 56 e 114 %, com CV entre 3,8 e 23% (Tabelas 9 e 10), nos níveis de fortificações de 30, 40 e 50µL dos padrões para a cauda do epidídimo e 30, 40 e 50µL de adrenalina e 60, 70 e 80µL de noradrenalina para o ducto deferente. Assim, os resultados obtidos neste estudo foram próximos aos encontrados em métodos descritos pela literatura especializada, mostrando-se em concordância com os valores aceitáveis para a validação de nova metodologia em amostras biológicas.

Estes dados inferem ainda, que o emprego do ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} na extração (SANCHEZ et al., 2004) e da coluna cromatográfica ISRP – C_{18} imobilizada com HSA (MENEZES e FÉLIX, 1996) são adequados para efetuar a determinação de noradrenalina e adrenalina em amostras reais de tecidos de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de ratos.

Tabela 9. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) na cauda do epidídimo (CE) de ratos Wistar.

Órgão (n = 9)	Concentração fisiológica de NA e ADR (ng mg)		Concentração fisiológica de NA e ADR fortificada (ng mg)		Concentração de NA e ADR detectada (ng mg)		Recuperação (%)		CV (%)	
							(NA)	(ADR)	(NA)	(ADR)
CE 1	0,030	0,015	0,840	0,830	0,680	0,830	81	100		
CE 2	0,050	0,034	0,820	0,710	0,920	0,660	112	93	16,50	11,15
CE 3	0,070	0,360	0,820	1,110	0,760	0,830	62	74		
CE 4	0,110	0,040	1,070	1,000	1,020	0,980	95	98		
CE 5	0,050	0,450	1,400	1,800	1,430	1,580	102	56	3,80	10,70
CE 6	0,024	0,018	1,200	1,200	1,120	1,310	101	109		
CE 7	0,310	0,090	0,900	0,680	0,760	0,730	85	107		
CE 8	0,020	0,016	1,150	1,140	0,980	1,100	85	96	4,00	6,40
CE 9	0,030	0,057	1,310	1,340	1,190	1,450	91	108		

N = Número de órgãos.

Tabela 10. Avaliação da recuperação da noradrenalina (NA) e adrenalina (ADR) no ducto deferente (DD) de ratos Wistar.

Órgão (n = 9)	Concentração fisiológica de NA e ADR (ng mg)		Concentração fisiológica de NA e ADR fortificada (ng mg)		Concentração de NA e ADR detectada (ng mg)		Recuperação (%)		CV (%)	
							(NA)	(ADR)	(NA)	(ADR)
DD 1	0,021	0,010	4,170	2,610	3,680	3,130	88	120		
DD 2	0,060	0,038	3,910	2,450	3,510	2,100	90	86	6,15	19,13
DD 3	0,017	0,059	3,500	2,230	2,800	1,980	80	89		
DD 4	0,110	0,040	3,070	1,520	2,180	1,030	71	68		
DD 5	0,016	0,027	3,020	1,530	2,700	1,230	89	80	23,00	8,10
DD 6	0,110	0,070	3,040	1,590	1,760	1,200	56	75		
DD 7	0,080	0,020	3,410	1,690	3,370	1,940	99	114		
DD 8	0,070	0,010	4,380	2,470	3,500	2,220	80	90	13,50	16,00
DD 9	0,011	0,028	3,340	1,980	2,600	1,680	98	85		

N = Número de órgãos

A 7- Amostra real

As amostras de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal foram analisadas de acordo com o método validado anteriormente, sendo determinadas as concentrações de noradrenalina e adrenalina pelo método de calibração de adição padrão.

Embora, os valores encontrados para as concentrações de noradrenalina e adrenalina em órgãos reprodutores das duas variedades de ratos tenham sido menores que os valores obtidos para o limite de detecção (LD) do sistema analítico utilizado, eles devem ser considerados muito significantes dentro do contexto farmacológico visto que, a noradrenalina sofre depleção na terminação nervosa após a simpatectomia química por guanetidina (RANG et al., 2004). Deste modo, se esperava detectar baixas concentrações desse neurotransmissor.

As Figuras 32, 33 e 34 mostram exemplos de cromatogramas obtidos a partir do extrato ácido de cauda de epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de ratos Wistar. As Figuras 35, 36 e 37 correspondem a cromatogramas dos extratos ácidos de cauda do epidídimo, ducto deferente e vesícula seminal de ratos Sprague-Dawley.

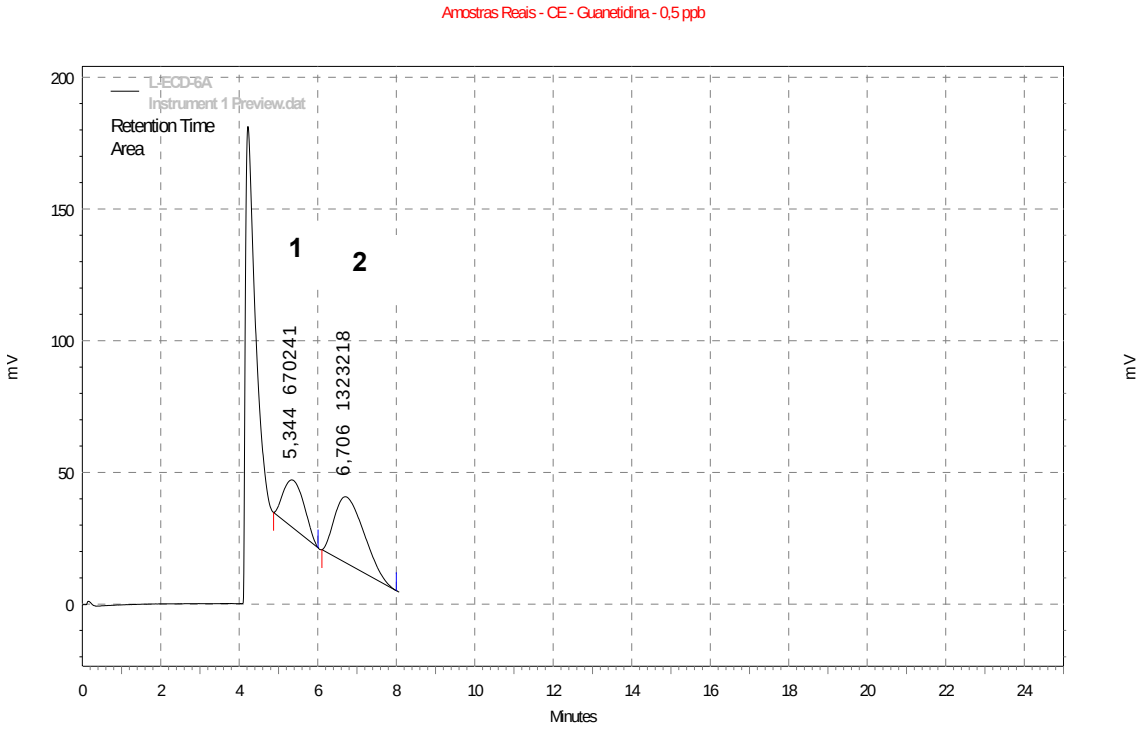


Figura 32. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de cauda de epidídimo de rato Wistar tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 0,5µg L^{-1}.
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina)

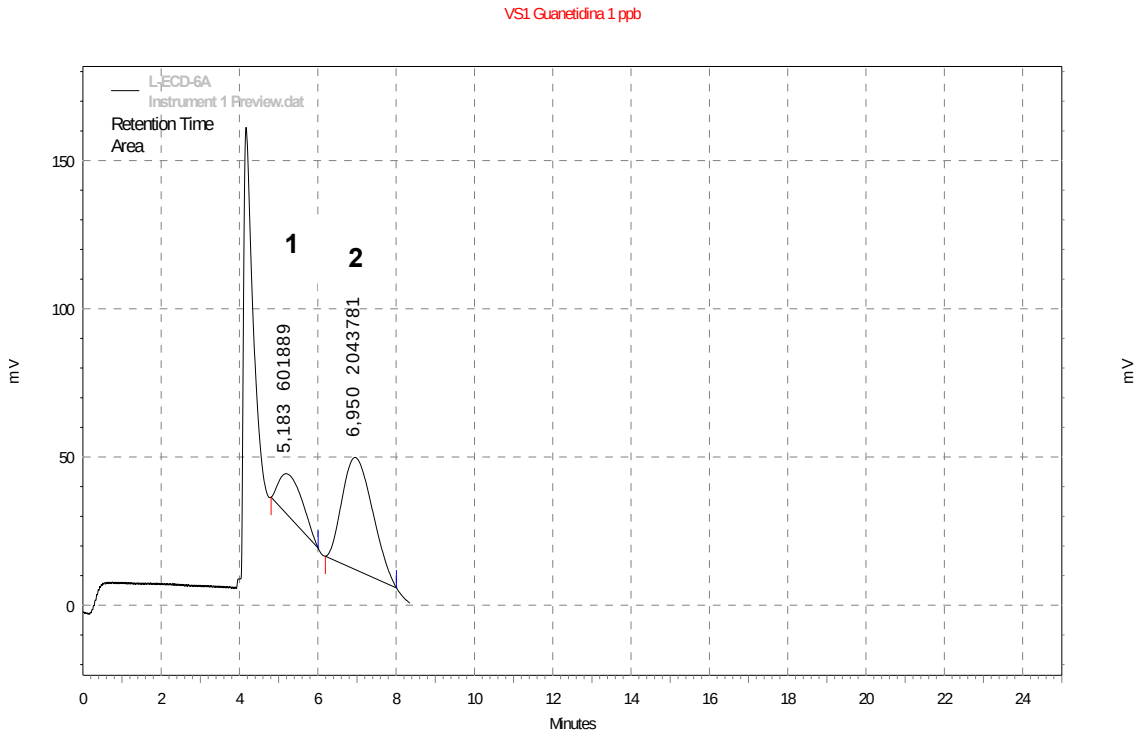


Figura 34. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de vesícula seminal de rato Wistar tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0µg L^{-1}.
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina)

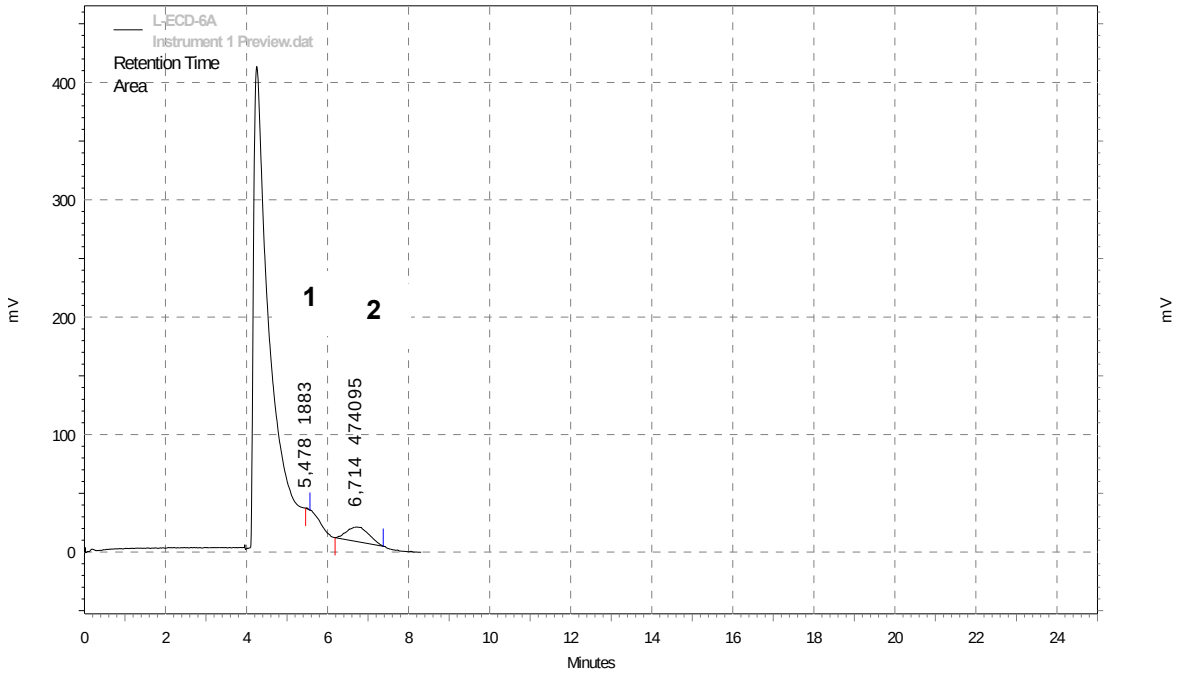


Figura 35. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de cauda de epidídimo de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0µg L^{-1}.
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina)

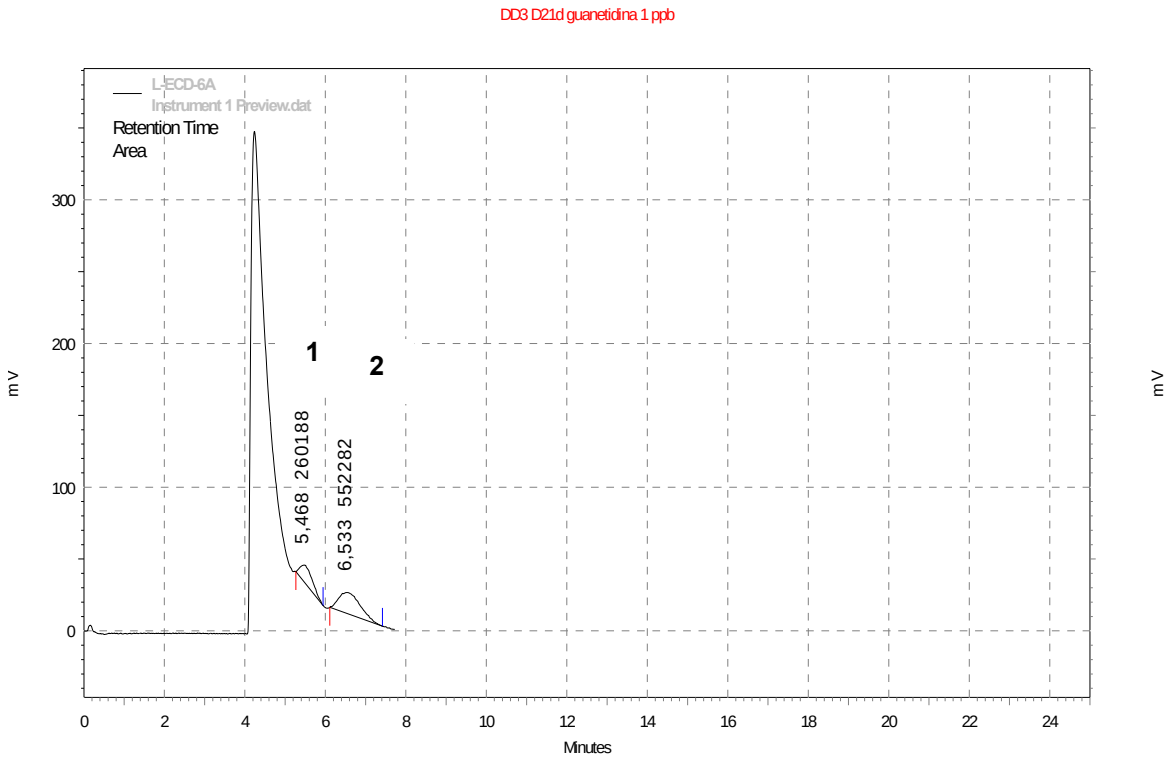


Figura 36. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de ducto deferente de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0µg L^{-1}.
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina)

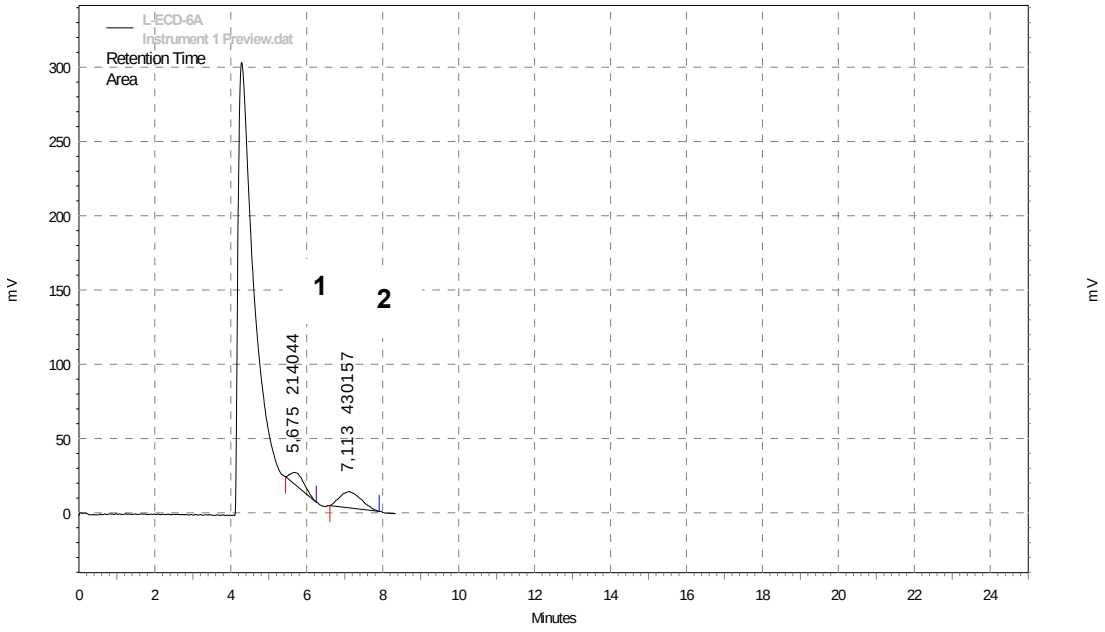


Figura 37. Cromatograma do extrato ácido da amostra real de vesícula seminal de rato Sprague-Dawley tratado com sulfato de guanetidina, com adição de padrão de 1,0µg L^{-1}.
(1 = Noradrenalina; 2 = Adrenalina)

A 8- Comparação do método analítico desenvolvido com outras técnicas analíticas empregando HPLC para a determinação de noradrenalina e adrenalina em tecidos biológicos

Várias técnicas para a determinação de noradrenalina e adrenalina em tecidos e fluidos biológicos necessitam do pré-tratamento da amostra (NAFFAH-MAZACORATTI et al., 1992, PAPPA-LOUISI et al., 1997, CHI et al., 1999, SASTRE et al., 2004, PATEL et al., 2005), geralmente requerem a homogeneização e centrifugação, antes da análise por HPLC. Métodos de extração em fase sólida ou extração por solventes também são comumente usados. Alguns trabalhos (PAPPA-LOUISI et al., 1997, KEMPINAS et al., 1998, CHI et al., 1999, SASTRE et al., 2004) utilizaram a própria fase móvel no procedimento de extração. TAVARES et al. (2003) e PATEL et al. (2005), extraíram as catecolaminas com ácido perclórico na concentração de 0,1mol L^{-1}. A literatura (MOURA et al., 1990, NAFFAH-MAZACORATTI et al., 1992) também descreve o uso do ácido perclórico nessa mesma concentração, seguido da alumina como técnica de extração.

