UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

**ANÁLISE DE FLAVONÓIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA
DE ALTA EFICIÊNCIA E ELETROFORESE CAPILAR -
OTIMIZAÇÃO DE SEPARAÇÃO E APLICAÇÕES
TECNOLÓGICAS**

FERNANDO GUSTAVO TONIN

Tese de doutorado

Prof^a Dr^a Marina F. M. Tavares

SÃO PAULO
21 de fevereiro de 2006

“Análise de flavanóides por cromatografia líquida e alta eficiência e eletroforese capilar - otimização de separação e aplicações tecnológicas”

GUSTAVO FER^NANDO TONIN

Tese de Doutorado submetida ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Química - Área: Química Analítica.

Aprovado(a) por:

Profa. Dra. ~~MARINA FRANCO MAGGI~~ TAVARES
(Orientadora e Presidente)

Prof. ~~Dr.~~ JOÃO PEDRO SIMON FARAH
IQ - USP

Profa. Dra. CAROL HOLLINGWORTH COLLINS
IQ - UNICAMP

Prof. ~~Dr.~~ JOSÉ ALBERTO FRACASSI DA SILVA
IQ - UNICAMP

Prof. Dr. ~~MARCELO~~ ALEXANDRE PRADO
FEA - UNICAMP

SÃO PAULO
09 DE JUNHO 2006

T
543.0894
665a

*“Ando devagar porque já tive pressa
e levo este sorriso, porque já chorei demais.
Hoje me sinto mais forte, mais feliz quem sabe
eu só levo a certeza que de muito pouco eu sei,
eu nada sei.”*

Almir Sater e Renato Teixeira

Aos meus pais Lourival e Maria Antonieta

AGRADECIMENTOS

À Profa. Marina F. M. Tavares pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho

Ao professor Farah pela paciência e disposição em ensinar

À Alessandra pelo amor, compreensão e companheirismo

Aos amigos e familiares pela compreensão durante estes anos de estudo

Ao CNPq pela concessão da bolsa de estudo

Aos colegas do grupo LACE

Ao Renatão pelo injetor !!!!!

A todos os professores do Instituto de Química de alguma forma contribuíram para a minha formação acadêmica

Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1.1 Aspectos gerais	2
1.1.2 Aspectos estruturais	4
1.1.3 Análise de flavonóides	7
 Capítulo 2 – Análise de flavonóides por HPLC	 18
2.1 Introdução	20
2.2 Objetivos	28
2.3 Parte Experimental	29
2.3.1 Equipamentos e softwares	29
2.3.2 Reagentes e padrões	29
2.3.3 Preparação das amostras de Neem	30
2.3.4 Metodologia	30
2.4 Resultados e discussão	32
2.4.1 Comportamento cromatográfico	32
2.4.2 Modelagem dos fatores de retenção (k) em função da composição da fase móvel	40
2.4.3 Avaliação das diferenças dos sistemas cromatográficos	47
2.4.4 Desenvolvimento de metodologia para análise de flavonóides majoritários presentes nas folhas de <i>Azadirachta indica</i> (Neem)	56
2.4.4.1 Análise Qualitativa e seleção da fase móvel	56
2.4.4.2 Otimização das condições de gradiente e temperatura	62
2.4.4.3 Figuras de mérito do método proposto	68
2.5 Conclusões	73
2.6 Referências bibliográficas	74

Capítulo 3 – Análise de flavonóides por RF-MEKC	76
3.1. Introdução	77
3.2 Objetivos	81
3.3 Parte experimental	81
3.3.1 Equipamento e condicionamento do capilar	81
3.3.2 Reagentes e soluções	82
3.3.3 Preparo da amostra	83
3.3.4 Condições analíticas	83
3.4 Resultados e discussão	84
3.4.1 Efeito de solventes na migração eletroforética dos flavonóides	91
3.4.2 Otimização	98
3.5 Conclusões	103
3.6 Referências bibliográficas	105
 Capítulo 4 – Análise de flavonóides agliconas	 107
4.1 Introdução	108
4.2 Objetivos	110
4.3 Parte experimental	111
4.3.1 Equipamentos e softwares	111
4.3.2 Reagentes e soluções	111
4.3.3 Preparação das amostras	112
4.3.4 Metodologia	113
4.4 Resultados e discussão	114
4.4.1 Desenvolvimento da metodologia de separação	114
4.4.1.1 Seleção da fase móvel	114
4.4.1.2 Otimização das condições do gradiente	128

4.4.2 Figuras de mérito da metodologia desenvolvida	134
4.4.2.1 Linearidade	134
4.4.2.2 Precisão	135
4.4.2.3 Estimativa dos limites de quantificação e detecção	136
4.4.3 Otimização das condições de hidrólise de extratos de <i>Azadirachta indica</i> (Neem)	138
4.5 Conclusões	153
4.6 Referências bibliográficas	154
Capítulo 5 – Detecção de substâncias antioxidantes “on-line” em HPLC	156
5.1 Introdução	157
5.2 Objetivos	160
5.3 Experimental	161
5.3.1 Equipamentos e softwares	161
5.3.2 Preparação do ABTS*	161
5.3.3 Metodologia	162
5.4 Resultados e discussão	163
5.4.1 Detecção de substâncias antioxidantes presentes em <i>Azadirachta indica</i> (Neem)	165
5.4.2 Outras aplicações	168
5.4.2.1 <i>Salvia officinalis</i> (Sálvia)	168
5.4.2.2 <i>Melissa officinalis</i> (Melissa)	170
5.4.2.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> (Alecrim)	172
5.5 Conclusões	174
5.6 Referências bibliográficas	175

Capítulo 6 – Otimização de extração de flavonóides de <i>Azadirachta indica</i>.	176
6.1 Introdução	177
6.2 Objetivos	178
6.3 Experimental	178
6.4 Resultados e discussão	179
6.4.1 Modelagem do índice de refração	179
6.4.2 Modelagem da densidade	181
6.4.3 Modelagem da concentração dos flavonóides glicosilados	183
6.4.3.1 Rutina	183
6.4.3.2 Isoquercitrina	186
6.4.3.3 Nicotiflorin	188
6.4.3.4 Astragalin	191
6.4.3.5 Quercitrina	193
6.4.4 Simulação e otimização	195
6.5 Conclusões	196
6.6 Referências bibliográficas	197
Capítulo 7 – Considerações finais	198
7.1 Conclusões finais	199
7.2 Perspectivas futuras	200

Símbolos e Abreviações

ABTS	2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)
ACN	acetonitrila
APCI	ionização química à pressão atmosférica
CE	eletroforese capilar
CHES	N-Cyclohexyl-2-aminoethanesulfonic acid
CMC	concentração micelar crítica
CZE	eletroforese capilar em zona
DAD	detector de arranjo de diodos
ESI	ionização por eletrospray
Fi	força cromatográfica inicial
HEPES	2-(Cyclohexylamino)ethanesulfonic acid
HPLC	cromatografia líquida de alta eficiência
k	fator de retenção
LOD	limite de detecção
LOQ	limite de quantificação
LSER	Relação Linear de Energia de Solvatação
MEKC	cromatografia micelar eletrocinética
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas
N	número de pratos
R ₂	refração molar
RF-MEKC	cromatografia micelar eletrocinética em fluxo eletrosmótico reduzido
R _m	resolução modificada
R _s	resolução
S/R	relação sinal / ruído
SDS	dodecilsulfato de sódio
t _{aq}	tempo de residência do analito na fase aquosa
t _g	tempo de gradiente
THF	tetrahidrofurano
TLC	cromatografia em Camada Delgada

t_{mc}	tempo de migração da micela
TMS	trimetilsilil
t_r	tempo de retenção
TROLOX	6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2carboxylic acid
UV	ultra-violeta
V_2	volume molar
V_x	volume de McGowan
$\Sigma\alpha_2^H$	acidez por ponte de hidrogênio
$\Sigma\beta_2^H$	basicidade por ponte de hidrogênio
α	fator de separação
π_2^*	dipolaridade/polarizabilidade

RESUMO

No presente trabalho foram estudadas as separações de 18 flavonóides (9 agliconas e 9 glicosídeos) pelas técnicas de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência em fase reversa (RP-HPLC) e Cromatografia Micelar Eletrocínética em fluxo reverso (RF-Meck). Em ambas as técnicas foram avaliados solventes puros (metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano) e suas misturas como formas de promover a variação de seletividade, através da modificação da fase móvel em HPLC, e da natureza do aditivo orgânico em RF-Meck.

Nos estudos efetuados em HPLC utilizando-se gradiente, pode-se comprovar a possibilidade da modelagem do fator de retenção em função da proporção de solvente utilizados (MeOH, ACN, THF e suas misturas). Pode-se ainda, com base nos dados de retenção e na análise hierárquica de clusters, diferenciar quatro diferentes grupos de sistemas cromatográficos com diferentes seletividades para flavonóides agliconas, e outros quatro com diferentes seletividades para glicosídeos. Os sistemas cromatográficos mais ortogonais (cada um pertencente a um grupo de seletividade) foram aplicados na separação de uma planta modelo (*Azadirachta indica*), de onde pode-se escolher a fase móvel mais seletiva para se otimizar a separação dos flavonóides glicosilados presentes nas folhas desta planta. No método final otimizado pode-se identificar e quantificar cinco dos flavonóides majoritários presentes, sendo três glicosídeos de quercetina (rutina, isoquercitrina e quercitrina) e dois glicosídeos de kaempferol (astragalin e nicotiflorin), em amostras de duas diferentes procedências (Piracicaba-SP e Silvânia-GO).

Nos estudos envolvendo a separação dos dezoito flavonóides por RF-MEKC pode-se comprovar diferenças significativas de seletividade quando se

varia a natureza do solvente orgânico utilizado como aditivo, além de se observar tendências na migração em função das propriedades do solvente adicionado e da estrutura molecular do flavonóide. O solvente de menor eficiência para separação dos flavonóides foi o MeOH. Através da análise dos eletroferogramas obtidos através de um planejamento experimental de misturas, e das trocas de pares críticos observadas nos vários eletrólitos utilizados, obteve-se um método de separação com apenas um par crítico em menos de 12 minutos de corrida. O coeficiente de variação obtido para o fator de retenção foi de 1,5% e para área de 3%, considerando-se cinco injeções. O método desenvolvido foi aplicado com sucesso na identificação dos flavonóides majoritários presentes na planta modelo (Neem), obtendo-se o mesmo resultado do estudo anterior.

Como forma de avaliar a concentração de flavonóides totais presentes em espécies vegetais é comum a análise de extratos após hidrólise ácida (conversão de todos glicosídeos em agliconas). Desta forma otimizou-se uma metodologia de separação em RP-HPLC de 8 flavonóides agliconas comumente presentes em alimentos e extratos vegetais de uso cosmético. A otimização foi efetuada mediante um planejamento experimental de misturas, para escolha da fase móvel mais seletiva, e de um planejamento fatorial composto central, para otimização das condições de gradiente. O método obtido foi o mais rápido já visto dentro da literatura consultada. A separação em linha de base foi efetuada em menos de 15 minutos, com coeficientes de variação de área entre 0,1 e 1,8%, coeficiente de correlação de 0,9993 a 0,9994 na faixa de 5 a 100 µg/mL, e limites de quantificação estimados na faixa de 0,1 a 0,21 µg/mL. O método desenvolvido foi aplicado na otimização das

condições de hidrólise de um extrato de Neem. A otimização foi efetuada através de metodologia de superfície de resposta, levando-se em consideração a concentração de ácido adicionada, o tempo de reação, a temperatura, e a concentração de um antioxidante (ácido ascórbico) adicionado. O resultado da otimização foi uma metodologia de hidrólise com tempo de reação igual a 5 minutos, utilizando-se 1,4 mol/L de HCl, 119 °C e 500 µg/mL de ácido ascórbico. Através das metodologias de análise e de hidrólise desenvolvidas pode-se constatar a presença e quantificar no extrato de Neem os flavonóides agliconas quercetina, kaempferol e miricetina.

Com o objetivo de se avaliar quais os componentes presentes em extratos vegetais são os responsáveis pelo poder antioxidante atribuído a determinadas plantas, foi montado um sistema de avaliação de poder antioxidante “on-line” com reação pós-coluna em HPLC (baseado na literatura) utilizando-se como “radical livre modelo” o ABTS. A análise da planta modelo (Neem) neste sistema mostrou que os flavonóides glicosilados identificados nas partes anteriores deste trabalho são os responsáveis pelo poder antioxidante atribuído a esta planta. De posse desta informação, e visando a obtenção de extratos para aplicações cosméticas com poder antioxidante, modelou-se a extração dos flavonóide do Neem em função da composição do solvente extrator (água, etanol , propilenoglicol e suas misturas), de acordo com um planejamento simplex centróide ampliado. Além da previsão da concentração dos princípios ativos pode-se ainda prever outras propriedades dos extratos obtidos, tais como, índice de refração e densidade, muitas vezes constituintes de especificações técnicas de acordo com as aplicações a que se destinam (cremes, xampús, etc).

ABSTRACT

At this work, separation of 18 flavonoids (9 aglycones and 9 glycosides) using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) and Reduced Flow Micellar Electrokinetic Chromatography (RF-MEKC) were evaluated. For both techniques, pure solvents (methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran) e their mixtures were evaluated as an approach of varying selectivity by changing mobile phase in HPLC and organic additive type in RF-MEKC.

For HPLC studies using gradient elution, it was possible to guarantee the modeling for retention factor in function of organic solvent used (methanol, acetonitrile and tetrahydrofuran and theirs mixtures). It can be also confirmed, based on retention data and hierarquical clusters analysis, four different chromatographic groups with different selectivity for flavonoid aglycone, and four groups with different selectivity for glycosides. More orthogonal chromatographic systems (each one belonging to a selectivity group) were applied to Neem (*Azadirachta Indica*) analysis. From this study, it can be chosen the most selective mobile phase composition and optimize flavonoid glycosides separation present at Neem leaves. Applying optimized method, five major flavonoids can be identified and quantified, three quercetin glycosides (rutin, isoquercitrin and quercitrin) and two kaempferol glycosides (astragalin and nicotiflorin), at two samples from different origins (Piracicaba-SP and Silvânia-GO).

For studies regarding eighteen flavonoids separation by RF-MEKC can be proved significant selectivity differences when distinct organic solvent are used as additive. Moreover, it can be noted tendencies in migration behaviour depending of

solvent used and molecular structure of flavonoids. The solvent with less efficiency to flavonoid separation is methanol. Analyzing electropherograms obtained by a design of mixtures and by critical pairs changes observed in diverse electrolytes, a separation method with only one critical pair and 12 minutes run was obtained. Coefficient of variation obtained for retention factor was 1.5% and 3% for area ($n=5$). Developed method was applied to identify major flavonoids at model plant (Neem) and same results observed at previous work were obtained.

In order to evaluate total flavonoid concentration present in a plant is a common approach to analyse extracts after acid hydrolyze (convert all glycosides to aglycones). A method was optimized to separate 8 flavonoid aglycones by RP-HPLC usually present in food and vegetal extracts to cosmetic use. Optimization was performed by a mixture factorial design to select the most selective mobile phase composition and one factorial design with central point to optimize gradient parameters. Developed methodology is the faster reported in literature until now. Baseline separation was achieved in less than 15 minutes, with coefficients of variation between 0.1 and 1.8%, correlation coefficient from 0,9993 to 0,9994 at 5-100 $\mu\text{g/mL}$ concentration range and quantification limits from 0.1 to 0.21 $\mu\text{g/mL}$. Developed method was used to optimize hydrolyze parameters for a Neem extract. Optimization was realized by a response surface methodology, having concentration of acid added, reaction time, temperature and antioxidant (ascorbic acid) concentration added as parameters. From this study was developed a hydrolyze methodology with 5 minutes of reaction time, using 1.4 mol/L HCl, 119 °C and 500 $\mu\text{g/mL}$ of ascorbic acid. Applying method of analysis

and hydrolyze developed at Neem extracts it can be identified and quantified aglicones quercetin, kaempferol and miricetin.

Aiming to evaluate which compounds in a vegetal extract have antioxidant activity credited to some plants, an on-line system with post-column reaction was built in HPLC (based on literature), using ABTS as free radical model. Neem analysis at this system showed that flavonoid glycosides identified before are the responsible for antioxidant activity described for this plant. Based on this information and intending to obtain vegetal extracts with antioxidant activity for cosmetic use, Neem extraction procedure was modeled in function of solvent mixture used (water, ethanol, propylene glycol and their mixtures), following a simplex centroid design. Besides the concentration of active components prediction it can also be predict other properties like refractive index and density, properties that might be included at technical specifications depending of the intended use (creams, shampoos, etc).

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 Flavonóides

1.1.1 Aspectos gerais

É estimado que cerca de 2% de todo o carbono fotossintetizado pelas plantas (cerca de 1×10^9 tonelada por ano) é convertido em flavonóides ou compostos correlatos¹. Com pouquíssimas exceções, somente as plantas possuem a capacidade de sintetizar flavonóides, em contraste com animais e fungos².

Os flavonóides podem ocorrer em todas as partes das plantas, sendo as agliconas principalmente encontradas em exudados de farináceos, ceras que recobrem folhas, cascas, brotos, ou como cristais em células de cactus, enquanto os seus derivados glicosilados estão presentes geralmente em vacúolos de flores, folhas, galhos ou raízes. Os compostos que fazem parte dessa classe de metabólitos secundários vegetais são os responsáveis pelos pigmentos coloridos das flores, além de atuarem como inibidores de enzimas, como sistema de defesa contra a radiação ultra-violeta (UV) e insetos, e também como quelantes de metais tóxicos às plantas. Além disso, estão envolvidos em processo de fotosensibilização e transferência de energia, morfogênese, determinação de sexo, fotossíntese e regulação de hormônios de crescimento³.

Por haver uma forte tendência de plantas quimiotaxonomicamente parecidas produzirem tipos similares de flavonóides, estes são comumente utilizados como marcadores quimiotaxonômicos², porém o maior interesse está ligado às suas funções fisiológicas e no estudo dos benefícios que estes compostos podem originar à saúde humana.

A propriedade mais bem documentada pela literatura é a capacidade em atuar como antioxidante, podendo atuar em pelo menos três diferentes sistemas de produção de radicais livres⁴. Devido aos seus baixos potenciais redox, os flavonóides podem reduzir espécies radicalares altamente oxidantes⁵, dando origem a radicais flavonóides bem menos reativos, o que previne, por exemplo, a peroxidação lipídica⁶ e, conseqüentemente, os danos causados por radicais livres a membranas celulares. Os flavonóides podem ainda inibir a formação da espécie altamente reativa peroxinitrito por duas vias: captando óxido nítrico⁷ ou inibindo a enzima xantina oxidase⁸ (importante fonte biológica de superóxido). Alguns flavonóides, como por exemplo a quercetina, podem atuar como inibidores da reação de Fenton (geração de radicais altamente reativos hidroxil) através do efeito quelante de ferro⁹, um catalisador da reação.

Os flavonóides podem ser usados na prevenção do câncer¹⁰, demência¹¹, arteriosclerose¹² e doenças do coração^{13,14}. Atuam ainda em diversos processos biológicos através da interação com sistemas enzimáticos, como por exemplo a ciclooxygenase e a lipooxygenase^{15,16}, influenciando a coagulação, assim como, os processos inflamatórios¹⁷. Muitas outras atividades biológicas são atribuídas aos flavonóides: antiviral, antimicrobial, anti-hepatotóxico, anti-osteoporótico, antialérgico e antiespasmódico.

Dados sobre a absorção, metabolismo e excreção de flavonóides consumidos na dieta humana são escassos e algumas vezes contraditórios, mas sempre revelam benefícios à saúde humana. Um dos pontos ainda não resolvidos é se somente as agliconas^{18,19,20} ou também os glicosídeos são capazes de permear as paredes do intestino e serem absorvidos. A hipótese mais provável é que a absorção se dê na forma de aglicona, sendo o primeiro

passo na absorção a desglicosilação, o que é consistente, uma vez que as células epiteliais do intestino possuem uma alta atividade β -glicosidase^{21,22}. Depois da absorção os flavonóides são extensivamente metabolizados, sendo os grupos hidroxila conjugados a ácido glucurônico, sulfato, ou a grupos metil^{23,24}. No cólon os microorganismos podem degradar as espécies não absorvidas, sendo as espécies conjugadas excretadas na bile. O que explica as grandes diferenças de biodisponibilidade entre indivíduos é justamente as diferenças entre as microfloras intestinais²⁵.

O consumo de flavonóides pela população varia grandemente de país para país^{4,23} dependendo dos hábitos e costumes alimentares de cada local. As principais fontes de flavonóides na dieta humana são as frutas e bebidas (sucos de fruta, vinho tinto, chá, café e cerveja), e em menor extensão ervas e vegetais^{26 27}.

1.1.2 Aspectos estruturais

Do ponto de vista estrutural os flavonóides são compostos por dois grupos fenil ligados através de uma ponte de três carbonos, normalmente ciclizados, dando origem a uma estrutura básica do tipo C₆-C₃-C₆. De acordo com a ciclização e o grau de oxidação do segmento de três carbonos, eles podem ser classificados em diversos grupos. Os aspectos estruturais das principais classes de flavonóides são mostradas na figura 1.1. Cerca de 400 flavonas agliconas, 450 flavonóis agliconas, 350 flavanonas agliconas, 300 isoflavonas agliconas, 19 antocianidinas e 250 chalconas agliconas foram reportadas até hoje².

Nas plantas, os flavonóides podem ocorrer em várias formas modificadas correspondendo a hidroxilações adicionais, metilações, e o mais importante, glicosilações². Ocasionalmente pode-se encontrar ainda ligado ao núcleo dos flavonóides e a seus açúcares, ácidos aromáticos e alifáticos, sulfato, grupos prenil, metilenodioxil e isoprenil. Flavonóides ocorrem comumente como O-glicosídeos, nos quais um ou mais grupos hidroxila da aglicona estão ligados a açúcares, dando origem a ligações glicosídicas do tipo O-C, as quais são ligações hemiacetal ácido lábeis. O efeito da glicosilação é a perda de reatividade e o aumento da solubilidade em água, podendo ser considerada como uma forma de proteção das plantas na prevenção de danos citoplasmáticos e como segurança na estocagem dentro dos vacúolos celulares²⁸. Em princípio qualquer dos grupos hidroxil podem ser glicosilados, porém, certas posições são favorecidas: por exemplo o grupo hidroxil na posição 7 das flavonas, flavanonas e isoflavonas, os grupos OH das posições 3 e 7 dos flavonóis e flavanóis, e os grupos OH das posições 3 e 5 das antocianidinas (Figura 1.1) A glicosilação da posição 5 é bastante rara em compostos com grupo carbonil na posição 4, uma vez que esses grupos OH podem fazer pontes de hidrogênio com o grupo carbonil adjacente.

O açúcar mais comumente encontrado é a glicose, em seguida galactose, ramnose, xilose, e arabinose, sendo raro encontrar manose, frutose, ácidos glucorônico e galacturônico^{2,29}. Os dissacarídeos também são bastante encontrados sendo os mais comuns deles a rutinose (ramnosil-(α 1 $\rightarrow$ 6)-glicose) e o neohesperidose (ramnosil-(α 1 $\rightarrow$ 2)-glicose), sendo que tri e tetra-sacarídeos são encontrados ocasionalmente. Podem ocorrer ainda esterificações em um ou mais grupos OH dos açúcares dando origem a flavonóides acilados.

Figura 1.1 – Estrutura básica das principais classes de flavonóides. Posições de glicosilação mais comuns estão indicadas por setas

1.1.3 Análise de flavonóides

Os flavonóides podem ser analisados nas suas formas conjugadas ou como agliconas, conforme a necessidade e o enfoque dado aos resultados. Em fluídos biológicos (soro, plasma e urina) os flavonóides estão presentes na forma de conjugados glucuronídeos e sulfatos, e na maioria dos casos somente o conteúdo total de agliconas é determinado, sendo necessária uma etapa de hidrólise. Por outro lado, quando o interesse é a atividade biológica promovida por determinada planta, ou a classificação de espécies vegetais^{30, 31,32}, o interesse está nas formas conjugadas intactas. Neste caso a análise é complexa devido ao número de analitos aumentar significativamente, sendo necessários métodos de análise seletivos e sensíveis. Em vista da complexidade das análises de flavonóides, quase todos os métodos relacionados incluem uma técnica de alto desempenho.

1.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência

A análise de flavonóides por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é normalmente realizada no modo de fase reversa em colunas C8 ou C18 com suporte de sílica, porém outras fases como Sephadex, sílica e poliamida também são utilizadas. A eluição em gradiente é normalmente realizada em sistemas de solventes binários, com soluções aquosas de tampão acetato ou formiato, e metanol ou acetonitrila como solventes orgânicos.

Se o principal objetivo é a determinação dos flavonóides majoritários, corridas de 30 a 60 minutos são suficientes para separar de 5 a 10 compostos^{33,34}.

A separação de 30 a 50 compostos, incluindo estruturas conjugadas como glicosídeos, malonatos e acetatos, normalmente requer corridas de até 2 horas^{35,36}.

Uma avaliação geral dos métodos reportados na literatura mostra que em vários artigos são utilizadas eluições em gradiente segmentado, compostos por vários patamares e rampas sem qualquer explicação da escolha dos parâmetros escolhidos. Na maioria dos casos as otimizações são efetuadas por tentativa e erro, e nem sempre fica claro qual o objetivo final da otimização^{36,37,38,39,40}.

Com relação aos sistemas de detecção, todas as agliconas contém no mínimo um anel aromático e conseqüentemente apresentam absorção no UV. A espectrofotometria no UV é a técnica mais popular para detecção e quantificação de agliconas.. A detecção em múltiplos comprimentos de onda e detectores de arranjo de diodos são ferramentas bastante úteis em estudos de investigação e quantificação das principais agliconas, o mesmo podendo ser considerado para a análise dos flavonóides conjugados. A identificação de flavonóides pertencentes a uma mesma subclasse é possível de ser efetuada através da detecção por DAD (espectros característicos), porém a distinção entre dois flavonóides pertencentes a uma mesma subclasse com pequenas modificações estruturais não é possível a não ser que seja feita por comparação com padrões. Aplicações interessantes da utilização da detecção por DAD em HPLC são apresentadas na análise de extratos de *H. stoechas*⁴¹ e para a determinação de flavonas e isoflavonas em *G. tinctoria*⁴².

Para a análise de flavonóides a detecção por fluorescência é utilizada ocasionalmente por que o número de flavonóides que exibem fluorescência é

limitado. Para estes compostos, os limites de detecção é uma ordem de magnitude menor, comparados a detecção por UV. Além disso, a fluorescência aumenta a seletividade da detecção em matrizes complexas⁴³. As classes de flavonóides que exibem fluorescência incluem as isoflavonas⁴⁴, flavonóides com grupos OH na posição 3^{45,46}, e flavonas metoxiladas⁴⁷.

A maioria dos flavonóides são eletroativos devido a presença de grupos fenólicos, desta forma a detecção eletroquímica é passível de ser empregada. Isoflavonas em alimentos a base de soja foram determinados por cromatografia líquida e detecção coulométrica⁴⁸. Peyrat-Maillard e colaboradores utilizaram detecção eletroquímica para avaliar atividade antioxidante de compostos fenólicos incluindo onze flavonóides.⁴⁹

A conjunção da alta eficiência de separação da técnica de HPLC com a seletividade e sensibilidade da espectrometria de massas constitui uma das técnicas de análise mais modernas para flavonóides^{50,51,52,53}. Na maioria das aplicações a espectrometria de massas é utilizada em combinação com a detecção em UV, para facilitar a confirmação da identidade dos flavonóides com base em padrões e dados de referência. Para a identificação de compostos desconhecidos a detecção por MS/MS ou MSⁿ pode ser utilizada para a caracterização estrutural^{54,55} e análise de flavonóides^{56,57,58}. Na análise de flavonóides, como em muitas outras áreas de aplicação, interfaces com ionização a pressão atmosférica (APCI) e ionização por eletrospray (ESI) são amplamente utilizadas. O modo de ionização mais freqüentemente utilizado é o ESI, porém o APCI está se tornando cada vez mais popular, e em alguns casos melhores respostas são obtidas neste modo^{59, 60}. De acordo com alguns estudos, a análise

no modo negativo fornece melhor sensibilidade, entretanto o modo positivo não deve ser negligenciado, pois informações complementares podem ser obtidas em estudos de identificação de compostos desconhecidos⁵¹. A composição dos eluentes, o pH e as características dos componentes do tampão exercem grande influência nos resultados obtidos. Na análise de flavonóides os aditivos mais comuns são ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio e formiato de amônio^{51,61}. O uso de ácido tricloroacético também foi reportado apesar de suprimir a ionização devido aos efeitos de pareamento iônico e tensão superficial⁶².

1.1.5 Cromatografia gasosa

A cromatografia gasosa foi utilizada para a análise de flavonóides no início da década de sessenta. O primeiro trabalho publicado no assunto⁶³ reportou a separação de flavonóides derivatizados utilizando-se uma coluna semi-preparativa recheada de um polímero de silicone, sendo a detecção efetuada por condutividade térmica. Após a introdução da cromatografia líquida, a cromatografia gasosa de flavonóides não foi muito investigada, apesar de nos últimos anos atenção especial tem sido dada à técnica, possivelmente devido ao desenvolvimento de cromatografia gasosa de alta temperatura e melhores procedimentos de derivatização^{64, 65, 66}. Os métodos baseados em cromatografia gasosa fornecem alta resolução e baixos limites de detecção, porém são métodos trabalhosos devido às etapas de derivatização. Na maioria dos casos a derivatização na forma de trimetilsilileter (TMS) é inevitável para aumentar a

volatilidade dos flavonóides e melhorar a estabilidade térmica. Para flavonóides com mais de um grupo hidroxila, a metilação pode originar vários derivados, o que pode dificultar a quantificação. As condições de separação não mudaram muito desde a década de sessenta, embora atualmente colunas capilares são utilizadas no lugar de colunas de vidro recheadas.

1.1.6. Eletroforese capilar

A maioria dos trabalhos que utilizam a eletroforese capilar (CE) para a análise de flavonóides são direcionados a pesquisa de produtos naturais, incluindo a análise de plantas^{67,68,69}, vegetais⁷⁰, ervas⁷¹ e outros produtos derivados de frutas ou plantas^{72,73}. Os modos mais utilizados são eletroforese capilar de zona (CZE) e cromatografia eletrocínética micelar (MEKC), com tampão fosfato ou borato, capilares de 50-100 µm de diâmetro interno, tensão aplicada de 10 a 30 kV e volumes de injeção de 10 a 50 nL. A detecção é usualmente realizada com UV, mas detectores de fluorescência⁶⁷, detecção eletroquímica^{71,74} e espectrometria de massa^{73,75} também são utilizados.

1.1.7 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia em camada delgada (TLC) é utilizada para a análise de flavonóides desde a década de sessenta, e é especialmente útil no “screening” rápido de plantas e extratos medicinais para substâncias farmacologicamente

ativas, antes de uma análise instrumental detalhada, principalmente pelo fato de várias amostras poderem ser analisadas simultaneamente^{76,77}. Na maioria das aplicações é utilizada sílica como fase estacionária, e as placas são reveladas ou com uma combinação de 2-(difenilborioxo)etilamina e polietilenoglicol, ou com cloreto de alumínio, sendo a detecção realizada utilizando luz UV em 360-365 ou 250-260 nm^{78,79}.

1.2 Referências bibliográficas

1. Smith H. In *Phytochrome*, Mitrakos K, Shropshire W (eds), Academic Press: London (1972) 433.
2. Iwashina T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J. Plant Res.* 113 (2000) 287.
3. Di Carlo G, Mascolo N, Izzo AA, Capasso F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. *Life Sci.* 65 (1999) 337.
4. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DEC, Boelens PG, van Norren K, van Leeuwen PAM. Flavonoids: a review of probable mechanisms of actions and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74 (2001) 418.
5. Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *J. Nat. Prod.* 63 (2000) 1035.
6. Cos P, Calomme M, Sindambiwe JB, De Bruyne T, Cimanga K, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Cytotoxicity and lipid peroxidation-inhibiting activity of flavonoids. *Planta Med.* 67 (2001) 515.
7. van Acker SABE, Tromp MNJL, Haenen GRMM, van der Vijgh WJF, Bast A. Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214 (1995) 755.
8. Cos P, Ying L, Calomme M, Hu JP, Cimanga K, Van Poel B, Pieters L, Vlietinck AJ, Vanden Berghe D. Structure–activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J. Nat. Prod.* 61 (1998) 71.
9. Ferrali M, Signorini C, Caciotti B, Sugherini L, Ciccoli L, Giachetti D, Comporti M. Protection against oxidative damage of erythrocyte membrane by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett.* 416 (1997) 123.
10. Le Marchand L. Cancer preventive effects of flavonoids. *Biomed. Pharmacother.* 56 (2002) 296.
11. Commenges D, Scotet V, Renaud S, Jacqmin-Gadda H, Barberger-Gateau P, Dartigues JF. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* 16 (2000) 357.

12. Aviram M, Fuhrman B. Wine flavonoids protect against LDL oxidation and atherosclerosis. *Ann. NY Acad. Sci.* 957 (2002) 146.
13. Hertog MGL, Feskens EJM, Hollman PCH, Katan MB, Kromhout D. Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart-disease—The Zutphen elderly study. *Lancet* 342 (1993) 1007.
14. Mojzisova G, Kuchta M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. *Physiol. Res.* 50 (2001) 529.
15. Kim HP, Mani I, Iversen L, Ziboh VA. Effects of naturally occurring flavonoids and biflavonoids on epidermal cyclooxygenase and lipoxygenase from guinea-pigs. *Prostag. Leukotr. Ess.* 58 (1998) 17.
16. You KM, Jong HG, Kim HP. Inhibition of cyclooxygenase/lipoxygenase from human platelets by polyhydroxylated/methoxylated flavonoids isolated from medicinal plants. *Arch. Pharm. Res.* 22 (1999) 18.
17. Pelzer LE, Guardia T, Juarez AO, Guerreiro E. Acute and chronic antiinflammatory effects of plant flavonoids. *Farmaco* 53 (1998) 421.
18. Hollman PCH, Katan MB. Absorption, metabolism and health effects of dietary flavonoids in man. *Biomed. Pharmacother.* 51 (1997) 305.
19. Hollman PCH. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects? *J. Sci. Food Agric.* 81 (2001) 842.
20. Day AJ, Mellon F, Barron D, Sarrazin G, Morgan MRA, Williamson G. Human metabolism of dietary flavonoids: identification of plasma metabolites of quercetin. *Free Rad. Res.* 35 (2001) 941.
21. Day AJ, Williamson G. Biomarkers for exposure to dietary flavonoids: a review of the current evidence for identification of quercetin glycosides in plasma. *Br. J. Nutr.* 86 (2001) S105.
22. Nemeth K, Plumb GW, Berrin JG, Juge N, Jacob R, Naim HY, Williamson G, Swallow DM, Kroon PA. Deglycosylation by small intestinal epithelial cell α -glucosidases is a critical step in the absorption and metabolism of dietary flavonoid glycosides in humans. *Eur. J. Nutr.* 42 (2003) 29.
23. Hollman PCH, Arts ICW. Flavonols, flavones and flavanols — nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agric.* 80 (2000) 1081.

24. Rice-Evans C. Flavonoid antioxidants. *Curr. Med. Chem.* 8 (2001) 797.
25. Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of control of sodium-salt contamination. *Biol. Mass Spectrom.* 21 (1992) 408.
26. Justesen U, Knuthsen P, Leth T. Determination of plant polyphenols in Danish foodstuffs by HPLC–UV and LC–MS detection. *Cancer Lett.* 114 (1997) 165.
27. Crozier A, Burns J, Aziz AA, Stewart AJ, Rabiasz HS, Jenkins GI, Edwards CA, Lean MEJ. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biol. Res.* 33 (2000) 79.
28. Stobiecki M. Application of mass spectrometry for identification and structural studies of flavonoid glycosides. *Phytochemistry* 54 (2000) 237.
29. Harborne JB, Mabry TJ. *The Flavonoids: Advances in Research*. Chapman and Hall: London, (1982)
30. J.F. Stevens, E. Wollenweber, M. Ivancic, S. Sundberg, M.L. Deinzer, *Phytochemistry*, 51 (1999) 771.
31. B. Ducrey, J.L. Wolfender, A. Marston, K. Hostettmann, *Phytochemistry*, 138 (1995) 129.
32. R.J. Grayer, G.C. Kite, M. Abou-Zaid, L.J. Archer, *Phytochem. Anal.* 11, (2000) 257.
33. N. Fabre, I. Rustan, E. de Hoffman, J. Quetin-Leclercq, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 12 (2001) 707.
34. A.A. Franke, L.J. Custer, *J. Chromatogr. B* 662 (1994) 47.
35. W. Li, J.F. Fitzloff, *J. Chromatogr. B* 765 (2001) 99.
36. F. Vallejo, F.A. Tomas-Barberan, F. Ferreres, *J. Chromatogr. A* 1054 (2004) 181.
37. V. Carbone, P. Montoro, N. de Tommasi, C. Pizza, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 34 (2004) 295.
38. A.M. El-Shafae, M.M. El-Domiaty, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 26 (2001) 539.
39. M. Careri, L. Elviri, A. Mangia, M. Musci, *J. Chromatogr. A* 881 (2000) 449.
40. G. Le Gall, M.S. DuPont, F.A. Mellon, A.L. Davis, G.J. Collins, M.E. Verhoeven, I.J. Colquhoun, *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003) 2438.

41. M. Carini, G. Aldini, S. Furlanetto, R. Stefani, R. Maffei Facino, J. Pharm. Biomed. Anal. 24 (2001) 517.
42. M. Luczkiewicz, D. Glod, T. Baczek, A. Bucinski, Chromatographia, 60 (2004) 179.
43. E. de Rijke, A. Zafra-Gómez, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, J. Chromatogr. A 932 (2001) 55.
44. E. de Rijke, H.C. Joshi, H.R. Sanderse, F. Ariese, U.A.Th. Brinkman, C. Gooijer, Anal. Chim. Acta 468 (2002) 3.
45. P.K. Sengupta, M. Kasha, Chem. Phys. Lett. 68 (1979) 382.
46. W.M. Stoggl, C.W. Huck, G.K. Bonn, J. Sep. Sci. 27 (2004) 524.
47. C.W. Huck, G.K. Bonn, Phytochem. Anal. 12 (2001) 104.
48. B. Klejdus, J. Vacek, V. Adam, J. Zehnalek, R. Kizek, L. Trnkova, V. Kuban, J. Chromatogr. B 806 (2004) 101.
49. M.N. Peyrat-Maillard, S. Bonnely, C. Berset, Talanta 51 (2000) 709.
50. X. Ma, P. Tu, Y. Chen, T. Zhang, Y. Wei, Y. Ito, J. Chromatogr. A 992 (2003) 193.
51. E. de Rijke, H. Zappey, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 995.
52. M.-J. Dubber, V. Sewram, N. Mshicileli, G.S. Shephard, I. Kanfer, J. Pharm. Biomed. Anal. 37 (2005) 723.
53. A. Tolonen, J. Uusitalo, Rapid Commun. Mass Spectrom. 18 (2004) 3113.
54. H.M. Merken, G.R. Beecher, J. Agric. Food Chem. 48 (2000) 577.
55. M. Stobiecki, Phytochemistry 54 (2000) 237.
56. M. Careri, A. Mangia, M. Musci, J. Chromatogr. A 794 (1998) 263.
57. X.-G. He, J. Chromatogr. A 888 (2000) 203.
58. D.G. Watson, C. Atsriku, E.J. Oliveira, Anal. Chim. Acta 492 (2003) 17.
59. E. de Rijke, H. Zappey, F. Ariese, C. Gooijer, U.A.Th. Brinkman, J. Chromatogr. A 984 (2003) 45.
60. U. Justesen, P. Knuthsen, T. Leth, J. Chromatogr. A. 799 (1998) 101.
61. S.H. Hansen, A.G. Jensen, C. Cornett, I. Bjørnsdóttir, S. Taylor, B. Wright, I.D. Wilson, Anal. Chem. 71 (1999) 5235.

62. C.T. da Costa, J.J. Dalluge, M.J. Welch, B. Coxon, S.A. Margolis, D. Horton, J. Mass Spectrom. 35 (2000) 540.
63. N. Narasimhachari, E.V. Rudloff, Can. J. Chem. 40 (1962) 1123.
64. M. Morton, O. Arisaka, A. Miyake, B. Evans, Environ. Toxicol. Pharmacol. 7 (1999) 221
65. F. Deng, S.W. Zito, J. Chromatogr. A 986 (2003) 121.
66. Y.C. Fiamegos, C.G. Nanos, J. Vervoort, C.D. Stalikas, J. Chromatogr. A 1041 (2004) 11.
67. D. Baumann, S. Adler, M.A. Hamburger, J. Nat. Prod. 64 (2001) 353.
68. B.R. Baggett, J.D. Cooper, E.T. Hogan, J. Carper, N.L. Paiva, J.T. Smith, Electrophoresis 23 (2002) 1642.
69. O. Mellenthin, R. Galensa, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 594.
70. E. Dadakova, E. Prochazkova, M. Krizek, Electrophoresis 22 (2001) 1573.
71. G. Chen, H. Zhangb, J. Ye, Anal. Chim. Acta 423 (2000) 69.
72. T.F. Jiang, Y. Li, Y.P. Shi, Planta Med. 70 (2004) 284.
73. C.W. Huck, G. Stecher, W. Ahrer, W.M. St'oggl, W. Buchberger, G.K. Bonn, J. Sep. Sci. 25 (2002) 903.
74. X. Xu, X. Qi, W. Wang, G. Chen, J. Sep. Sci. 28 (2005) 647
75. M.A. Aramendia, I. Garcia, F. Lafont, J.M. Marinas, J. Chromatogr. A 707 (1995) 327.
- 76 I. Fecka, A. Kowalczyk, W. Cisowski, J. Planar Chromatogr. 17 (2004) 22.
- 77 C.A.M. Pereira, J.H. Yariwake, F.M. Lancas, J.N. Wauters, M. Tits, L..Angenot, Phytochem. Anal. 15 (2004) 241.
- 78 I. Jasprica, A. Smolcic-Bubalo, A. Mornar, M. Medic-Saric, J. Planar Chromatogr. 17 (2004) 95.
- 79 G. Matysik, M. W'ojciak-Kosior, Chromatographia 61 (2005) 89.

CAPÍTULO 2

ANÁLISE DE FLAVONÓIDES POR HPLC

2.1 Introdução

A retenção de um soluto em cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa envolve basicamente três processos¹ : i) a criação de uma cavidade na fase estacionária de acordo com o tamanho e formato do soluto, ii) a transferência do soluto da fase móvel para a cavidade pré-formada na fase estacionária, iii) o fechamento da cavidade deixada na fase móvel. O processo (ii) envolve o “desligamento” das forças atrativas entre o soluto e a fase móvel e o “ligamento” das forças atrativas entre soluto e fase estacionária, necessitando-se portanto considerar ambas as fases quando se estudam processos de retenção, diferentemente das considerações das primeiras teorias de retenção, como por exemplo a solvofóbica² de Horváth, que quase exclusivamente considerava a etapa (iii) do processo.

Em termos gerais, a retenção pode ser relacionada com a mudança de energia livre associada à distribuição do soluto entre a fase estacionária e móvel, através dos vários tipos de interações entre soluto e fases, incluindo forças dispersivas, dipolares, e interações por ponte de hidrogênio, todas contribuindo simultaneamente para a energia livre de retenção num processo inerentemente multivariado. De acordo com o modelo de relação linear de energia de solvatação (LSER) o processo de retenção pode ser explicado pela equação 2.1^{3,4}.

$$\log k = \log k_0 + vV_2 + s\pi_2^* + a\Sigma\alpha_2^H + b\Sigma\beta H_2 + rR_2 \quad (\text{Equação 2.1})$$

onde k é o fator de retenção do soluto, e os termos com subscrito 2 representam descritores dos solutos, incluindo volume molar (V_2), dipolaridade/polarizabilidade (π_2^*), acidez por ponte de hidrogênio ($\Sigma\alpha_2^H$), basicidade por ponte de hidrogênio ($\Sigma\beta_2^H$), e refração molar (R_2). Estes

descritores representam a habilidade do soluto para participar em vários tipos de interação soluto-fase, sendo os coeficientes que multiplicam cada descritor as “respostas” do sistema cromatográfico (fase estacionária e fase móvel) a estas interações. Os coeficientes da equação de LSER (v , s , a , b , r e $\log k_0$) podem ser ajustados através de regressão linear múltipla, com base em dados de retenção de substâncias previamente selecionadas, cujos descritores sejam conhecidos, dando origem a uma equação que pode ser utilizada na previsão do valor de fator de retenção de qualquer substância em função dos descritores dessa substância, além de refletir as principais forças que regem a retenção naquele determinado sistema. A literatura mostra que os fatores principais que governam a retenção em fase reversa com fases aquosas usando ACN, MeOH e THF como modificadores orgânicos são o volume do soluto e a sua capacidade em fazer pontes de hidrogênio como receptor de prótons, sendo consequentemente os valores dos coeficientes “ v ” e “ b ” da equação 2.1 maiores quando comparados aos coeficientes “ s ”, “ a ”, e “ r ”. O modelo determinado por LSER somente é válido na condição utilizada na “calibração”, devendo-se recorrer ao mesmo processo de “calibração” caso as condições cromatográficas (tanto de fase móvel como fase estacionária e temperatura) sejam modificadas. Esse procedimento de “recalibração” é necessário porque os coeficientes da equação refletem as interações físico-químicas que ocorrem entre o soluto e as fases, e uma modificação do sistema cromatográfico implica necessariamente na modificação dessas interações, seja na intensidade ou no tipo (sinal do coeficiente).^{5,6}

De acordo com o modelo de LSER a seletividade, ou seja, a retenção diferenciada de dois compostos (j e i) é obtida de uma forma multivariada,

dependendo da diferença de cada um dos descritores dos compostos, segundo a equação 2.2 :

$$\log \alpha = v(V_j - V_i) + s(\pi_{2j}^* - \pi_{2i}^*) + a(\Sigma \alpha_{2j}^H - \Sigma \alpha_{2i}^H) + b(\Sigma \beta_{2j}^H - \Sigma \beta_{2i}^H) + r(R_{2j} - R_{2i}) \quad (\text{Equação 2.2})$$

onde α é o fator de separação (seletividade), e os termos entre parêntese são as diferenças entre os vários descritores dos dois solutos.

De acordo com a equação 2.2 pode-se notar que a variação da seletividade pode ser obtida através da variação dos coeficientes da equação, uma vez que os descritores dos solutos são constantes.

Dentro do processo de otimização de separação a seletividade ocupa um papel de destaque, uma vez que a seletividade é um dos fatores que mais influencia a resolução se considerarmos equação 2.3⁷:

$$Rs = \left(\frac{1}{4} \right) (\alpha - 1) N^{\frac{1}{2}} \left[\frac{k}{(1+k)} \right] \quad (\text{Equação 2.3})$$

onde Rs é a resolução de dois picos adjacentes, α é o fator de separação (seletividade), N é o número de pratos, e k é o fator de retenção.

A seletividade de um sistema cromatográfico pode ser variada de diversas formas, entre elas, através do tipo de solvente utilizado, do tipo de fase estacionária utilizada, da temperatura e do valor de pH (para analitos ionizáveis). Em um artigo de revisão, Snyder⁸ analisou e comparou a capacidade relativa de diferentes variáveis em alterar a seletividade, concluindo que a alteração do tipo de solvente de metanol ou acetonitrila para tetrahidrofurano é uma forma pragmática de se alterar a seletividade. Snyder⁸ conclui ainda que a troca de fases estacionárias apolares por fases relativamente mais polares pode ser bastante útil, e que a temperatura e a porcentagem de solvente orgânico na fase móvel não são variáveis tão efetivas

quanto as anteriores na alteração da seletividade de solutos não ionizáveis. O fato dos três solventes acima mencionados serem os principais solventes utilizados em HPLC de fase reversa deve-se principalmente ao fato de apresentarem valores de dipolaridade/polarizabilidade (π), acidez por ponte de hidrogênio ($\Sigma\alpha^H$), e basicidade por ponte de hidrogênio ($\Sigma\beta^H$) diferentes⁹, ou seja, através da utilização desses solventes e de suas misturas pode-se conseguir fases móveis com uma ampla gama de tipos de interações moleculares diferentes, podendo-se variar os coeficientes da equação 2.2 de forma a se obter um sistema mais seletivo de acordo com os solutos estudados. Na Tabela 2.1 são mostrados os valores dos parâmetros solvatocrômicos dos três solventes e da água, normalmente utilizados em combinação.

Tabela 2.1 – Parâmetros solvatocrômicos dos solventes mais usados em HPLC de fase reversa¹⁰

solvente	π^*	$\Sigma\alpha^H$	$\Sigma\beta^H$
H ₂ O	1,09	1,17	0,48
ACN	0,75	0,19	0,31
MeOH	0,6	0,93	0,62
THF	0,58	0,00	0,55

π : dipolaridade/polarizabilidade, α : acidez por ponte de hidrogênio, β : basicidade por ponte de hidrogênio

Através dos valores dos parâmetros solvatocrômicos dos solventes mais utilizados em HPLC em fase reversa pode-se perceber que o MeOH tem a capacidade de participar em pontes de hidrogênio tanto como receptor como doador de prótons, tendo ainda uma relativamente alta dipolaridade, ou seja, é capaz de interagir com os solutos e com as próprias moléculas do eluente por pelo menos três forças. A acetonitrila é a que possui a maior dipolaridade,

porém, a sua capacidade em participar em pontes de hidrogênio é bastante reduzida, sendo a sua participação como receptora de prótons um pouco mais pronunciada quando comparada a sua capacidade doadora, e o tetrahidrofurano somente é capaz de participar em pontes de hidrogênio como receptor de prótons, tendo a menor dipolaridade quando comparado a ACN e MeOH.

Neste capítulo é abordada qualitativamente as variações na retenção de 18 flavonóides (Figuras 2.1a, 2.1b e 2.1c) em função da alteração do solvente que compõe a fase móvel, sendo todos as fases móveis estudadas compostas por misturas aquosas dos solventes puros, em misturas binárias, e em misturas ternárias. Ainda neste capítulo, é mostrado o desenvolvimento de uma metodologia de análise para os flavonóides glicosilados majoritários presentes na espécie vegetal *Azadirachta indica*.

Galangina (1)

Kaempferol (2)

Quercetina (3)

Miricetina (4)

Isorhamnetina (5)

Crisina (6)

Apigenina (7)

Luteolina (8)

Naringenina (9)

Figura 2.1a – Estrutura dos flavonóides estudados

Astragalin (10)

Nicotiflorin (11)

Quercitrina (12)

Isoquercitrina (13)

Rutina (14)

Isorhamnetina-3-O-glucosideo (15)

Isorhamnetina-3-O-rutinosideo (16)

Apigenina-7-O-glucosideo (17)

Luteolina-7-O-glucosideo (18)

Figura 2.1b – Estrutura dos flavonóides estudados (continuação)

ramnose (ram)

glicose (gluc)

rutinose (rut)

Figura 2.1c – Estrutura dos açúcares ligados às agliconas.

2.2 Objetivos

- Estudar a retenção de 18 estruturas de flavonóides entre agliconas e glicosídeos, utilizando-se fases móveis aquosas com modificadores orgânicos MeOH, ACN, THF e suas misturas binárias e ternárias.
- Desenvolvimento de metodologia de análise para identificação e quantificação dos flavonóides majoritários presentes na espécie *Azadirachta indica* (Neem)

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Equipamentos e softwares

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com bomba quaternária LC 10Avp, sistema controlador SCL 10Avp, e detector de arranjo de diodos SPD-M10vp. O injetor utilizado foi do tipo automático Waters 717 Plus e o software de aquisição e tratamento de dados foi o Class vp 5.02 fornecido juntamente com o cromatógrafo Shimadzu. Foi utilizada uma coluna Gemni C18 (Phenomenex) com as dimensões de 25 cm de comprimento com diâmetro de 0,46 cm e tamanho de partícula de 5 μ m, tendo como suporte um misto de sílica e polímero orgânico.

Os tratamentos estatísticos foram realizados com o software *Statistica*

2.3.2 Reagentes e padrões

Todos os solventes utilizados foram grau HPLC da marca Tedia, e a água deionizada através de sistema Milli-Q. No início de cada dia as fases móveis foram degaseificadas utilizando-se vácuo e banho de ultra-som e constantemente purgados com hélio durante os experimentos. O pH da fase aquosa foi ajustado em 2,5 com ácido fosfórico grau HPLC (Tedia), sendo adicionado a mesma quantidade de ácido fosfórico utilizado no acerto de pH da água às fases orgânicas.

Os padrões galangina (1) e crisina (6) foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Os padrões kaempferol (2), quercetina (3), miricetina (4), apigenina (7), luteolina (8), naringenina (9) e rutina (14) foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, USA). Isoramenitina (5), isoquercetrina (13), isoramenitina-3-O-glicosídeo (15), isoramenitina-3-O-rutinosídeo (16), apigenina-7-O-glucosídeo (17) e luteolina-7-O-glicosídeo (18) foram adquiridos da Extrasynthèse (Genay, France). Os padrões de astragalin (10), nicotiflorin (11) e quercitrina (12) foram comprados da Chromadex

(Santa Ana, CA, USA). As soluções dos padrões foram preparadas em etanol em concentrações de 1000 µg/mL e estocadas abaixo de 0°C até o uso. Soluções aquosas contendo aproximadamente 50% de solvente orgânico em água foram preparadas na concentração apropriada para injeção em cada caso.

2.3.3 Preparação das amostras de Neem

As folhas trituradas de Neem (*Azadirachta Indica*) cultivadas no Brasil foram adquiridas junto ao Projeto Neem Brasil (Silvânia, GP, Brasil), e de acordo com o fornecedor foram obtidas de plantas com idade entre 2 e 6 anos, sendo secas a temperatura ambiente à sombra. Na etapa de desenvolvimento da metodologia de análise utilizou-se um extrato hidroalcoólico a 50% de etanol (v/v) feito com uma relação de planta/solvente (m/v) de 1:10, através de agitação em ultra-turrax a 11000 rpm por cerca de 20 minutos.

Foram analisadas também folhas de Neem coletadas na fazenda da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios (APTA), situada na Rodovia SP 127 (Piracicaba-Rio Claro) km 30. As folhas de Neem (de árvores com aproximadamente 3 anos) foram certificadas pelo Dr. Nivaldo Guirado, engenheiro agrônomo pesquisador da APTA. As folhas foram secas à sombra no próprio laboratório.

2.3.4 Metodologia

Todas as corridas cromatográficas foram efetuadas em modo gradiente, sendo as composições das diferentes fases móveis ajustadas através da regra de correspondência de força de solventes proposta por Schoenmakers e colaboradores¹¹ (equações 2.4 e 2.5) com uma pequena modificação para ACN (equação 2.6):

$$\%ACN = 0,32(\%MeOH)^2 + 0,57\%MeOH \quad (\text{Equação 2.4})$$

$$\%THF = 0,66\%MeOH \quad (\text{Equação 2.5})$$

$$\%ACN = 0,2(\%MeOH)^2 + 0,57\%MeOH \quad (\text{Equação 2.6})$$

sendo %ACN a porcentagem de acetonitrila (v/v) em mistura aquosa correspondente a força cromatográfica de uma determinada porcentagem (v/v) de metanol, e %THF a porcentagem de tetrahydrofurano (v/v) em mistura aquosa correspondente a força cromatográfica de uma determinada porcentagem de metanol (v/v).

A temperatura foi ajustada em 30°C, a vazão utilizada foi de 1,5 ml/min, o volume injetado foi de 10 µL, e a detecção efetuada de 200 nm a 500 nm. Sendo os cromatogramas registrados em 355 nm.

2.4 Resultados e discussão

2.4.1 Comportamento cromatográfico

Foram efetuadas dez corridas no modo gradiente utilizando-se como fase móvel misturas aquosas de MeOH, ACN, THF e suas misturas binárias e ternárias. Os vários pontos experimentais (proporções dos solventes orgânicos) foram definidos de acordo com um planejamento estatístico de misturas simplex centróide ampliado^{12,13}. A variação da porcentagem de fase orgânica durante o gradiente foi equivalente a força de 10% de MeOH a 100% de MeOH em 40 minutos, seguindo-se a regra de correspondência de força entre solventes de Schoenmakers¹¹ com modificações para ACN (ver item 2.3.4).