É importante enfatizar que o pré-tratamento da amostra pode induzir a alguns problemas, tais como: o tempo dispensado no processo, manuseio laborioso, erros de manipulação, contaminação por outros agentes, alto custo, decomposição de alguns compostos, entre outros.

O presente método analítico desenvolvido dispensa o pré-tratamento da amostra, fato importantíssimo no diagnóstico e tratamento de doenças relacionadas às catecolaminas, na qual se faz necessário a rapidez na quantificação destes hormônios.

Em cada um dos trabalhos supracitados foram desenvolvidas fases móveis diferentes para a eluição dos analitos no material biológico. Há artigos (TAVARES et al., 2003, PATEL et al., 2005) que empregaram fases móveis com cinco ou mais componentes na mistura, aumentando as chances de erros e de variação nos resultados obtidos, além de favorecer o aumento da pressão do sistema cromatográfico, contribuindo para a diminuição da vida útil do equipamento (QUATTROCCHI et al., 1992).

Muitos trabalhos da literatura não apresentam na análise dos parâmetros cromatográficos bem como na validação analítica, como por exemplo: o limite de detecção e/ou de quantificação (PAPPA-LOUISI et al., 1997, CHI et al., 1999,

TAVARES et al., 2003), valores de recuperação e o respectivo CV (PAPPA-LOUISI et al., 1997, TAVARES et al., 2003) e o volume da amostra injetado (PATEL et al., 2005), entre outros fatores.

Quanto às aplicações do método analítico proposto, pode ser bastante útil para fins de estudos cinéticos, de controle terapêutico, na dosagem plasmática de noradrenalina e adrenalina, no diagnóstico de patologias ligadas ao metabolismo e excesso ou falta desses hormônios, bem como ao sistema imune, uma vez que as catecolaminas vêm mostrando importante função no sistema imune, controlando a apoptose de linfócitos (BERGQUIST et al., 1998, 2002). Além disso, estão envolvidas no controle de muitos processos metabólicos, secreção de hormônios (BREINDENBACH et al., 1998, KNIGGE et al., 1999, VALET e SAULNIER - BLACHE, 1999, DEMARIA et al., 2000). No estudo de alterações ligadas ao stress, atividade psicomotora, processo emocional, sono e memória, devido às catecolaminas estarem relacionadas ao funcionamento desses sistemas (PYTHON et al., 1996, DURSTEWITZ et al., 1999, FERRY et al., 1999, ROMANIDES et al., 1999, SOUTHWICK et al., 1999).

Desde que YOSHIDA et al. (1984) descreveram a preparação de colunas cromatográficas imobilizadas com proteínas plasmáticas e/ou séricas que as mesmas são frequentemente utilizadas em análises de tecidos e fluidos biológicos.

Diversas proteínas, como a BSA (albumina do soro bovino), HSA (albumina do soro humano), avidina e AGP (α-1-glicoproteína) são utilizadas para a preparação de colunas cromatográficas proteína-imobilizadas, podendo ser obtidas comercialmente ou preparadas em laboratório.

Entre as vantagens de se utilizar albuminas, citam-se: são abundantes nos vertebrados, são comercialmente disponíveis a um custo baixo (HE e CARTER, 1992) e suas propriedades físico-químicas permitem que sejam utilizadas várias condições cromatográficas no modo reverso de eluição, o que é uma ótima vantagem quando se trabalha com análise de amostras biológicas por injeção direta.

Muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos empregando a coluna ISRP-C_{18} por nosso laboratório (Laboratório de Cromatografia Líquida), entre eles: determinação de catecolaminas em plasma e glândula adrenal de ratos, sob diferentes condições cromatográficas, como por exemplo, fase móvel com metanol, tampão fosfato e diferente concentração de EDTA (SANCHEZ et al., 2003, 2004), extração e separação de pesticidas em leite cru (MENEZES e FÉLIX, 1996,

MENEZES et al., 1998), determinação de cafeína em amostras de urina (MENEZES et al., 1999), determinação de ocratoxinas A e B em cervejas (SIMIONATO, 2005), entre outros.

Desta forma, fica evidenciada a importância da metodologia proposta e validada neste estudo para a determinação de noradrenalina e adrenalina em tecidos de órgãos reprodutores de ratos.

B- Efeitos da simpatectomia química por sulfato de guanetidina sobre os órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley

De acordo com a literatura especializada existem diferenças entre espécies de animais quanto à resposta ao tratamento com guanetidina. Animais de uma mesma espécie, porém de variedades diferentes, também podem apresentar essas diferenças (DOWNING e JUUL, 1973, O' DONNELL e SAAR, 1974, JOHNSON et al., 1977 e EVANS et al., 1979). Foi observado que ratos de duas variedades (Wistar e Sprague-Dawley) submetidos à desnervação química por guanetidina responderam diferentemente a parâmetros reprodutivos, quando expostos a doses e períodos de tratamento diferentes (GUIMARÃES et al., 1997, KEMPINAS et al., 1998ab, SILVA, 2002).

Com base no vasto histórico da literatura sobre simpatectomia química por guanetidina foram selecionadas as doses e o tempo de tratamento para as duas variedades de ratos avaliadas neste estudo, a Wistar e a Sprague-Dawley. A literatura relata que a melhor dose para desencadear desnervação química seletiva em órgãos reprodutores de ratos da variedade Wistar é 10mg/kg durante 30 dias (LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993, 1996, ROSA e SILVA et al., 1995, GUIMARÃES et al., 1997) e em ratos da variedade Sprague-Dawley é 6,25 mg/kg durante 21 dias (KEMPINAS et al., 1998ab, SILVA, 2002).

B1- Peso dos órgãos reprodutores

Os **ratos Wistar** tratados com sulfato de guanetidina apresentaram aumento significativo de 26% no peso da cauda do epidídimo e de 73% no peso da vesícula seminal, mas não no peso do ducto deferente (Tabela11).

Não houve diferença estatisticamente significativa no peso dos órgãos reprodutores dos ratos Wistar tratados com sulfato de guanetidina que permaneceram durante 90 dias em recuperação (Tabela 12).

Tabela 11. Peso dos órgãos reprodutores dos ratos Wistar dos grupos controle e tratado com 10 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 30 dias.

Órgãos	N	Guanetidina	N	Controle
Cauda do Epidídimo (mg)	5	323,34 ± 9,44**	5	256,17 ± 11,44
Ducto Deferente (mg)	5	127,32 ± 5,02	5	125,67 ± 4,96
Vesícula Seminal (mg)	5	2441,21 ± 66,02***	5	1410,10 ± 67,69

Diferença estatisticamente significativa: ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$.
Teste estatístico de Mann-Whitney.
N = número de animais.

Tabela 12. Peso dos órgãos reprodutores dos ratos Wistar dos grupos controle e tratado com 10 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 30 dias, que permaneceram 90 dias em recuperação após a suspensão do tratamento.

Ór

Os **ratos Sprague-Dawley** tratados com sulfato de guanetidina apresentaram um aumento significativo de 32% no peso da cauda do epidídimo e de 97% no peso da vesícula seminal, enquanto o peso do ducto deferente não alterou devido ao tratamento (Tabela13).

Não houve diferença estatisticamente significativa no peso dos órgãos reprodutores dos ratos Sprague-Dawley tratados que permaneceram durante 90 dias em recuperação (Tabela 14).

Tabela 13. Peso dos órgãos reprodutores dos ratos Sprague-Dawley dos grupos controle e tratado com 6,25 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 21 dias.

Órgãos	N	Guanetidina	N	Controle
Cauda do Epidídimo (mg)	5	333,40 ± 11,63**	5	253,20 ± 3,14
Ducto Deferente (mg)	5	133,80 ± 7,71	5	120,20 ± 5,98
Vesícula Seminal (mg)	5	2869,10 ± 17,72**	5	1452,25 ± 12,76

Diferença estatisticamente significativa: ** $p < 0,001$.
Teste estatístico de Mann-Whitney.
N = número de animais.

Tabela 14. Peso dos órgãos reprodutores dos ratos Sprague-Dawley dos grupos controle e tratado com 6,25 mg/kg de sulfato de guanetidina, durante 21 dias, que permaneceram 90 dias em recuperação após a suspensão do tratamento.

Órgãos	N	Guanetidina	N	Controle
Cauda do Epidídimo (mg)	5	288,80 ± 15,51	5	253,70 ± 6,42
Ducto Deferente (mg)	5	142,74 ± 5,83	5	130,28 ± 4,66
Vesícula Seminal (mg)	5	1701,00 ± 133,81	5	1670,20 ± 285,03

Teste estatístico de Mann-Whitney.
N = número de animais.

Os resultados mostraram, portanto, um aumento significativo dos pesos da cauda do epidídimo e da vesícula seminal tanto dos ratos Wistar, quanto dos ratos Sprague-Dawley tratados com guanetidina. Esses dados corroboram trabalhos da literatura para ratos Wistar (SILVA, 2002) e Sprague-Dawley (KEMPINAS et al., 1998a), que descrevem aumento significativo do peso da vesícula seminal e da cauda do epidídimo, devido à retenção de secreção e de espermatozóides, respectivamente.

Sabe-se que após a desnervação química com guanetidina, ocorre aumento na concentração de células germinativas na cauda do epidídimo (KEMPINAS et al., 1998a, SILVA, 2002), em virtude da rica inervação simpática presente em todo o epidídimo, que aumenta muito na porção caudal, continuando presente e de forma importante no ducto deferente (para referências vide RICKER, 1998). Desta forma, o aumento de células germinativas, em decorrência da desnervação química, poderia ser um fator que contribuiu para o aumento do peso deste segmento do órgão.

O fato do peso do ducto deferente não sofrer alteração devido ao tratamento com guanetidina está associado à sua função, a de transportar e emitir o esperma, ao contrário do epidídimo, que apresenta função de armazenamento.

Trabalhos anteriores (HODSON, 1964, 1965, EVANS et al., 1972, 1979, LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993, SILVA, 2002) também demonstraram que a desnervação simpática do sistema reprodutor masculino com guanetidina leva a dilatação da vesícula seminal devido retenção do produto de secreção, refletindo distúrbios na contratilidade e aumentando o peso do órgão. A secreção da vesícula seminal contribui significativamente para o volume do fluido do ejaculado e esse fluido parece ser essencial para o transporte de um número suficiente de espermatozóides dentro do útero, e a frutose, a qual faz parte dessa secreção, serve como fonte de energia para a sobrevivência espermática no trato reprodutivo (KLINEFELTER e HESS, 1998).

Após 90 dias da suspensão do tratamento com guanetidina, os animais Wistar e Sprague-Dawley tratados deixaram de apresentar diferença estatisticamente significativa para o peso dos órgãos reprodutores, sugerindo a recuperação, pelo menos parcial, da inervação simpática. Resultados semelhantes foram obtidos para ratos Wistar tratados com 10mg/kg, durante 30 dias, que permaneceram 60 dias em período de recuperação (SILVA, 2002). NASSR et al. (1997), relataram o mesmo resultado, com exceção do peso do ducto deferente, que se manteve significativamente maior após o período de suspensão de tratamento.

B2- Concentração de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores

O tratamento com guanetidina provocou uma redução significativa na concentração de noradrenalina na vesícula seminal (Figura 40) de adrenalina na cauda do epidídimo (Figura 41) dos ratos Wistar, e também uma redução de noradrenalina no ducto deferente dos ratos Sprague-Dawley (Figura 45). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram alteração estatisticamente significativa em decorrência do tratamento com guanetidina (Figuras 38, 39, 42, 43, 44, 46, 47, 48 e 49).

A suspensão do tratamento com guanetidina permitiu a recuperação de valores normais de concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar (Figura 40), mas não foi suficiente para levar à recuperação da concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar (Figura 41) e da concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley (Figura 45).