Apesar da variação da equivalência entre forças de MeOH e ACN ser do tipo quadrática, somente a porcentagem inicial e final foram calculadas pela equação 2.6, considerando-se uma variação linear dentro deste intervalo. A regra de correspondência entre ACN e MeOH foi modificada pelo fato de que nos experimentos iniciais observou-se um valor de fator de retenção para o último composto bem menor quando se utilizava ACN e a regra de correspondência original com relação ao fator de retenção do mesmo soluto em MeOH, e uma das considerações deste estudo é que para se avaliar a variação de seletividade devido a natureza do solvente deve-se manter o intervalo de eluição praticamente constante.

Uma vez que existe variação na composição da fase móvel entre os vários experimentos, e na força cromatográfica devido ao gradiente, tem-se como resultado um espaço experimental definido por um Prisma¹⁴, segundo a Figura 2.2, onde planos horizontais correspondem a misturas com mesma força cromatográfica

(entenda-se força cromatográfica como valor aproximadamente constante para o valor de k do último composto a eluir) e planos verticais correspondem a pontos de mesma seletividade.

- Seletividade de $P_1 = P_2$
- Força de $P_1 < P_2$

Figura 2.2 – Representação do espaço experimental segundo o modelo “Prisma”

As composições das fases binárias e ternárias foram calculadas multiplicando-se a porcentagem de determinado solvente na mistura pela sua força corrigida em relação ao MeOH. Na Tabela 2.2 tem-se as proporções iniciais e finais de cada solvente para cada experimento.

Tabela 2.2 – Porcentagens iniciais e finais de cada solventes em cada experimento

código	Ponto de seletividade	%MeOH	%MeOH	%ACN	%ACN	%THF	%THF
		inicial	final	inicial	final	inicial	final
A	100%MeOH	10.0	100	-	-	-	-
B	100%ACN			5.90	77.0	-	-
C	100%THF			-	-	6.60	66.0
D	50%MeOH-50%ACN	5.00	50.0	2.95	38.5	-	-
E	50%MeOH-50%THF	5.00	50.0	-	-	3.30	33.0
F	50%ACN-50%THF	-	-	2.95	38.5	3.30	33.0
G	67%MeOH*	6.67	66.7	0.98	12.8	1.10	11.0
H	67%ACN*	1.67	16.7	3.93	51.3	1.10	11.0
I	67%THF*	1.67	16.7	0.98	12.8	4.4	44.0
J	Triplo***	3.33	33.3	1.97	25.7	2.20	22.0

*a diferença para 100% é composta igualmente pelos outros dois solventes.** 33,33% de cada solvente

Os cromatogramas obtidos em cada experimento são mostrados nas Figuras 2.3a, 2.3b e 2.3c.

Figura 2.3a – Cromatogramas obtidos com solventes puros na fase aquosa

Figura 2.3b – Cromatogramas obtidos com misturas binárias de solventes na fase aquosa

Figura 2.3c – Cromatogramas obtidos com misturas ternárias de solventes na fase aquosa.

Figura 2.3c (continuação) – Cromatograma obtido com mistura ternária de solventes (igual proporção) na fase aquosa.

De acordo com o cromatograma da Figura 2.3a-A existem dois grandes grupos de compostos, os glicosídeos eluindo em tempos menores seguidos pelas agliconas com um tempo de eluição maior, sendo a única exceção a aglicona miricetina (flavonol com o maior número de hidroxilas no anel B – vide Figura 2.1) que elui juntamente com os compostos glicosilados. A eluição das agliconas em MeOH segue a ordem flavonol-flavona para pares de compostos com a mesma substituição no anel B (Figura 2.1), com exceção do par 6/1 onde essa ordem é invertida. Ainda com relação ao grupo da agliconas pode-se observar uma co-eluição parcial entre os compostos naringenina (única flavanona da série) e quercetina, e uma co-eluição total entre os compostos isorhamnetina e apigenina. Analisando-se a eluição dos glicosídeos observa-se que existe a co-eluição dos pares de compostos que tem como açúcar na posição 3 glicose e rutinose, considerando-se a aglicona quercetina como estrutura básica, o mesmo comportamento ocorre para os glicosídeos de kaempferol com o mesmo padrão de

substituição. Esse comportamento não é seguido pelos glicosídeos de isorhamnetina, onde existe uma pequena separação entre os picos (fator de separação igual a 1.009), sendo a ordem de eluição glicose-rutnose (picos 15 e 16). As flavonas glicosiladas (picos 17 e 18) são completamente resolvidas do restante dos compostos.

O padrão de eluição quando se usa ACN pura como fase móvel aquosa (Figura 2.3a-B) é mais pronunciado no que se refere aos dois grandes grupos definidos anteriormente, ou seja, todas as agliconas eluem após os glicosídeos sem nenhuma exceção. A ordem de eluição das agliconas nesse caso é invertida com relação ao MeOH, as flavonas eluem antes dos flavonóis com mesmo padrão de substituição no anel B, sendo esta tendência seguida para todos os pares flavona/flavonol. Ocorre um aumento pronunciado na separação dos picos 5 e 7 (co-eluidos na situação anterior), porém a separação entre o par 3 e 8 é comprometida. Os pares de picos referentes aos glicosídeos de quercetina, kaempferol e isorhamnetina, onde os açúcares substituintes são glicose e rutnose são completamente resolvidos nesta condição, seguindo a ordem de eluição glicose-rutnose. Nesta condição o glicosídeo de luteolina (pico 18) co-elui parcialmente com o glicosídeo de quercetina (pico 13), e o glicosídeo de apigenina (pico 17) co-elui totalmente com o ramnosídeo de quercetina e glicosídeo de isorhamnetina (picos 15 e 12).

Quando utiliza-se THF como modificador orgânico da fase móvel (Figura 2.1a-C) tem-se a maior divisão entre os dois grandes grupos glicosídeos e agliconas. Considerando-se a eluição das agliconas e os pares flavona-flavonol, onde os substituintes no anel B são apenas hidroxilas (desconsiderando o pico 5 e 9), pode observar-se um padrão de eluição diferente dos anteriores. Neste caso a ordem

seguida é de flavona seguida de flavonol com $N+1$ hidroxilas no anel B, onde N é o número de hidroxilas no anel B da flavona, sendo o maior fator de separação obtido para N igual 1, uma vez que para N igual a dois observa-se co-eluição total (picos 4 e 8) e para N igual a 0 a co-eluição é parcial (picos 2 e 6). Isorhamnetina (pico 5) exibe um comportamento intermediário entre os flavonóis 2 e 3, com um fator de separação menor quando se considera o composto 3 (duas hidroxilas no anel B) do que quando se considera o composto 2 (apenas uma hidroxila no anel B). Analisando-se os glicosídeos observa-se a sequência de eluição: rutinosídeo de quercetina, seguido de isorhamnetina e kaempferol (picos 14, 16 e 11), sendo a mesma tendência seguida quando o açúcar substituinte na posição 3 do esqueleto básico é a glicose (picos 13, 15 e 10). Nesta condição quercitrina (pico 12) é separado dos demais flavonóides, enquanto as flavonas glicosiladas apigenina-7-O-glicosídeo (pico 17) e luteolina-7-O-glicosídeo (pico 18) apresentam uma co-eluição parcial e total com os compostos astragalin (pico 10) e isorhamnetina-3-O-glucosídeo (pico 15) respectivamente.

2.4.2 Modelagem dos fatores de retenção (k) em função da composição da fase móvel

Uma vez observadas tendências no padrão de eluição dos flavonóides em função da composição da fase móvel, avaliou-se a possibilidade de modelagem dos valores de fator de retenção, segundo um planejamento de misturas simplex centróide ampliado. Os valores dos fatores de retenção (k) para cada composto nas condições utilizadas para modelagem são apresentados na Tabela 2.3. Os valores dos coeficientes dos modelos ajustados foram avaliados através de análise de variância, sendo mantidos coeficientes não significativos necessários para a manutenção de um modelo hierárquico segundo a equação 2.4. Os valores dos coeficientes obtidos para cada composto são apresentados na Tabela 2.4

$$k = a * A + b * B + c * C + d * A * B + e * A * C + f * B * C + g * A * B * C \text{ (Eq. 2.4).}$$

Onde, k é o valor do fator de retenção, as letras minúsculas (a, b, c, d, e, f, g), representam coeficientes ajustados para o modelo, e as letras maiúsculas (A, B, C) são porcentagens em força de cada solvente relativo a MeOH.

Para cada um dos 18 flavonóides estudados foi ajustada uma equação, sendo que a qualidade do ajuste de cada equação pode ser observada através dos gráficos de valor previsto contra valor observado (Figura 2.4)

Tabela 2.3 – Valores de fator de retenção para os 18 flavonóides estudados em cada sistema cromatográfico (vide Tabela 2.2 para códigos dos sistemas e Figura 2.1 para estruturas)

		COMPOSTOS																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Condição	A	14.52	12.60	11.48	10.19	12.78	14.17	12.79	11.93	11.36	10.30	10.32	10.25	9.478	9.450	10.35	10.44	9.909	9.114
	B	13.06	10.45	9.126	7.737	10.58	12.68	10.22	9.082	10.06	7.020	6.673	7.100	6.453	6.124	7.091	6.764	7.125	6.412
	C	14.78	13.61	13.00	12.17	13.19	13.50	12.69	12.18	13.17	9.000	8.392	9.611	8.602	7.846	8.705	8.015	9.159	8.667
	D	14.62	12.28	10.99	9.508	12.47	14.27	12.29	11.20	11.33	9.239	9.048	9.197	8.425	8.225	9.321	9.197	9.075	8.202
	E	15.14	13.67	12.74	11.56	13.30	14.02	13.01	12.31	12.81	9.629	9.261	10.03	9.047	8.552	9.356	9.000	9.706	9.009
	F	14.12	12.33	11.38	10.25	12.08	12.99	11.52	10.74	11.55	7.991	7.515	8.415	7.504	6.950	7.840	7.345	7.982	7.345
	G	14.77	12.87	11.81	10.55	12.66	13.73	12.26	11.40	11.92	8.880	8.547	9.212	8.281	7.865	8.743	8.388	8.821	8.094
	H	14.95	13.14	12.03	10.69	13.04	14.23	12.88	11.99	12.04	9.810	9.630	10.00	9.059	8.824	9.705	9.556	9.581	8.785
	I	14.23	11.92	10.69	9.305	11.88	13.46	11.46	10.43	11.13	8.081	7.754	8.313	7.487	7.095	8.086	7.731	8.119	7.294
	J	14.73	13.25	12.41	11.34	12.89	13.47	12.38	11.72	12.50	8.838	8.360	9.300	8.370	7.737	8.603	8.065	8.902	8.304

Tabela 2.4 – Valores dos coeficientes ajustados para cada composto segundo a equação 2.4 (vide Figura 2.1 para estruturas dos compostos)

		Compostos																	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
coeficientes*	<i>a</i>	14.52	12.63	11.52	10.23	12.80	14.24	12.82	11.96	11.40	10.32	10.34	10.31	9.49	9.47	10.36	10.45	9.91	9.12
	<i>b</i>	13.10	10.47	9.14	7.74	10.66	12.64	10.24	9.12	10.03	7.02	6.67	7.11	6.45	6.12	7.09	6.76	7.14	6.41
	<i>c</i>	14.75	13.58	12.97	12.14	13.23	13.47	12.67	12.18	13.10	8.99	8.38	9.62	8.59	7.83	8.70	8.01	9.15	8.66
	<i>d</i>	3.39	3.04	2.77	2.23	3.09	3.26	3.02	2.66	2.45	2.35	2.25	2.07	1.87	1.79	2.43	2.40	2.27	1.77
	<i>e</i>	1.90	2.15	1.92	1.50	1.11	-	0.88	0.82	2.04	-0.07	-0.36	-	0.04	-0.37	-0.68	-0.90	0.67	0.48
	<i>f</i>	0.79	1.08	1.14	1.08	-	-	-	-	-	-0.11	-0.10	-	-0.11	-0.18	-0.24	-0.19	-0.64	-0.79
	<i>g</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-3.20	-2.51	-	-2.10	-1.85	-3.27	-4.09	-3.96	-3.42

$$*k = a * \%MeOH + b * \%ACN + c * \%THF + d * \%MeOH * \%ACN + e * \%MeOH * \%THF + f * \%ACN * \%THF + g * \%MeOH * \%ACN * \%THF$$

Figura 2.4 – Valores previstos X observados para o ajuste do fator de retenção.

Figura 2.4 – (continuação)

Figura 2.4 – (continuação).

Através dos modelos obtidos é possível prever o valor do fator de retenção para cada composto em qualquer proporção de solvente utilizado, sempre respeitando a condição de correspondência de gradiente de força equivalente a 10% de MeOH até 100% em 40 minutos. Na Tabela 2.5 são apresentados dados obtidos para um teste de previsão feito com uma fase móvel composta de 24% de MeOH, 30% de ACN e 50% de THF.

Tabela 2.5 – Valores obtidos para o teste de modelagem do fator de retenção

Composto	k previsto	k obtido	erro(%)
1	14.76	14.65	-0.74
2	13.64	13.51	-0.95
3	13.02	12.89	-1.04
4	8.22	8.20	-0.26
5	8.36	8.35	-0.16
6	12.04	11.94	-0.88
7	11.49	11.40	-0.76
8	10.84	10.75	-0.76
9	8.58	8.57	-0.08
10	12.29	12.18	-0.90
11	8.06	8.09	0.44
12	9.18	9.15	-0.37
13	12.18	12.03	-1.20
14	7.71	7.75	0.40
15	8.13	8.15	0.26
16	8.76	8.74	-0.19
17	12.70	12.61	-0.69
18	8.75	8.74	-0.08

De acordo com os valores obtidos para o erro de previsão (máximo de 1.2%) pode-se afirmar que os modelos ajustados podem ser úteis na escolha da fase

móvel mais seletiva quando se conhece a composição da amostra a ser analisada, uma vez que se pode prever o valor de k para cada composto.

2.4.3 Avaliação das diferenças dos sistemas cromatográficos

O desenvolvimento de metodologias de análise para amostras complexas como os extratos vegetais, onde não se conhece exatamente a composição qualitativa, é um verdadeiro desafio analítico. A probabilidade de haver co-eluições de substâncias desconhecidas com os analitos de interesse é tão maior quanto a complexidade da amostra e o desconhecimento da composição da mesma. Um alternativa interessante nas etapas iniciais de desenvolvimento de metodologias aplicadas neste tipo de amostra é a análise em diferentes sistemas cromatográficos onde haja diferenças significativas de seletividade. Na literatura tais sistemas são chamados de ortogonais ou dissimilares¹⁵. A ortogonalidade de dois sistemas cromatográficos pode ser determinada plotando-se os fatores de retenção dos compostos em teste de cada sistema cromatográfico em um sistema de coordenadas cartesianas, sendo que, quanto maior a dispersão maior a ortogonalidade, ou seja, maior não só as diferenças entre os fatores de retenção mais também as trocas de ordem de eluição. Como medida de dispersão pode-se utilizar o valor do coeficiente de correlação de Pearson (r), sendo que quanto menor este coeficiente, menor é a correlação entre os fatores de retenção nos dois sistemas cromatográficos, e consequentemente maior a ortogonalidade e a diferença de seletividade. Na Tabela 2.6 são apresentados os valores correspondentes a matriz de correlação dos valores do fator de retenção dos dezoito flavonóides estudados (Tabela 2.3) nos dez sistemas da Tabela 2.2.

Tabela 2.6 – Matriz de correlação dos valores de fator de retenção nos dez sistemas estudados (vide Tabela 2.2 para códigos dos sistemas).

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
A	1.0000									
B	0.9732	1.0000								
C	0.8641	0.9248	1.0000							
D	0.9927	0.9936	0.9033	1.0000						
E	0.9277	0.9661	0.9889	0.9552	1.0000					
F	0.9276	0.9699	0.9882	0.9569	0.9989	1.0000				
G	0.9788	0.9882	0.9481	0.9909	0.9843	0.9840	1.0000			
H	0.9688	0.9951	0.9535	0.9894	0.9857	0.9879	0.9965	1.0000		
I	0.9062	0.9541	0.9955	0.9386	0.9982	0.9981	0.9733	0.9770	1.0000	
J	0.9518	0.9820	0.9753	0.9747	0.9966	0.9974	0.9942	0.9957	0.9917	1.0000

A matriz de correlação mostra os valores de r (Pearson) para todos os sistemas cromatográficos estudados, podendo-se obter a correlação entre dois sistemas na intersecção de uma linha com uma coluna. A Tabela 2.3 mostra que os dois sistemas cromatográficos mais ortogonais (menor valor de r) são o A e o C, representando fases móveis onde utilizou-se 100% de MeOH como modificador orgânico e 100% de THF (em força cromatográfica relativo ao MeOH) respectivamente. Da mesma forma pode-se identificar os dois sistemas mais similares como o E e o F, compostos de misturas binárias de MeOH com THF e ACN com THF. De acordo com esse resultado pode-se afirmar que as propriedades do THF são determinantes nessas misturas binárias, uma vez que mesmo em mistura com dois solventes com propriedades distintas (Tabela 2.1), o resultado em termos de seletividade permanece praticamente o mesmo. Na Figura 2.5 são mostrados os gráficos de valores de $k \times k$ para os sistemas mais ortogonal e menos ortogonal.

Através desses gráficos é possível observar a maior dispersão para o sistema mais ortogonal (Figura 2.5a).

Figura 2.5 – Gráficos de $k \times k$ para os sistemas (a) mais ortogonal e (b) menos ortogonal.

Apesar de ter sido possível identificar os sistemas mais ortogonais e os mais similares, através da matriz de correlação fica difícil dividir todos os sistemas em grupos similares. Esse agrupamento pode ser feito através da técnica estatística de análise de cluster hierárquico¹⁶ e, segundo Heyen e colaboradores¹⁷, essa análise pode ser feita utilizando-se como fator de similaridade o valor de $(1-r)$, e como técnica de associação a ligação ponderada pela média (weighted-average-linkage). Os resultados obtidos aplicando-se a análise de cluster segundo as condições propostas por Heyen¹⁷ são mostrados no dendograma da Figura 2.6.

O dendograma da Figura 2.6 pode ser interpretado através da altura das conexões entre os vários sistemas e clusters formados por eles. Quanto maior a altura da linha que conecta dois sistemas ou dois clusters maior é a dissimilaridade entre esses cluster ou sistemas e consequentemente maior a sua ortogonalidade, uma vez que a classificação utilizada leva em consideração o valor de $(1-r)$. Desta forma atribuindo-se um valor limite para o valor de $(1-r)$ tem-se um limite de interconexões entre os clusters e consequentemente dá-se origem a grupos distintos de sistemas.

De acordo com a Figura 2.6 atribuindo-se um valor limite de 0,014 para $(1-r)$ tem-se a divisão dos dez sistemas cromatográficos estudados em 4 grupos, de acordo com a Tabela 2.6. Os dados da Tabela 2.6 mostram que o comportamento do sistema cromatográfico A (MeOH) não é comparável a nenhum outro constituindo sozinho o grupo I, enquanto que misturas de ACN com MeOH (sistema D) e ACN pura (sistema B) apresentam similaridades quanto ao comportamento cromatográfico (grupo II). As misturas ternárias com igual proporção de solventes (sistema J) e proporções maiores de MeOH (sistema G) e ACN (sistema H)

compõem o grupo III. O grupo IV é composto por sistemas cromatográficos onde a fase móvel é composta por pelo menos 50 % de THF (em força cromatográfica).

Tabela 2.6 – Grupos ortogonais obtidos pela análise de cluster (vide Tabela 2.2 para códigos dos sistemas cromatográficos)

grupos	sistemas cromatográficos
I	A
II	D, B
III	G, H, J
IV	C, E, F, I

Figura 2.6 – Dendrograma obtido para a análise de cluster hierárquico utilizando-se a associação ponderada pela média.

Nos gráficos da Figura 2.7 são apresentados os valores de $k \times k$ para pares de sistemas pertencentes a grupos distintos de acordo coma análise de clusters.

Figura 2.7 – Gráficos de $k \times k$ para sistemas ortogonais de acordo com a análise de clusters.

Figura 2.7 – (continuação)

A análise dos dados de retenção foi feita até agora considerando flavonóides em geral, porém o comportamento de agliconas e glicosídeos pode ser diferente para diferentes sistemas cromatográficos, ou seja, uma análise para glicosídeos e outra para agliconas pode revelar um comportamento diferente do encontrado até agora considerando-se casos específicos. A Figura 2.8 mostra a análise de clusters efetuada considerando somente os dados de retenção dos glicosídeos.

Figura 2.8 – Dendrograma obtido para a análise de cluster hierárquico com dados de flavonóides glicosídeos.

De acordo com a Figura 2.8 se considerarmos um valor limite de $(1-r)$ igual a 0,054 tem-se a divisão dos dez sistemas cromatográficos em novos quatro grupos (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 – Grupos ortogonais obtidos pela análise de cluster para glicosídeos (vide Tabela 2.2 para códigos dos sistemas cromatográficos)

grupos	sistemas cromatográficos
Ia	A
IIa	D, G
IIIa	B, H, J
IVa	C, E, F, I

A única modificação observada além da modificação da intensidade das diferenças de alturas que conectam os clusters é a troca de grupos entre os sistemas B e G.

Os resultados da análise de clusters quando se consideram somente as agliconas é mostrado na Figura 2.9.

Figura 2.9 – Dendrograma obtido para a análise de cluster hierárquico com dados de flavonóides agliconas.

Se considerarmos um valor limite de 0,025 para $(1-r)$ tem-se o agrupamento dos dez sistemas cromatográficos em 4 grupos diferentes descritos na Tabela 2.8.

Tabela 2.8 – Grupos ortogonais obtidos pela análise de cluster para agliconas (vide Tabela 2.2 para códigos dos sistemas cromatográficos)

grupos	sistemas cromatográficos
Ib	A, D, G
IIb	H, B
IIIb	C
IVb	E, F, J, I

A análise dos dados de retenção das agliconas mostram que as modificações do agrupamento dos sistemas cromatográficos são mais pronunciadas. O sistema C passa a compor sozinho um grupo, enquanto os grupos Ia e IIa (análise dos glicosídeos) se fundem num único grupo, os sistemas H e B continuam agrupados no mesmo grupo sem a presença do sistema J, que substitui o grupo C no grupo IVa (análise glicosídeos) dando origem ao grupo IVb.

Em geral os resultados obtidos mostram que interações que mais influenciam a retenção dos glicosídeos e agliconas são diferentes, uma vez que os agrupamentos de acordo com os fatores de retenção sofrem modificações pronunciadas em função do solvente ou mistura de solventes que compõem a fase móvel.

*2.4.4 Desenvolvimento de metodologia para análise de flavonóides majoritários presentes nas folhas de *Azadirachta indica* (Neem)*

2.4.4.1 Análise Qualitativa e seleção da fase móvel

A literatura reporta que os flavonóides majoritários presentes nas folhas de Neem são os glicosídeos astragalin (10), nicotiflorin (11), quercitrina (12), isoquercitrina (13), rutina (14) e miricetina-3-O-rutinosídeo¹⁸. Todos os flavonóides reportados com exceção do glicosídeo de miricetina foram estudados nas sessões

anteriores. Em princípio vários dos sistemas cromatográficos apresentados anteriormente tem seletividade adequada para serem utilizados no desenvolvimento de um método para quantificação dos flavonóides de Neem. O fato de não se conhecer o comportamento cromatográfico do glicosídeo de miricetina e por se tratar de uma espécie vegetal onde outras substâncias podem estar presentes além dos flavonóides estudados, faz com que a aplicação dos sistemas ortogonais determinados na seção anterior sejam úteis neste momento.

Para cada um dos grupos ortogonais foi selecionado um sistema cromatográfico e aplicado a um extrato hidroglicólico de Neem. Uma vez que a literatura reporta que os flavonóides majoritários são glicosídeos¹⁸, considerou-se os grupos ortogonais determinados através dos dados de retenção dos glicosídeos (Tabela 2.7). Na Tabela 2.9 é apresentado o sistema cromatográfico selecionado dentro de cada grupo ortogonal.

Tabela 2.9 – Sistemas cromatográficos selecionados para o início da otimização da separação de flavonóides presentes em Neem.

grupo*	sistema cromatográfico selecionado
Ia	A
IIa	G
IIIa	J
IVa	E

* de acordo com a Tabela 2.7.

Na Figura 2.10 é apresentado o cromatograma obtido no sistema cromatográfico A.

Figura 2.10 – Cromatograma do extrato de Neem obtido com o sistema cromatográfico A (numeração de acordo com a Figura 2.2 - * picos não identificados)

O cromatograma obtido com o sistema cromatográfico A mostra a presença de picos com espectros UV característicos de flavonóides com fatores de retenção iguais aos dos padrões que a literatura relata estarem presentes no Neem, por isso foram assinalados tentativamente com os respectivos números. Além dos picos assinalados observa-se também a presença de picos não identificados que também apresentam espectros característicos de flavonóides.

Como já era de se esperar pelos dados obtidos com os estudos efetuados com os padrões, o sistema cromatográfico G (Figura 2.11) é capaz de discriminar os flavonóides presentes no Neem, havendo uma melhoria considerável na resolução. Os compostos 13 e 14, assim como 10, 11 e 12 são completamente resolvidos nessa condição, além disso ocorre o aparecimento de outro composto não identificado com espectro característico de flavonóide, provavelmente proveniente da resolução do

primeiro pico não identificado do cromatograma da Figura 2.10. Nesse caso é possível fazer a inferência de que um desses picos não identificados no início do cromatograma seja miricetina-3-O-rutinosídeo levando-se em consideração a ordem de eluição dos glicosídeos de quercetina e kaempferol, e da estrutura da miricetina-3-O-rutinosídeo (flavonol com 3 hidroxilas no anel B e um rutinosídeo na posição 3 do esqueleto). Uma outra característica apresentada nesse sistema cromatográfico é que o pico número 11 apresentou pequenas modificações no espectro de UV ao longo de sua largura, o que pode ser interpretado como uma possível co-eluição com uma substância de espectro de UV semelhante (outro flavonóide).

As principais diferenças observadas nos resultados obtidos quando se aplica o sistema cromatográfico J (Figura 2.12) com relação ao G são a melhoria da resolução entre os picos 13 e 14 e o aparecimento de dois picos não identificados logo após o pico 11. Esses interferentes provavelmente foram separados do pico 11 uma vez que a intensidade relativa desse pico em relação aos picos 10 e 12 no cromatograma da Figura 2.11 é diminuída, além de ter sido detectado através do espectro de UV uma possível co-eluição naquela situação. No cromatograma da Figura 2.12 apesar dos picos interferentes estarem parcialmente co-eluídos com o pico 11, o espectro de UV deste pico (considerando a região onde não há co-eluição visível), assim como de todos os demais analitos de interesse não apresentam modificações ao longo de suas larguras, o que leva a crer que não existem co-eluições, ou se elas existem são co-eluições com compostos minoritários que não influenciam de forma significativa na intensidade dos picos.

Figura 2.11 – Cromatograma do extrato de Neem obtido com o sistema cromatográfico G (numeração de acordo com a Figura 2.2 - * picos não identificados)

Figura 2.12 – Cromatograma do extrato de Neem obtido com o sistema cromatográfico J (numeração de acordo com a Figura 2.2 - * picos não identificados).

Na Figura 2.13 é apresentado o cromatograma referente ao sistema E. Pode-se observar neste cromatograma com relação ao do sistema J (Figura 2.11) que aparece um pico desconhecido co-eluído parcialmente com o pico 14, enquanto os

analitos de interesse permanecem resolvidos entre si com uma diminuição na resolução entre os picos 13 e 11. Novamente a análise dos espectros dos picos dos analitos de interesse revelaram que o pico 11 apresenta co-eluição com uma espécie interferente.

Figura 2.13 – Cromatograma do extrato de Neem obtido com o sistema cromatográfico E (numeração de acordo com a Figura 2.2 - * picos não identificados).