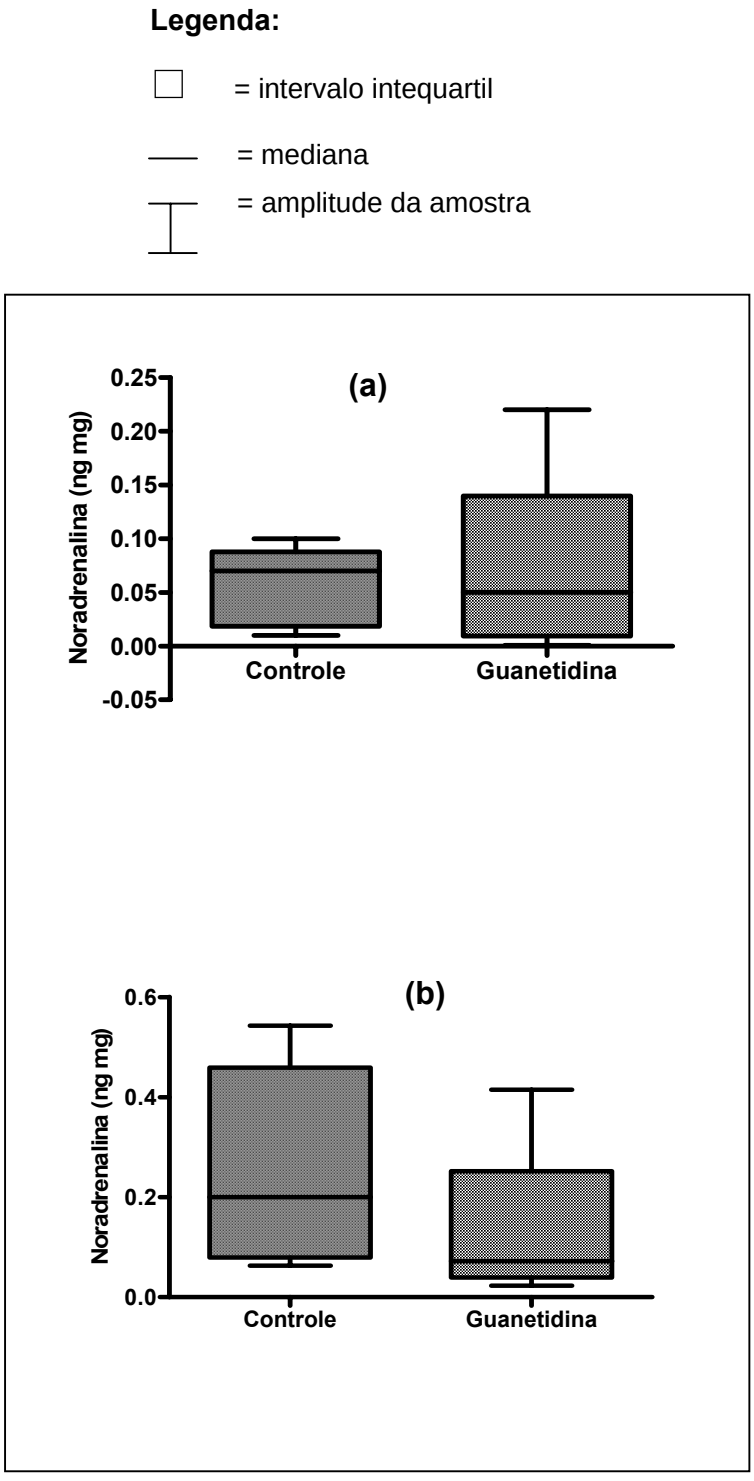


Figura 38. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

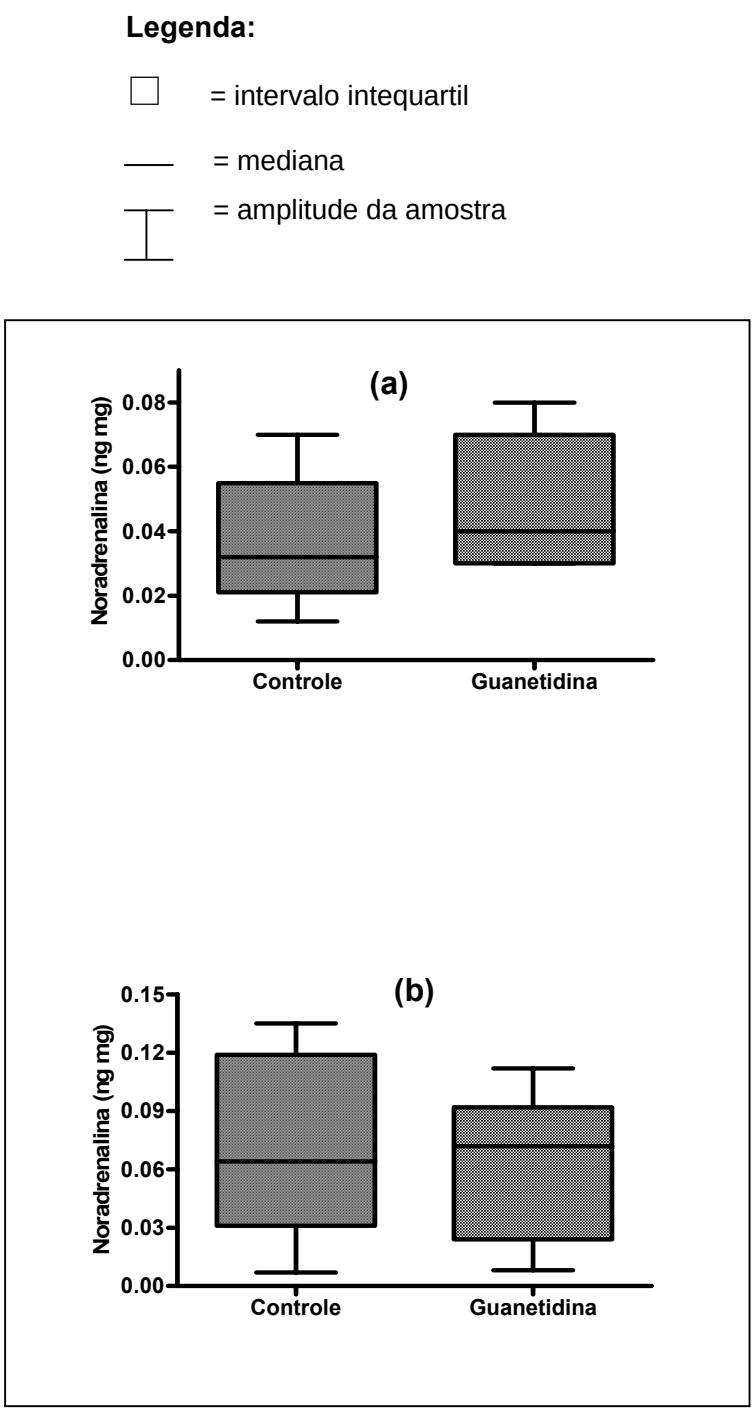


Figura 39. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

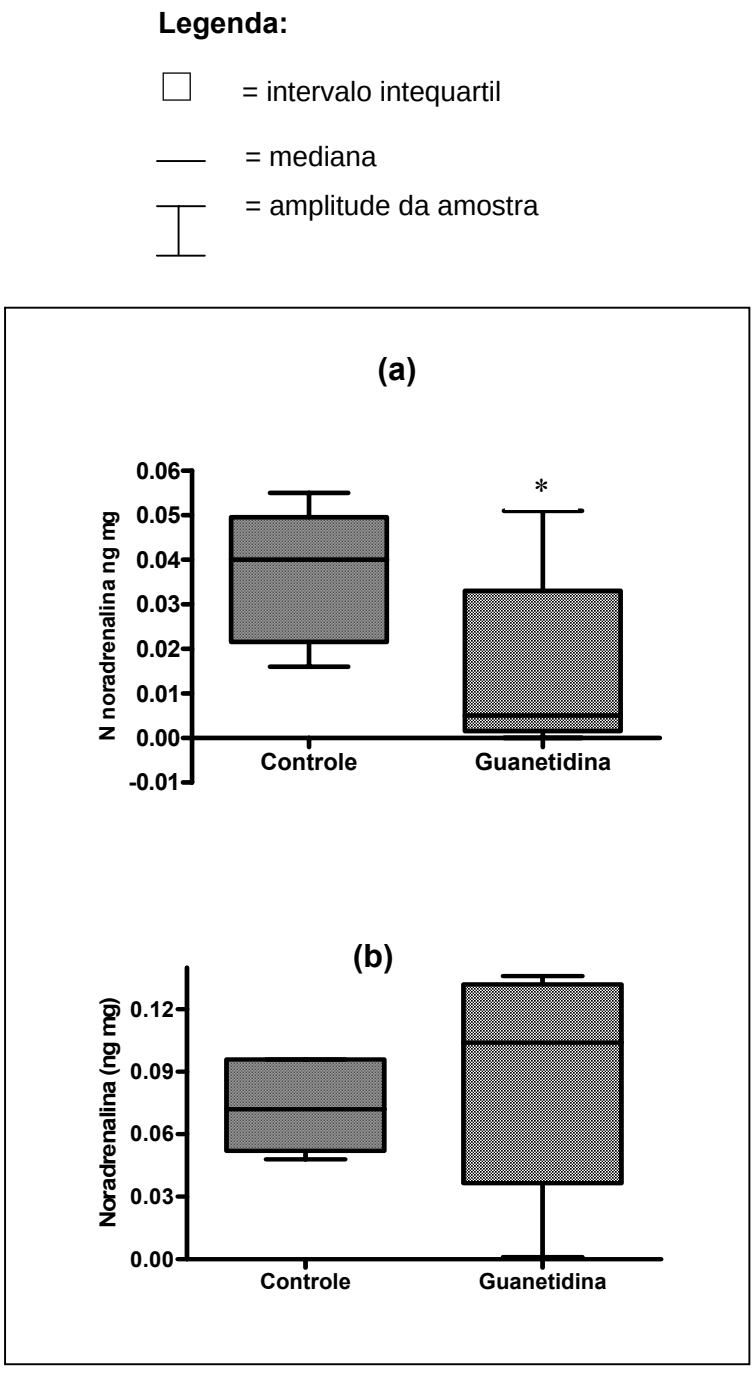


Figura 40. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *p < 0,05 (n = 5).

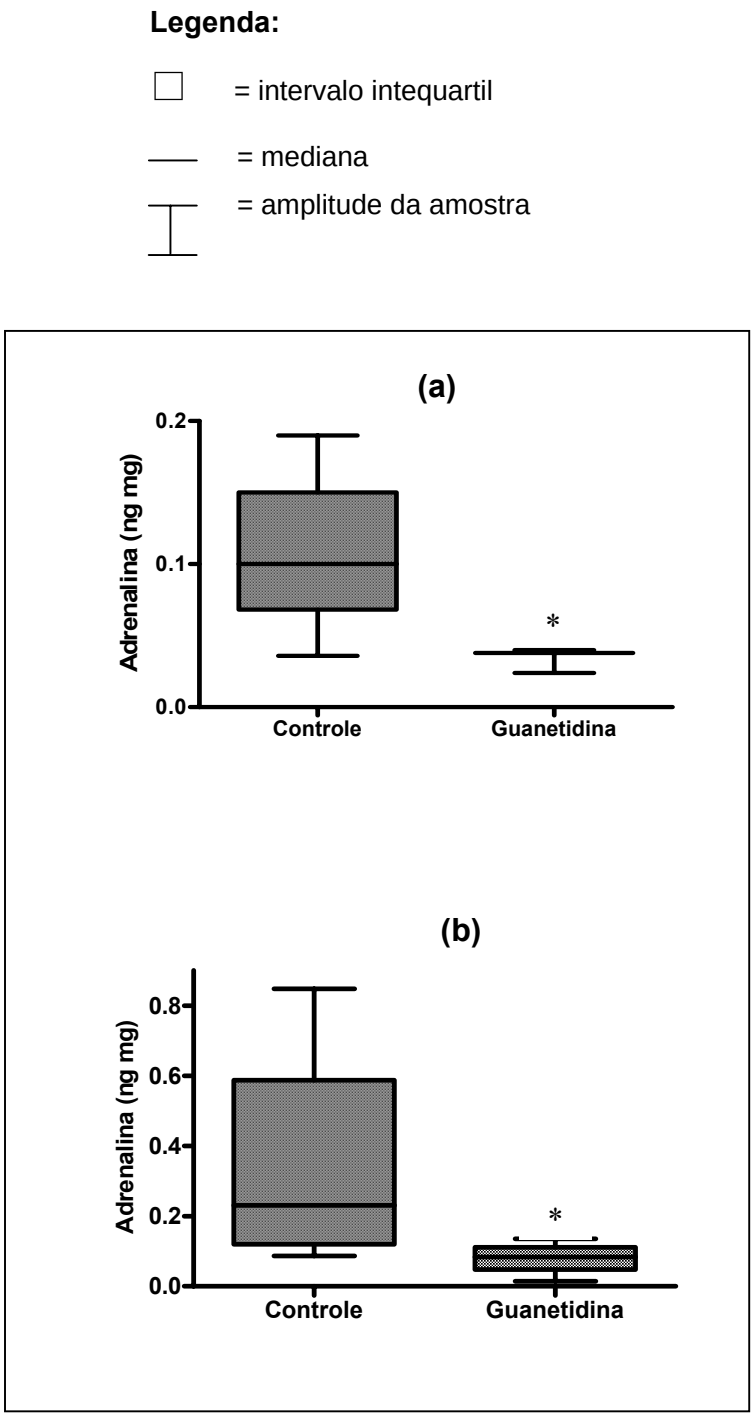


Figura 41. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *p < 0,05 (n = 5).

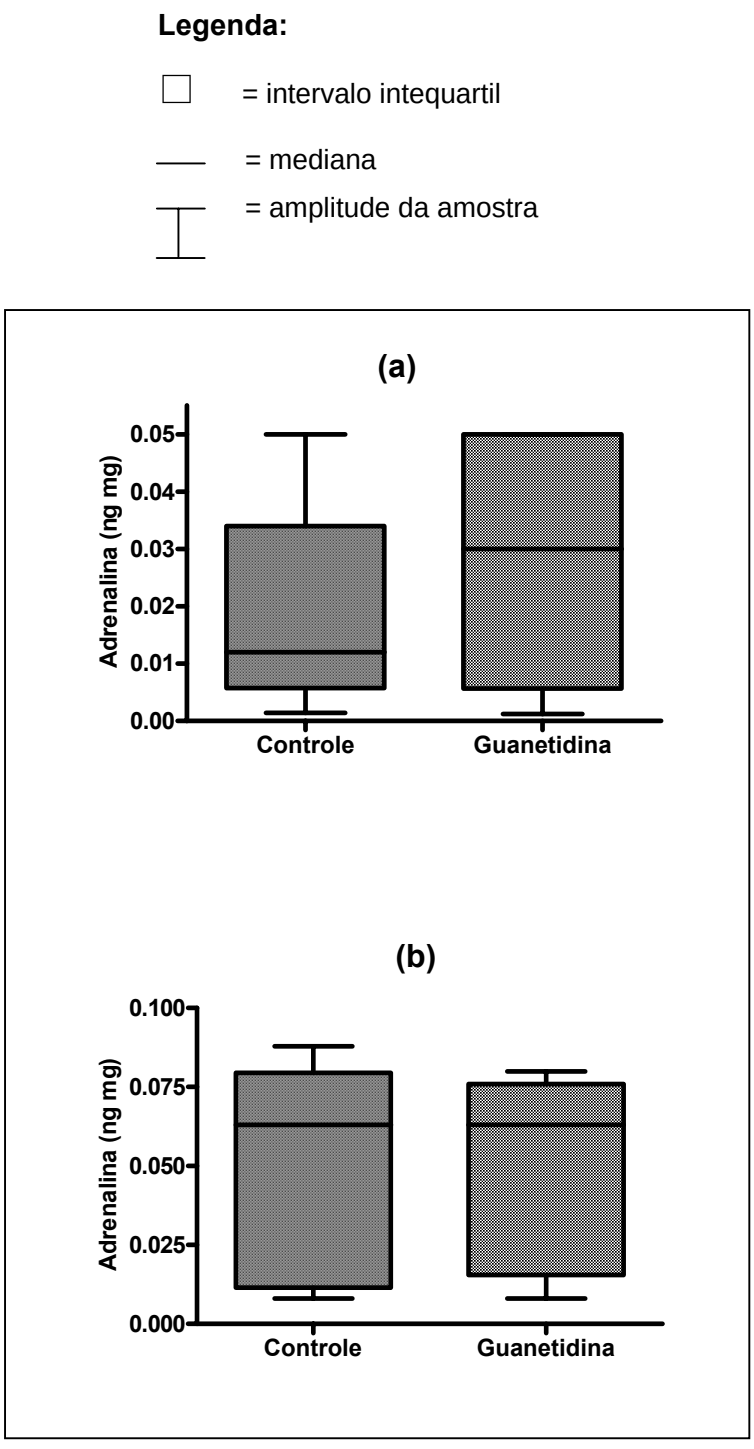


Figura 42. Concentração de adrenalina no ducto deferente de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

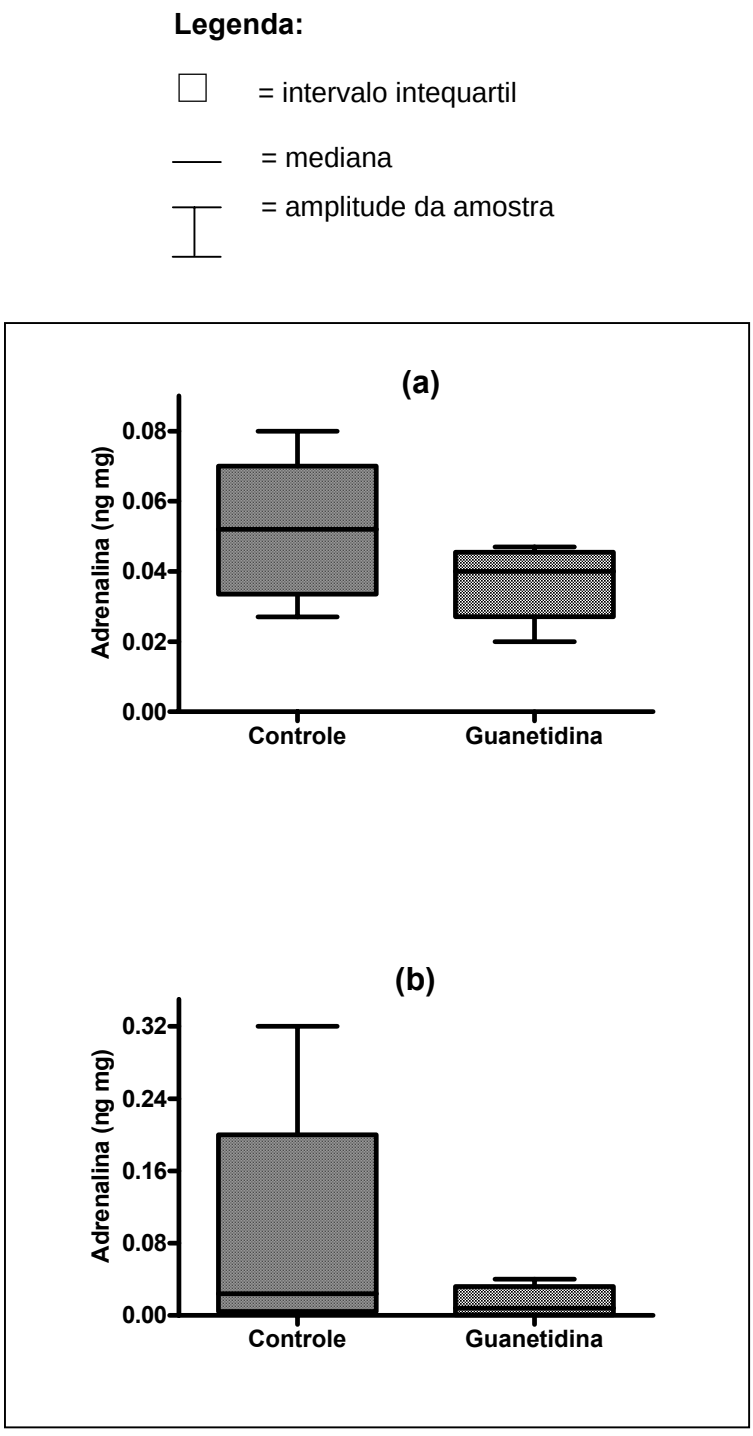


Figura 43. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de animais Wistar controle e tratados com 10 mg/kg, durante 30 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

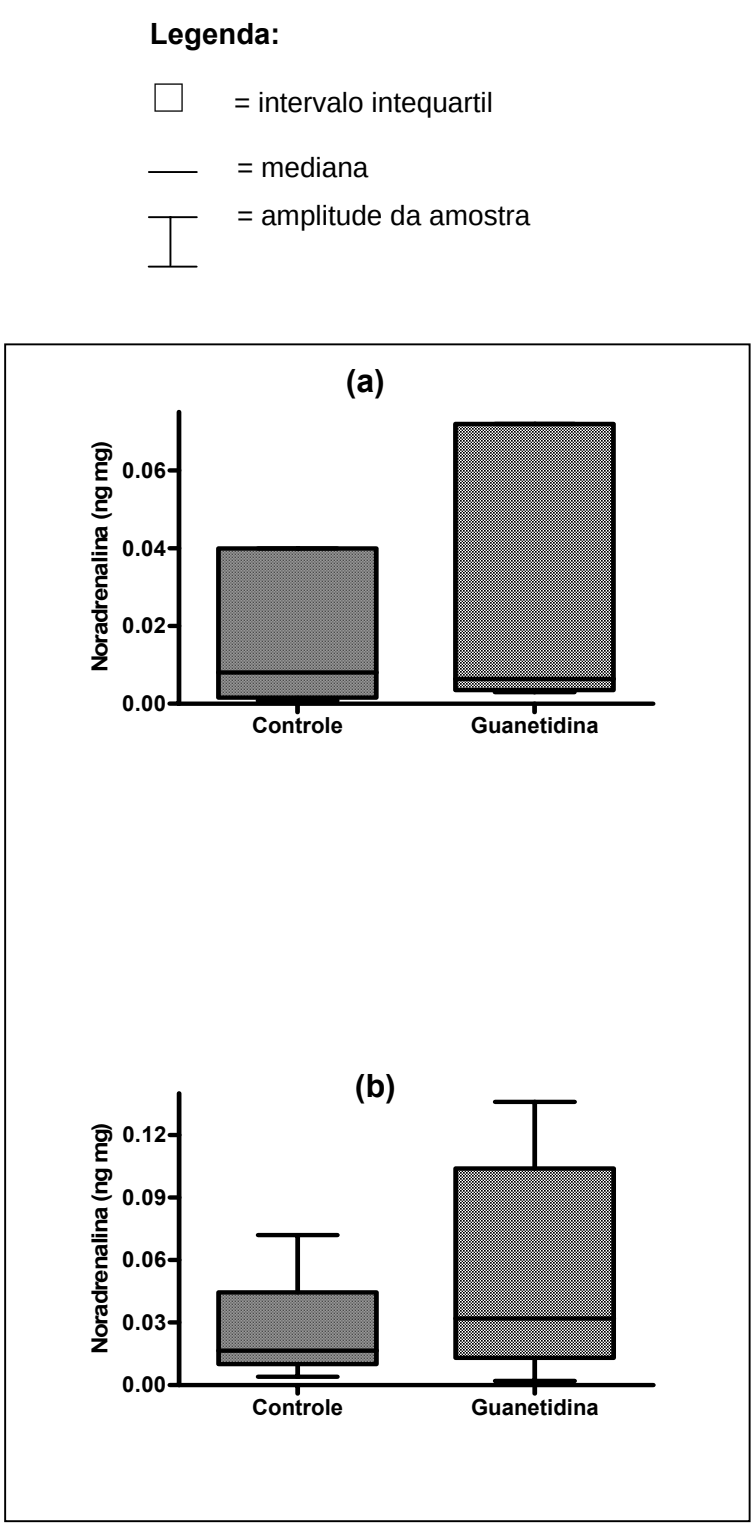


Figura 44. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

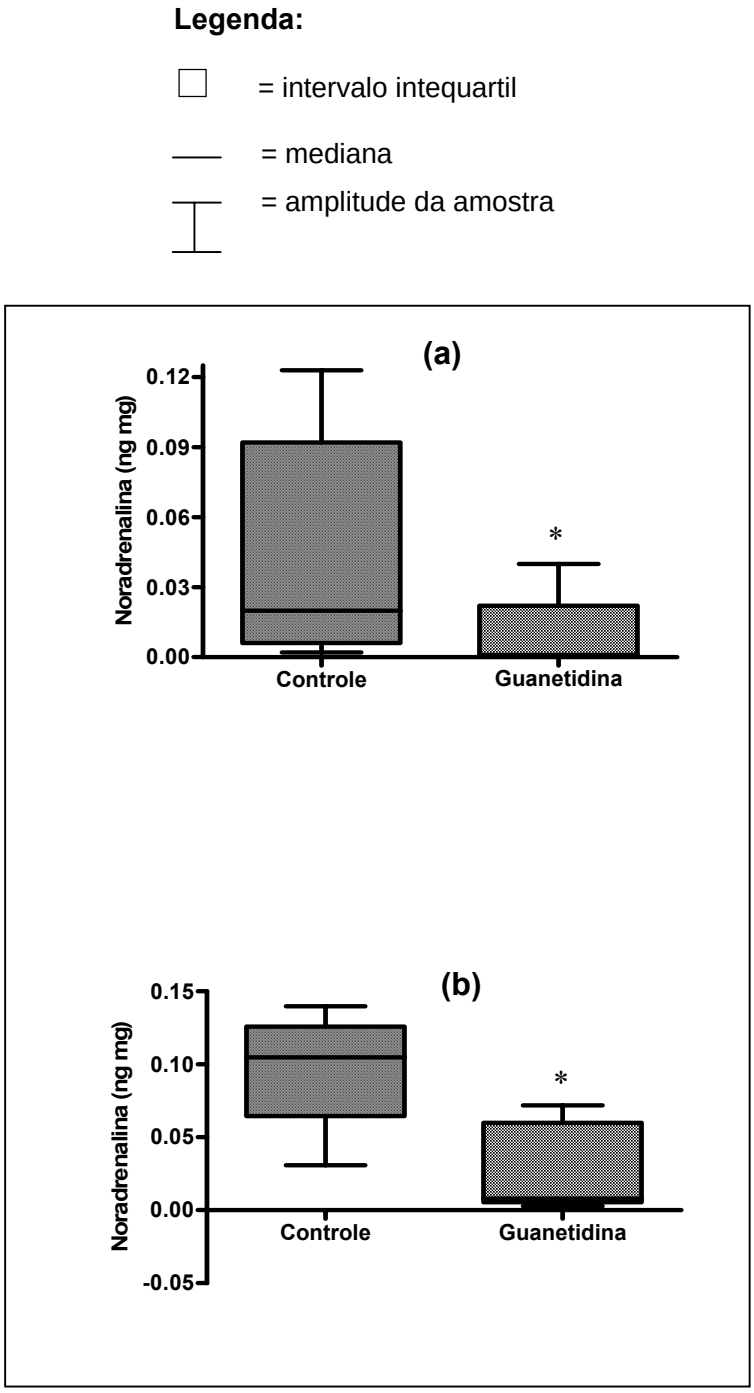


Figura 45. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney, *$p < 0,05$ ($n = 5$).

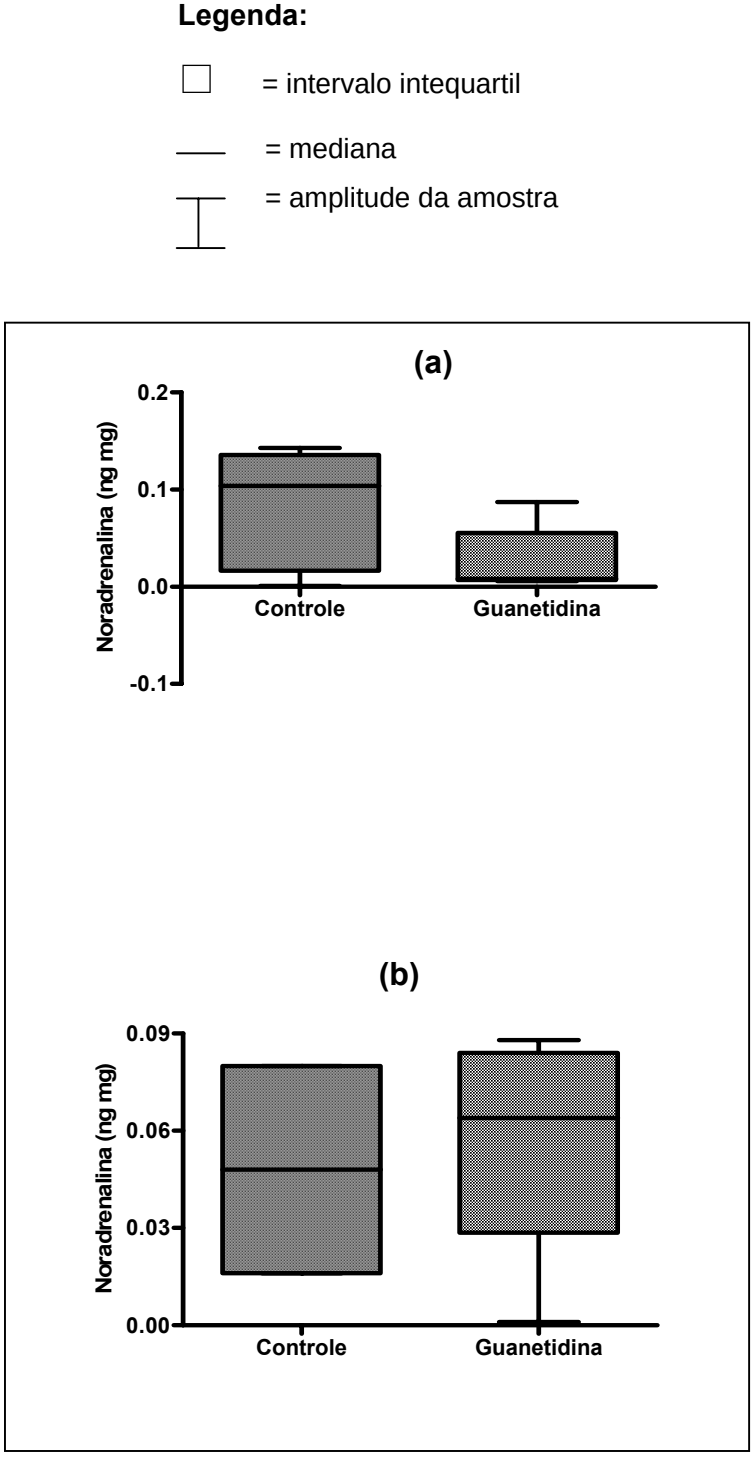
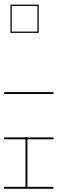


Figura 46. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

Legenda:



= intervalo intequartil

= mediana

= amplitude da amostra

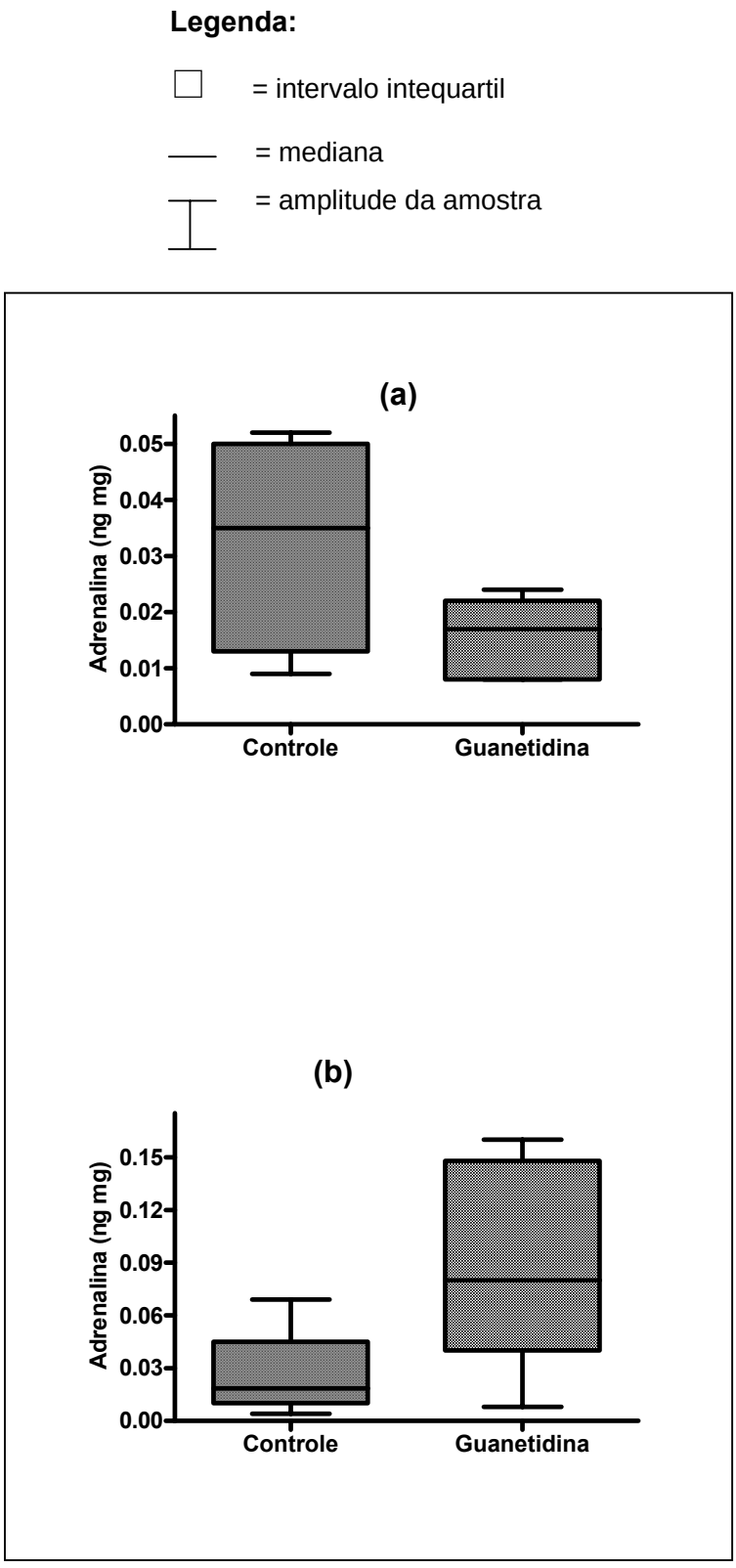


Figura 48. Concentração de adrenalina no ducto deferente de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

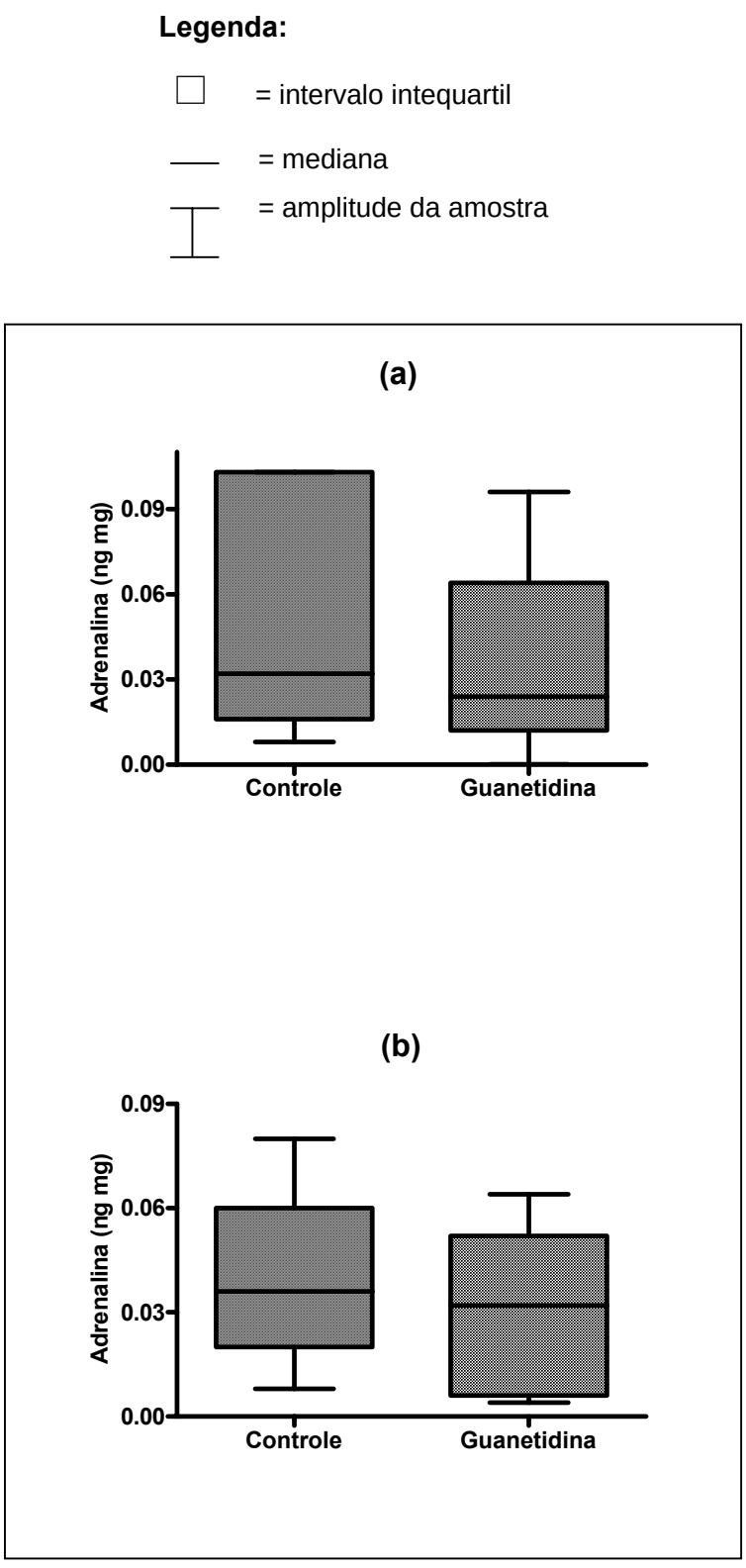


Figura 49. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de animais Sprague-Dawley controle e tratados com 6,25 mg/kg, durante 21 dias (a), e animais que permaneceram 90 dias em recuperação após suspensão do tratamento (b). Dados expressos em valores individuais. Teste estatístico de Mann-Whitney (n = 5).