Com base nos dados obtidos nos quatro sistemas cromatográficos pode-se afirmar que a identificação de rutina, isoquercitrina, quercitrina, astragalin e nicotiflorin são inequívocas, uma vez que pode-se identificar todas essas substâncias por tempo de retenção e espectro de UV em cada uma das condições ditas ortogonais. Dentro dos sistemas cromatográficos analisados tem-se no sistema J o mais seletivo considerando-se não só os analitos de interesse mas também os picos interferentes. Dessa forma optou-se pelo sistema cromatográfico J para dar continuidade ao processo de otimização da análise, objetivando principalmente a maior resolução entre o pico 11 e seus interferentes.

2.4.4.2 Otimização das condições de gradiente e temperatura

Uma vez selecionada a fase móvel considerada mais seletiva, deu-se continuidade ao processo de otimização estudando-se a influencia da força cromatográfica inicial e do tempo de gradiente para se atingir uma força cromatográfica equivalente a de 100% de MeOH na resolução do pico 11 com seus interferentes. Os estudos foram efetuados segundo um planejamento de superfície de resposta considerando-se um planejamento fatorial em estrela com ponto central. Na Tabela 2.10 são mostradas as condições de análise de cada experimento e na Figura 2.13 os cromatogramas obtidos em cada condição.

Tabela 2.10 – Experimentos realizados segundo planejamento fatorial em estrela com ponto central.

Experimento	%inicial de fase orgânica*	tempo de gradiente**
1	5.0	20.0
2	5.0	60.0
3	20.0	20.0
4	20.0	60.0
5	12.5	11.7
6	12.5	68.3
7	1.9	40.0
8	23.1	40.0
9	12.5	40.0

Figura 2.14 – cromatogramas obtidos de acordo com as condições da Tabela 2.10

Figura 2.14 – (continuação)

Figura 2.14 – (continuação)

De acordo com os cromatogramas da Figura 2.14 observa-se uma tendência na melhora da resolução quando a força inicial da fase móvel é menor com tempos de gradiente maiores. A partir desta informação testou-se uma nova condição onde a força inicial da fase móvel é igual a menor dentro das já testadas (experimento 7 – Tabela 2.10) com um tempo de gradiente igual a 60 minutos. No cromatograma da Figura 2.15 é apresentado o resultado obtido nesta condição.

Figura 2.15 – Cromatograma obtido com aumento do tempo de gradiente para 60 minutos de acordo com as condições do experimento 7 da Tabela 2.10.

Como pode-se observar não houve nenhuma melhora com relação ao resultado obtido no experimento 7 da Tabela 2.10. A resolução entre o pico 11 e os interferentes foi diminuída, além de observar-se o aumento do tempo de análise. Considerando-se a condição 7 da Tabela 2.10 como a melhor obtida estudou-se a influência da temperatura na resolução entre o pico 11 e os seus interferentes nas temperaturas de 40°C e 50°C. Na Figura 2.16 são apresentados os cromatogramas nas duas temperaturas testadas, de onde pode-se perceber que na temperatura de 40°C os dois interferentes passam a co-eluir totalmente, porém a

resolução entre o pico 11 e os picos dos interferentes é aumentada com relação a condição 7 da Tabela 2.10. Na condição onde utiliza-se 50°C a resolução entre o pico 11 e seus interferentes é melhorada com relação a condição 7 da Tabela 2.10, porém os interferentes passam a co-eluir parcialmente com o pico 10. Comparando-se os resultados obtidos em 40°C e 50°C tem-se uma melhora na resolução do pico 11 e seus interferentes em ambas as condições, porém a melhora é mais acentuada em 40°C, além de não haver comprometimento do pico 10.

Figura 2.16 – Cromatogramas obtidos através da variação da temperatura com relação ao experimento 7 da Tabela 2.10.

A partir de todos os estudos efetuados considerou-se a condição do experimento 7 da Tabela 2.10 conduzido na temperatura de 40°C como a otimizada para quantificação dos flavonóides glicosídeos majoritários presentes nas folhas de *Azadirachta indica*. Nesta condição a resolução obtida para o pico 11 e seus interferentes foi de aproximadamente 1,15 medido pelo método USP (United States Pharmacopeia). Foram testadas volumes de injeção de 5 µL a 20 µL em intervalos de 5 µL concluindo-se que o volume de injeção de 15 µL é o maior volume possível de ser injetado sem que haja comprometimento da resolução do par crítico (pico 11 e seus interferentes) e por esse motivo foi fixado como o volume de injeção ótimo do método desenvolvido.

2.4.4.3 Figuras de mérito do método proposto

Foram construídas curvas de calibração com 6 pontos compreendendo a faixa de concentração de 1 µg.mL⁻¹ até 100 µg.mL⁻¹. As injeções foram efetuadas em triplicata nas concentrações de 1, 5, 25, 50, 75 e 100 µg.mL⁻¹. O valor do coeficiente de variação observado ficou entre 0,1% e 1,3%. A estatística das curvas, assim como o gráfico da curva de calibração são mostrados na Tabela 2.11 e Figura 2.17.

Tabela 2.11 – Estatística das curvas de calibração

	Faixa de concentração (µg/ml)	a	b	R ²	F	Desvio padrão da regressão
rutina	1 - 100	21356	455	0.9999	38481	9647
isoquercitrina	1 - 100	23885	345	0.9999	33296	11599
nicotiflorin	1 - 100	30855	-707	0.9999	33747	14884
astragalin	1 - 100	37998	1160	0.9999	40021	16832
quercitrina	1 - 100	27533	1048	0.9999	38100	12500

n = 3

Figura 2.17 – Curvas de calibração obtidas para os glicosídeos presentes nas folhas de Neem

A estimativa dos limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram efetuados com base na relação sinal/ruído (S/R), considerando um valor igual a 3 para limite detecção e 10 para limite de quantificação. Foram efetuadas medidas da intensidade do ruído na região de eluição de cada pico num cromatograma obtido com a injeção de uma mistura de água e etanol (branco), sendo este valor de intensidade correlacionado com a intensidade dos sinais de cada pico na concentração de 0,0625 µg.L⁻¹. Os valores obtidos para LOQ e LOD de cada flavonóide são apresentados na Tabela 2.12.

Tabela 2.12 – Estimativa dos limites de detecção e quantificação.

composto	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
rutina	0.027	0.091
isoquercitrina	0.040	0.132
nicotiflorin	0.032	0.106
astragalin	0.023	0.077
quercitrina	0.030	0.099

Uma vez obtidas algumas figuras de mérito do método efetuou-se a otimização da extração dos flavonóides majoritários presentes nas folhas de Neem, objetivando um tempo de extração na qual a mesma possa ser considerada exaustiva. Esse estudo foi conduzido inicialmente utilizando-se 3 gramas da planta seca e triturada para 30 mL de uma mistura etanol/água na proporção de 1:1 (v/v) sob agitação a 11000 rpm em ultra-turrax, retirando-se alíquotas a cada 5 minutos de agitação. Os resultados obtidos são mostrados no gráfico da Figura 2.18.

Figura 2.18 – Gráfico da área correspondente ao pico de cada flavonóide em função do tempo de extração

De acordo com os dados da Figura 2.18 pode-se concluir que o tempo de extração suficiente para que haja uma concentração constante no extrato é de 20 minutos. Uma vez que a concentração no tempo de 20 minutos pode ter ficado constante por motivos de saturação do solvente efetuou-se outro teste de extração mantendo-se o volume de solvente para extração constante em 30 mL variando-se a

massa de planta utilizada. Foram feitos extratos com 1 g, 2 g e 3 g de planta. De acordo com os resultados obtidos neste experimento (Figura 2.19) pode-se concluir que não existe saturação do solvente, uma vez que as áreas encontradas nos extratos com diferentes relações planta/solvente seguem um comportamento linear, ou seja, dentro dos limites estudados a extração é independente da massa utilizada tendo-se a máxima extração a partir de 20 minutos. Desta forma pode-se concluir que um possível procedimento de extração das folhas de Neem para análise dos flavonóides majoritários é a agitação em ultra-turrax por 20 minutos utilizando-se uma relação planta/solvente de 2 g para 30 mL de uma mistura de etanol e água na proporção de 1:1 (v/v). Este foi o procedimento aplicado nos experimentos seguintes.

Figura 2.19 – Variação das áreas referentes aos picos dos flavonóides glicosídeos presentes no Neem em função da relação planta/solvente utilizada na confecção do extrato.

A metodologia de análise e extração desenvolvida foi aplicada em três amostras diferentes, duas delas oriundas da cidade de Piracicaba (estado de São Paulo) e uma de Silvânia (estado de Goiás). Os resultados obtidos convertidos em porcentagem de massa são mostrados na Tabela 2.13.

Tabela 2.13 – Valores obtidos para concentração de flavonóides majoritários em 3 amostras de folhas de Neem (valores expressos em porcentagem em massa)

amostra	rutina (% m/m)	isoquercitrina (% m/m)	nicotiflorin (% m/m)	astragalin (% m/m)	quercitrina (% m/m)
Piracicaba 1	0.831 (0,2)	0.5797 (0,1)	0.095 (1,7)	0.0435 (1,5)	0.1347 (0,2)
Piracicaba 2	0.692 (0,1)	0.813 (0,7)	0.066 (2,0)	0.04799 (0,06)	0.116 (0,1)
Goiás	0.729 (0,3)	0.970 (0,7)	0.0747 (1,1)	0.068 (1,8)	0.1849 (0,4)

* Valores entre parênteses correspondem aos coeficientes de variação em % para triplicata de injeção.

As variações de cada flavonóide em função da amostra são mostradas na Figura 2.20.

Os resultados mostram que as condições de cultivo (solo, temperatura, etc) influenciam na concentração relativa dos flavonóides quando se comparam as amostras de Piracicaba e Silvânia. Comparando-se as duas amostras de Piracicaba percebe-se que as proporções relativas de rutina e isoquercitrina são invertidas, o que leva a crer que as condições de saúde da planta interferem na produção diferenciada dos flavonóides, uma que a amostra Piracicaba 2 foi obtida de uma planta com a saúde debilitada.

2.5 Conclusões

Dos estudos efetuados pode-se concluir que a retenção dos flavonóides pode ser modelada em função da proporção do solvente orgânico, ou da mistura deles, que se utiliza como modificador da fase móvel aquosa. A utilização de MeOH, ACN e THF em fases móveis aquosas, seja na forma pura ou em misturas, dá origem a sistemas cromatográficos com diferentes seletividades na separação de flavonóides. Os sistemas cromatográficos ortogonais determinados para flavonóides, foram aplicados com sucesso no desenvolvimento de uma metodologia de análise cromatográfica para um extrato de planta de composição parcialmente desconhecida (Neem).

Os valores de linearidade, repetibilidade, limite de detecção e limite de quantificação do método proposto para quantificação dos flavonóides majoritários presente no Neem, são suficientes para a aplicação em amostras reais de extrato da planta.

2.6 Referências bibliográficas

1. J.G. Dorsey, K.A. Dill, Chem. Ver., 89 (1989) 331.
2. Cs. Horváth, W. Melander, I. Molnár, J. Chromatogr., 125 (1976) 129
3. M.H. Abraham, M. Rosés, J. Phys. Org. Chem., 7(1994) 672.
4. M.H. Abraham, J. Andonian-Haftvan, G.S. Whiting, A. Leo, J. Chem. Soc., Perkin Trans. II (1994) 1777.
5. L.C. Tan, P.W. Carr, M.H. Abraham, J Chromatogr. A, 752 (1996) 1.
6. L.C. Tan, P.W. Carr, J Chromatogr. A, 799 (1998) 1
7. L.R.Snyder, J.J. Kirkland, J.L. Glajch, Pratical HPLC Method Development, 2nd ed., Wiley-Interscience, New York, 1997
8. L.R. Snyder, J. Chromatogr. B, 689 (1997) 105.
9. L.R. Snyder, P.W. Carr, S.C. Rutan, J. Chromatogr., 656 (1993) 537.
10. T.H. Dzido, J Liq.Chrom.& Rel. Technol., 23 (2000) 2772.
11. P.J. Schoenmakers, H.A.H. Billiet, L. de Galan, J.Chromatogr., 205 (1981) 13
12. B.B. Neto, I.S. Scarminio, R.E. Bruns, Como Fazer Experimentos – Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria, 2a. ed, Editora da Unicamp, Campinas, 2003.
13. J. Grabrielsson, N.O. Lindberg, T. Lundstedt, J. Chemometrics, 16 (2002) 141.
14. A.M. Siouffi, R.P.T. Luu, J. Chromatogr. A, 592 (2000) 71
15. G. Xue, A.D. Bendick, R. Chen, S.S. Sekulic, J. Chromatogr. A, 1050 (2) (2004) 159.
16. B.K. Lavine, Encyclopedia of Analytical Chemistry, 1a. ed, John Wiley & Sons Ltda, Chichester, 2000.
17. E. Van Gyseghem, S. Van Hemelryck, M. Daszykowski, F. Questier, D.L. Massart, Y. Vander Heyden, J. Chromatogr A, 988 (2003) 77.
18. R.R. Chattopadhyay, J. Ethnopharmacology, 67 (1999) 373

CAPÍTULO 3
ANÁLISE DE FLAVONÓIDES POR RF-MEKC

3.1. Introdução

A maioria dos flavonóides possui em suas estruturas grupos ionizáveis em conjugação com regiões neutras e hidrofóbicas (figura 3.1). Desta forma a análise de flavonóides por eletroforese capilar pode ser realizada através de eletroforese capilar em zona (CZE), assim como por cromatografia micelar eletrocínica (MEKC).

	Nome		R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
1	Galangina	a	OH	H	H	H	OH
2	Kaempferol	a	OH	H	OH	H	OH
3	Quercetina	a	OH	OH	OH	H	OH
4	Myricetina	a	OH	OH	OH	OH	OH
5	Isorhamnetina	a	OH	OCH ₃	OH	H	OH
6	Chrysina	a	H	H	H	H	OH
7	Apigenina	a	H	H	OH	H	OH
8	Luteolina	a	H	OH	OH	H	OH
9	Naringenina	b	-	-	-	-	-
10	Astragalina	a	O-glu	H	OH	H	OH
11	Nicotiflorin	a	O-rut	H	OH	H	OH
12	Quercitrina	a	O-rha	OH	OH	H	OH
13	Isoquercitrina	a	O-glu	OH	OH	H	OH
14	Rutina	a	O-rut	OH	OH	H	OH
15	Isorhamnetina-3-O-glucoside	a	O-glu	OCH ₃	OH	H	OH
16	Isorhamnetina-3-O-rutinoside	a	O-rut	OCH ₃	OH	H	OH
17	Apigenina-7-O-glucoside	a	H	H	OH	H	O-glu
18	Luteolina-7-O-glucoside	a	H	OH	OH	H	O-glu

Figura 3.1 – Estrutura dos flavonóide em estudo

Em eletrólitos com pH alto a dissociação de grupos OH fenólicos ($pK_a \approx 9$) faz com que as moléculas estejam na forma aniônica podendo-se explorar

as diferenças de mobilidade como fator responsável pela separação. A adição de um tensoativo micelizado tal como SDS, assim como outros aditivos a eletrólitos com pH básico, constitui uma estratégia para se melhorar a seletividade. Entretanto se o enfoque do estudo é a interação entre as micelas de SDS e as moléculas do analito, deve-se optar por eletrólitos com pH ácido. Em uma condição em que se tem um tensoativo micelizado em pH ácido tem-se a cromatografia micelar eletrocinética em fluxo eletrosmótico reduzido (RF-Mekc). Nesta condição os flavonóides se apresentam na forma neutra e a migração é conduzida somente pela interação destes com as micelas carregadas negativamente de SDS. Em RF-Mekc não se tem uma janela definida de migração, além disso, a migração segue uma ordem inversa com relação a Mekc, ou seja, moléculas que interagem mais fortemente com as micelas possuem um tempo de migração menor (figura 3.2).

Figura 3.2 – (a) Representação esquemática do mecanismo de separação em RF-Mekc. (b) representação do eletroferograma obtido em RF-Mekc.

A equação do tempo de migração em RF-Mekc é deduzida segundo a teoria básica de cromatografia:

$$t_R = t_{MC} + t_{aq} \quad (\text{Equação 3.1})$$

onde t_{aq} é o tempo em que o analito permanece na fase aquosa (imóvel) e t_{MC} é o tempo do marcador de micela. Segue que:

$$t_R = t_{MC} + t_{MC} * \frac{t_{aq}}{t_{MC}} = t_{MC} + t_{MC} * \frac{n_{aq}}{n_{MC}} \quad (\text{Equação 3.2})$$

onde (n_{aq}/n_{MC}) é o fator de retenção, definido da mesma forma que em cromatografia de eluição. Desta forma tem-se que o fator de retenção pode ser descrito como:

$$k = \frac{(t_R - t_{MC})}{t_{MC}} \quad (\text{Equação 3.3})$$

ou seja, um composto que é totalmente particionado na micela, o marcador de micela, serve para os mesmos propósitos do marcador de volume morto em cromatografia de eluição.

As similaridades e diferenças entre Mekc e RF-Mekc, fundamentos e aplicações representativas têm sido descritas na literatura^{1,2,3}. Um exemplo recente de uma separação de flavonóides por RF-Mekc foi publicada por Gotti e colaboradores⁴. O modo de separação foi escolhido em função da instabilidade dos analitos (no caso catequinas) em meio básico. Variações do pH do eletrólito e da concentração de SDS não se mostraram suficientes para se alcançar a seletividade desejada, desta forma, foram utilizados sistemas compostos de micelas mistas de SDS/sais de bile e ciclodextrinas.

A migração (e conseqüentemente a seletividade) em Mekc e RF-Mekc podem ser manipuladas pela escolha adequada do tipo de tensoativo ou misturas deles, bem como através de outros aditivos orgânicos como ciclodextrinas, uréia e solventes orgânicos³. Solventes orgânicos normalmente influenciam no fluxo eletrosmótico¹³, bem como nas estruturas das micelas^{5,6,7,8}. Adicionalmente a interação soluto/micela pode ser modulada pela presença de solventes^{9,10}, a qual depende da estrutura do soluto e das propriedades do solvente.

O conhecimento acumulado ao longo de décadas a respeito dos efeitos de solventes orgânicos sobre a reorganização de fases aquosas, solubilização, estruturas micelares, e interação micela-soluto, tem estimulado o uso de solventes orgânicos para propósito de otimização em separações por eletroforese capilar. A otimização de separação de flavonóides usando solventes orgânicos tem sido efetuada utilizando o modo univariado ("one-variable-at-a-time"). A separação de 12 aldeídos fenólicos foi otimizada por Rodriguez-Delgado e colaboradores usando Mekc em uma variedade de eletrólitos contendo SDS (HEPES, borato e CHES)¹¹. A influência da concentração e pH do eletrólito, concentração de SDS e voltagem aplicada foram os parâmetros estudados, além do efeito da adição de solventes (metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, 1-butanol, acetona e acetonitrila) na seletividade.

Neste trabalho é abordada o estudo e otimização da separação de 18 flavonóides utilizando-se eletrólitos aditivados com solventes orgânicos de acordo com um planejamento estatístico de misturas, usando os solventes clássicos de cromatografia líquida em fase reversa de acordo com o triângulo

de seletividade de Snyder¹². As separações são discutidas em função da estrutura das moléculas, da interação destas com micelas de SDS e das possíveis modificações causadas pela adição dos solventes.

3.2 Objetivos

- Estudo e otimização da separação de 18 flavonóides (figura 1) por RF-MEKC em função da natureza do solvente orgânico utilizado como aditivo
- Análise qualitativa dos flavonóides majoritários presentes nas folhas de *Azadirachta indica*.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Equipamento e condicionamento do capilar

Os experimentos foram conduzidos em um equipamento (HP^{3D}CE, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA), equipado com um detector de arranjo de diodos, controle de temperatura mantido a 20°C, e software para controle e tratamento de dados fornecido pelo fabricante do equipamento (HP Chemstation). Foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies) com comprimento total de 48,5 cm (comprimento até a janela de detecção 40 cm), sendo os diâmetros externo e interno iguais a 375 µm e 75 µm respectivamente.

No início de cada dia o capilar foi condicionado com metanol por 15 minutos (980 mbar), seguido por 15 minutos de água deionizada, solução de ácido fosfórico 0,1 mmol/L por mais 15 minutos, e finalmente com o eletrólito de

corrida por mais 15 minutos. Entre cada corrida o capilar foi recondicionado passando-se o próprio eletrólito de corrida por 2 minutos a 980 mbar. No final de cada dia o capilar foi lavado com água deionizada por 15 minutos , seguido por metanol por 15 minutos e novamente com água deionizada por mais 15 minutos.

3.3.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, sendo a água deionizada (Milli-Q system, Millipore, Bedford, MA, USA), e os solventes grau HPLC. Os padrões dos flavonóides galangina (1) e crisina foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Os padrões de kaempferol (2), quercetina (3), miricetina (4), apigenina (7), luteolina (8), naringenina (9) e rutina foram obtidos da Sigma (St Louis, MO, USA). Isorhamnetina (5), isoquercitrina (13), isorhamnetina-3-O-glucosideo (15), isorhamnetina-3-O-rutinosideo (16), apigenina-7-O-glucosideo (17) e luteolina-7-O-glucosideo (18) foram fornecidos pela Extrasynthese (Genay, France). Padrões de astragalin (10), nicotiflorin (11) e quercitrina (12) foram adquiridos junto a Chromadex (Santa Ana, CA, USA).

Soluções estoque foram preparadas em etanol na concentração de 1000 µg/mL e armazenadas em temperatura abaixo de 0°C até o uso. Soluções aquosas desses padrões foram preparadas na concentração de 40 µg/mL contendo 5 % de etanol v/v e 30 mmol/L de SDS.

3.3.3 Preparo da amostra

As folhas de Neem (*Azadirachta indica*) cultivadas no Brasil foram adquiridas junto ao Projeto Neem Brasil (Silvânia, GO, Brasil).

Os extratos foram preparados submetendo-se uma mistura contendo 20 ml de solução etanólica (20% v/v) e 4 g de planta triturada a agitação (11000 rpm) por 3 minutos, com repouso de 10 minutos. Este ciclo de agitação/repouso foi repetido por 2 vezes. O extrato resultante foi filtrado em membrana de 0,45 μ m e diluído conforme a necessidade, sempre resultando numa concentração final de 5% de etanol e 30 mM de SDS.

3.3.4 Condições analíticas

As soluções de padrões e amostras foram injetadas no modo hidrodinâmico a 30 mbar de pressão por 3 segundos, sendo os cromatogramas monitorados a 255 nm. O sistema de eletroforese foi operado sob voltagem constante de -22 KV.

As separações estudadas foram conduzidas em eletrólitos contendo 20 mmol/L de tampão fosfato pH 2,5 e 50 mmol/L de SDS, sendo adicionado uma quantidade constante de 20% de solvente orgânico (v/v). Dentro da concentração fixa de 20% de solvente orgânico, foram efetuadas corridas com solventes puros (metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano), com misturas binárias de igual proporção (10%+10%), ternárias com igual proporção (6,66%+6,66%+6,66%), e ternárias com preponderância de um dos solventes (16,66%+3,33%+3,33%), de acordo com um planejamento de misturas simplex centróide ampliado.

O eletrólito otimizado é composto por 50 mmol/L de SDS, 20 mmol/L de tampão fosfato pH 2,5 e uma mistura binária de 5% de tetrahidrofurano (THF) v/v e 15% de acetonitrila (ACN) v/v.

3.4 Resultados e discussão

Neste trabalho eletrólitos de composição fixa (50 mmol/L de SDS em 20 mmol/L de tampão fosfato a pH 2,5) foram aditivados por uma quantidade fixa de 20% de solvente, sendo os solventes metanol, acetonitrila e tetrahidrofurano. Além dos eletrólitos contendo os solventes puros foram também estudados eletrólitos modificados pela adição de misturas binárias e ternárias destes solventes. Algumas propriedades dos solventes utilizados, relevantes para este trabalho, são apresentadas na tabela 3.1

Tabela 1 - Propriedades dos solventes utilizados neste trabalho

Solvente	$\Sigma\alpha_2^H$	$\Sigma\beta_2^H$	ϵ
MeOH	0,43	0,435	32,70
ACN	0,07	0,319	35,95
THF	0,00	0,481	7,58

$\Sigma\alpha_2^H$: média da acidez promovida por pontes de hidrogênio; $\Sigma\beta_2^H$: média da basicidade promovida por pontes de hidrogênio¹⁴; ϵ : constante dielétrica¹³

O metanol é um solvente prótico que participa em pontes de hidrogênio como aceptor ou doador de prótons, exibindo altos valores de acidez por pontes de hidrogênio ($\Sigma\alpha_2^H$) e basicidade por pontes de hidrogênio ($\Sigma\beta_2^H$)¹⁴, assim como uma constante dielétrica moderavelmente alta (ϵ). Acetonitrila e THF são ambos solventes polares apróticos com valores altos de $\Sigma\beta_2^H$, e

valores de $\Sigma\alpha_2^H$ iguais ou próximo de zero, diferindo enormemente no valor da constante dielétrica¹³.

Na figura 3.2 são apresentados os eletroferogramas obtidos em cada uma das condições estudadas. Através desses eletroferogramas é possível observar que existe uma grande variação na seletividade dos sistemas conforme o solvente ou mistura deles que se utiliza como modificador.

Os modelos de “Relação Linear de Energia de Solvatação” (do inglês LSER), tem sido extensivamente utilizados no estudo de mecanismos de separação em MECK^{15,16,17,18,19,20}, assim como em outras técnicas de separação. Em geral esses modelos tem mostrado que moléculas grandes apolares tendem a se incorporar na fase micelar em detrimento da fase prótica aquosa de alta constante dielétrica. De fato para compostos neutros a basicidade por pontes de hidrogênio do soluto e o trabalho de cavitação são reconhecidamente os fatores dominantes que descrevem a distribuição de solutos em soluções micelares aquosas de SDS^{15,16,19,21}. Entretanto o que acontece com os flavonóides é algo um pouco diferente do que o esperado para molécula grandes e apolares. Desta forma antes de tentar estabelecer uma relação entre migração em RF-Meck e estrutura do analito (flavonóide) ou examinar o efeito de solventes ao meio micelar, é interessante descrever a natureza esperada da interação entre as moléculas de flavonóides e micelas de SDS.

Hasan e colaboradores²² estudaram a interação de quatro flavonóides com estruturas particulares com SDS através de espectroscopia de absorção em função da concentração de SDS, acima e abaixo da concentração micelar crítica (CMC). O espectro de UV dos flavonóides exibem duas bandas de maior

Figura 3.2 – Otimização da composição do eletrólito. Eletrólitos compostos por 50 mmol/L de SDS, tampão fosfato 20 mmol/L em pH 2,5 e quantidade especificada de solvente. (A) misturas unitárias e binárias de solventes: (a) 20% MeOH; (b) 20% THF; (c) 20% ACN; (d) 10% MeOH/10% ACN; (e) 10% MeOH/10% THF; (f) 10% THF/10% ACN. Condições experimentais (vide seção experimental). Picos rotulados conforme figura 3.1; (*) antraceno. Mistura de flavonóide a 40 µg/mL

Figura 3.2 (continuação) – Otimização da composição do eletrólito. Eletrólitos compostos por 50 mmol/L de SDS, tampão fosfato 20 mmol/L em pH 2,5 e quantidade especificada de solvente. (B) misturas ternárias de solventes: (g) 6,66% MeOH/6,66%ACN/6,66%THF; (h) 13,33%MeOH/3,33%ACN/3,33%THF; (i) 13,33%THF/3,33%ACN/3,33%MeOH; (j) 13,33%ACN/3,33%THF/3,33%. Condições experimentais (vide seção experimental). Picos identificados conforme figura 3.1; (*) antraceno. Mistura de flavonóides a 40 µg/mL

absorção na região de 240 nm a 400 nm, sendo a banda I (300 nm a 380 nm) associada com a absorção do sistema cinamoil (lado direito da molécula que inclui o anel B quando dividido por um plano que passa pelo átomo de oxigênio do anel C, figura 3.1), e a banda II (240 nm a 280 nm) associada a absorção promovida pelo sistema benzoil (lado esquerdo da molécula que inclui o anel A, figura 3.1). Deslocamentos batocrômicos da banda I e II ocorrem com o aumento da grau de hidroxilação dos anéis A e B (fig. 1), e deslocamentos hipsocrômicos especialmente da banda I ocorrem com a metilação ou glicosilação da posição 3-OH do anel C (fig. 1) e posição 5-OH do anel A²³.