O tratamento crônico com guanetidina provoca degeneração de neurônios simpáticos, e/ou depleção do conteúdo de catecolaminas no gânglio cervical superior, gânglio hipogástrico, e em ductos e glândulas do sistema reprodutor masculino. Outros tipos celulares, que não os neurônios, não são susceptíveis à ação da droga (ERANKO e ERANKO, 1971, BURNSTOCK et al., 1971, HEATH et al., 1972, HEATH e BURNSTOCK, 1977). Sabe-se que baixas doses de guanetidina provocam uma potente desnervação seletiva em órgãos sexuais acessórios de ratos Wistar (LAMANO CARVALHO et al., 1990, 1993b, SILVA, 2002) e Sprague-Dawley (KEMPINAS et al., 1998ab).

A redução na concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley tratados com guanetidina, confirmou a efetividade do tratamento.

No trabalho desenvolvido por SILVA (2002), experimentos de reatividade farmacológica da vesícula seminal confirmaram a retenção do produto de secreção, através da diminuição de sensibilidade à acetilcolina (mediador também responsável pela contratilidade da musculatura lisa no aparelho reprodutor), o que explicaria o aumento do peso desta glândula. Neste trabalho, após a avaliação das concentrações de catecolaminas por HPLC/ECD dos órgãos reprodutores das duas variedades de ratos, observou-se diminuição da concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar tratados com 10mg/kg durante 30 dias o que poderia sugerir a relação direta do aumento do peso deste órgão com a sua desnervação. Este fato não se aplica ao peso do ducto deferente, que se manteve constante durante o tratamento dos animais Sprague-Dawley com 6,25 mg/kg, por 21 dias.

A redução de adrenalina na cauda do epidídimo dos animais Wistar tratados com guanetidina pode estar relacionada com o fato de a noradrenalina ser a precursora da adrenalina na biossíntese das catecolaminas. Uma vez a noradrenalina diminuída ou depletada, conseqüentemente haverá diminuição de adrenalina ou não haverá a síntese deste neurotransmissor, respectivamente.

Vários parâmetros reprodutivos reportados na literatura foram estudados para ratos que permaneceram durante algum tempo em período de recuperação após suspensão do tratamento com guanetidina.

SWEDIN e LINDHOLMER (1974) relataram infertilidade em ratos Sprague-Dawley simpatectomizados, mesmo após um ano da remoção dos nervos

hipogástricos. HIB et al. (1979), utilizando 10mg/kg/dia de guanetidina, por 8 semanas, em ratos Wistar, observaram que os mesmos não recuperaram a capacidade fertilizante antes de 150 dias da suspensão do tratamento.

A investigando da fertilidade de ratos Sprague-Dawley, tratados por 8 semanas com 25mg/kg de guanetidina, registraram ausência de espermatozóides nas vaginas das ratas que com eles foram cruzadas. Houve reversibilidade desse efeito após 8 semanas do término da administração do sulfato de guanetidina, embora somente parte dos animais tenha recuperado a fertilidade. Sugeriram então que, se os animais fossem mantidos por um período adicional de tempo, melhores resultados poderiam ser obtidos (HEPP e KREYE, 1973).

SILVA (2002) demonstrou para animais da variedade Wistar desnervados com 10mg/kg de sulfato de guanetidina por 30 dias, que permaneceram em recuperação durante 60 dias, uma redução no número de espermatozóides ejaculados de 20%.

Neste trabalho, os ratos Sprague-Dawley que ficaram mantidos em período de recuperação de 90 dias, após a suspensão do tratamento, ainda mostraram uma redução significativa nos níveis de noradrenalina no ducto deferente (Figura 45), e os ratos Wistar mantiveram a diminuição da concentração de adrenalina na cauda do epidídimo (Figura 41).

Nossos resultados estão de acordo com a literatura reportada acima, que observou a reversibilidade dos efeitos da guanetidina apenas em parte dos parâmetros reprodutivos avaliados após certo período de tempo em que os animais ficaram em recuperação. Deste modo, os resultados desse estudo sugerem que seria necessário um período maior de recuperação para reverter os efeitos do sulfato de guanetidina sobre a concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley.

B3- Comparação das concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos Wistar e Sprague-Dawley

A aplicação de análise estatística para comparação das concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos Wistar “versus” Sprague-Dawley, controles e tratados com guanetidina, mostrou que:

a) em ratos tratados com guanetidina, as concentrações de noradrenalina e adrenalina apresentaram uma diminuição para a variedade Sprague-Dawley (Figuras 50, 51, 52, 53, 54 e 55), porém apenas a concentração de noradrenalina no ducto deferente mostrou uma diminuição estatisticamente significativa (Figura 51).

b) em ratos controles, as concentrações de noradrenalina foram menores na cauda do epidídimo e no ducto deferente da variedade Sprague-Dawley (Figuras 56 e 57) e maior na vesícula seminal (Figura 58). As concentrações de adrenalina foram menores na cauda do epidídimo, apresentando diferença estatisticamente significativa (Figura 59), e na vesícula seminal de ratos Sprague-Dawley (Figura 61). No ducto deferente a concentração mostrou-se maior (Figura 60).

B3.1- Concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos tratados com guanetidina

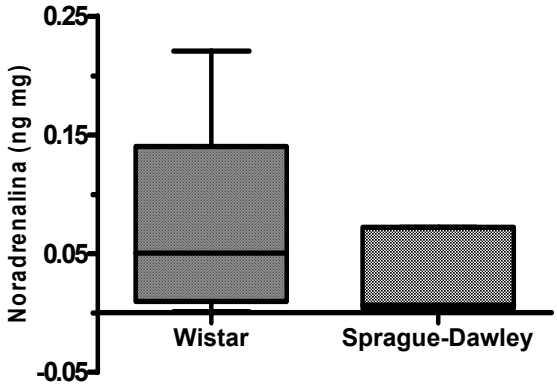


Figura 50. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

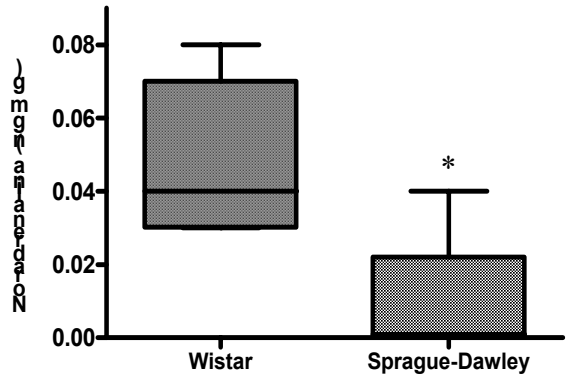


Figura 51. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5).

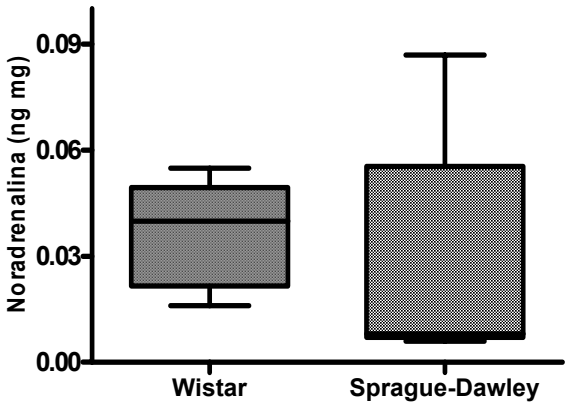


Figura 52. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

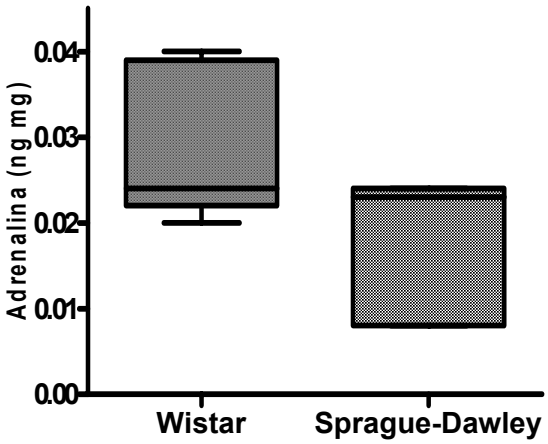


Figura 53. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5).

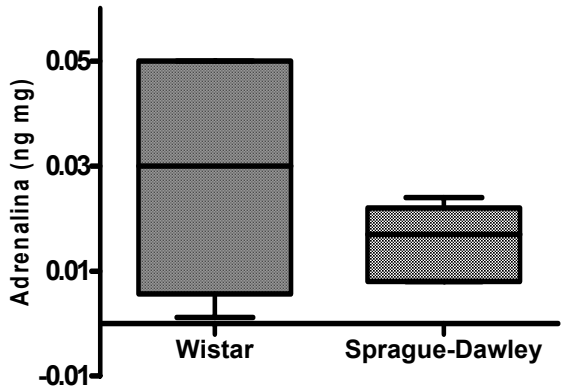


Figura 54. Concentração de adrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

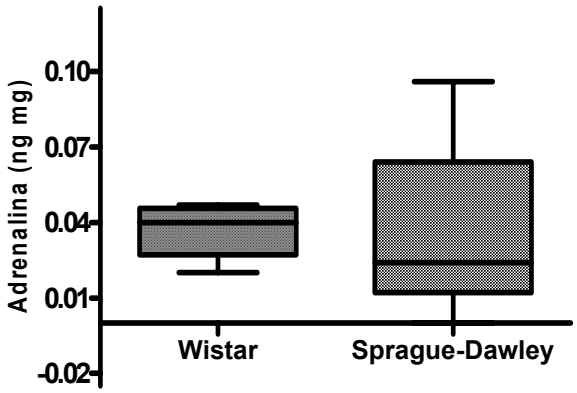


Figura 55. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley, tratados com 10 e 6,25 mg/kg de guanetidina, durante 30 e 21 dias, respectivamente. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

B3.2- Concentrações de noradrenalina e adrenalina nos órgãos reprodutores de ratos controles

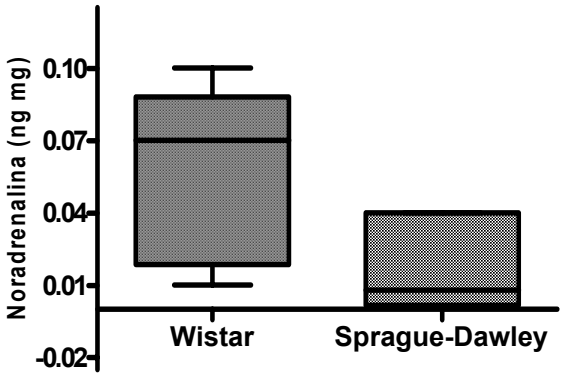


Figura 56. Concentração de noradrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

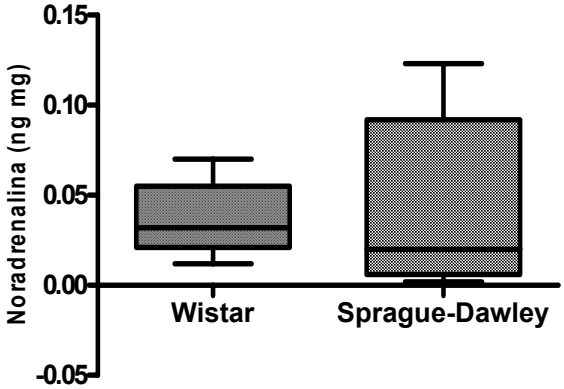


Figura 57. Concentração de noradrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

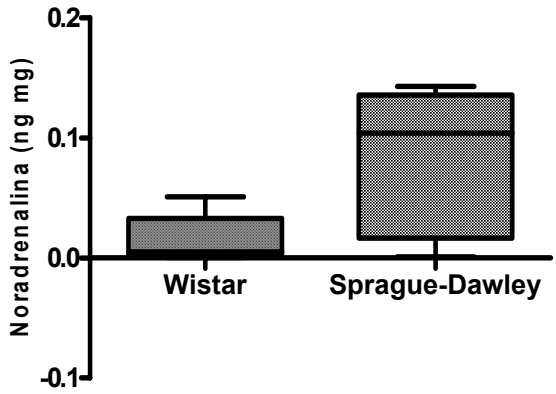


Figura 58. Concentração de noradrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

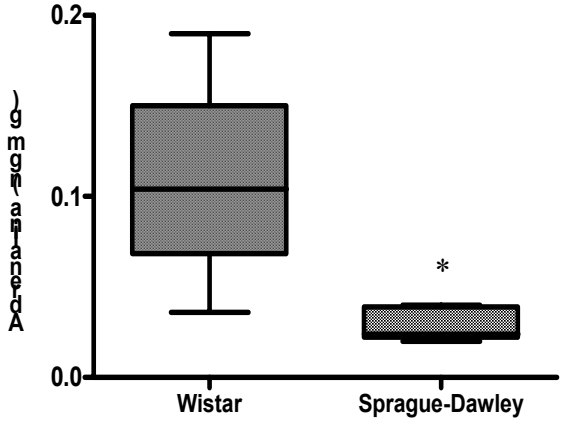


Figura 59. Concentração de adrenalina na cauda do epidídimo de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney, *p < 0,05 (n = 5).

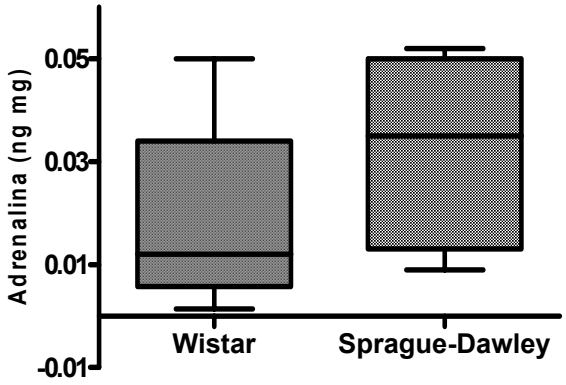


Figura 60. Concentração de adrenalina no ducto deferente de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

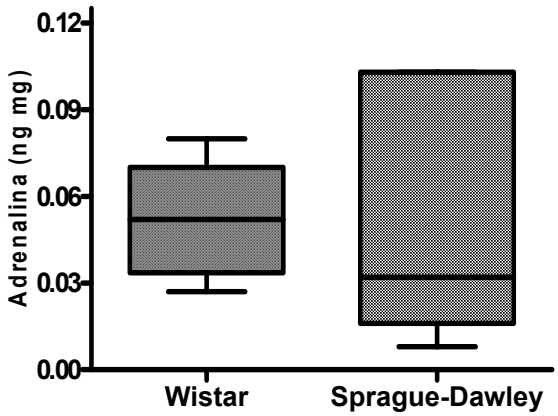


Figura 61. Concentração de adrenalina na vesícula seminal de ratos Wistar e Sprague-Dawley controles. Teste estatístico de Mann-Withiney (n = 5).

Legenda:

□ = intervalo intequartil

—— = mediana

⊤ = amplitude da amostra

De acordo com a literatura especializada, existem diferenças de respostas entre espécies quanto ao tratamento com sulfato de guanetidina. O efeito citotóxico da droga em provocar destruição generalizada dos neurônios noradrenérgicos foi observado apenas no rato. Em outras espécies, como por exemplo, gatos, (DOWNING e JUUL, 1973; JOHNSON et al., 1977), cobaias (O' DONNELL e SAAR, 1974), coelhos e hamsters (JOHNSON et al., 1977), camundongos e sapos (EVANS et al., 1979), foi observado efeito farmacológico transitório com depleção moderada dos estoques de noradrenalina.

EVANS et al. (1979), sugerem que provavelmente, as diferenças entre espécies na resposta ao tratamento com guanetidina são atribuídas a diferentes níveis de captura e acúmulo da droga nos neurônios noradrenérgicos. A guanetidina promove a liberação aguda de noradrenalina nas terminações nervosas, e bloqueia sua recaptura, determinando assim uma drástica diminuição na concentração deste neurotransmissor nos tecidos (JOHNSON e MANNING, 1984).