Baseado numa série de medidas dos deslocamentos batocrômicos e hipsocrômicos em água e metanol Hasan e colaboradores propuseram a formação de um complexo entre os grupos hidroxil do flavonóide e a cabeça polar da molécula de surfactante através de uma ligação de hidrogênio. O sitio da interação foi atribuído aos grupos hidroxil nas posições 7 do anel A (fig. 3.1) ou 4' do anel B (fig. 3.1). Através da ligação por um desses sítios, a “cabeça” polar do SDS facilita e estende a deslocalização eletrônica ao longo das duplas ligações conjugadas, aumentando a densidade eletrônica do oxigênio cetônico do anel C.

Os dados de Hasan sugerem que a interação entre flavonóides e micelas de SDS tem uma natureza fortemente eletrostática, desta forma é bastante razoável inferir que a solubilização dos flavonóides ocorre numa região interfacial da micela, e que a energia de cavitação neste microcompartimento é mais relevante do que no interior da micela propriamente dita.

Como uma forma de avaliar a contribuição da cavitação no mecanismo de retenção dos flavonóides avaliou-se como varia o fator de retenção (k) em função do volume característico de McGowan²⁴ (V_x). Na figura 3.3 é apresentado o gráfico de fator de retenção (k), calculado com base num marcador de micela (antraceno), em função do volume característico de McGowan.

Figura 3.3 – Valores de fator de retenção (k) em função do volume de McGowan – efeito da cavitação.

A partir da figura 3 pode-se distinguir 3 grupos de moléculas : agliconas (menores), glicosídeos contendo os açúcares ramnose e glicose (médias), e glicosídeos contendo o açúcar rutinose (maiores). Ao contrário do comportamento esperado para moléculas maiores, os glicosídeos contendo rutinose permanecem preferencialmente no meio externo às micelas (maiores valores de fator de retenção). Ainda da figura 3 pode-se perceber que a cavitação no eletrólito modificado com ACN é mais fácil relativamente a interface micelar, provavelmente devido ao efeito disruptor de cluster de água

que a ACN exerce²⁵. Para o eletrólito modificado com metanol a cavitação é bastante similar ao da interface micelar (menor coeficiente angular), o que é concordante com dados já apresentados na literatura utilizando-se sondas solvatocrômicas^{26,27}.

A discussão acima é bastante simplista, uma vez que considera o valor de V_x como o único fator a ser considerado no trabalho de cavitação. Na verdade o valor de V_x no presente estudo torna-se um descritor redundante, uma vez que as moléculas contendo o açúcar rutinose são as maiores, porém o aumento do tamanho com relação às outras moléculas é em grande parte devido à adição de hidroxilas, o que torna a molécula mais susceptível a interações específicas. Desta forma para se ter uma visão real do mecanismo de retenção dos flavonóides no modo RF-Meck modificado por solventes é necessário que se tenha conhecimento das contribuições das interações específicas e não-específicas, que fogem ao escopo atual do presente estudo.

Uma consideração importante é que a adição de certos aditivos orgânicos, como por exemplo álcoois de cadeia curta e outros aditivos como uréia, ao eletrólito causam um aumento da CMC e um decréscimo do número de agregação^{17,28}, porém essas variações se devem ao impacto desses aditivos nas propriedades do meio e não da incorporação à estrutura micelar. Mesmo ocorrendo possíveis modificações nas micelas (CMC e tamanho) tem-se a manutenção do número de “cabeças” polares por unidade de área uma vez que o tamanho da micela é controlado principalmente pela densidade de carga superficial²⁹. Considerando que as interações entre flavonóides e micelas são de origem predominantemente eletrostáticas, modificações na estrutura da micela não são prejudiciais a sua retenção. Consequentemente nas discussões

a seguir é assumido que existe a presença de micelas na presença de 20% de solvente orgânico, e que as possíveis modificações estruturais resultantes não são suficientes para modificar o mecanismo de interação entre micela e analito, e que as modificações nas migrações ocorrem simplesmente por uma modificação no ambiente externo às micelas. Uma outra consideração que torna-se relevante é que a interação entre os flavonóides e monômeros de SDS (presentes em crescentes concentrações quando se aumenta a quantidade de solvente no meio) é muito pequena quando comparada ao número de micelas, mesmo sabendo-se que a mobilidade efetiva dos flavonóides é uma somatória das mobilidades dos complexos e agregados ponderada pela maior ou menor predominância destes.

3.4.1 Efeito de solventes na migração eletroforética dos flavonóides

O comportamento eletroforético de vários flavonóides em diferentes modos de eletroforese capilar e suas relações estruturais tem sido descritos na literatura^{30,31,32,33,34}. Entretanto a influência na migração de flavonóides pela adição de solventes orgânicos ainda não foi sistematicamente estudada, embora muitos autores tenham utilizado os solventes para manipular a seletividade^{11,35,36}.

Tendo em vista que as separações estudadas neste trabalho foram conduzidas no modo RF-Meck, os compostos que possuem a maior interação com as micelas de SDS possuem tempos de migração menores. Como é de se esperar, em praticamente todas as condições tem-se as agliconas migrando mais rapidamente que os respectivos glicosídeos (figura 2). Além disso, dentro do grupo das agliconas a ordem de eluição segue o número de grupos hidroxila

no anel B (figura. 1), independentemente do tipo de solvente utilizado. Desta forma, os compostos mais hidrofóbicos da série, galangina (pico 1) e crisina (pico 6) que não possuem hidroxilas no anel B são as agliconas que eluem primeiro. Um grupo de flavonóides com uma hidroxila no anel B (kaempferol, isorhamnetina, e apigenina, picos 2,5 e7 respectivamente) eluem na sequência seguidos por quercetina e luteolina (picos 3 e 8, respectivamente) com duas hidroxilas. Miricetina (pico 4) com três hidroxilas no anel B e, conseqüentemente mais hidrofílico, elui por último.

Dentro dos compostos estudados tem-se dois subgrupos de flavonóides: os flavonóis (1, 2, 3, 4 e 5) que são caracterizados pela presença de uma hidroxila na posição 3 do anel C (fig. 1), e as flavonas (6,7,e 8) que não apresentam hidroxila nesta posição. Com relação a migração dos flavonóis e flavonas, os eletrólitos modificados com MeOH e ACN tem um comportamento similar (mesma ordem de migração), porém algumas diferenças podem ser pontuadas. Em metanol a seletividade é menor e os picos são mais largos, os picos mais hidrofóbicos 1 e 6 praticamente migram com o marcador de micela (antraceno), além disso a aglicona mais hidrofílica miricetina (pico 4) co-elui com o primeiro flavonóide glicosídeo a eluir. A baixa seletividade promovida pelo metanol é certamente uma consequência de suas propriedades (tabela 1), ou seja, a sua capacidade em atuar como aceitor e doador de prótons em pontes de hidrogênio (valores similares de $\Sigma\alpha_2^H$ e $\Sigma\beta_2^H$).

Dentro dos flavonóides estudados tem-se somente um composto que pertence ao subgrupo das flavanonas (fig. 1), sendo que neste composto a hidroxila da posição 7 é provavelmente o sítio de interação com as micelas de SDS, além disso a saturação da ligação entre os carbonos C2 e C3 nas

flavanonas prejudica a extensa conjugação entre os anéis B e C, e como resultado a hidroxila na posição 4 tem um caráter fenólico. Este caráter fenólico da hidroxila da posição 4 faz com que o par de elétrons neste oxigênio seja comparativamente mais disponível para a solvatação por um solvente com características de doador de prótons, e como consequência tem-se um retardamento na eluição deste composto em metanol quando comparado a ACN e THF (solventes com valores de $\Sigma\alpha_2^H$ igual ou próximo de zero).

Analisando os valores de fator de retenção para os eletrólitos modificados com solventes puros tem-se uma relação de 16,6 vezes quando se comparam os k' s da aglicona mais hidrofílica com a mais hidrofóbica para metanol ($k_{\text{galangina}}=0,014$; $k_{\text{miricetina}}=0,24$) comparado com 7,5 para ACN ($k_{\text{galangina}}=0,11$; $k_{\text{miricetina}}=0,82$). O maior valor de relação entre os valores de k para metanol do que para ACN indica que a solubilização dos compostos mais hidrofílicos, isto é, compostos com maior número de hidroxilas no anel B, é grandemente favorecida pela propriedade prótica do metanol. O mesmo comportamento foi observado para a série de glicosídeos, entretanto os valores de relação de k' s não são tão pronunciados devido a contribuições de grupos OH's dos açúcares (em MeOH: $k_{\text{quercitrina}}=0,25$, $k_{\text{rutina}}=0,046$, relação igual 1,9; em ACN: $k_{\text{quercitrina}}=0,95$, $k_{\text{rutina}}=0,1,67$, relação igual 1,8).

Nos eletrólitos modificados com THF observa-se a inversão da ordem de eluição com respeito a ACN: o pico 2 antecede o pico 7 e o pico 3 antecede o pico 8. Nos eletrólitos modificados com THF observa-se a ordem de eluição flavonol-flavona considerando o mesmo padrão de substituição do anel B. Tal padrão de eluição provavelmente deve-se principalmente a baixa constante dielétrica que fornece um ambiente competitivo para solubilização das flavonas

(mais hidrofóbicas) no ambiente exterior com relação ao ambiente micelar. Esta ordem de eluição também é válida para o par flavonol-flavona 1 e 6 (pico 1 antecede o pico 6), e apesar desta ordem ser mantida no eletrólito modificado com ACN, a resolução entre este par de picos é bastante aumentada no eletrólito com THF.

O comportamento da retenção dos flavonóides sob investigação em solventes contendo THF, ACN, e suas misturas pode ser visualizado na figura 4.

Figura 3.4 – Fator de retenção em função da % de ACN em eletrólitos compostos originalmente por 20% de THF.

Neste gráfico pode-se perceber que a retenção dos compostos nas micelas com relação ao marcador antraceno é diminuída (maiores valores de k) conforme aumenta-se a proporção de ACN no eletrólito originalmente composto somente por THF, ou seja, os compostos são mais bem solubilizados no ambiente externo às micelas quando tem-se mais ACN no eletrólito. Este fenômeno é mais pronunciado para flavonóis com um número maior de hidroxilas no anel B, sendo miricetina o flavonóide mais susceptível a este fenômeno.

Um outro fato a ser considerado é o efeito da metilação de hidroxilas do anel B. Quando se comparam os composto 2 (kaempferol), 3 (quercetina), e 5 (isorhamnetina) pode-se perceber que estes diferem apenas no substituinte na posição 3' (figura 3.1). Isorhamnetina (3' = OCH₃) é mais polar que kaempferol (3' = H) e ambos são muito menos polares que quercetina (3' = OH), sendo a ordem de eluição em todos os eletrólitos mantida conforme o grau de polaridade. O que observa-se é que em eletrólitos contendo somente ACN ocorre a co-eluição de kaempferol e isorhamnetina, sendo a separação destes aumentada conforme aumenta-se a proporção de THF (dentro dos 20% fixos de solvente), culminando numa separação completa em eletrólito contendo somente THF (solvente com menor constante dielétrica). O mesmo comportamento é observado quando se analisa as estruturas contendo como substituinte na posição 3 a glicose nestas mesmas agliconas (compostos 13,15 e 10), assim como quando o substituinte é o açúcar rutinose (compostos 14,16 e 11).

Quando considera-se a separação dos glicosídeos em eletrólitos contendo somente solventes puros tem-se no composto 14 (rutina), com duas

hidroxilas no anel B e um dissacarídeo (rutinose) na posição 3, o mais hidrofílico dos flavonóides em estudo (fig. 2); os compostos 11 e 16 somente são separados no eletrólito contendo THF, e os compostos 13 e 18 co-eluem em todos os eletrólitos (compostos por solventes puros). É possível examinar com maiores detalhes o efeito dos solventes nos compostos glicosilados quando se comparam valores de relação de fatores de retenção (k_R). Na tabela 2 tem-se a relação de k do glicosídeo pelo k da aglicona correspondente para eletrólitos contendo solventes puros.

k_R^1	MeOH ²	ACN ²	THF ²
glicosídeos de kaempferol			
k_{10}/k_2	4,1	3,5	6,2
K_{11}/k_2	4,7	4,2	8,0
glicosídeos de quercetina			
k_{12}/k_3	2,2	2,0	3,0
k_{13}/k_3	3,4	2,9	4,4
k_{14}/k_3	4,1	3,5	5,8
Glicosídeos de isorhamnetin			
K_{15}/k_5	5,2	3,6	5,2
k_{16}/k_5	5,9	4,2	6,6
Glicosídeos de apigenina			
K_{17}/k_7	6,3	3,8	4,4
Glicosídeos de luteolina			
K_{18}/k_8	4,9	3,4	3,7

1 – Valores de relação entre fatores de retenção. 2 – igual a 20% v/v em eletrólitos de composição fixa (50 mmol/L de SDS e 20mmol/L de tampão fosfato pH 2,5).

Os valores de relação de k (k_R) podem ser consideradas uma medida da eficácia do solvente em discriminar o par de solutos aglicona e seu respectivo glicosídeo. Obviamente todos os solventes são capazes de discriminar os

pares aglicona/glicosídeo (todos os valores de relação são maiores que 1), entretanto quanto maior o valor de k_R mais efetivo é o solvente nessa discriminação. Os valores de k_R são sempre maiores e menores em eletrólitos contendo THF e ACN respectivamente, independentemente do número de hidroxilas no anel B e do tipo de açúcar ligado a posição 3 do esqueleto. Se o grupo hidroxila da posição 3' do anel B é metilado os valores de k_R para THF se aproximam dos valores de k_R para metanol. Quando a glicosilação ocorre na posição 7 (anel A) os valores de k_R são maiores em metanol seguido por THF e ACN. Acetonitrila é o aditivo menos efetivo na separação de qualquer par aglicona/glicosídeo, enquanto THF é o solvente que melhor discrimina os pares aglicona/glicosídeo de kaempferol, quercetina e isorhamnetin.

Para o mesmo tipo de açúcar os valores de k_R são maiores para kaempferol (1 OH no anel B) do que para quercetina (2 OH's no anel B). A ponte de hidrogênio intramolecular entre os dois grupos OH no anel B na quercetina pode dificultar a interação da micela de SDS com o OH da posição 4'. Para diferentes tipos de açúcar (por exemplo glicosídeos de quercetina) os valores de k_R em eletrólitos com THF segue a ordem rutinose > glicose > ramnose. É possível que a condição de planaridade do anel B em relação ao anel C seja afetada quando um dissacarídeo (rutinose) está ligado ao esqueleto da aglicona (posição 3 do anel B), prejudicando a interação com a micela via OH da posição 4'. Quando o OH da posição 4' é metilada (isorhamnetina e seus glicosídeos) o anel B torna-se mais hidrofóbico e a interação do flavonóide com as cabeças polares do SDS via posição 4' torna-se um tanto quanto dificultada, o que piora a eficácia dos eletrólitos com THF enquanto a eficácia dos eletrólitos com MeOH é melhorada. Quando a

glicosilação é na posição 7, um dos sítios de interação com o SDS é perdido e a população de moléculas que interagem através deste ponto é forçada para a solução, sendo neste caso o eletrólito aditivado com MeOH mais efetivo do que o eletrólito com THF na distinção entre o par aglicona/glicosídeo.

3.4.2 Otimização

Para efeito de otimização de separação recorreu-se a uma inspeção dos eletroferogramas da figura 3.2, buscando-se por condições onde houvessem mudanças de pares críticos. Eletrólitos com proporções maiores de MeOH (fig. 3.2Aa) são ineficientes para promover uma boa separação (existem vários analitos co-eluído). Através do decréscimo da quantidade de MeOH e aumento da quantidade de ACN (figuras 3.2Aa, 3.2Ad e 3.2Ac) ocorre um aumento da resolução do par 1/6, assim como do pico 7 em relação ao par co-eluído 2/5. Além disso as agliconas 4 e 9 separam-se do bloco dos glicosídeos, há um aumento na seletividade para os picos 10, 12, 15 e 17, mas os pares 11/16 e 13/18 permanecem co-eluídos. É interessante notar que em eletrólitos contendo 50% de ACN e 50% de MeOH tem-se a separação dos solutos 13 e 18. Uma possível explicação para este fato é que o metanol é um solvente altamente estruturado e não solvata muito bem as moléculas a não ser que sua estrutura seja parcialmente rompida, o que acontece quando uma certa quantidade de ACN é adicionada. Por outro lado a adição de ACN pura não solvata suficientemente e seletivamente estes glicosídeos (par 13/18) devido a sua fraca capacidade de atuar como doadora de prótons em ligações de hidrogênio. Através do decréscimo da quantidade de metanol e aumento da quantidade de THF nos eletrólitos (figuras 3.2Aa, 3.2Ab e 3.2Ae) tem-se o

favorecimento da separação do par 1/6 porém a separação dos analitos 2,5 e 7 é severamente comprometida; ocorre a inversão dos solutos 3 e 8; o soluto 16 move-se em direção ao soluto 14 separando-se do soluto 11; ocorre um aumento na seletividade para os solutos 12, 10, 17 e 15; o par crítico 13/18 é mantido. A separação dos flavonóides sob investigação é passível de ser alcançada em eletrólitos compostos por misturas de THF e ACN simplesmente devido ao fato de que ocorrem trocas de pares críticos. Pela diminuição da quantidade de THF e aumento da quantidade de ACN (figuras 3.2Ab, 3.2Af e 3.2Ac) o pico do soluto 2 move-se em direção ao par 7/5, tem-se a troca de ordem dos picos 3/8, 17/10 e 18/13, além de uma grande variação de seletividade com relação aos solutos 18, 11, 13 e 16. Na condição da figura 3.2Af, composta de eletrólito com iguais quantidades de ACN e THF, tem-se a separação de quase todos os picos (comprometido em alguma extensão). Se a quantidade de ACN é aumentada tem-se a resolução dos pares 3/8 assim como torna-se possível a separação do par 13/16. A separação dos solutos 2, 7 e 5 sempre é comprometida em alguma extensão. Na figura 3.5 tem-se a separação dos flavonóides numa condição intermediária entre as condições das figuras 3.2Ac e 3.2Af, isto é, num eletrólito composto por 15% de ACN e 5% de THF. Nesta condição tem-se a resolução de 15 compostos em linha de base em menos de 12 minutos e o composto 5 é parcialmente separado do par 7/2. Uma observação importante é que na condição otimizada da figura 3.5 tem-se uma grande semelhança de comportamento com relação as misturas

Figura 3.5 – Condição otimizada para os flavonóides em estudo. Eletrólito composto por 50 mmol/L de SDS em 20 mmol/L de tampão fosfato pH 2,5 contendo 5% de THF e 15% de ACN (v/v).

ternárias de solventes (figura 3.2B), entretanto quando se tem metanol presente ocorre uma perda de eficiência, e conseqüentemente a resolução de alguns pares de picos é comprometida, especialmente na figura 3.2Bg onde tem-se uma mistura ternária com iguais quantidades dos três solventes.

Injeções repetidas da mistura de padrões na condição da figura 3.5 forneceu valores de CV melhores que 2,2% para tempo de migração (1,5% CV para fator de retenção) e 3% de CV para área (n=5). O valor de precisão entre dias resultou em valores melhores que 2,2% para CV de tempo de migração (2,3% CV para fator de retenção) e 3,8% de CV para área (dois dias, triplicata de injeção).

Na figura 3.6 é apresentado um eletroferograma obtido através da aplicação das condições otimizadas num extrato hidroalcoólico de folhas de Neem. Através deste eletroferograma pode-se identificar os flavonóides majoritários presentes nas folhas de Neem por tempo de eluição e espectro de UV. Além de se identificar os mesmos flavonóide identificados no capítulo anterior pode-se verificar a presença de outros compostos com espectros característicos de flavonóides. Levando-se em consideração o comportamento de eluição dos flavonóide estudados em função da estrutura pode-se inferir que os flavonóide que eluem depois da rutina (pico número 14) podem ser glicosídeos de miricetina, uma vez que a literatura reporta a presença destes nas folhas de Neem.

Figura 3.6 – Eletroferograma do extrato hidroalcoólico de Neem obtido nas condições otimizadas como na figura 3.5. (*antraceno; f: picos com espectro característicos de flavonóides.)

3.5 Conclusões

Uma vez que sejam conhecidas os fatores predominantes que governam a interação dos solutos com as micelas é possível selecionar quais propriedades do meio influenciam tais interações e conseqüentemente selecionar modificadores de eletrólitos mais adequados. Este trabalho explora com sucesso as diferenças de acidez e basicidade por pontes de hidrogênio e constante dielétrica dos solventes utilizados como modificadores orgânicos (MeOH, ACN e THF) na obtenção da separação de flavonóide por RF-Mekc. As interações entre micelas de SDS e flavonóides são de caráter eletrostático. Eletrólitos modificados com MeOH resultam em separações com seletividades menores tanto para agliconas quanto para glicosídeos. Isso deve-se provavelmente pela sua moderavelmente alta constante dielétrica e pela sua capacidade de atuar como aceptor e doador de prótons em interações por ponte de hidrogênio, que faz com ele solvate razoavelmente bem todos os solutos sem discriminá-los. Os eletrólitos modificados com ACN e THF mostraram-se mais eficientes na separação dos flavonóides em estudo. Ambos os solventes são apróticos com valores altos de basicidade por pontes de hidrogênio. Uma vez que esses solventes diferem grandemente no valor de constante dielétrica, a melhor separação provavelmente foi obtida através do ajuste fino da constante dielétrica do meio, através da alteração da relação de proporções de ACN e THF no eletrólito de corrida.

Assim como no capítulo anterior os flavonóides majoritários presente nas folhas de Neem puderam ser identificados com base no tempo de eluição e do espectro de UV. A identificação desses flavonóides por dois mecanismos de separação diferentes (RF-Mekc e HPLC de fase reversa) e por informação

espectral (absorção no UV) fazem com que a identificação dos flavonóides seja praticamente inequívoca.

3.6 Referências bibliográficas

1. Janini, G. M., Issaq, H. J., Muschik, G. M., J. Chromatogr. A, 792 (1997) 125.
2. Quirino, J., Terabe, S., J.Chromatogr. A, 856 (1999) 465.
3. Jandera, P., Fischer, J., Jebavá, J., Effenberger, H., J. Chromatogr.A, 914 (2001) 233.
4. Gotti, R., Fiori, J., Mancini, F., Cavrini, V., Electrophoresis, 25 (2004) 3282.
5. Zana, R., Adv. Colloid Interface Sci, 57 (1995) 1.
6. Verrall, R. E., Chem. Soc. Rev, 24.(1995) 135.
7. Bakshi, M. S., Bull. Chem. Soc. Jpn, 69 (1996) 2723.
8. Bel'skii, V. E., Russ. Chem. Bull., 48 (1999) 864.
9. Sandra, P., Vercammen, J., J. High Resolut. Chromatogr., 21 (1998) 605.
10. Liu, Z., Zou, H., Ye, M., Ni, J., Zhang, Y., Electrophoresis, 20 (1999) 2898.
11. Rodríguez-Delgado, M. A., Pérez, M. L., Corbella, R., González, G., García-Montelongo, F. J., J. Chromatogr. A, 871 (2000) 427
12. Snyder, L. R., J. Chromatogr. Sci., 16 (1978) 223.
13. Sarmini, K., Kenndler, E., J. Chromatogr. A, 792 (1997) 3.
14. Abraham, M. H., J. Phys. Org. Chem., 6 (1993) 660.
15. Yang, S., Khaledi, M. G., Anal. Chem., 67 (1995) 499.
16. Muijselaar, P. G., Claessens, H. A., Cramers, C. A., Anal. Chem., 69 (1997) 1184.
17. Poole, C. F., Poole, S. K., J. Chromatogr. A, 792 (1997) 89.
18. Khaledi, M. G., Bumgarner, J. G., Hadjmohammadi, M., J. Chromatogr. A, 802 (1998) 35.
19. Liu, Z., Zou, H., Ye, M., Ni, J., Zhang, Y., J. Chromatogr. A, 863 (1999) 69.
20. Fuguet, E., Ràfols, C., Bosch, E., Abraham, M. H., Rosés, M., J. Chromatogr. A, 942(2002) 237.
21. Quina, F. H., Alonso, E. O., Farah, J. P. S., J. Phys. Chem., 99 (1995) 11708.
22. Naseem, B., Sabri, A., Hasan, A., Sakhawat Shah, S., Colloids Surf B., 35 (2004) 7
23. Mabry, T. J., Markham, K. R., Thomas, M. B., The Systematic Identification of Flavonoids, Springer-Verlag, Berlin 1970.

24. Abraham, M. H., McGowan, J. C., *Chromatographia*, 23 (1987) 243.
25. Wakisaka, A., Takahashi, S., Nishi, N., *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, 91 (1995) 4063.
26. Zachariasse, K. A., Phuc, N. V., Kozankiewicz, B., *J. Phys. Chem.*, 85 (1981) 2676.
27. Reichardt, C., *Chem. Rev*, 94 (1994) 2319.
28. Treiner, C., *J. Colloid Interface Sc.*, 90 (1982) 444.
29. Almgren, M., Swarup, S., *J. Phys. Chem.*, 86 (1982) 4212.
30. Tomás-Barberán, F. A., *Phytochem. Anal.* , 6 (1995) 177
31. Suntornsuk, L., *J. Pharm. Biom. Anal.*, 27 (2002) 679.
32. Molnár-Perl, I., Füzfai, Zs., *J. Chromatogr. A*, 1073 (2005) 201.
33. Morin, Ph., Villard, F., Dreux, M., André, P., *J. Chromatogr. A*, 628 (1993) 161.
34. Wang, S. F., Zhang, J. Y., Chen, X. G., Hu, Z. D., *Chromatographia*, 59 (2004) 507.
35. Liang, H.-R., Sirén, H., Riekkola, M.-L., Vuorela, P., Hiltunen, R., *J. Chromatogr. A*, 746 (1996) 123.
36. Wang, S.-P., Huang, K.-J., *J. Chromatogr. A*, 1032 (2004) 273.

CAPÍTULO 4

ANÁLISE DE AGLICONAS

4.1 Introdução

Os flavonóides são polifenóis encontrados abundantemente em plantas na forma de glicosídeos. As inúmeras combinações de açúcares com estruturas básicas de flavonóides dão origem a uma grande quantidade de possíveis estruturas, o que dificulta a sua determinação. A indisponibilidade de padrões comerciais de um grande número de estruturas faz com que a quantificação seja mais comumente executada após submeter a amostra à hidrólise, transformando as formas glicosiladas em agliconas¹. A transformação dos glicosídeos em agliconas reduz o número de possíveis estruturas, uma vez que todos os glicosídeos de uma determinada aglicona acabam se transformando nesta aglicona. Apesar da espécie determinada não ser exatamente a que está presente na planta ou extrato, o procedimento de determinação de agliconas é bastante aceito para fins de comparação entre espécies vegetais e no controle de qualidade de alimentos e produtos derivados de plantas.

Normalmente a reação de hidrólise efetuada para transformar os flavonóides glicosilados em agliconas é do tipo ácida, requerendo concentrações relativamente altas de ácidos minerais (1 a 2 mol.L⁻¹) sob condições de refluxo^{2,3}. A escolha da condição de hidrólise é um fator crítico quando a obtenção de dados quantitativos se faz necessário. As condições de temperatura, concentração de ácido e tempo de reação para a hidrólise de uma determinada estrutura muitas vezes podem causar a degradação de outras estruturas, ou mesmo não ser suficiente para que ocorra a hidrólise de uma forma quantitativa², necessitando-se de um estudo criterioso das

condições da reação de hidrólise para que os resultados reflitam realmente a concentração dos flavonóides de uma amostra.

Neste capítulo é abordado o desenvolvimento de uma metodologia de separação por HPLC de oito estruturas de agliconas mais comumente encontradas em plantas (miricetina, quercetina, luteolina, apigenina, isorhamnetina, kaempferol, crisina e galangina), assim como, a otimização das condições de hidrólise para a obtenção de dados quantitativos de flavonóides agliconas presentes nas folhas de *Azadirachta indica*.

4.2 Objetivos

- Desenvolvimento de metodologia de análise de flavonóides agliconas (miricetina, luteolina, quercetina, apigenina, isorhamnetina, kaempfeol, crisina e galangina) por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Otimização das condições de hidrólise de extratos de Neem para quantificação de agliconas.

4.3 Parte experimental

4.3.1 Equipamentos e softwares

Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com bomba quaternária LC 10Avp, sistema controlador SCL 10Avp, e detector de arranjo de diodos SPD-M10vp. O injetor utilizado foi do tipo automático Waters 717 Plus e o software de aquisição e tratamento de dados foi o Class vp 5.02 fornecido juntamente com o cromatógrafo Shimadzu. As análises estatísticas dos planejamentos de experimentos foram efetuadas com o software Design-Expert versão 6.06 (State Ease, Inc).

Foi utilizada uma coluna do tipo C18 com grupos polares embutidos Synergi Fusion (Phenomenex). As partículas da coluna utilizada são de diâmetro igual a 4 μ m sendo o suporte de sílica. As dimensões da coluna são de 15 cm de comprimento por 0,46 cm de diâmetro interno.

4.3.2 Reagentes e soluções

Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico, os solventes grau HPLC da marca Tedia e a água deionizada através de sistema Milli-Q. Os padrões de galangina (1) e crisina (6) foram adquiridos da Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Os padrões de kaempferol (2), quercetina (3), miricetina (4), apigenina (7) e luteolina (8) da Sigma (St. Louis, MO, USA). Isoramenitina foi adquirida junto a Extrasynthèse (Genay, France). As soluções dos padrões foram preparadas em etanol em concentrações de 1000 μ g/mL e estocadas abaixo de 0°C até o uso. Soluções aquosas contendo aproximadamente 50% de etanol em água foram preparadas na concentração apropriada para injeção em cada caso.

4.3.3 *Preparação das amostras*

O extrato de Neem utilizado na otimização das condições de hidrólise foi preparado numa relação de planta/solvente extrator de 1:10 (m/m). O solvente extrator utilizado foi uma mistura de etanol, água e propilenoglicol em iguais proporções (v/v). As folhas trituradas de Neem (*Azadirachta Indica*) cultivadas no Brasil foram adquiridas junto ao Projeto Neem Brasil (Silvânia, GO, Brasil), e de acordo com o fornecedor foram obtidas de plantas com idade entre 2 e 6 anos, sendo secas a temperatura ambiente à sombra. O extrato foi preparado por agitação mecânica por cerca de 6 horas, filtrado e reservado para análise ou reação de hidrólise.

As reações de hidrólise foram efetuadas em frascos âmbar de 4 mL munidos de tampa e sistema de vedação. O sistema de agitação utilizado foi do tipo magnético com barras de agitação com cerca de 0,5 cm. Utilizou-se como sistema de aquecimento uma chapa elétrica e cuba de vidro preenchida com óleo de silicone, sendo a temperatura controlada por termômetro de mercúrio com precisão de $\pm 0,5$. Os volumes de reagentes e amostra utilizados na reação foram de 0,5 mL de extrato, 1mL de veículo extrator, 0,5 mL de solução de ácido ascórbico em água, 0,5 mL de etanol e 0,5 mL de solução de ácido clorídrico em água, resultando num volume total de 3 mL. Dessa forma o meio reacional era composto por cerca de 16,7% (v/v) de propilenoglicol e 83,3% de mistura 1:1 etanol/água. As soluções de ácido ascórbico e ácido clorídrico foram preparadas em concentrações adequadas conforme a concentração final necessária em cada experimento, considerando-se uma diluição de 6 vezes.

Uma vez terminado o tempo de reação a solução resultante foi resfriada sob agitação magnética em banho de água por cerca de 5 minutos. Após

resfriada a solução foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, sendo a solução utilizada para lavar o frasco e completar o volume do balão composta por etanol e água numa relação de 1:1. A solução final diluída foi filtrada em membrana de 0,45 μm e injetada logo após o seu preparo.

4.3.4 Metodologia

O sistema cromatográfico foi operado na vazão de 1,5 mL/min, sendo a coluna mantida na temperatura de 30°C. A detecção foi feita na faixa de comprimento de onda de 200 nm a 500 nm e os cromatogramas registrados em 355 nm. As fase móveis foram preparadas seguindo-se a correspondência de força cromatográfica entre solventes sugerida por Schoenmakers com pequenas modificações (vide seção 2.3). Na etapa de otimização utilizou-se gradientes de solvente orgânico correspondentes a força cromatográfica de 10% de MeOH até 100% de MeOH em 30 minutos. As fases móveis estudadas foram compostas de água em pH 2,5 acertado com ácido fosfórico e os solventes MeOH, ACN e THF puros e suas misturas binárias e ternárias, segundo um planejamento estatístico de misturas simplex centróide ampliado.

As análise dos extratos hidrolisados de Neem foram efetuados na condição de separação otimizada.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 *Desenvolvimento da metodologia de separação*

4.4.1.1 Seleção da fase móvel

A primeira etapa do processo de desenvolvimento da metodologia de separação foi a seleção da fase móvel, ou melhor, da mistura de solventes orgânicos mais seletiva para a separação das estruturas selecionadas para estudo. A estratégia utilizada foi a mesma abordada no Capítulo 2, porém a escolha da fase móvel foi baseada numa análise quantitativa dos resultados obtidos no planejamento de misturas. Como um dos objetivos foi a obtenção de uma separação rápida com a máxima resolução possível entre todos os picos, utilizou-se uma coluna de menor comprimento, com um diâmetro de partícula menor com relação à empregada no Capítulo 2. Além das modificações nas dimensões da coluna, o recheio da coluna utilizada nesta etapa do trabalho é baseado em partículas de sílica, o que difere da coluna utilizada no Capítulo 2, que era composta por partículas de composição híbrida de sílica e material polimérico orgânico. Devido ao fato das modificações da natureza do suporte da fase estacionária poder alterar as características da retenção, apesar de ambas as colunas utilizadas serem de fase reversa tipo C18, optou-se por repetir os experimentos efetuados no Capítulo 2 com essa nova coluna, porém utilizando um tempo de gradiente de 30 minutos para se atingir uma força cromatográfica equivalente a 100% de MeOH partindo de uma força equivalente a 10% de MeOH. Na Tabela 4.1 são listadas as condições de porcentagem de solventes inicial e final utilizadas em cada experimento.

Tabela 4.1 – Porcentagens iniciais e finais de cada solvente em cada experimento utilizado na otimização da fase móvel

código	Ponto de seletividade	%MeOH	%MeOH	%ACN	%ACN	%THF	%THF
		inicial	final	inicial	final	inicial	final
A	100%MeOH	10.0	100	-	-	-	-
B	100%ACN	-	-	5.90	77.0	-	-
C	100%THF	-	-	-	-	6.60	66.0
D	50%MeOH-50%ACN	5.00	50.0	2.95	38.5	-	-
E	50%MeOH-50%THF	5.00	50.0	-	-	3.30	33.0
F	50%ACN-50%THF	-	-	2.95	38.5	3.30	33.0
G	67%MeOH	6.67	66.7	0.98	12.8	1.10	11.0
H	67%ACN	1.67	16.7	3.93	51.3	1.10	11.0
I	67%THF	1.67	16.7	0.98	12.8	4.4	44.0
J	Triplo	3.33	33.3	1.97	25.7	2.20	22.0

Os cromatogramas obtidos em cada uma das condições da Tabela 4.1 são mostrados na Figura 4.1.

De acordo com os cromatogramas obtidos pode-se observar as mesmas tendências de retenção obtidas no Capítulo 2, porém com algumas modificações de resolução e tempo de retenção devido a alterações na taxa de gradiente. Dos vários experimentos efetuados tem-se nas condições E, F e J, as únicas condições onde não existem picos com co-eluições totais, sendo, portanto a região experimental que compreende esses pontos a possível região de obtenção do ótimo de resolução.

Uma vez observada a possibilidade de modelagem dos valores de fator de retenção em função da composição da fase móvel (Capítulo 2), optou-se por desenvolver uma função resposta para otimização que fosse uma medida relativa ao valor de retenção. A utilização da resolução de picos adjacentes é

Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos com misturas aquosas de um único solvente orgânico (vide Tabela 4.1) – Identificação conforme figura 3.1.

Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos com misturas aquosas de dois solventes orgânicos (vide Tabela 4.1) – Identificação conforme figura 3.1.

Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos com misturas aquosas de três solventes orgânicos (vide Tabela 4.1) – Identificação conforme figura 3.1.

Figura 4.1 – Cromatogramas obtidos com misturas aquosas de três solventes orgânicos em proporções iguais de força cromatográfica (vide Tabela 4.1)

problemática em casos como o atual, onde ocorrem inversões na ordem de eluição dos picos, pois os picos utilizados no cálculo da resolução do primeiro par de picos a eluir em uma determinada condição podem diferir em uma segunda condição, e desta forma a resolução passa a não ser uma função do fator de retenção de cada pico. A estratégia utilizada neste estudo foi a de fixar a ordem dos picos e calcular a resolução em todas as condições estudadas, impondo esta ordem de eluição, sendo a maximização simultânea de todas as funções que descrevem cada uma dessas resoluções a condição de ótimo. A escolha dessa ordem foi feita em função da observação de que nas condições onde ocorrem as maiores resoluções (condições E, F e J) a ordem de eluição é constante e, provavelmente, a condição de ótimo deve seguir a mesma ordem. Desta forma, em regiões onde ocorrem inversões de picos, os valores de resolução podem ser negativos, o que faz com que esses valores passem a ser chamados deste ponto em diante de “resolução modificada” (R_m). A ordem crescente de tempo de retenção imposta foi de miricetina (4), luteolina (8),

quercetina (3), apigenina (7), isorhamnetina (5), kaempferol (2), crisina (6) e galangina (1). Os valores de “resolução modificada” calculados a partir dos tempos de retenção e larguras a meia altura para cada par de picos são mostradas na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Valores obtidos para “resolução modificada” para cada uma das condições utilizadas

experimento	%ACN	%MeOH	%THF	par 1	par 2	par 3	par 4	par 5	par 6	par 7
1	1.00	0.00	0.00	11.64	0.05	9.83	2.72	-1.05	16.21	2.63
2	0.00	1.00	0.00	12.38	-3.72	10.02	0.00	-2.13	12.23	1.65
3	0.00	0.00	1.00	-0.20	6.04	-2.16	3.92	2.83	-0.94	9.26
4	0.50	0.50	0.00	13.42	-1.85	10.22	1.16	-1.44	14.33	1.87
5	0.50	0.00	0.50	3.74	4.61	1.58	4.01	1.66	4.69	7.69
6	0.00	0.50	0.50	4.99	3.09	2.18	2.09	2.44	2.65	7.05
7	0.33	0.33	0.33	6.75	2.61	3.67	2.55	1.41	6.13	6.90
8	0.67	0.17	0.17	9.05	1.48	6.71	2.87	0.04	10.57	4.97
9	0.17	0.67	0.17	9.41	0.25	6.07	1.13	0.49	7.93	4.81
10	0.17	0.17	0.67	2.60	4.92	0.20	3.34	2.62	1.65	8.33

* par 1: miricetina e luteolia; par 2: quercetina e luteolina; par 3: apigenina e quercetina; par 4: isorhamnetina e apigenina; par 5: kaempferol e isorhamnetina; par 6: crisina e isorhamnetina; par 7: galangina e crisina.

Os valores de resolução modificada da Tabela 4.2 foram modelados de acordo com um planejamento de misturas simplex centróide ampliado, sendo os modelos analisados quanto à significância por análise de variância (ANOVA). Os valores de coeficientes não significativos foram mantidos em casos onde essa condição era necessária para a manutenção da hierarquia. Em alguns casos foram feitas transformações das respostas conforme análise do gráfico de Box-Cox⁴. Os valores dos coeficientes obtidos são mostrados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Valores dos coeficientes obtidos para modelagem da resolução modificada (R_M) em função da composição da fase móvel

		Pares de picos						
		Par 1*	Par 2 ¹	Par 3*	Par 4*	Par 5 ²	Par 6*	Par 7*
coeficientes*	<i>a</i>	11.66	7.29	9.92	2.68	1.36	16.11	2.67
	<i>b</i>	12.31	0.10	9.87	-0.03	0.20	11.96	1.80
	<i>c</i>	-0.10	27.44	-2.02	3.95	11.42	-0.73	9.05
	<i>d</i>	4.56	-	-	-	-	-	-
	<i>e</i>	-8.70	18.91	-9.68	2.89	5.64	-12.55	8.44
	<i>f</i>	-5.34	12.81	-8.14	-	18.07	-13.09	8.04
	<i>g</i>	-	-	-	-	-	-	-

$$^* R_M = a * A + b * B + c * C + d * A * B + e * A * C + f * B * C + g * A * B * C$$

$$^1 (R_M + 4.09)^{1.43} = a * A + b * B + c * C + d * A * B + e * A * C + f * B * C + g * A * B * C$$

$$^2 (R_M + 2.34)^{1.48} = a * A + b * B + c * C + d * A * B + e * A * C + f * B * C + g * A * B * C$$

onde A: %ACN; B: %MeOH; C: %THF

Os valores dos sinais dos coeficientes podem ser interpretados como efeitos sinérgicos ou antagônicos conforme forem positivos ou negativos, sendo a intensidade desse efeito medida pelo valor em módulo do coeficiente. Um efeito sinérgico implica no aumento de resolução, por exemplo utilizando-se uma fase móvel composta exclusivamente por água e ACN (vide coeficiente a) espera-se um valor de R_M maior para o par 1 do que quando utiliza-se

MeOH (vide coeficiente b) no lugar de ACN. Ainda para o par 1 pode-se observar pelo coeficiente “c” que a utilização de THF ao invés de ACN ou MeOH é uma situação indesejada, pois o efeito é antagônico tendo-se como consequência a diminuição do valor de R_M . As superfícies de resposta obtidas de acordo com as equações ajustadas, assim como, os gráficos de “valor obtido X valor previsto” são mostrados na Figura 4.2.

Figura 4.2 – Superfícies de resposta obtidas para R_M e gráficos de valor previsto X valor obtido (de acordo com a modelagem de R_M).

Figura 4.2 – continuação.

Figura 4.2 – continuação.

Nas superfícies de resposta da Figura 4.2 pode-se visualizar a composição de solventes da fase móvel, onde tem-se a tendência para melhorias da resolução para cada par de picos, sendo a curvatura das superfícies uma consequência direta dos efeitos de interações binárias entre os solventes. Através dos gráficos de “valor previsto X valor obtido” é possível

observar que os ajustes obtidos podem ser úteis nas previsões quantitativas, uma vez que existe uma boa correlação entre esses valores.

Uma vez obtidas as equações que podem se usadas para prever os valores de R_M para cada um dos pares de picos, efetuou-se a maximização de todas essas equações simultaneamente para se obter um máximo global. Para se efetuar a maximização simultânea de todas as equações, recorreu-se a uma função resposta composta por múltiplas funções, neste caso cada uma representando o valor de R_M para cada par de pico. A função utilizada foi originalmente descrita por Derringer e Suich⁵ que a atribuíram o nome de “desirability”. Essa função (Equação. 4.1) nada mais é do que a média geométrica de todas as respostas normalizadas, obtidas de cada uma das funções que a compõe.

$$D = \left(d_1^{r_1} \times d_2^{r_2} \times d_3^{r_3} \times \dots \times d_n^{r_n} \right)^{\frac{1}{\sum r}} \quad (\text{Equação. 4.1})$$

sendo : d_1, d_2, d_3, d_n os valores normalizados das várias funções e r_1, r_2, r_3, r_n os possíveis pesos dados a essas respostas conforme a importância dada a cada uma delas.

A normalização de cada uma das respostas é feita levando-se em consideração o menor e o maior valor que se espera obter conforme as equações 4.2, 4.3 e 4.4

$$d_i = 0 \quad \text{se } Y_i \leq Y_{i-\text{inf}} \quad (\text{Eq. 4.2})$$

$$d_i = \left[\frac{Y_i - Y_{i-\text{inf}}}{Y_{i-\text{max}} - Y_{i-\text{inf}}} \right]^p \quad \text{se } Y_{i-\text{inf}} \leq Y_i \leq Y_{i-\text{max}} \quad (\text{Eq. 4.3})$$

$$d_i = 1 \quad \text{se } Y_i \geq Y_{i-\text{max}} \quad (\text{Eq. 4.4})$$

onde: d_i é o valor normalizado da resposta, Y_i é o valor obtido numa determinada condição, $Y_{i-\text{inf}}$ é o menor valor esperado, $Y_{i-\text{max}}$ é o valor máximo que se deseja obter, “p” é um peso dado a variações da resposta no valor de d_i .

De acordo com o valor de “p” a variação de “ d_i ” na equação 4.3 pode se aproximar do valor máximo (igual a 1) de uma forma côncava, linear ou convexa conforme a ilustração da Figura 4.3.

Figura 4.3 – Comportamento da função resposta normalizada (d_i) em função do valor de “p”.

Os valores de Y_{i-max} (máxima R_M) utilizados na otimização foram obtidos através da maximização independente de cada função e os valores de Y_{i-min} foram fixos num valor correspondente a 2. O principal objetivo da otimização foi a busca de uma condição em que se observassem melhorias com relação às condições utilizadas na modelagem (experimento 6 da Tabela 4.2). Os valores utilizados para “r” de acordo com a equação 4.1 foram atribuídos em função dos valores obtidos para R_M na condição 6 da Tabela 4.2, sendo máximo (valor igual a 5) para os pares com R_M menores que 3 (pares 3, 4, 5 e 6) e mínimo (igual a 1) para o restante dos pares de picos. Os valores de “p” conforme a equação 4.3 foram todos considerados igual a 1, ou seja, optou-se por uma variação linear entre a resposta obtida e o valor da resposta normalizada. A fase móvel mais seletiva de acordo com as condições de otimização consideradas foi uma fase móvel composta por ACN com força igual a 10% de MeOH, 43% de MeOH, e THF com uma força equivalente a 47% de MeOH, considerando a condição de gradiente de uma força equivalente a 10% de

MeOH até uma força equivalente a 100% de MeOH em 30 minutos. Os valores de R_M obtidos experimentalmente na condição otimizada, assim como, os valores teóricos são apresentados na Tabela 4.3.

Tabela 4.3 – Valores de resolução obtidos experimentalmente para a condição otimizada

	Resolução <small>teórica</small>	Resolução <small>experimental</small>	desvio (%)
par 1	5.19	4.99	-4.0
par 2	3.18	3.09	-2.7
par 3	2.25	2.36	4.8
par 4	2.25	2.28	1.4
par 5	2.21	2.11	-4.3
par 6	3.28	3.15	-4.1
par 7	7.28	7.25	-0.3

De acordo com os valores obtidos pode-se afirmar que o processo de otimização da fase móvel foi bem sucedido considerando-se os valores de erro obtidos, e que apenas o valor de R_M para o par 5 foi inferior ao da melhor condição utilizada na otimização (experimento 6 da Tabela 4.2), sendo todos os outros valores maiores com relação àquela condição. Apesar da maioria dos valores experimentais obtidos serem inferiores aos valores teóricos obtidos na otimização, o menor valor de R_M obtido experimentalmente foi de 2,11, que é suficiente para garantir a separação dos picos relativos ao par 5.

4.4.1.2 Otimização das condições do gradiente

Uma vez otimizada a proporção de solventes a ser utilizada como fase móvel estudou-se a o comportamento da resolução dos picos em função da força cromatográfica inicial (F_i) e do tempo de gradiente (t_g) para se atingir uma força cromatográfica equivalente a 100% de MeOH. Este estudo foi realizado

através de metodologia de superfície de resposta, utilizando-se um planejamento fatorial composto central. Os valores dos níveis utilizados para cada fator, assim como, as respostas obtidas para resolução de cada par de picos em cada experimento são mostrados nas Tabelas 4.4 e 4.5.

Tabela 4.4 – Níveis dos fatores utilizados no planejamento de superfície de resposta

experimento	força inicial*	tempo de gradiente**
1	40.00	10.73
2	60.00	10.73
3	40.00	14.27
4	60.00	14.27
5	35.86	12.50
6	64.14	12.50
7	50.00	10.00
8	50.00	15.00
9	50.00	12.50

* em relação a % de MeOH.

** tempo necessário para se atingir uma força cromatográfica equivalente a 100% de MeOH.

Tabela 4.5 – Valores de resolução obtidos para cada experimento do planejamento de superfície de resposta

experimento	par 1	par 2	par 3	par 4	par 5	par 6	par 7
1	3.58	2.27	1.68	1.66	1.53	2.72	4.92
2	2.74	2.05	1.77	1.76	1.71	3.09	6.05
3	4.15	2.60	1.86	1.96	1.82	2.79	5.78
4	2.71	2.03	1.77	1.80	1.78	3.08	6.88
5	3.68	2.29	1.66	1.73	1.57	2.71	5.13
6	1.77	1.49	1.14	1.37	1.34	2.85	6.03
7	3.85	2.63	1.80	1.93	1.89	2.92	5.57
8	4.03	2.88	2.02	2.16	2.10	2.96	6.77
9	3.92	2.81	1.94	2.08	2.03	2.88	6.35

Os dados da Tabela 4.5 foram modelados, sendo ajustadas equações que descrevem a resolução para cada par de picos em função da força inicial da fase móvel (em relação ao MeOH) e do tempo de gradiente. Os valores dos coeficientes obtidos para cada equação são mostrados na Tabela 4.6.

Tabela 4.6 – Valores dos coeficientes das equações de resolução em função da força cromatográfica inicial e tempo de gradiente.

		Pares de picos						
		par 1	par 2	par 3	par 4	par 5	par 6	par 7
Coeficientes*	a	-14.153	-7.316	-3.830	-3.943	-5.409	2.353	-7.071
	b	0.651	0.426	0.241	0.247	0.275	0.011	0.369
	c	0.480	-	-	-	0.046	-	0.240
	d	-0.008	-	-	-	-	-	-
	e	-0.006	-0.005	-0.003	-0.003	-0.003	-	-0.003
	f	-	-	-	-	-	-	-

$Resolução = a + b * tg + c * Fi + d * tg * Fi + e * tg^2 + f * Fi^2$ onde tg é o tempo de gradiente e Fi é a força inicial da fase móvel

Uma vez obtidas as equações que descrevem a resolução de cada par de picos em função da força cromatográfica inicial e do tempo de gradiente necessário para se obter uma força cromatográfica igual a de 100% de MeOH, procedeu-se a otimização utilizando-se a função “desirability” (Eq. 4.1). Os valores dos pesos (“r” da equação 4.1) dados a resolução de cada par de picos foram todos iguais a 3, e os valores de “p” (equação 4.3) foram todos iguais a 1, ou seja, considerou-se uma variação linear entre a resolução e a resposta normalizada para todos os pares de picos. Na Figura 4.4 é mostrada o gráfico do valor da função “desirability” em função do tempo de gradiente e da força cromatográfica inicial da fase móvel. É possível observar através deste gráfico que o valor ótimo para força cromatográfica inicial da fase móvel está compreendido dentro da faixa estudada, porém o valor de “desirability” cresce

com o aumento do tempo de gradiente. Desta forma na otimização numérica a faixa de tempo de gradiente considerada foi extrapolada para um máximo de 21 minutos, sendo mantida a faixa estudada de força inicial.

Figura 4.4 – Gráfico de “desirability” em função da força cromatográfica inicial e tempo de gradiente

O resultado da otimização numérica foi uma fase móvel com força inicial equivalente a 48,3 % de MeOH, com um tempo de gradiente necessário para se atingir uma força cromatográfica equivalente a 100% de MeOH igual a 21 minutos. De acordo com o comportamento da função “desirability”, a extrapolação para valores maiores de tempo de gradiente poderiam resultar em um valor de “desirability” maior (maiores resoluções), porém isso acarretaria o aumento no tempo de corrida. Como o valor obtido no limite máximo (21 minutos) é o suficiente para que se tenha uma resolução em linha de base de todos os componentes, optou-se por considerar o valor numérico obtido como o ótimo. Os valores das resoluções teóricas obtidas na condição otimizada,

assim como, os valores obtidos experimentalmente são mostrados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 – Valores de resolução obtidos experimentalmente para a condição otimizada

	Resolução teórica	Resolução experimental	Desvio (%)
par 1	4.60	4.44	-3.60
par 2	2.77	3.07	9.77
par 3	1.97	2.24	12.0
par 4	2.06	2.42	14.8
par 5	2.39	2.38	-0.42
par 6	2.87	3.22	10.8
par 7	8.19	7.53	-8.76

Apesar dos desvios percentuais serem relativamente altos entre o valor previsto e o obtido experimentalmente, os únicos erros que foram negativos (valor experimental menor que o teórico) são valores de resolução bastante altos que não implicam na diminuição da qualidade da separação. O restante dos desvios observados são todos positivos, ou seja, os valores experimentais são maiores que os previstos teoricamente. Na Figura 4.5 é apresentado o cromatograma obtido na condição otimizada, assim como os espectros de UV de cada pico na faixa de comprimento de onda de 230nm a 500nm, obtidos através de detector de arranjo de diodos. A variação da porcentagem de solventes em função do tempo, de acordo com a força cromatográfica e tempo de gradiente otimizados é mostrado na Tabela 4.8

Tempo (min)	%MeOH inicial	%MeOH final	%ACN inicial	%ACN final	%THF inicial	%THF final
0	20.8	3.2	15.0	-	-	-
21	-	-	-	43.0	7.7	31.0

Figura 4.5 – Cromatograma obtido na condição otimizada.

4.4.2 Figuras de mérito da metodologia desenvolvida

4.4.2.1 Linearidade

A linearidade do método desenvolvido foi avaliada na faixa de concentração de 5 µg/mL a 100 µg/mL. Foram injetadas soluções de padrão de 5, 10, 25, 50, 75 e 100 µg/mL em triplicata e construídas curvas de calibração para cada flavonóide aglicona. Na Tabela 4.9 são mostrados os valores obtidos para a análise estatística da regressão linear .

Tabela 4.9 – Estatística das curvas de calibração dos flavonóides agliconas.

	Faixa de concentração (µg/ml)	a*	b*	R ²	F	Desvio padrão da regressão
miricetina	5 - 100	19867	8352	0.9994	6178	21403
luteolina	5- 100	31773	24302	0.9994	6587	33149
quercetina	5 - 100	24192	23091	0.9994	6970	24539
apigenina	5 - 100	27745	20746	0.9994	7205	27679
isorhamnetin	5 - 100	22699	13745	0.9994	7089	22829
kaempferol	5 - 100	26785	15618	0.9994	7214	26705
crisina	5 - 100	10327	3329	0.9994	6427	10908
galangina	5 - 100	21861	15689	0.9993	5971	23957

*y = ax +b; n = 3

Na Figura 4.5 são apresentadas as curvas de calibração dos flavonóides agliconas estudados.

Figura 4.5 – Curvas de calibração obtidas para os flavonóides agliconas

4.4.2.2 Precisão

Os valores de repetibilidade de área foram avaliados através da injeção de padrões em 3 níveis de concentração (5, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$), sendo as injeções efetuadas em triplicata. Os valores de coeficiente de variação obtidos para os 3 níveis são mostrados na Tabela 4.10.

Tabela 4.10 – Valores de repetibilidade de área expressos como CV (%)

	5 $\mu\text{g/mL}$ – CV (%)	50 $\mu\text{g/mL}$ – CV (%)	100 $\mu\text{g/mL}$ – CV (%)
miricetina	0.28	0.19	0.45
luteolina	0.54	0.10	0.40
quercetina	0.92	0.20	0.54
apigenina	1.2	0.27	0.47
isorhamnetin	1.2	0.33	0.49
kaempferol	0.30	0.41	0.60
crisina	1.8	0.40	0.56
galangina	0.31	0.36	0.24

n = 3

Os valores de precisão intermediária foram avaliados injetando-se em triplicata, em 3 dias diferentes padrões com os mesmos níveis de concentração utilizados na avaliação da repetibilidade. Em cada um dos 3 dias foram feitas diluições apropriadas, partindo-se sempre de uma mesma solução estoque de concentração igual a 1000 µg/mL. Os resultados obtidos expressos como coeficiente de variação da média de cada dia, são mostrados na Tabela 4.11.