Além disso, vale ressaltar que, mesmo em situações experimentais diversas, ratos pertencentes à mesma variedade, mas provenientes de fornecedores diferentes, podem não responder de forma homogênea aos tratamentos (CLARK, 1995).

Dentro deste contexto, SILVA (2002), investigando as possíveis diferenças de resposta entre ratos Wistar e Sprague-Dawley, ao tratamento com sulfato de guanetidina, mostrou que a variedade Sprague-Dawley é bem mais sensível que a Wistar, quando os animais são tratados com a mesma dose (6,25mg/kg), durante o mesmo período de tratamento (21 dias). Neste mesmo estudo ocorreu redução da ordem de 60% no número de espermatozóides ejaculados por ratos Wistar, que esteve associada a uma redução de 50% da taxa de prenhez das fêmeas que foram acasaladas com esses animais. Entretanto, KEMPINAS et al. (1998b), avaliando parâmetros reprodutivos em ratos Sprague-Dawley, observaram que não houve ejaculação após tratamento com guanetidina, impossibilitando a concepção da prole.

No presente trabalho, ratos Sprague-Dawley tratados com menor dose e por menor período de tempo com sulfato de guanetidina apresentaram menor concentração de noradrenalina nos três órgãos avaliados quando comparados aos Wistar, mostrando diferença estatisticamente significativa apenas para o ducto deferente, confirmando a maior sensibilidade da variedade Sprague-Dawley. Sabe-se que o tratamento com guanetidina na dose de 6,25 mg/kg durante 7 dias é suficiente para desnervar órgãos reprodutores de animais Sprague-Dawley, o que foi

comprovado através do aumento do peso da cauda do epidídimo e vesícula seminal, além de níveis de noradrenalina não detectados por HPLC/ECD, na cauda do epidídimo (KEMPINAS et al., 1998a).

Em ratos do grupo controle, avaliados quanto a esse mesmo parâmetro, a adrenalina mostrou-se reduzida no ducto deferente e constatou-se diferença estatisticamente significativa para essa redução na cauda do epidídimo para a variedade Sprague-Dawley em relação à Wistar. As concentrações reduzidas de adrenalina podem estar relacionadas com a idade dos animais, os quais se apresentam idosos e deste modo, possuem uma quantidade menor de neurotransmissores. Quando foram comparadas as concentrações de noradrenalina nos órgãos reprodutores desses animais, não foi detectada diferença estatística. Porém, foi possível observar uma diminuição desta catecolamina na cauda do epidídimo e no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley, sugerindo que essa variedade apresente uma quantidade biológica menor desse neurotransmissor e, possivelmente por esse motivo, sofra desnervação química pela guanetidina mais rapidamente.

B4- Aplicabilidade do estudo com guanetidina e sua relação com o significado clínico da inervação autonômica no aparelho reprodutor masculino

Conforme descrito na introdução deste trabalho, o modelo experimental de simpatectomia química por guanetidina possui semelhanças com casos de homens acometidos por lesão na medula espinhal. A perda da inervação por lesão na medula acarreta infertilidade masculina que está associada a parâmetros anormais do sêmen o qual se apresenta muito pobre (WANG et al., 2005, BRACKETT et al., 1996). O sêmen é produzido na vesícula seminal e é constituído por substâncias nutritivas como a glicose e secreções gelatinosas ricas em frutose, que serve como fonte energética para os espermatozóides ejaculados.

Segundo RICKER (1998), as causas potenciais para a infertilidade seriam a motilidade e morfologia alterada dos espermatozóides e a sua longevidade diminuída. Estes fatores levam a uma taxa reduzida de fertilização. Considerando que o epidídimo atua especificamente no processo de maturação e armazenamento dos

espermatozóides sob o controle do sistema nervoso autônomo (SNA), a infertilidade poderia ser em parte, resultado da função epididimária prejudicada. Neste contexto, KEMPINAS et al. (1998b), avaliaram a qualidade do sêmen comprometido pela simpatectomia química e cirúrgica em ratos Sprague-Dawley, com ênfase nos possíveis danos sobre as funções desempenhadas pelo epidídimo. Observaram diminuição significativa no peso do epidídimo e no número de espermatozóides na cauda epididimária e taxa de fertilização reduzida.

BRACKETT et al. (1996), investigaram se o sêmen de homens acometidos por lesão na medula espinhal inibiria a motilidade dos espermatozóides em homens normais, e se o sêmen de homens normais melhoraria a motilidade dos espermatozóides em homens com lesão na medula. Observaram que, sêmen de homens com lesão na medula inibiu a motilidade espermática em homens normais, e sêmen de homens normais melhorou a motilidade em homens com perda da inervação. Concluíram assim, que a baixa motilidade dos espermatozóides observada na maioria dos homens com lesão na medula espinhal, se deve ao menos em parte, as anormalidades no plasma seminal resultante de danos causados no SNA.

Estudos de HIRSCH et al. (1991), LINSERNMEYER e PERKASH (1991) e BRACKETT et al. (1994), sugeriram que etapas da espermatogênese e a maturação dos espermatozóides em homens, podem ser afetadas após a lesão da medula espinhal.

A ejaculação também é controlada pelo SNA através dos segmentos T10-12 da medula espinhal. Em T12 estaria localizado o centro reflexo da ejaculação (BENSON, 1994, KEMPINAS et al., 1998b). Deste modo, quando a lesão na medula é nos segmentos T10-12, o centro da ejaculação ou a função do SNA nesta região serão danificados. Se a lesão ocorrer abaixo de T12, o centro da ejaculação, bem como o funcionamento do SNA pode permanecer intacto, porém os músculos do pênis e da uretra não serão conectados ao centro da ejaculação (YAMAMOTO et al., 1997). Assim, homens acometidos por lesão na medula espinhal apresentam problemas de ereção e ejaculação (YAMAMOTO et al., 1997). Entretanto, o sêmen desses homens pode ser obtido através da estimulação elétrica.

A informação sobre a ocorrência de alterações nos espermatozóides após lesão da medula espinhal, prejudicando a motilidade dessas células e ocasionando infertilidade é extremamente valiosa, uma vez que, a partir dela poderiam ser desenvolvidos tratamentos com potencial para superar a incapacidade funcional dos espermatozóides decorrente da perda da inervação.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A fase móvel com ácido metanosulfônico solucionou a instabilidade inicialmente observada na linha de base dos cromatogramas obtidos e permitiu a melhor detecção das catecolaminas avaliadas através de parâmetros cromatográficos e da sensibilidade e estabilização do detector eletroquímico com a utilização da válvula FCV-12AH, apresentando melhor resposta entre eficiência e tempo de análise.

A avaliação da recuperação das catecolaminas foi ajustada utilizando o método de calibração de adição padrão. Os resultados obtidos mostraram-se de acordo com valores aceitáveis para a validação de uma nova metodologia analítica em amostras biológicas, assegurando a eficiência e a confiabilidade do método.

O método analítico foi aplicado com desempenho às amostras reais das duas variedades de ratos, permitindo a determinação de baixas concentrações das catecolaminas estudadas, principalmente da noradrenalina, a qual diminui significativamente após desnervação química dos órgãos reprodutores. Apresentou simplicidade no tratamento das amostras e rapidez de análise, devido ao emprego do ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} no procedimento de extração e da coluna cromatográfica ISRP-C_{18} imobilizada com a proteína albumina do soro humano (HSA) que permite a injeção direta da amostra.

O modelo experimental de desnervação química por guanetidina foi efetivo em promover a simpatectomia química seletiva dos órgãos reprodutores, o que ficou evidenciado pelo aumento dos pesos da cauda do epidídimo e da vesícula seminal. A avaliação da concentração de noradrenalina por método de HPLC/ECD, no entanto, mostrou diminuição apenas na vesícula seminal dos ratos Wistar e no ducto deferente dos ratos Sprague-Dawley.

A variedade Sprague-Dawley mostrou-se mais sensível aos efeitos da simpatectomia química que a variedade Wistar, e isso se aplica, pelo menos em parte, à menor concentração de noradrenalina nos ratos da primeira variedade, o que também poderia explicar a ocorrência de desnervação mais rapidamente e com dose menor de guanetidina. A redução da concentração de adrenalina nos órgãos reprodutores dos ratos Wistar tratados com guanetidina ocorreu devido a noradrenalina ser a precursora da adrenalina na biossíntese das catecolaminas.

A suspensão do tratamento por 90 dias foi efetiva em recuperar, comparativamente ao grupo controle, o peso de órgãos reprodutores nas duas variedades de ratos e a concentração de noradrenalina na vesícula seminal da variedade Wistar, mas não foi suficiente para reverter, a valores normais, os níveis de noradrenalina no ducto deferente de ratos Sprague-Dawley.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLENMARK, S. Optical resolution by liquid chromatography on immobilized bovine serum albumin. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 9, p. 425-442, 1986.

ANAZAWA, A. T. **Preparação, caracterização e avaliação de diferentes fases estacionárias reversas tipo C_8 para CLAE.** 1996. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de Campinas, Campinas, 1996.

ANDERSON, D. J. High-performance liquid chromatography in clinical analysis. **Anal. Chem.,** v. 71, p. 314R-27R, 1999.

ANNINO, J. **Química clínica**: princípios e métodos: São Paulo: Manole, 1978.

ATHERTON, N. D. HPLC measurement of phenylalanine by direct injection of plasma onto of internal-surface-reversed-phase silica support. **Clin. Chem.**, v. 35, p. 975- 978, 1989.

BAUER, G. R.; CROLL, F. G. T.; GOLDRICK, R. B.; JEREMY, D.; RAFTOS, J.; WHYTEH, M.; YOUNG, A. Guanethidine in treatment of hypertension. **Br. Med. J**., v. 2, p. 410-5, 1961.

BAUMGARTEN, H. G.; FALK, B.; HOLSTEIN, A. F.; OWMAN, T. Adrenergic innervation of the human testis, epididymis, ductus deferens and prostate: a fluorescence microscopic and fluorometric study. **Z. Zellforsch.**, v. 90, p. 81-95, 1968.

BENEDICT, C. R. Simultaneous measurement of urinary and plasma norepinephrine, epinephrine, dopamine, dihydroxyphenylalanine and dihydroxyphenilacetic acid by coupled-column high-performance liquid chromatography on C_8 and C_{18} stationary phases. **J. Chromatogr.**, v. 385, p. 369-75, 1987.

BERGQUIST, J.; TARKOWSKI, A.; EWING, A.; EKMAN, R. Catecholaminergic suppression of immunocompetent cells. **Immunol. Today**, v. 19, n. 12, p. 562-567, 1998.

BERGQUIST, J.; SCIUBISZ, A.; KACZOR, A.; SILBERRING, J. Catecholamines and methods for their identification and quantitation in biological tissues and fluids. **J. Neurosci. Methods**, v. 113, p. 1-13, 2002.

BENSON, G. S. Male sexual function: erection, emission and ejaculation. In: KNOBIL E.; NEILL, J. D. (ed.). **The Physiol. Reprod.**, v. 1, p. 1489-506, 1994.

BIDLINGEMEYER, B. A. **Pratical HPLC methodology and applications.** New York: Willey-Intersciencse, 1992.

BOGOSLOVSKI, S. J.; SAKODYNSKII, K . A.; SEDAN, A. A. Diphyl sorbents for direct sample injection of drugs in biological matrices. In: INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON CRHOMATOGRAPHY, 1992, Aix-en-provence.

BOSS, K. S.; RUDOLPHI, A.; VIELHAUER, S.; WALFORT, A.; LUBDA, D.; EISENBEID, F. F. Alkyl-diol silica (ADS): restrict access precolumn packings for direct injection and coupled-column chromatography of biofluids. **Fresenius J. Anal. Chem.,** v. 352, p. 684-90, 1995.

BOSS, K. S.; RUDOLPHI, A. The use of restricted-access media in HPLC, part I – classification and review. **LC-GC**, v. 15, p. 602-11, 1997.

BOSS, K. S.; GRIMM, C. H. High-performance liquid chromatography integrated solid-phase extraction in bioanalysis using restricted access precolumn packing. **Trends. Anal. Chem.**, v. 18, p. 175-80, 1999.

BRAESTRUP, C.; NIELSEN, M.; SCHEEL-KRUGER, J. Accumulation and disappearance of noradrenaline and its major metabolites synthesized from intraventriculary injected (3H) dopamine in the rat brain. **J. Neurochem.**, v. 23, p. 569-78, 1974.

BRACKETT, L. N.; LYNNE, C. M.; WEIZMAN, M. S.; BLOCH, W. E.; ABAE, M. Endocrine profiles and semen quality of spinal cord injured men. **J. Urol.**, v. 151, p. 114, 1994.

BRACKETT, L. N.; DAVI, C. R.; PADRON, F. O.; LYNNE, M. C. Seminal plasma of spinal cord injured men inhibits sperm motility of normal men. **J. Urol.**, v. 155, p. 1632-35, 1996.

BREIDENBACH, A.; FUHRMANN, H.; BUSCHE, R.; SALLMANN, HP. Studies on equine lipid metabolism. l. A fluorometric method for the measurement of lipolytic activity in isolated adipocytes of rats and horses. **Zentralbl. Veterinarmed. A.,** v. 45, p. 635-43, 1998.

BROCK, A. J.; CUNNANE, C. T. Studies on the mode of action of bretylium and guanethidine in post-ganglionic sympathetic nerves fibres. **Archiv. Pharmacol.,** v. 338, n. 5, p. 504-9, 1988.

BRUNTON, L. L.; LAZO, S. J.; PARKER, L. K. Fármacos que agem em sinapses e locais neuroefetores juncionais. In:_____. **Goodman e Gilman. As bases farmacológicas da terapêutica.** 11. ed. Tecmedd, 2007. p. 89-205.

BURNSTOCK, G.; EVANS, B.; GANNON, B. J.; HEATH, J. W.; JAMES, V. A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine. **Br. J. Pharmacol.**, v. 23, p. 657-67, 1971.

CASS, Q. B., DEGANI, A .L. G.; CASSIANO, N. M; PEDRAZOLLI JR. J. Enantiomeric determination of pantoprazole in human plasma by multidimensional high-performance liquid chromatography**. J.Chromatogr., B.,** v. 766, p. 153-60, 2002.

CAUSON, R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis: viewpoint and discussion. **J. Chromatogr. B.**, v. 689, p.175-80, 1997.

CHASIN, A. A. M.; NASCIMENTO, E. S.; RIBEIRO-NETO, L. M.; SIQUEIRA, M. E. P. B.; ANDRAUS, M. H.; SALVADORI, M. C.; FERNÍCOLA, N. A. G.; GORNI, R.; SALCEDO, S. Validação de métodos toxicológicos: uma abordagem geral. **Rev. Bras. Toxicol.**, v. 1, n. 11, p. 1-6, 1998.

CHIAP, P.; HUBERT, P. H.; BOULANGER, B.; CROMMEN, J. Validation of an automated method for the liquid chromatographic determination of atenolol in plasma: aplication of a new validation protocol. **Anal. Chim. Acta.**, v. 391, p. 227-38, 1999.

CHI, J. D.; ODONTIADIS, J.; FRANKLIN, M. Simultaneous determination of catecholamines in rat brain tissue by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr. B**, v. 731, p. 361-7, 1999.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho – HPLC.** São Paulo: Edgar Blucher, 1998.

CLARCK, J. T. Sexual function in altered physiological states: comparison of effects of hypertension, diabetes, hyperprolactinemia and others to “normal” aging in male rats. **Neurosci Biobehav. Rev.,** v. 19, p. 279-302, 1995.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Introdução a métodos cromatográficos**. 5. ed. Campinas: Unicamp, 1998.

COOK, S. E.; PINKERTON, T. C. Characterization of internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **J. Chromatogr**., v. 368, p. 233-48, 1986.

COOPER, B. R.; WIGHTMAN, M. R.; JORGENSON, J. W. Quantitation of epinephrine and norepinephrine secretion from individual adrenal medullary cells by microcolumn high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 653, p. 25-34, 1994.

CORTES, H. J.; ROTHMAN, L.D. Multidimensional high-performance liquid chromatography. In: CORTES, H. J. (editor). **Multidimensional chromatography:** techniques and applications. H. J. (Ed). New York: Marcel Dekker, 1990. v. 50, p. 219-50.

CURRIE, L. A. Nomenclature in evaluation of analytical methods including detection and quantification capabilities. **Anal. Chim. Acta**, v. 391, p. 105-26, 1999.

DARYL, J.; BRIAN, G.; HUNTER, T.; FEIBUSH, B. Shielded hydrophobic phase a new conceptor direct injection analysis of biological by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 433, n. 264, p. 264-270, 1998.

DAVANKOV, V. A.; TSYURUPA, M. P. Structure and properties of porous hypercosslinked polystyrene sorbents styrosorb. **Pure Appl. Chem.,** v. 61, p. 1881-1888, 1989.

DEMARIA, J. E.; NAGY, G. M.; LERANT, A. A.; FEKETE, M. I.; LEVENSON, C. W.; FREEMAN, M. E. Dopamine transporters participate in the physiological regulation of prolactin. **Endocrinology**, v. 141, p. 366-74, 2000.