Tabela 4.11 – Valores de precisão intermediária de área expressos como CV (%)

	5 µg/mL – CV (%)	50µg/mL – CV (%)	100 µg/mL – CV (%)
miricetina	1.8	0.65	0.99
luteolina	1.0	1.3	1.5
quercetina	1.8	1.5	1.3
apigenina	1.0	1.2	1.4
isorhamnetin	1.7	1.5	1.3
kaempferol	1.9	1.6	1.4
crisina	2.1	1.7	1.4
galangina	2.0	1.8	1.4

n = 9

4.4.2.3 Estimativa dos limites de quantificação e detecção

As estimativas dos limites de quantificação e detecção foram feitos considerando-se uma relação sinal/ruído de 3 e 10 para o limite de detecção e quantificação, respectivamente. O valor do ruído foi medido na região de eluição de cada pico, a partir de uma corrida onde injetou-se uma mistura de etanol e água numa relação de 1:1. O sinal utilizado como referência foi obtido de um cromatograma onde injetou-se uma mistura de padrões na concentração de 0,625 µg/mL para todos os flavonóides, com exceção de crisina, cujo sinal de referência foi obtido de um cromatograma originado de uma solução de 2,5

µg/mL. Os valores estimados do LOQ e LOD para cada flavonóide são mostrados na Tabela 4.12.

Tabela 4.12 – Valores estimados de LOD e LOQ.

	LOD (µg/mL)	LOQ (µg/mL)
miricetina	0.45	0.14
luteolina	0.20	0.13
quercetina	0.37	0.15
apigenina	0.41	0.21
isorhamnetin	0.41	0.18
kaempferol	0.21	0.11
crisina	0.73	0.56
galangina	0.43	0.19

4.4.3 Otimização das condições de hidrólise de extratos de *Azadirachta indica* (Neem)

A otimização das condições de hidrólise foi efetuada considerando-se como principais fatores a temperatura na qual foi conduzida a reação, a concentração de ácido clorídrico utilizada, o tempo de reação e a concentração de um antioxidante auxiliar, para amenizar as perdas de flavonóides por degradação⁶. O antioxidante auxiliar utilizado foi o ácido ascórbico. Em geral os métodos de hidrólise de flavonóides glicosilados descritos na literatura são feitos em condições de refluxo, o que faz com que a temperatura de reação seja limitada pela mistura de solventes no meio reacional. Neste trabalho, a hidrólise foi conduzida em sistema fechado, o que faz com que a temperatura possa ser elevada além da temperatura de refluxo da mistura de solventes utilizada. Uma vez que podem existir interações entre os vários fatores optou-se por efetuar a otimização fazendo-se uso de metodologia de superfície de resposta, utilizando-se para isso um planejamento fatorial composto central. Todos os experimentos foram efetuados com um mesmo extrato de Neem (vide seção 4.3), considerando-se como respostas do planejamento as áreas dos picos de cada aglicona, obtidas em cada condição de hidrólise. Em um primeiro planejamento fatorial os níveis considerados para cada fator foram baseados em condições descritas na literatura⁶. Os valores dos níveis utilizados para cada fator em cada experimento, assim como, os valores de área obtidos são mostrados na Tabela 4.13. Na Figura 4.6 são mostrados cromatogramas obtidos com o extrato de Neem hidrolisado em 3 condições diferentes.

Tabela 4.13 – Valores de área de cada aglicona em cada experimento do planejamento fatorial utilizado na otimização das condições de hidrólise

	[HCl] ¹	temperatura ²	tempo ³	[ac. asc.] ⁴	Miricetina ⁵	Quercetina ⁶	Kaempferol ⁷
1	0.8	80	30	500	214755	2625397	348894
2	1.5	80	30	500	267022	3159548	455356
3	0.8	120	30	500	251874	2979507	458127
4	1.5	120	30	500	183598	2388932	382482
5	0.8	80	90	500	224465	2941087	426711
6	1.5	80	90	500	254653	3081047	452922
7	0.8	120	90	500	169997	2252578	380899
8	1.5	120	90	500	104619	1465759	248794
9	0.8	80	30	2000	217208	2542681	331086
10	1.5	80	30	2000	255613	3084882	439391
11	0.8	120	30	2000	208771	2703494	419343
12	1.5	120	30	2000	167836	2206232	354888
13	0.8	80	90	2000	227265	2889164	407831
14	1.5	80	90	2000	240437	2966602	433791
15	0.8	120	90	2000	145498	2019854	335591
16	1.5	120	90	2000	86811	1082513	173942
17	0.8	100	60	1250	221071	2887113	438394
18	1.5	100	60	1250	205000	2630831	416560
19	1.15	80	60	1250	226632	2931660	422011
20	1.15	120	60	1250	157076	2155919	334968
21	1.15	100	30	1250	250858	3058590	447540
22	1.15	100	90	1250	205588	2701849	396287
23	1.15	100	60	500	239216	2965114	439661
24	1.15	100	60	2000	223871	2861375	437220
25	1.15	100	60	1250	237000	2912714	445962
26	1.15	100	60	1250	233455	2910668	447591
27	1.15	100	60	1250	217576	2694765	416418
28	1.15	100	60	1250	205526	2680228	423243

¹ concentração de ácido clorídrico em mol/L; ² temperatura em °C; ³ tempo em minutos;
⁴ concentração de ácido ascórbico em µg/mL; ⁵ área do pico da miricetina; ⁶ área do pico da quercetina; ⁷ área do pico do kaempferol.

Figura 4.6 – Cromatogramas obtidos com extrato de Neem hidrolisado. (condições de hidrólise de acordo com a Tabela 4.13 – a: condição 1; b: condição 24; c: condição 16). Identificação conforme figura 3.1. *picos com espectro característico de flavonóide.

De acordo com a Figura 4.6, os flavonóides obtidos após hidrólise ácida correspondem às agliconas dos glicosídeos descritos na literatura como sendo os flavonóides majoritários presentes nas folhas de Neem, ou seja, derivados de miricetina, quercetina e kaempferol. Pode-se observar ainda que as concentrações relativas de cada pico estão de acordo com os dados obtidos no Capítulo 2, ou seja, existe a predominância de glicosídeos de quercetina, seguido pelos glicosídeos de kaempferol e miricetina. Uma vez que a análise do extrato antes da hidrólise (resultados não mostrados) não revelou a presença de flavonóides nas formas de agliconas, pode-se correlacionar a concentração de agliconas obtidas após hidrólise com a concentração de flavonóides glicosilados. De acordo com a Figura 4.6a tem-se no início do cromatograma picos com espectro característico de flavonóides (marcados com asterisco), sendo provavelmente flavonóides glicosilados não hidrolisados. Na Figura 4.6b tem-se um cromatograma obtido a partir de um extrato hidrolisado em condições mais drásticas de concentração de ácido, tempo e temperatura. Pode-se perceber por esse cromatograma que os picos anteriormente identificados na Figura 4.6a, como possíveis flavonóides glicosilados não hidrolisados desaparecem, enquanto que as áreas relativas a quercetina e kaempferol aumentam (Tabela 4.13), o que leva a crer que se tratavam de glicosídeos de quercetina e kaempferol. Pelos dados da Tabela 4.13 é possível observar ainda que nesta condição de hidrólise ocorre a diminuição da área da miricetina, provavelmente devido a degradações, uma vez que a literatura reporta que este flavonóide é susceptível à decomposição em condições mais drásticas de hidrólise⁶. O cromatograma da Figura 4.6c foi obtido na condição mais drástica de hidrólise dentro do planejamento

experimental. É possível observar neste cromatograma uma série de picos não identificados, provavelmente oriundos da degradação dos flavonóides, levando-se em conta que a área relativa de todos as agliconas anteriormente identificadas é severamente diminuída. Uma vez observado que as condições ótimas para a hidrólise de quercetina e kaempferol podem causar degradação na miricetina, e que condições menos drásticas de hidrólise, que poderiam ser utilizadas para quantificação de miricetina, podem não ser quantitativas para quercetina e kaempferol, modelou-se os dados da Tabela 4.13 de acordo com um planejamento de superfície de resposta, visando uma otimização simultânea onde todos os flavonóides possam ter o máximo de rendimento. Na Tabela 4.14 são apresentados os valores dos coeficientes obtidos na modelagem.

Tabela 4.14 – Valores dos coeficientes obtidos para o ajuste das equações que descrevem as áreas das agliconas em função dos fatores do planejamento de superfície de resposta

coeficientes*	miricetina	quercetina	kaempferol
k	-924174	-1E+07	-1928983
a	488366.5	5656256	759306.4
b	19023.69	204223.7	35643.21
c	1904.057	41414.61	9208.411
d	-24.6721	-22.1974	4.83111
e	-68458.4	-741225	-19836.7
f	-73.9191	-764.956	-128.543
g	7.557328	33.83081	-8.88194
h	0.017994	0.11284	0.015171
i	-3279.53	-36658.4	-6257.07
j	-370.034	-8900.46	-1882.44
l	0.75127	-26.591	-3.99115
m	-30.9768	-408.63	-64.8065
n	-0.33666	-3.12889	-0.47814

o

0.039159

-0.46179

-0.16116

*
 $\text{área} = k + a \cdot A + b \cdot B + c \cdot C + d \cdot D + e \cdot A^2 + f \cdot B^2 + g \cdot C^2 + h \cdot D^2 + i \cdot A \cdot B + j \cdot A \cdot C + l \cdot A \cdot D + m \cdot B \cdot C + n \cdot B \cdot D + o \cdot C \cdot D$
 A: concentração de ácido clorídrico; B: temperatura; C: tempo; D: concentração de ácido ascórbico

Os gráficos dos valores previstos X observados para a área de cada aglicona de acordo com as equações ajustadas são mostrados na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Gráfico dos valores de área previstos X valores obtidos de acordo com as equações ajustadas para as áreas dos flavonóides agliconas.

Os modelos foram validados através de análise de variância (ANOVA), sendo mantidos os coeficientes não significativos necessários para a manutenção da hierarquia. De acordo com os gráficos de Figura 4.7 pode-se perceber que existe uma boa correlação entre os valores previstos e os valores obtidos, que em conjugação com a significância do modelo avaliada por ANOVA, fazem com que as equações possam ser utilizadas para previsões. Uma vez obtidas as equações procedeu-se a otimização simultânea através da função “desirability”, de acordo com a equação 4.1. Os valores mínimos e máximos esperados (vide equação 4.3) utilizados na normalização das respostas para cada flavonóide foram considerados como a mínima área obtida no planejamento e a área máxima obtida através da maximização de cada equação de cada flavonóide individualmente. Os valores utilizados de “p” para a normalização das respostas de acordo com a equação 4.3, foram iguais a 1 para quercetina e kaempferol, e 5 para miricetina. Os pesos dados aos flavonóides na função “desirability” foram iguais a 3 para quercetina e kaempferol, e 5 para miricetina. Os valores de “p” assim como os valores dos pesos de cada flavonóide na função “desirability” foram escolhidos de forma a dar uma importância maior a miricetina, uma vez que este flavonóide é o mais susceptível a degradações.

O resultado obtido na otimização foi uma concentração de ácido clorídrico igual a 1,2 mol/L, temperatura de 96 °C, tempo de reação igual a 30 minutos e concentração de ácido ascórbico igual a 500 µg/mL, com um valor de “desirability” igual a 0,995. Os valores de área previstos para o ótimo global, assim como, os valores ótimos previstos obtidos para cada flavonóide

otimizado individualmente (diferentes condições foram obtidas) são mostrados na Tabela 4.15.

Tabela 4.15 – Comparação entre os valores teóricos de área obtidos através da otimização individual e simultânea

	ótimo individual	ótimo global	desvio (%)
miricetina	269081	269026	0.02
quercetina	3192820	3181580	0.35
kaempferol	465656	461062	0.99

De acordo com os valores de desvio porcentual entre os ótimos individuais e globais, existe a possibilidade de submeter a amostra a uma única condição de hidrólise sem que haja perdas significativas de informação quantitativa para qualquer um dos flavonóides. Apesar da otimização ter sido bem sucedida, pelo menos teoricamente, os valores dos fatores tempo de reação e concentração de ácido ascórbico, obtidos na condição de ótimo, estão no limite inferior da faixa utilizada no planejamento experimental. Dessa forma os valores de ótimo obtidos podem ser somente ótimos locais, ou seja, uma condição de ótimo dentro dos limites do fatorial. Na Figura 4.8 são apresentadas as superfícies de resposta obtidas para cada um dos flavonóides em função da concentração de ácido ascórbico e tempo de reação, sendo os outros fatores mantidos no valor ótimo.

Figura 4.8 – Superfícies de resposta para área de cada um dos flavonóides em função da concentração de ácido ascórbico e tempo de reação mantidos os outros fatores na condição de ótimo.

De acordo com as superfícies de resposta da Figura 4.8 é possível observar que existe uma tendência de crescimento da área de todos os flavonóides quando se diminui a concentração de ácido ascórbico e tempo de reação, sendo esta tendência mais pronunciada para miricetina, kaempferol e quercetina, nesta ordem. De acordo com a análise das superfícies de resposta conclui-se que o ótimo determinado é local, e que um novo planejamento experimental englobando níveis menores para concentração de ácido ascórbico e tempo de reação pode fornecer informações a respeito do ótimo global. Desta forma a reação de hidrólise foi novamente estudada por um

segundo planejamento fatorial composto central , englobando o valor ótimo obtido anteriormente, porém considerando-se os menores limites do planejamento anterior para o tempo de reação e concentração de ácido ascórbico como limites superiores do novo planejamento. As condições estudadas, assim como, os resultados obtidos são mostrados na Tabela 4.16.

Tabela 4.16 – Valores obtidos para o segundo planejamento fatorial

	[HCl] ¹	temperatura ²	tempo ³	[ac. asc.] ⁴	Miricetina ⁵	Quercetina ⁶	Kaempferol ⁷
1	1	90	5	0	127123	1502577	178208
2	2	90	5	0	212007	2474552	324364
3	1	120	5	0	274668	3236988	477445
4	2	120	5	0	270886	3178076	482516
5	1	90	30	0	263435	3176701	461571
6	2	90	30	0	249347	3023525	458238
7	1	120	30	0	222157	2787169	437709
8	2	120	30	0	262288	3143277	476885
9	1	90	5	500	124235	1454428	171425
10	2	90	5	500	196973	2307346	297467
11	1	120	5	500	274532	3249521	475596
12	2	120	5	500	267052	3184596	480769
13	1	90	30	500	256908	3093298	451187
14	2	90	30	500	247444	3015925	453891
15	1	120	30	500	151492	2074405	337550
16	2	120	30	500	168658	2214683	358913
17	1	105	17.5	250	258523	3117485	455549
18	2	105	17.5	250	241677	2982993	455984
19	1.5	90	17.5	250	266592	3160926	462518
20	1.5	120	17.5	250	225952	2816276	445494
21	1.5	105	5	250	269893	3193017	459871
22	1.5	105	30	250	236014	2919569	449581
23	1.5	105	17.5	0	262010	3142524	472820
24	1.5	105	17.5	500	251168	3043429	466538
25	1.5	105	17.5	250	259607	3119187	476849
26	1.5	105	17.5	250	256462	3084832	469841
27	1.5	105	17.5	250	261461	3125153	482462

¹ concentração de ácido clorídrico em mol/L; ² temperatura em °C; ³ tempo em minutos; ⁴ concentração de ácido ascórbico em µg/mL; ⁵ área do pico da miricetina; ⁶ área do pico da quercetina; ⁷ área do pico do kaempferol.

A primeira tentativa de modelagem dos dados da Tabela 4.16 foi o ajuste de um modelo quadrático, como o ajustado para os dados do primeiro planejamento, porém, apesar dos resultados da análise de variância indicarem que os modelos quadráticos eram significativos, observou-se que existia falta de ajuste, o que prejudica a previsão e conseqüentemente a otimização. O procedimento adotado então foi o ajuste de um modelo cúbico. Apesar do número de experimentos efetuados não ser suficiente para a estimativa de todos os coeficientes de um modelo cúbico, a regressão através do procedimento de “backward elimination” forneceu modelos significativos sem falta de ajuste, através da eliminação sucessiva de coeficientes não significativos. Os valores obtidos para os coeficientes das equações de cada flavonóide são apresentados na Tabela 4.17. Os gráfico de valores previstos X valores observados são mostrado na Figura 4.9.

Figura 4.9 – Gráfico de valores observado X valores previstos.

Tabela 4.17 – Valores dos coeficientes obtidos para o segundo planejamento composto central

coeficientes*	miricetina	quercetina	kaempferol
k	-6636550	-7E+07	-9442676
a	5574137	58470589	8022693
b	97397.95	1012703	129133.8
c	61293.94	701582.6	104087
d	-353.69	-4087.29	-606.884
e	-1085150	-1.2E+07	-1777413
f	-332.023	-3373.16	-394.746
g	-57.5043	-772.725	-157.18
h	-	-	-0.1537
i	-67351.4	-685273	-88339.2
j	-39324.6	-449358	-62672.3
l	306.5505	3275.161	643.752
m	-406.24	-4480.81	-631.525
n	1.59718	19.71202	2.55936
o	20.75772	219.1456	28.77604
p	8989.683	96292.72	14453.73
q	6905.7	82569.66	12609.48
r	-107.881	-1135.9	-219.882
s	174.9294	1690.461	188.2622
t	166.4887	1783.777	215.4147
u	-0.22642	-2.37968	-0.31131

$$*área = k + a*A + b*B + c*C + d*D + e*A^2 + f*B^2 + g*C^2 + h*D^2 + i*A*B + j*A*C + l*A*D + m*B*C + n*B*D + o*C*D + p*A^2*B + q*A^2*C + r*A^2*D + s*A*B^2 + t*A*B*C + u*B*C*D$$

A: concentração de ácido clorídrico em mol/L; B: temperatura em °C; C: tempo em minutos; D: concentração de ácido ascórbico em µg/mL.

Através da maximização simultânea da área de todos os flavonóides através da função “desirability” (equação 4.1), considerando-se o valor de “p” (equação 4.2) igual a 5, 3 e 3 para miricetina, quercetina e kaempferol respectivamente, e os valores de “r” (equação 4.1) iguais a 5 para miricetina, 3

para quercetina e 3 para kaempferol, obteve-se um valor de “desirability igual a 0,986. Utilizando-se os mesmos critérios de pesos adotados, porém minimizando-se o tempo de reação obteve-se um valor de “desirability” igual a 0,930. Os valores obtidos de acordo com as duas condições de otimização são mostradas na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Condições de hidrólise obtidas na otimização

	otimização 1	otimização 2*	diferença (%)
[HCl]	1.44	1.40	-
temperatura	90,0	119	-
tempo de reação	30	5,0	-
[ácido ascórbico]	500	500	-
Miricetina	283669	279858	1.34
Quercetina	3365160	3330200	1.04
kaempferol	504269	495405	1.76

*otimização com minimização do tempo de reação

Os valores da Tabela 4.18 mostram que as diferenças entre as áreas dos flavonóides quando se minimiza o tempo de reação ficam todas abaixo de 1,8 % com relação ao ótimo sem a imposição de limitações de tempo. Desta forma optou-se por considerar a condição onde se tem o menor tempo de hidrólise como a condição otimizada, uma vez que se tem uma diminuição de 6 vezes no tempo de preparo de amostra, sem perda significativa de informação quantitativa. O resultado experimental obtido através de triplicata de hidrólise e de injeção nas condições otimizadas, assim como, os valores teóricos são mostrados na Tabela 4.19.

Tabela 4.19 – Comparação entre valores experimentais e teóricos das áreas dos picos obtidos na otimização final das condições de hidrólise

	experimental	teórico	diferença (%)*
miricetina	280757 (3116)	279858	0.32
quercetina	3293414 (11641)	3330200	-1.12
kaempferol	487634 (1180)	495405	-1.59

*tomando como referência o valor teórico. Valores entre parênteses correspondem ao desvio padrão da triplicata de hidrólise

Da mesma forma que na otimização efetuada através do primeiro planejamento, tem-se o ótimo nos extremos dos fatores ácido ascórbico e tempo de reação, porém neste caso o ótimo situa-se no extremo inferior do tempo de reação e no extremo superior da concentração de ácido ascórbico. As superfícies de resposta em função do tempo e concentração de ácido ascórbico, com os outros fatores fixos no valor ótimo são mostradas na Figura 4.10. Através das superfícies de resposta é possível observar que existe uma leve tendência de aumento na área de todos os flavonóides quando se diminui o tempo de reação e se aumenta a concentração de ácido ascórbico. Experimentos (resultados não mostrados) efetuados ao redor do valor ótimo de tempo de reação (tempo de reação igual a 3 minutos) e com quantidades superiores de ácido ascórbico (750 µg/mL) mostraram que os valores de área obtidos nessas condições são inferiores com relação ao valores obtidos no ponto determinado como ótimo, o que leva a crer que o extremo do planejamento onde situa-se o ótimo provavelmente trata-se do máximo da superfície de resposta.

Figura 4.10 – Superfícies de resposta em função do tempo de reação e concentração de ácido ascórbico mantidos os outros fatores no valor ótimo

Os valores médios referentes a triplicata de injeção para hidrólise efetuada em três diferentes dias são mostrados na Tabela 4.17.

Tabela 4.17 – Valores obtidos em três diferentes dias

	dia 1	dia 2	dia 3	Média	CV (%)
Miricetina	280757	276025	280547	279109	0,96
Quercetina	3293414	3260130	3304779	3286108	0,70
kaempferol	487634	488500	483655	486596	0,53

Os valores de concentração dos flavonóides agliconas da amostra utilizada para otimização da hidrólise são mostrados na Tabela 4.18.

Tabela 4.18 – Valores de concentração obtidos para o extrato utilizado na otimização de hidrólise

	dia 1	dia 2	dia 3	Média	CV (%)
Miricetina	137	135	137	136	0.99
Quercetina	1352	1338	1357	1349	0.71
kaempferol	176	177	175	176	0.55

Os valores dos coeficientes de variação para as determinações das concentrações de flavonóides agliconas no extrato hidroglicólico de Neem mostram que o método de hidrólise é reprodutível.

4.5 Conclusões

A utilização do planejamento de misturas, para a seleção da fase móvel mais seletiva, em conjugação com a utilização de planejamento fatorial composto central, para a otimização das condições de gradiente, foram explorados com sucesso na otimização da separação dos flavonóides agliconas. Através da metodologia otimizada pode-se separar com resolução de linha de base, em um tempo de análise bastante apreciável, 8 flavonóides agliconas comumente encontrados em alimentos e plantas utilizadas em extratos para uso cosméticos. Além de ter sido útil para determinação de flavonóides em extratos de Neem, o método é potencialmente aplicável a qualquer amostra onde necessite-se conhecer a concentração de flavonóides agliconas. De acordo com a literatura consultada este é o primeiro método onde tem-se a separação simultânea dessas 8 agliconas.

A otimização da hidrólise através de planejamento de superfície de resposta forneceu uma metodologia com excelente reprodutibilidade e com um tempo de preparo de amostra bastante reduzido. Assim como no caso da

otimização de separação, a metodologia de hidrólise é potencialmente aplicável a outras plantas cuja composição sejam de flavonóides glicosilados na posição 3 do esqueleto básico. Independentemente do valor da recuperação dos flavonóide agliconas, a metodologia de hidrólise fornece o rendimento máximo.

4.6 Referências bibliográficas

1. T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas, The systematic identification of flavonoids, Springer-Verlag, New York, 1970.
2. M.G.L. Hertog, P.C.H. Hollman, D.P. Venema, J.Agric. Food Chem. 40 (1992) 1591.
3. H.M. Merken, G.R. Beecher, J. Agric. Food Chem. 48 (200) 577
4. T. Ryan, Modern Regression Methods, John Wiley, New York, 1997
5. G. Derringer, R. Suich, J. Qual. Technol. 12 (1980) 214.
6. Nuutila A.M. , Kammiovirta K., Oksman-Caldentey K.-M, Food Chem. 76 (2002) 519.

CAPÍTULO 5

**DETECÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
ANTIOXIDANTES “ON-LINE” EM HPLC**

5.1 Introdução

Nos organismos vivos os radicais livres são normalmente gerados pelo metabolismo celular, atuando como sinalizadores de processos bioquímicos, assim como no mecanismo de defesa dos organismos contra agentes invasores externos. Um sofisticado sistema de defesa enzimático e não-enzimático é responsável pela manutenção da homeostase, ou seja, pela manutenção dos níveis adequados de concentração dessas espécies altamente reativas (em geral oxidantes). Além dos radicais livres gerados pelo próprio organismo (fontes endógenas), fontes externas como luz ultra-violeta, radiação ionizante, quimioterápicos e toxinas do meio podem contribuir para o aumento dos níveis dos radicais livres. Como consequência direta da perda da homeostase (stress oxidativo) tem-se os processos degenerativos, como por exemplo, o envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, câncer, e problemas metabólicos (como o diabetes por exemplo)².

O consumo de alimentos ricos em espécies antioxidantes pode ter um importante papel na manutenção da saúde e prevenção das doenças, através do fornecimento ao organismo de ferramentas suplementares no combate aos radicais livres. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma relação inversa entre o consumo de frutas e vegetais e a incidência de doenças como câncer³ e problemas coronários⁴, o que confirma a hipótese de que o aumento dos níveis de concentração de substâncias antioxidantes no organismo pode auxiliar o mesmo a manter a homeostase e conseqüentemente uma boa condição de saúde.

A capacidade de uma determinada substância ou espécie vegetal em combater ou evitar a formação de radicais livres pode ser avaliada através da medição de indicadores de stress oxidativo num determinado organismo após a sua administração (in vivo), ou por metodologias baseadas em reações de inibição de formação ou decaimento de um determinado radical livre modelo (in vitro). Apesar da comprovação da capacidade antioxidante “in vivo” ser um método mais apropriado, pois a propriedade é testada num ambiente mais complexo e semelhante ao da aplicação final a que se destina a molécula ou espécie vegetal em estudo, os métodos “in vitro” são em geral mais baratos, mais rápidos, e reproduzíveis, sendo portanto uma boa alternativa em etapas iniciais de “screening” onde é necessário um grande número de análises

Um grande número de tipos de testes “in vitro”⁵ é reportado na literatura, cada um explorando um determinado radical modelo e mecanismo de ação (doação de hidrogênio ou elétron). Um dos métodos mais simples e aceitos para a medição tanto em sistemas hidrofóbicos como em hidrofílicos, é o baseado na atenuação do espectro visível do radical pré-formado ABTS⁶ (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) pela substância ou extrato em teste. A atenuação da absorbância do ABTS na sua forma de radical pode ser correlacionada com a concentração da substância ensaiada e com o tempo de reação, e comparada com uma substância padrão, como por exemplo TROLOX (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid).

Na busca por novas moléculas com propriedades antioxidantes o principal alvo são as espécies vegetais, em geral aquelas reportadas por estudos etnofarmacológicos com alguma atividade contra doenças relacionadas ao stress

oxidativo. Através da medição da capacidade antioxidante do extrato de uma determinada planta pode-se verificar a sua potencialidade ou não como alvo na descoberta de novas moléculas, porém a informação de qual o princípio ativo, ou seja, qual ou quais as moléculas presentes na planta são as responsáveis pela atividade em questão permanece desconhecido até que seja feito um exaustivo trabalho de isolamento.

Através da utilização de métodos “on line” que combinam as vantagens de protocolos de medida rápidas e sensíveis com uma técnica de separação de alta eficiência, pode-se detectar rapidamente componentes de misturas complexas que possuem poder antioxidante, sendo possível a sua caracterização ou em casos em que isso não seja possível o direcionamento do isolamento e caracterização da substância.

Neste capítulo é abordada a montagem e aplicação de um sistema descrito na literatura¹ para detecção “on-line” em HPLC de substâncias com poder antioxidante, utilizando-se como radical modelo o ABTS.

5.2 Objetivos

- Implantação de um sistema para detecção de substâncias antioxidantes on-line com cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliação individual da atividade antioxidante de compostos presentes em extratos vegetais de uso cosmético

5.3 Experimental

5.3.1 Equipamentos e softwares

Sistema de separação: Foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu equipado com bomba quaternária LC 10Avp, sistema controlador SCL 10Avp, e detector de arranjo de diodos SPD-M10vp. O injetor utilizado foi do tipo manual (Rheodyne) com alça de amostragem de 5 μ L, e o software de aquisição e tratamento de dados foi o Class vp 5.02 fornecido juntamente com o cromatógrafo Shimadzu. Foi utilizada uma coluna Gemni C18 (Phenomenex) com as dimensões de 25 cm de comprimento com diâmetro de 0,46 cm e tamanho de partícula de 5 μ m, tendo como suporte um misto de sílica e polímero orgânico. O sistema de separação foi operado numa vazão igual a 1mL/min, e na temperatura de 30°C.