DESILETS, C. P.; ROUNDS, M. A.; REGNIER, F. E. Semipermeable surface reversed-phase media for high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.,** v. 544, p. 25-39, 1991.

DOWNING, A. O.; JUUL, P. The effect of guanethidine pretreatment on transmission in the superior cervical ganglion. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 32, p. 369-81, 1973.

DURSTEWITZ, D.; KELC, M.; GUNTURKUN, O. A neurocomputational theory of the dopaminergic modulation of working memory functions. **J. Neurosci.**, v. 19, p. 2807-22, 1999.

EL BADAWI, A.; SCHENK, E. A. The distribution of cholinergic and adrenergic nerves in the mammalian epididymis: a comparative histochemical study. **Am. J. Anat.**, v. 121, p. 1-14, 1967.

ELIASSON, R.; RISLEY, P. L. Adrenergic innervation of the male reproductive ducts of some mammals. III. Distributions of noradrenaline and adrenaline. **Acta Physiol. Scand.**, v. 73, p. 311-9, 1968.

ERANKO, L.; ERANKO, O. Effects of guanethidine on nerve cells and amall intensely fluorescent cells in sympathetic ganglia of newborn and adult rats. **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v. 30, p. 403-16, 1971.

EVANS, B.; GANNON, B. J.; HEATH, J. W.; BURNSTOCK, G. Long-lasting damage to the internal male genital organs and their adrenergic innervation in rats following chronic treatment with the antihypertensive drug guanethidine. **Fertil. Steril**., v. 23, p. 657-67, 1972.

EVANS, B.; HEATH, J. W.; BURNSTOCK, G. Effects of chronic guanethidine on the sympathetic nervous system of mouse and toad. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 63, p. 81-92, 1979.

FEIBUSH, B.; SANTASANIA, C. T. Hydrophilic shielding of hydrophobic, cation and anion-exange phases for separation of small analytes: direct injection of biological fluids onto high-performance liquid chromatographic columns. **J. Crhomatogr.,** v. 544, p. 41-49, 1991.

FERRARESI, C.; APPOLLONIO, J.; BIANCHI, G.; FRIGO, M.; MARZORATI, C.; PECORA, N.; PEREGO, N.; PIERPAOLI, C.; FRATOLLA, L. Benzodiazepine receptors and diazepam binding inhibitor: a possible link between stress, anxiety and the immune system. **Psychoneuroendocrinology**, v. 18, p. 3-22, 1993.

FERRY, B.; ROOZENDAAL, B.; McGAUGH, J. L. Role of norepinephrine in mediating stress hormone regulation of long-term memory storage: a critical involvement of the amygdale. **Biol. Psychiatry**, v. 46, p. 1140-52, 1999.

FOLEY, J. P.; DORSEY, J. G. Equation for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and shewed peaks. **J. Anal. Chem.**, v. 55, p. 730-5, 1983.

FRANCOTE, E.; DAVATZ, A.; RICHERT, P. Development and validation of chiral high-performance liquid chromatographic methods for the quantification of valsartan and of the tosylate of valinebenzyl ester. **J. Chromatogr., B.,** v. 686, p. 77-83, 1996.

FRIED, K.; WAINER, I. W. Column-switching techniques in the biomedical analysis of stereoisomeric drugs: why, how and when. **J. Chromatogr.**, v. 689, p. 91-104, 1997.

GIDDINGS, J. C. Use of multiple dimensions in analytical separations. In: CORTES, H. J. (Editor). **Multidimensional chromatography:** techniques and applications. New York: Marcel Dekker, v. 50. p. 219-50, 1990.

GILINSKY, M. A.; FAIBUSHEVISH, A. A.; LUNTE, C. E. Determination of myocardial norepinephrine in freely moving rats using in vivo microdialysis sampling and liquid chromatography with dual-electrode amperometric detection. **J. Pharm. Biom. Anal.,** v. 24, p. 929-35, 2001.

GISCH, D. J.; HUNTER, B. T.; FEIBUSH, B. Shielded hydrophobic phase: a new concept for direct injection analysis of biological fluids by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.,** v. 433, p. 264-8, 1988.

GOMES, R. F.; CASS, Q. B.; CALAFATTI, S. A.; PEDRAZOLLI, J. J. Determinação de amoxilina em saliva por cromatografia multidimensional. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26., 2003, Poços de Caldas. **Livro de Resumo da SBQ**, 2003. QA076.

GONZALEZ, M. J.; JIMÉNEZ, B.; HERNÁNDEZ, L. M.; VIDALMADJAR, C.; PLACE, H. Use of a new HPLC stationary phase for one-step clean-up of human-milk for pcdd. **HCR-j. High Resolut. Chromatogr.,** v. 16, p. 129-30, 1993.

GUIMARÃES, M. A.; LUNARDI, L. O.; PELLIZZON, C. H.; KEMPINAS, W. G.; ROSA E SILVA, A. A. M. Male gonadal denervation by guanethidine at pre-puberty: different doses, different results. The intervention of the pineal eeafferentation. **Cell. Mol. Biol.**, v. 3, n. 3, p. 383-91, 1997.

HAGESTAM, I. H.; PINKERTON, T. C. Internal surface reversed-phase silica supports for liquid chromatography. **Anal. Chem.**, v. 57, p. 1757-63, 1985.

HAGINAKA, J.; YASUDA, H.; WAKAI, J.; MATSUNAGA, H.; YASUDA, H.; KIMURA, Y. Internal-surface reversed-phase silica support for direct injection determination of drugs in biological fluids by liquid chromatography. **Anal. Chem.,** v. 61, p. 2445-8, 1989.

HAGINAKA, J.; WAKAI, J.; YASUDA, H. Syntesis of mixed-function-phase silica supports for liquid chromatography and their application to assays of drugs in serum. **J. Chromatogr.,** v. 535, p. 163-72, 1990.

HAGINAKA, J. Drug determination in serum by liquid chromatography with restricted access stationary phases. **Trends Anal. Chem.,** v. 10, p. 17-22, 1991.

HAGINAKA, J.; MURASHIMA, T. Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-blonded sílica materials by liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 620, p.199-205, 1993.

HAGINAKA, J.; SEYAMA, C.; MURASHIMA, T. J. Retention and enantioselective properties of ovomucoid-bonded silica: Influence of physical properties of base materials and space length. **Chromatographia**, v. 660, p. 275-81, 1994.

HEATH, J. W.; BURNSTOCK, G. Selectivity of neuronal degeneration produced by chronic guanethidine treatment. **J. Neurocytol.**, v. 6, p. 397-405, 1977.

HEATH, J. W.; EVANS, B.; GANNON, B. J.; BURNSTOCK, G.; JAMES, V. B. Degeneration of adrenergic neurons following guanethidine treatment: the ultraestrutural study. **Virchous Arch. Abt. B. Zellpathol.**, v. 11, p. 182-97, 1972.

HEPP, R.; KREYE, V. A. W. Effect of long - Term treatment with high doses of guanethidine on sperm transport and fertility of rats. **Br. J. Pharmacol.**, v. 48, p. 30-35, 1973.

HE, X. M.; CARTER, D. C. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. **Nature**, v. 358, p. 209-15, 1992.

HERMANSSON, J.; GRAHN, A. Determination of drugs by direct injection of plasma into a biocompatible extrain column based on a protein-entrapped hydrophobic phase. **J. Chromatogr.,** v. 660, p. 119-29, 1994.

HIB, J.; PONZIO, R. O.; VILAR, O. Contractile behavior of the rat epididymis after sympathectomy produced by the administration of guanethidine. **Andrologia**, v. 11, p. 461-5, 1979.

HIRSCH, I. H.; MCCUE, P.; ALLEN, J.; LEE, J.; STAAS, W. E. Quantitative testicular biopsy in spinal cord injured men: comparison to fertile controls. **J. Urol.**, v. 146, p. 337-41, 1991.

HODSON, N. Role of the hypogastric nerves in seminal emission in the rabbit. **J. Reprod. Fertil.**, v. 7, p. 113-22, 1964.

HODSON, N. Sympathetic nerves and reproductive organs in the male rabbit. **J. Reprod. Fertil.**, v. 10, p. 209-20, 1965.

HOSOYA, K.; KISHII, Y.; KIMATA, K.; ARAKI, T.; TANAKA, N.; SVEC, F.; FRÈCHET, J. M. J. Uniform-size hydrophobic polymer-based separation media selectively modified with a hydrophilic external polymeric layer. **J. Chromatogr.,** v. 690, p. 21-8, 1995.

JAVIDAN, S.; CWIK, M. J. Determination of catecholamines in human plasma by HPLC with electrochemical detection. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v. 19, p. 1339-48, 1996.

JENKE, D. R. Chromatographic method validation: a review of current practices and procedures I. General concepts and guidelines. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 5, n. 19, p. 719-36, 1996.

JOHNSON, E. M.; MACIA, R. A.; YELLIN, T. O. Marked difference in the susceptibility of several species to guanethidine – induced chemical sympathectomy. **Life Sciences**, v. 20, p. 107-12, 1977.

JOHNSON, E. M.; MANNING, P. T. Guanethidine induced destruction of sympathetic neurons. **Int. Rev. Neurobiol.**, v. 25, p. 1-37, 1984.

JUNQUEIRA, C. L.; CARNEIRO, J. Aparelho reprodutor masculino. In:____. **Histologia Básica.** 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 427-9.

KANDA, T.; SHIROTA, O.; OHTSU, Y.; YAMAGUCHI, M. Síntesis and characterization of polymer-coated mixed-functional stationary phases with several different hydrophobic groups for direct analysis of biological samples by liquid chromatography. **J. Chromatogr., A.,** v. 722, p. 115-21, 1996.

KATAOKA, H, New trends in sample preparation for clinical and pharmaceutical analysis. Trends. **Anal. Chem.,** v. 22, n. 4, p. 232-44, 2003.

KEDIA, K.; MARKLAND, C. The effect of pharmacological agents on ejaculation. **J. Urol.,** v. 114, p. 569-73, 1975.

KEMPINAS, W. G.; SUAREZ, J.D.; ROBERTS, N.L.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J. M.; KLINEFELTER, G. R. Rat epididymal sperm quantity, quality, and transit after guanethidine - induced sympathsectomy. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 890-6, 1998a.

KEMPINAS, W. G.; SUAREZ, J. D.; ROBERTS, N. L.; STRADER, L.; FERRELL, J.; GOLDMAN, J. M.; NAROTSKY, M. G.; PERREAULT, S. D.; EVENSON, D. P.; RICKER, D.D., KLINEFELTER, G. R. Fertility of rat epididymal sperm after chemically and surgically induced sympathectomy. **Biol. Reprod.**, v. 59, p. 897-904, 1998b.

KLINEFELTER, G. R.; HESS, R. A. Toxicology of the male excurrent ducts and accessory sex glands. In: KORACH, K. S. **Reprod. Devel. Toxicol.** New York: Dekker, 1998. p. 553-91.

KIMATA, K.; TSUBOI, R.; HOSOYA, K.; TANAKA, N.; ARAKI, T. Method for the preparation of internal-surface reversed-phase packing materials starting from alkylsilylated silica gels. **Anal. Chem.,** v. 62, p. 807-10, 1990.

KNIGGE, U.; WILLEMS, E.; KJAER, A.; JORGENSEN, H.; WARBERG, J. Histaminergic and catecholaminergic interactions in the central regulation of vasopressin and oxytocin secretion. **Endocrinology,** v. 140, p. 3713-9, 1999.

KUMAZAWA, T.; MIZUMURA, K.; SATO, J. Response properties of polymodal receptorsstudied using in vitro testis superior spermactic nerve preparations of dogs. **J. Neurophysiol.**, v. 57, p. 702-11, 1987.

KVETNANSKY, R.; FUKUHARA, K.; PACAK, K.; CIZZ, G.; GOLDSTEIN, D. S.; KOPIN, I. J. Endogenous glucocorticoids restrain catecholamines syntesis and release at rest and during immobilization stress in rats. **Endocrinology**, v. 133, p. 1411-9, 1993.

LAMANO-CARVALHO, T. L.; PETENUSCI, S. O.; FAVARETTO, A. L. V.; KEMPINAS, W. G. Morfometric and biochemical evaluation of rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine. **Arch. Int. Physiol. Biochem.**, v. 98, p. 225-30, 1990.

LAMANO-CARVALHO, T. L.; PETENUSCI, S. O.; FAVARETTO, A. L. V.; KEMPINAS, W. G. Prepubertal development of rat prostate and seminal vesicle following chemical sympathectomy with guanethidine. **Braz. J.Med. Biol. Res**., v. 26, p. 639-46, 1993.

LAMANO-CARVALHO, T. L.; GUIMARÃES, M. A.; KEMPINAS, W. G.; PETENUSCI, S. O.; ROSA E SILVA, A. A. M. Effects of guanethidine-induced sympathectomy on the spermatogenic and steroidogenic testicular functions of prepubertal to mature rats. **Andrologia**, v. 28, p.117-22, 1996.

LANÇAS, F. M. **Cromatografia em fase gasosa.** São Carlos: Acta, 1993.

LEANDRO, Z. F. **Bisfenol A:** validação de método e ocorrência em água superficial e tratada da cidade de Araraquara. 2006. 94 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

LEITE, F. **Validação em análise química.** 4. ed. Campinas: Átomo, 2002.

LINSENMEYER, T. A.; PERKASH, I. Infertility in men with spinal cord injury. **Arch. Phys. Med. Rehab.**, v. 72, p. 747-54, 1991.

LODISK, H.; BLATIMORE, D.; BERK, A.; ZIPURSKY, S. L.; MATSUDAIRA, P.; DARNELL, J. **Mol. C. Biol.** 3nd. ed. New York: Scientific American Books, 1995.

MAJORS, R. E.; BOSS, K. S.; GRIMM, C. H.; LUBDA, D.; WIELAND, G. Pratical guidelines for HPLC-intrated sample preparation using column switching. **LCGC**, v. 14, p. 554-60, 1996.

MANO, N.; ODA, Y.; ASAKAWA, N.; YOSHIDA, Y.; SATO, T.; MIWA, T. Studies of ovomucoid-avidin, conalbumin and flavoprotein conjugated chiral stationary phases for separation of enantiomers by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 687, n. 223, p. 223-6, 1994.

MELANDER, W. R.; HORVARD, K. E. **J. Chromatogr.**, v. 65, p. 203, 1981.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G. Analysis of organoclorine pesticides in plain milk using direct injection on a ISRP column, with column switching. **J. Liq. Chromatogr.,** v. 19, p. 3221-8, 1996.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G.; DEMARCI, A. C. C. O. On-line extraction and determination of carbofuran in raw milk by direct HPLC injection on ISRP column. **Chromatographia**, v. 47, p. 81-3, 1998.

MENEZES, M. L.; FÉLIX, G. On-line extraction and separation of bendiocarb, methomyl, methylparation and pentaclorophenol pesticides from raw milk. **J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.**, v. 21, p. 2863-71, 1998.

MENEZES, M. L.; SANCHEZ, A.; MARTINS, P. R.; GARCIA, M. Z.; PEREIRA, O. C. M.; CARDOSO, A. A. Determinação de cafeína em amostras de urina por injeção direta no HPLC. **Salusvita**, v. 18, n. 2, p. 35-9, 1999.

MOURA, D.; AZEVEDO, I.; GUIMARÃES, S. Differential distribution in, and release from, sympathetic nerve endings of endogenous noradrenaline and recently incorporated catecholamines. **Arc. Pharmacol.**, v. 342, p. 153-9, 1990.

NAFFAH-MAZZACORATTI, M. G.; CASARINI, D. E.; FERNANDES, M. J. S. CAVALHEIRO, E. A. Serum catecholamine levels determined by high-performance liquid chromatography coupled with electrochemical detection. **Arq. B. Endocrinol. Metabol.**, v. 36, p. 119-22, 1992.

NASSR, A. C.; MALVEZZI, C. K.; KEMPINAS, W. G. Reversibilidade do efeito da simpatectomia química sobre o aparelho reprodutor masculino de rato. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE DE SÃO CARLOS, 1997. **Resumos...** São Carlos, 1997, p. 194.

NAWROCKI, J. The silanol group and its role in liquid chromatography. **J. Chromatogr.**, v. 779, p. 29-71, 1997.

NI, P.; GUYON, F.; CAUDE, M.; RESSET, R. Automated determination of catecholamines using on-column extraction of diphenylborate-catecholamine complexes and high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 12, n. 10, p. 1873-88, 1989.

NIMURA, N.; ITOH, H.; KINOSHITA, T. Diol-bonded silica-gel as a restricted access packing forming a binary-layered phase for direct injection of serum for the determination of drugs. **J. Chromatogr. A.,** v. 689, p. 203-10, 1995.

NORBERG, K. A.; RISLEY, P. L.; UNGERSTEDT, U. Adrenergic innervation of the male reproductive ducts in some mammals. I. The distribuction of adrenergics nerves. **Z. Zellforsch.**, v. 76, p. 278-86, 1967.

NUP, C.; ROSENBERG, P.; LINKE, H.; TORDIK P. Quantitation of catecholamines in inflamed human dental pulp by high-performance liquid chromatography. **J. Endod.,** v. 27, p. 73-5, 2001.

ODA, Y.; ASAKAWA, N.; ABE, S.; YOSHIDA, Y.; SATO, T. Avidin protein-conjugated column for direct injection analysis of drug enantiomers in plasma by high-performance liquid chromatography. **J. Chromatogr.,** v. 572, p. 133-41, 1991.

O'DONNELL, S. R.; SAAR, N. The effects of 6-hydroxydopamine and guanethidine on peripheral adrenergic nerves in the guinea-pig. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 28, p. 251-6, 1974.

OERTEL, R.; RICHTER, K.; GRAMATTÉ, T.; KIRCH, W. Determination of drugs in biological fluids by high-performance liquid chromatography with on-line sample processing. **J. Chromatogr.,**v. 797, p. 203-9, 1998.

OISHI, R.; MISHIMA, S.; KURIYAMA, H. Determination of norepinephrine and its metabolites released from rat vas deferens using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **Life Sci.,** v. 32, p. 933-40, 1983.

PAPPA-LOUISI, A.; ROFALIKOU, E.; MICHAELIDIS, B. Determination of biogenic amines and related compounds in the ganglia and the auricle and ventricle of the heart of the Snail Helix Lucorum L. by HPLC with amperometric detection. **J. Liq. Chrom. Rel. Techol.,** v. 20, p. 2427-39, 1997.

PATEL, B.; ANIL, ARUNDELL, M.; PARKER, K. H.; YEOMAN, S. M. O.; HARE, D. Simple and rapid determination of serotonin and catecholamines in biological tissue using high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatog., B**, v. 818, p. 269-76, 2005.

PEREIRA, O. C. M.; DEGA, M. R.; SOUZA, M. S. S. Noradrenergic response in vas deferens from rats submitted to acute nd repeated stress. **Gen. Pharmacol.,** v. 30, p. 417-21, 1998.

PERRY, J. A. The internal surface reverse phase. Concepts and applications. **J. Liq. Chromatogr.**, v. 13, p. 1047-74, 1990.

PERRY, J. A.; INVERGO, B.; WAGNER, H.; SZCZERBA, T. J.; RATEIKE, J. D. An improved internal-surface reversed-phase. **J. Liq. Chromatogr.,** v. 15, p. 3343-52, 1992.

PINKERTON, T. C.; MILLER, T. D.; COOK, S. E.; PERRY, J. A.; RATEIKE, J. D.The nature and use of internal surface reversed-phase columns: a new concept in higt performance liquid chromatography. **Biochromatography,** v. 1, p. 96- 103, 1986.

PINKERTON, T. C. High-performance liquid chromatography packing materials for analysis of small molecules in biological matrices by direct injection. **J. Chromatogr.**, v. 544, p. 13-23, 1991.

PINTO, T. A. E. **Desenvolvimento de um método rápido e eficiente por injeção direta em coluna cromatográfica ISRP para a determinação de corticosteróides em amostras sanguíneas:** estudo de estresse agudo em animais. 2005. 148 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

POMPON, A.; LEFEBVRE, I.; IMBACH, J. L. On-line internal surface reversed-phase cleaning: the direct HPLC analysis of crude biological samples. **Bioch. Pharmacol.**, v. 43, p. 1769-75, 1992.

PYTHON, A.; De SAINT HILAIREh, Z.; GAILLARD, J. M. Effects of a D2 receptor agonist RO 41-9067 alone and wit clonidine on sleep parameters in the rat. **Pharmacol. Biochem. Behav.**, v. 53, p. 291-6, 1996.

QUATTROCCHI, O. A.; ANDRIZZI, S. A.; LABA, R. F. **Introducción a la HPLC**: aplicación y prática. Buenos Aires: Merck, 1992. 422 p.

RACAITYTE, K.; LUTZ, E. S. M.; UNGER, K. K.; LUBDA, D.; BOOS, K. S. Analysis of neuropeptide Y and its metabolites by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry and integrated sample clean-up with a novel restricted-access sulphonic acid cation exchanger. **J. Chromatogr., A.,** v. 890, p. 135-44, 2000.

RAGGI, M. A.; SABBIONI, C.; CASAMENTI, G.; GERRA, G.; CALONGHI, N.; MASOTTI, L. Determination of catecholamines in human plasma by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. **J. Chromatogr., B. Biomed. Sci., Appl.**, v. 730, p. 201-11, 1999.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. Transmissão noradrenérgica. In:_____. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro:Guanabara Koogan, 2004. p. 130-1.

RIBANI, M.; BOTTOLI, 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.

RICKER, D. D.; CHANG, T. S. K. Neuronal imput from the inferior mesenteric ganglion (IMG) affects sperm transport within the rat cauda epididymis. **Int. J. Androl.**, v. 19, p. 371-6, 1996.

RICKER, D. D. The autonomic innervation of the epididymis: its effects on epididymal function and fertility. **J. Androl.**, v. 19, p. 1-4, 1998.

RISLEY, P. L.; SKREPETOS, C. N. Histochemical distribution of cholinesterases in the testis, epididymis and vas deferens of the rat. **Anat. Rec.**, v. 148, p. 231-41, 1964.

ROMANIDES, A. J.; DUFFY, P.; KALIVAS, P. W. Glutamatergic and dopaminergic afferents to the prefrontal cortex regulate spatial working memory in rats. **Neuroscience**, v. 92, p. 97-106, 1999.

ROSA E SILVA, A. A. M.; GUIMARÃES, M. A.; LAMANO CARVALHO, T. L.; KEMPINAS, W. G. Chemical sympathectomy blocks androgen biosynthesis during prepuberty. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 28, n. 10, p.1109-12, 1995.

ROSENBLOOM, S. E.; SHAPERA, R. P.; GOLDBLOOM, R. S.; SHEPS, M. C.; SHAPIRO, A. P. **Tecnic of controlled dfrug assay III.** Comparison of guanethine, mecamylamine and a placebo in the hypertensive pacient. **N. Engl. J. Med.**, v. 268, p. 797-803, 1963.

ROWLAND, D. L.; HOUTSMULLER, E. J. 8-OH-DPAT interacts with sexual experience and testosterone to affect ejaculatory response in rats. **Pharmacol. Biochem. Behav.,** v. 60, p. 143-9, 1998.

SANCHEZ, A. **Determinação de catecolaminas por cromatografia líquida de alta eficiência empregando uma coluna cromatográfica com superfície interna de fase reversa em plasma e glândulas adrenais de ratos submetidos ao estresse agudo.** 2000. 131 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2000.

SANCHEZ, A.; MENEZES, L. M.; PEREIRA, O. C. M. Determinação de catecolaminas em amostras de plasma de ratos por injeção direta usando CLAE. **Salusvita**, v. 20, p. 63-71, 2001.

SANCHEZ, A.; TOLEDO-PINTO, A. E.; MENEZES, L. M.; PEREIRA, O. C. M. A simple high-performance liquid chromatography assay for on-line determination of catecholamines in adrenal gland by direct injection on an ISRP column. **Pharmacol. Res.**, v. 50, p. 481-5, 2004.

SASTRE, E.; NICOLAY, A.; BRUGUEROLLE, B.; PORTUGAL, H. Method for simultaneous measurement of norepinephrine, 3-methoxy-4-hydroxyphenylglycol and 3, 4-dihydroxyphenylglycol by liquid chromatography with electrochemical detection: application in rat cerebral cortex and plasma after lithium chloride treatment. **J. Chromatogr., B.,** v. 801, p. 205-11, 2004.

SCHEURINK, A. J. W.; STEFFENS, A. B.; BOURINTIUS, H.; DRETELER, G. H.; BRUNTINK, R.; REMIE, R.; ZAAGSMA, J. Adrenal and sympathetic catecholamines in exercising rats. **Am. J. Physiol.**, v. 256, p. 155-60, 1989a.

SCHEURINK, A. J. W.; STEFFENS, A. B.; DRETELER, G. H.; BÉNTHEN, L.; BRUNTINK, R. Experience affects exercise-induced changes in catecholamines, glucose and FFA. **Am. J. Physiol.,** v. 256, p. 169-73, 1989b.

SHERMA, J.; BEROSA, M. Manual of analytical quality control for pesticides and related compounds, in human and environmental samples. U. S. Environmental Protection Agency, 1982.

SHULUN, W.; WANG, G.; BARTON, B. E.; MURFHY, F. T.; HUANG, H. F. S. Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat is associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling. **J. Androl.**, v. 26, p. 592-660, 2005.

SIAGHY, E. M.; DEVAUX, Y.; SCHROEDER, H.; SFAKSI, N.; UNGUREANU-LONGROIS, D.; ZANNAD, F.; VILLEMOT, J. P.; NABET, P.; MERTES, P. M. High-performance liquid chromatographic analysis of muscular interstitial arginine and norepinephrine kinetics. A microdialysis study in rats. **J. Chromatogr. B. Biomed. Sci. Appl.,** v. 18, p. 279-86, 2000.

SIMIONATO, S. R. M. E. **Determinação de ocratoxinas em cervejas, por injeção direta, empregando cromatografia líquida de alta eficiência.** 2005. 105 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

SILVA, D. A. F. **Simpatectomia química pela guanetidina:** estudos de parâmetros farmacológicos e da reversibilidade de parâmetros reprodutivos. 2002. 149 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

SJOSTRAND, N. O. The adrenergic innervation of the vas deferens and the accessory male genital glands. **Acta Physiol. Scand.**, v. 65, n. 257, p. 77-82, 1965.

SMIGOL, V.; SVEC, F.; FRÈCHET, J. M. J. Novel uniformly sized polymeric stationary-phase with hydrophilized large pores for direct-injection HPLC determination of drugs in biological-fluids. **J. Liq. Chromatogr.,** v. 17, p. 891-911, 1994.

SMITH, R. M. Before the injection-modern methods of sample preparation for separation techniques**. J. Chromatogr., A.,** v. 1000, p. 3-27, 2003.

SOUTHWICK, S. M.; PAIGE, S.; MORGAN, C. A.; BREMNER, J. D.; KRYSTAL, J. H.; CHARNEY, D. S. Neurotransmitter alterations in PTSD: catecholamines and serotonin. **Semin. Clin. Neuropsych.**, v. 4, p. 242-8, 1999.

STEFANICK, M. L.; SMITH, E. R.; SZUMOWSKI, D. A.; DAVIDSON, J. M. Reproductive physiology and behavior in the male rat following acute and chronic peripheral adrenergic depletion by guanethidine. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v. 23, p. 55-63, 1985.

SUDO, Y.; AKIBA, M.; SAKAKI, T.; TAKAHATA, Y. Glycerylalkylsilylated silica gels for direct-injection análisis of drugs in serum by high-performance liquid-chromatography. **J. Chromatogr.,** v. 17, p. 1743-54, 1994.

SWEDIN, G.; LINDHOLMER, C. Permanent infertility of the male rat denervation of the vas deferens and the accessory genital glands. **Andrologia**, v. 6, p. 103-10, 1974.

SWUARTZ, M. E.; KRULL, I. R. Validação de métodos cromatográficos. **Pharmacol. Tecnol.**, v. 2, p. 12-9, 1998.

TALO, A.; JAAKKOLA, U. M.; MARKKULA-VIITANEN, M. Spontaneous electrical activity of the rat epididymis in Vitro. **J. Reprod. Fertil.**, v. 57, p. 423-9, 1979.

TAVARES, P.; RIBEIRO FONTES, C. A.; TEIXEIRA, F. Cyclosporin effect on noradrenaline release from the sympathetic nervous endings of rat aorta. **Pharmacol. Res.**, v. 47, p. 27-33, 2003.

VALET, P.; SAULNIER-BLACHE, J. S. Metabolic and trophic role of catecholamines in the development of white adipose tissue. **Ann. Endocrinol.**, v. 60, p. 7-74, 1999.

VEJLSGAARD, V.; CHRISTENSEN, M.; CLAUSEN, E. Double-blind trial of four hypotensive drugs (methyldopa and three sympatholytic agents). **Br. Med. J.**, v. 2 p. 598-600, 1967.

YAMAMOTO, M.; MOMOSE, H.; YAMADA, K. Fathering of a child with the assistance of electroejaculation in conjunction with intracytoplasmic sperm injection: case report. **Spinal Cord**, v. 35, p. 179-80, 1997.

YAMAMOTO, E.; MURATA, K.; ISHIHAMA, Y.; ASAKAWA, N. Methylcellulose-immobilized reversed-phase precolumn for direct analysis of drugs in plasma by HPLC. **Anal. Sci.,** v. 17, p. 1155-9, 2001.

YOSHIDA, H.; MORITA, I.; TAMAI, G.; MASUJIMA, T.; TSURU, T.; TAKAI, N.; IMAI, H. Some characteristics of a protein-coated ODS column and its use for the determination of drugs by the direct injection analysis of plasma samples. **Chromatographia**, v. 19, p. 466-72, 1984.

YOSHITAKE, T.; FUJINO, K.; KEHR, J.; ISHIDA, J.; NOHTA, H.; YAMAGUCHI, M. Simultaneous determination of norepinephrine, serotonin, and 5-hydroxyindole-3-acetic acid in microdialysis samples from rat brain by microbore column liquid chromatography with fluorescence detection following derivatization with benzylamine. **Anal. Biochem.,** v. 312, p. 125-33, 2003.

WANG, J. M.; MACKENNA, K. E.; LEE, C. Determination of prostatic secretion in rats: effects of neurotransmitters and testosterone. **Prostate**, v. 18, p. 289-301, 1991.

WANG, S.; WANG, G.; BARTON, E. B.; MURPHY, F. T.; HUANG, S. F. H. Impaired sperm function after spinal cord injury in the rat is associated with altered cyclic adenosine monophosphate signaling. **J. Androl.**, v. 26, n. 5, p. 592-600, 2005.

ZEFERINO, A. M. **Determinação do monofluoracetato de sódio em soro sanguíneo por cromatografia líquida de alta efiência.** 2005. 113 f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

ZHANG, H. –X.; LIU, M. –C; ZHU, P. –L. Preparation of a polyglycol-C_8 bonded phase and its characteristics. **J. Chromatogr., A**., v. 722, p. 115-21, 2000.

ANEXO

ANEXO A – Peso dos órgãos reprodutores e volume de ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} adicionado.

Tabela 1. Peso da cauda do epidídimo (CE) de ratos Wistar e volume de ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} adicionado.

Órgão (n = 9)	Massa (mg)		Volume (mL)	
	Grupo Controle	Grupo Fortificado	Grupo Controle	Grupo Fortificado
CE 1	127	148	1,27	1,48
CE 2	176	156	1,76	1,56
CE 3	159	160	1,59	1,6
CE 4	141	166	1,41	1,66
CE 5	136	118	1,36	1,18
CE 6	159	135	1,59	1,35
CE 7	129	135	1,29	1,35
CE 8	179	177	1,79	1,77
CE 9	160	156	1,6	1,56

N = número de animais

Tabela 2. Peso do ducto deferente (DD) de ratos Wistar e volume de ácido perclórico 0,4 mol L^{-1} adicionado.

Órgão (n = 9)	Massa (mg)		Volume (mL)	
	Grupo Controle	Grupo Fortificado	Grupo Controle	Grupo Fortificado
DD 1	75	77	1,00	1,00
DD 2	82	85	1,00	1,00
DD 3	85	81	1,00	1,00
DD 4	83	80	1,00	1,00
DD 5	76	79	1,00	1,00
DD 6	79	72	1,00	1,00
DD 7	57	65	1,00	1,00
DD 8	72	84	1,00	1,00
DD 9	82	92	1,00	1,00

N = número de animais.

Livros Grátis

(http://www.livrosgratis.com.br)

Milhares de Livros para Download:

Baixar livros de Administração
Baixar livros de Agronomia
Baixar livros de Arquitetura
Baixar livros de Artes
Baixar livros de Astronomia
Baixar livros de Biologia Geral
Baixar livros de Ciência da Computação
Baixar livros de Ciência da Informação
Baixar livros de Ciência Política
Baixar livros de Ciências da Saúde
Baixar livros de Comunicação
Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE
Baixar livros de Defesa civil
Baixar livros de Direito
Baixar livros de Direitos humanos
Baixar livros de Economia
Baixar livros de Economia Doméstica
Baixar livros de Educação
Baixar livros de Educação - Trânsito
Baixar livros de Educação Física
Baixar livros de Engenharia Aeroespacial
Baixar livros de Farmácia
Baixar livros de Filosofia
Baixar livros de Física
Baixar livros de Geociências
Baixar livros de Geografia
Baixar livros de História
Baixar livros de Línguas

Baixar livros de Literatura
Baixar livros de Literatura de Cordel
Baixar livros de Literatura Infantil
Baixar livros de Matemática
Baixar livros de Medicina
Baixar livros de Medicina Veterinária
Baixar livros de Meio Ambiente
Baixar livros de Meteorologia
Baixar Monografias e TCC
Baixar livros Multidisciplinar
Baixar livros de Música
Baixar livros de Psicologia
Baixar livros de Química
Baixar livros de Saúde Coletiva
Baixar livros de Serviço Social
Baixar livros de Sociologia
Baixar livros de Teologia
Baixar livros de Trabalho
Baixar livros de Turismo