Sistema de reação pós-coluna: bomba Waters 6000A operando na vazão de 1 ml/min, percurso reacional feito de PEEK (Upchurch) com dimensões de 0,254 mm de diâmetro interno, 1,6 mm de diâmetro externo, e comprimento de 15,24 m, misturador em formato de “T” (AllTech), detector Knauer K-2600 e sistema Jhedi de aquisição de dados. Os tratamentos dos dados foram efetuados no software Origin 6.1.

*5.3.2 Preparação do ABTS**

A solução estoque de ABTS* foi preparada numa concentração de 2 mmol/L de ABTS em tampão fosfato pH 7,8. Após a adição de persulfato de potássio numa concentração final 0,5 mmol/L deixou-se a solução sob agitação em temperatura ambiente livre de luz por 16 horas. A concentração utilizada de ABTS* foi de 50

$\mu\text{mol/L}$ sendo ajustada através de medida espectrofotométrica no comprimento de onda de 734 nm ($\epsilon = 1,5 \times 10^4 \text{ L/mol.cm}$).

5.3.3 Metodologia

O gradiente de “screening” utilizado foi de 5% de fase B até 100% de fase B em 40 minutos, sendo a fase A composta de água com pH ajustado no valor de 2,5 com ácido fosfórico (aproximadamente 1,5 mmol/L), e a fase B composta de ACN com a mesma concentração de ácido fosfórico que a fase A. As identificações das substâncias foram feitas através de comparação do tempo de retenção e do espectro de UV-vis, tendo-se como referência uma biblioteca de espectros previamente montada com cerca de 40 substâncias potencialmente antioxidantes, compreendendo metabólitos secundários vegetais da classe dos ácidos fenólicos, cumarinas, fenilpropanóides e flavonóides.

5.4 Resultados e discussão

O princípio de funcionamento da montagem utilizada (Figura 5.1) é o de confluir o eluente da saída do detetor de um sistema HPLC convencional com um fluxo de uma solução de ABTS* através de um misturador em formato de “T”, uma vez efetuada a mistura, o fluxo final passa por um percurso reacional atingindo um segundo detector fixo num comprimento de onda onde haja absorção pelo ABTS*. Decaimentos do sinal do segundo detector implicam na diminuição da concentração de ABTS*, ou seja, na reatividade da substância que eluiu do sistema de separação frente ao radical modelo e, conseqüentemente, a caracterização da substância como antioxidante. Através do alinhamento dos cromatogramas gerados pelo detector 1 e 2 pode-se conhecer quais são as substâncias que possuem a atividade antioxidante.

Figura 5.1 – Esquema da montagem utilizada para medidas de poder antioxidante

De acordo com a literatura⁷, após a reação com persulfato a molécula de ABTS perde um elétron dando origem a uma espécie com um elétron desemparelhado, o que caracteriza a sua condição de radical livre. A estrutura da molécula nas suas formas original e radicalar, assim como, os espectros de absorção no UV-vis registrados antes e após a adição de persulfato (16 h de reação) são mostradas nas Figuras 5.2 e 5.3

Figura 5.2 – Reação de formação do radical ABTS*

Figura 5.3 – Espectro do ABTS nas formas normal (vermelho) e radicalar (azul)

Assim como no método original¹, o comprimento de onda utilizado para o monitoramento do decaimento do ABTS* foi de 734 nm, pois apesar do observar-se maiores intensidades nos comprimentos de onda de 394 nm e 414 nm, estes são mais passíveis de interferência por substância presentes em plantas.

5.4.1 Detecção de substâncias antioxidantes presentes em *Azadirachta indica* (Neem)

De acordo com os dados obtidos (Figura 5.4) as principais substâncias antioxidantes presentes na espécie *Azadirachta indica* são os flavonóides glicosídeos de quercetina identificados nos capítulos precedentes, ou seja, rutina, isoquercitrina e quercitrina. É possível observar que existem outros picos (com espectro característico de flavonóides) que também apresentam atividade antioxidante, porém por estarem em menores concentrações relativamente aos glicosídeos de quercetina, possuem uma atividade menor.

Além da detecção qualitativa das espécies foi feita também a comparação quantitativa do poder antioxidante dos glicosídeos de quercetina com relação ao TROLOX (padrão comumente utilizado de substância antioxidante). Esta comparação foi efetuada adicionando-se TROLOX a uma amostra de extrato de Neem, sendo esta amostra injetada em 5 diluições diferentes. Isso só foi possível por que no tempo de eluição do TROLOX não existe nenhuma substância presente no Neem que apresente poder antioxidante. Os picos relativos a rutina, isoquercitrina, quercitrina, e TROLOX originados no detector 2 foram integrados e suas áreas normalizadas. Uma vez que a diluição efetuada é inversamente

Figura 5.4 – Cromatograma obtido para o extrato hidroalcoólico de Neem

proporcional a concentração das substâncias, pode-se fazer uma curva de calibração de poder antioxidante para cada substância, sendo o coeficiente angular (a) da curva de cada substância um indicativo do poder antioxidante daquela substância independentemente da concentração. Através da relação entre os coeficientes angulares da substância em teste (a_s) com o do padrão de referência (a_t), no caso TROLOX, tem-se um valor de para efeito de comparação entre as substâncias. Os resultados obtidos para os glicosídeos de quercetina presentes no Neem são mostrados na tabela 5.1.

Tabela 5.1 – Comparação entre o poder antioxidantes das substâncias identificadas no extrato de Neem

	a	r^2	a_s/a_t
trolox	1,2458	0,9989	-
rutina	0,9793	0,9996	0,786
isoquercitrina	1,1162	0,9970	0,896
quercitrina	1,1868	0,9972	0,953

De acordo com a Tabela 5.1 e com a Figura 5.4 pode-se perceber que apesar da isoquercitrina estar presente em maior concentração e por isso apresentar um pico negativo relativo ao poder antioxidante com uma área maior, é a quercitrina que tem a maior relação a_s/a_t e, por esse motivo, é que tem o maior poder antioxidante como substância, apesar de contribuir com uma parcela menor para o poder antioxidante do extrato como um todo.

5.4.2 Outras aplicações

5.4.2.1 *Salvia officinalis* (Sálvia)

Na Figura 5.5 é apresentado o resultado obtido para um extrato hidroglicólico de sálvia utilizado em uso cosmético.

A única substância identificada com poder antioxidante é o ácido siríngico, sendo os picos majoritários (sem atividade), identificados como os conservantes bacteriostáticos metilparabeno e propilparabeno. Outros dois picos com atividade antioxidante apresentam espectros de UV característicos, sendo o primeiro de flavonóide e o segundo parecendo ser uma co-eluição de flavonóide e ácido fenólico.

A grande maioria das substâncias com atividade não foram identificadas neste caso, porém, é interessante notar que no início do cromatograma existem substâncias que não aparecem no cromatograma originado do detector 1 e apresentam atividade, assim como, existem substâncias que apresentam uma baixíssima absorção no comprimento de onda registrado pelo detector 1 e apresentam um pico de atividade (detector 2) proporcionalmente muito maior.

Dentro de uma certa aproximação se considerarmos que o cromatograma foi obtido partindo-se de uma fase móvel pobre para uma fase rica em solvente orgânico, e que a posição no cromatograma reflete a polaridade das substâncias, pode-se dizer que a Sálvia possui substâncias com atividade antioxidante desde hidrofílicas (tempos menores) até hidrofóbicas (tempos maiores).

Figura 5.5 – Cromatograma obtido para o extrato hidroglicólico de Sálvia. * picos não identificados; 1- metilparabeno, 2- propilparabeno

5.4.2.2 *Melissa officinalis* (Melissa)

No extrato hidroglicólico de *Melissa* pode-se observar que a substância presente que apresenta a maior atividade é o ácido rosmarínico (Figura 5.6). O fato deste composto estar em grande concentração no extrato e apresentar um alto poder antioxidante⁸ faz com que haja saturação do sinal devido ao consumo de todo o ABTS* (pico com um platô no máximo).

Nesta planta o número de substâncias que apresentam poder antioxidante é bem menor com relação a planta analisada no item anterior, além de praticamente não existirem substâncias com atividade que apresentam uma grande hidrofobicidade (tempos de eluição maiores). Foram identificadas ainda duas substâncias com espectro de UV característicos de ácidos fenólicos, porém a substância com maior atividade depois do ácido rosmarínico permanece sem identificação. Assim como no item anterior os picos com maiores intensidades no detector 1 foram identificados como parabenos.

Figura 5.6 – Cromatograma obtido para o extrato hidroglicólico de Melissa. * picos não identificados. 1-metilparabeno, 2-propilparabeno.

5.4.2.3 *Rosmarinus officinalis* (Alecrim)

Assim como no extrato de Melissa a substância com maior poder antioxidante encontrado no extrato hidroglicólico de Alecrim foi o ácido rosmarínico (Figura 5.7). O perfil de substâncias com atividade no Alecrim é muito semelhante ao da Sálvia quando se analisa tempos de retenção de 10 a 40 minutos, sendo as diferenças mais marcantes neste intervalo de tempo a presença no Alecrim de um composto com espectro característico de flavonóide, logo após o pico do metiparabeno, e a ausência de uma substância com atividade por volta dos 30 minutos. Considerando tempos de eluição menores que 10 minutos tem-se no Alecrim a ausência dos dois picos presentes na Sálvia com intensa atividade.

Figura 5.7 – Cromatograma obtido para o extrato hidroglicólico de Alecrim. * picos não identificados. 1-metilparabeno, 2-propilparabeno

5.5 Conclusões

A metodologia implantada mostrou-se útil na caracterização de compostos com a atividade antioxidante em extratos de plantas com reconhecida atividade antioxidante, e potencialmente útil na pesquisa fitoquímica de novas espécies, uma vez que pode-se constatar a presença ou não de espécies antioxidantes, e dependendo do programa de eluição utilizado e do tempo de retenção da substância de interesse inferir sobre sua polaridade e, conseqüentemente sobre um processo adequado de isolamento para posterior caracterização.

5.6 Referências bibliográficas

- 1 Koleva, Il, H.A.G. Niederlander, T.A. van Beek, *Analytical Chemistry* 73 (2001) 3373.
- 2 T. Finkel, N.J. Holbrook, *Nature* 408 (2000) 239.
- 3 J.M. Chan, P.H. Gann, E.L. Giovannucci, *Journal of Clinical Oncology* 23 (2005) 8152.
- 4 N.G. Stephens, A. Parsons, P.M. Schofield, F. Kelly, K. Cheeseman, M.J. Mitchinson, M.J. Brown, *Lancet* 347 (1996) 781.
- 5 O.I. Aruoma, *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523 (2003) 9.
- 6 R. Re, N. Pellegrini, A. Proteggente, A. Pannala, M. Yang, C. Rice-Evans, *Free Radical Biology and Medicine* 26 (1999) 1231.
- 7 S.L. Scott, W.J. Chen, A. Bakac, J.H. Espenson, *Journal of Physical Chemistry* 97 (1993) 6710.
- 8 S. Moreno, T. Scheyer, C.S. Romano, A.A. Vojnov, *Free Radical Research* 40 (2006) 223.

CAPÍTULO 6

**OTIMIZAÇÃO DE EXTRAÇÃO DE
FLAVONÓIDES DE *Azadirachta Indica***

6.1 Introdução

A pele é constantemente exposta a agentes ambientais como radiação ultra-violeta, poluentes do ar, oxidantes químicos, e microorganismos aeróbicos capazes de provocar o chamado stress oxidativo. As espécies reativas de oxigênio são consideradas as principais causas do envelhecimento da pele, câncer e certos tipos de desordem cutânea. Embora os radicais livres geralmente tenham um tempo de meia vida curto, estes são espécies altamente reativas capazes de interagir com DNA, proteínas, e ácidos graxos insaturados, provocando mutações e desestruturação de membranas e tecidos¹.

A pele saudável possui naturalmente um sistema de defesa contra o estress oxidativo, entretanto o ataque excessivo por substâncias oxidantes, como o provocado pela exposição em demasia a radiação UV, acaba saturando o sistema, levando-o a debilidade e conseqüentemente ao estresse oxidativo com todas as suas conseqüências. O fornecimento de substâncias antioxidantes externas ao sistema antioxidante endógeno por via tópica² pode prevenir ou minimizar o envelhecimento da pele.

Dentro deste contexto este capítulo aborda a modelagem de extração dos princípios antioxidantes presentes no Neem visando uma possível aplicação na área cosmética como protetor solar e adjuvante no combate aos efeitos deletérios causados por radicais livres.

6.2 Objetivos

- Modelagem de índice de refração e densidade de misturas de solventes extratores utilizados em preparações cosméticas.
- Modelagem da capacidade dessas misturas em extrair os flavonóides presentes nas folhas de Neem
- Otimização da extração dos princípios ativos dentro de possíveis especificações de produto impostas pelo mercado.

6.3 Experimental

Os solventes utilizados na preparação dos extratos foram etanol absoluto propilenoglicol, água deionizada e suas misturas segundo um planejamento simplex centróide ampliado³. As misturas de solventes utilizadas como veículo extrator foram feitas seguindo proporções em massa. Os extratos foram feitos com a planta seca e pulverizada numa relação de 50 gramas de planta para 500 mL de mistura extratora, através de agitação mecânica em recipientes fechados durante 6 horas. Uma vez pronto, o extrato foi filtrado em membrana 0,45 μm e analisado por HPLC de acordo com o método desenvolvido no Capítulo 2.

As medidas de densidade e índice de refração foram efetuadas por picnometria e com o refratômetro de Abbe respectivamente.

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Modelagem do índice de refração

Os valores de índice de refração obtidos para cada mistura extratora são mostrados na tabela 6.1

Tabela 6.1 – Resultados obtidos para índice de refração

%Etanol (m/m)	%Água (m/m)	%Propilenoglicol (m/m)	Índice de refração
100	0.00	0.00	1.3580
0.00	100	0.00	1.3325
0.00	0.00	100	1.4305
50.0	50.0	0.00	1.3580
50.0	0.00	50.0	1.3925
0.00	50.0	50.0	1.3871
33.0	33.0	33.0	1.3820
67.0	17.0	17.0	1.3725
17.0	67.0	17.0	1.3612
17.0	17.0	67.0	1.4060

Através desses valores modelou-se uma equação de índice de refração em função da mistura de solvente, utilizando-se a análise de variância como forma de avaliar a significância do modelo e dos seus coeficientes. Os valores dos coeficientes obtidos são mostrados na equação 6.1

$$ir = 1,36.A + 1,33.B + 1,43.C + 0,05.A.B + 0,02.B.C$$
 (Equação 6.1)
sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol.

O modelo que melhor se ajusta aos dados experimentais é o quadrático, sendo que as interações significativas (sinérgicas) ocorrem para misturas binárias de água com etanol e água com propilenoglicol. De acordo com o gráfico da figura 6.1 pode-se perceber que os dados experimentais se ajustam de uma forma adequada a equação 6.1. Nas Figura 6.2 e 6.3 tem-se o gráfico de contorno e a superfície de resposta ajustada de acordo com a equação 6.1.

Figura 6.1 – gráfico de valores obtidos pelos observados para o índice de refração

Figura 6.2 – gráfico de contorno obtido para o índice de refração

Figura 6.3 – superfície de resposta obtida para o índice de refração.

6.4.2 Modelagem da densidade

Os valores de densidade obtidos para cada mistura extratora são mostrados na tabela 6.2.

Tabela 6.2 – Valores obtidos para densidade

%Etanol	%Água	%Propilenoglicol	densidade
(m/m)	(m/m)	(m/m)	(g/ml)
100	0.00	0.00	0.7865
0.00	100	0.00	0.9968
0.00	0.00	100	1.0327
50.0	50.0	0.00	0.9081
50.0	0.00	50.0	0.8938
0.00	50.0	50.0	1.0324
33.0	33.0	33.0	0.9513
67.0	17.0	17.0	0.8662
17.0	67.0	17.0	0.9830
17.0	17.0	67.0	0.9879

A equação que melhor se ajusta aos dados experimentais obtidos (equação 6.2) é a que descreve um modelo cúbico especial.

$$\text{dens} = 0,787.A + 0,997.B + 1,032.C + 0,066.A.B - 0,064.A.C + 0,070.B.C + 0,102.A.B.C$$

(Equação 6.2)

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol. De acordo com os coeficientes obtidos, as misturas água-etanol e água-propilenoglicol sofrem contração de volume, uma vez que o tipo de interação entre esses dois solventes é sinérgica, ou seja, a densidade aumenta conforme se misturam esse dois solventes (massa é constante). O coeficiente que descreve a mistura etanol-propilenoglicol é negativo, ou seja, misturas desses dois solventes tem um efeito na diminuição da densidade, e pelo mesmo raciocínio seguido anteriormente pode-se dizer que existe uma expansão de volume quando se misturam esse dois solventes. A qualidade do ajuste dos dados de densidade pode ser observada na figura 6.4. Nas figuras 6.5 e 6.6 tem-se o gráfico de contorno e a superfície de resposta obtida.

Figura 6.4 - Gráfico de valores previstos pelos observados para densidade.

Figura 6.5 – gráfico de contorno obtido para densidade.

Figura 6.6 – superfície de resposta obtida para densidade

6.4.3 Modelagem da concentração dos flavonóides glicosilados

6.4.3.1 Rutina

Os valores de concentração encontrados para rutina em cada um dos extratos utilizados para modelagem são apresentados na tabela 6.3.

Tabela 6.3 – Dados obtidos para a concentração de rutina

%Etanol (m/m)	%Água (m/m)	%Propilenoglicol (m/m)	[rutina] (µg/ml)
100	0.00	0.00	98.3
0.00	100	0.00	323.9
0.00	0.00	100	115.5
50.0	50.0	0.00	487.9
50.0	0.00	50.0	116.9
0.00	50.0	50.0	494.0
33.0	33.0	33.0	492.7
67.0	17.0	17.0	283.3
17.0	67.0	17.0	460.7
17.0	17.0	67.0	385.7

De acordo com a equação 6.3 ajustada (modelo quadrático) existe sinergia entre etanol e água, e propilenoglicol e água, sendo o máximo de concentração teoricamente obtido para rutina igual a 526,6 µg/ml numa mistura extratora composta por 57% de água e 43% de propilenoglicol. Esse valor simulado pode ser obtido através da maximização da equação 6.3

$$[\text{rutina}] = 101,2.A + 304,5.B + 144,3.C + 1145,5.A.B + 1187,3.B.C \quad (\text{Equação 6.3})$$

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol. A qualidade do ajuste (figura 6.7) é bastante inferior com relação ao do índice de refração e densidade, porém a análise de variância revelou que o modelo é significativo. Nos gráficos das figuras 6.8 e 6.9 pode-se observar os gráficos de contorno e a superfície de resposta ajustado para os dados, onde

pode-se perceber que as misturas extratoras mais eficientes na extração de rutina são misturas binárias com água.

Figura 6.7 - Gráfico de valores previstos pelos observados para concentração de rutina.

Figura 6.8 – Contorno para os valores obtidos para concentração de rutina

Figura 6.9 – Superfície de resposta para concentração de rutina

6.4.3.2 Isoquercitrina

Os valores de concentração encontrados para isoquercitrina em cada um dos extratos utilizados para modelagem são apresentados na tabela 6.4.

Tabela 6.4 – Valores obtidos para concentração de isoquercitrina

%Etanol (m/m)	%Água (m/m)	%Propilenoglicol (m/m)	[isoquercitrina] ($\mu\text{g/ml}$)
100	0.00	0.00	157.3
0.00	100	0.00	319.0
0.00	0.00	100	166.2
50.0	50.0	0.00	672.7
50.0	0.00	50.0	164.2
0.00	50.0	50.0	650.0
33.0	33.0	33.0	684.1
67.0	17.0	17.0	432.5
17.0	67.0	17.0	591.5
17.0	17.0	67.0	565.4

A equação ajustada para a concentração de isoquercitrina (equação 6.4) prevê os mesmos efeitos sinérgicos que os anteriores, porém com intensidades diferentes. Isso deve-se provavelmente a semelhança estrutural entre os dois flavonóides.

$$[\text{Isoquercitrina}] = 163,3.A + 287,9.B + 209,6.C + 1816,7.A.B + 1783,2.B.C$$

(equação 6.4)

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol. De acordo com a função ajustada o maior valor de concentração que pode ser obtido é o de 695,4 µg/mL numa proporção de 52% de água e 48% de propilenoglicol. Os valores de proporção para se obter o máximo de concentração são bastante semelhantes aqueles encontrados para rutina.

Os gráficos que mostram a qualidade do ajuste, assim como o gráfico de contorno e a superfície de resposta ajustada são mostrados nas Figuras 6.10, 6.11 e 6.12.

Figura 6.8 - Gráfico de valores previstos pelos observados para concentração de isoquercitrina.

Figura 6.10 – Contorno para os valores obtidos para concentração de isoquercitrina

Figura 6.11 – Superfície de resposta para concentração de isoquercitrina

6.4.3.3 Nicotiflorin

Os valores de concentração encontrados para nicotiflorin em cada um dos extratos utilizados para modelagem são apresentados na tabela 6.5

Tabela 6.5 – Valores obtidos para concentração de nicotiflorin

%Etanol (m/m)	%Água (m/m)	%Propilenoglicol (m/m)	[nicotiflorin] (µg/ml)
100	0.00	0.00	18.9
0.00	100	0.00	63.9
0.00	0.00	100	21.6
50.0	50.0	0.00	92.4
50.0	0.00	50.0	22.4
0.00	50.0	50.0	90.8
33.0	33.0	33.0	91.8
67.0	17.0	17.0	55.8
17.0	67.0	17.0	84.1
17.0	17.0	67.0	72.3

A equação ajustada (equação 6.5) para a concentração de nicotiflorin segue abaixo:

$$[\text{Nicotiflorin}] = 20,34.A + 59,47.B + 27,44.C + 211,26.A.B + 208,28.B.C$$

(equação 6.5)

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol.

A máxima concentração possível de se obter de acordo com a maximização da equação 6.5 é de 96,6 µg/mL numa mistura 55% água e 45% propilenoglicol. Nas figuras 6.13, 6.14 e 6.15 pode-se observar a qualidade do ajuste através do gráfico dos valores previstos pelos valores obtidos, assim como, o gráfico de contorno e a superfície de resposta para a extração de nicotiflorin.

Figura 6.13 - Gráfico de valores previstos pelos observados para concentração de nicotiflorin.

Figura 6.14 – contorno obtido para concentração de nicotiflorin

Figura 6.15 – superfície de resposta para concentração de nicotiflorin.

6.4.3.4 Astragalin

Os valores de concentração encontrados para astragalin em cada um dos extratos utilizados para modelagem são apresentados na tabela 6.6.

Tabela 6.6 – Valores obtido para concentração de astragalin

%Etanol (m/m)	%Água (m/m)	%Propilenoglicol (m/m)	[astragalin] (µg/ml)
100	0.00	0.00	20.2
0.00	100	0.00	39.2
0.00	0.00	100	19.9
50.0	50.0	0.00	84.1
50.0	0.00	50.0	20.1
0.00	50.0	50.0	76.9
33.0	33.0	33.0	83.1
67.0	17.0	17.0	52.3
17.0	67.0	17.0	71.0
17.0	17.0	67.0	68.1

A equação ajustada (equação 6.6) para a concentração de astragalin segue abaixo:

$$[\text{Astragalin}] = 20,57.A + 35,28.B + 25,18.C + 225,74.A.C + 207,57.B.C$$

equação 6.6

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol.

A máxima concentração possível de se obter de acordo com a maximização da equação 6.6 é de 84,6 µg/mL numa mistura 54% água e 46% etanol. Na figura

6.16 é apresentado o gráfico de valores previstos pelos valores obtidos para a extração de astragalin.

Figura 6.16 - gráfico de valores obtidos pelos observados para concentração de astragalin

Figura 6.17 – Contorno para a concentração de astragalin

Figura 6.18 – Superfície de resposta para a concentração de astragalin

6.4.3.5 Quercitrina

Os valores de concentração encontrados para quercitrina em cada um dos extratos utilizados para modelagem são apresentados na tabela 6.7.

tabela 6.7 – dados obtidos para concentração de quercitrina

%Etanol	%Água	%Propilenoglicol	[quercitrina]
(m/m)	(m/m)	(m/m)	($\mu\text{g/ml}$)
100	0.00	0.00	40.1
0.00	100	0.00	79.4
0.00	0.00	100	39.1
50.0	50.0	0.00	158.7
50.0	0.00	50.0	39.5
0.00	50.0	50.0	151.3
33.0	33.0	33.0	161.2
67.0	17.0	17.0	101.1
17.0	67.0	17.0	139.0
17.0	17.0	67.0	134.3

A equação ajustada (equação 6.7) para a concentração de quercitrina segue abaixo:

$$[\text{quercitrina}] = 40,91.A + 71,86.B + 49,73.C + 414,59.A.B + 406,61.B.C$$

equação 6.7

sendo A: % em massa de etanol, B: % em massa de água, C: % em massa de propilenoglicol. A máxima concentração possível de se obter de acordo com a maximização da equação 6.7 é de 162,7 µg/mL numa mistura 53% água e 47% etanol

Figura 6.19 - gráfico de valores obtidos pelos observados para concentração de quercitrina

Figura 6.20 – contorno obtido para concentração de quercitrina

Figura 6.21 – superfície de resposta obtida para concentração de quercitrina

6.4.4 Simulação e otimização

Uma vez obtidas as equações que descrevem cada uma das concentrações dos flavonóides presentes no Neem, o índice de refração, e a densidade pode-se simular qualquer condição dentro de certas especificações. A figura 6.22 mostra a região que satisfaz uma condição onde a concentração dos flavonóides fica entre a máxima obtida experimentalmente e 10% a menos que essa concentração, com um índice de refração entre 1,33 e 1,37, e uma densidade de 0,9 e 1. Dentro dessa região ainda pode-se optar pela manufatura de extratos onde minimize-se a porcentagem de um certo solvente por questões de custo ou limitação de teor máximo, por exemplo. Minimizando-se a concentração de propilenoglicol (solvente de maior custo) tem-se um extrato com as mesmas especificações, porém com um custo de produção menor. Essa condição é obtida quando utiliza-se 54% de etanol e 46% de água. Uma outra possibilidade é a redução da concentração de etanol por questões de tolerância ao produto final, nessa condição pode-se fazer

um extrato com 38% de etanol, 44% de água e 18% de propilenoglicol que as condições iniciais ainda são mantidas.

Figura 6.22 – sobreposição das restrições e região ótima (azul)

6.5 Conclusões

Os dados de índice de refração e densidade podem ser modelados perfeitamente por equações que descrevem modelos quadrático e cúbico especial respectivamente. Os dados de concentração de flavonóides apesar de apresentarem um ajuste de menor qualidade podem ser usados para fazer estimativas. Através dos resultados obtidos pode-se concluir que a extração/solubilidade das estruturas estudadas seguem um mecanismo bastante

semelhante, uma vez que os efeitos para todas as substâncias são qualitativamente os mesmos.

Em geral pode-se concluir que a aplicação do planejamento estatístico de experimentos com misturas pode ser aplicado com sucesso na modelagem e otimização da extração de metabólitos secundários de Neem com atividade antioxidante. Constituindo uma excelente ferramenta auxiliar na manufatura de extratos comerciais com características específicas.

6.6 Referências bibliográficas

1. Y. Tanino, A. Budiyanto, M. Ueda, A. Nakada, W.T. Nyou, M. Yanagisawa, M. Ichihashi, Y. Yamamoto, *Journal of Dermatological Science* (2005) S21.
2. M. Andreassi, E. Stanghellini, A. Ettorre, A. Di Stefano, L. Andreassi, *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology* 18 (2004) 52.
3. L. Eriksson, E. Johansson, C. Wikstrom, *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 43 (1998) 1.

CAPÍTULO 7

CONSIDERAÇÕES FINAIS

7.1 Conclusões finais

As duas técnicas de separação utilizadas no presente trabalho mostraram-se bastante úteis no estudo de flavonóides em extratos vegetais. Em ambas pode-se identificar os flavonóides majoritários presentes nas folhas da planta *Azadirachta indica*. Uma vez que os mecanismos de separação envolvidos nas duas técnicas são de natureza diferente, pode-se dizer que a identificação dos compostos em ambas (aliado a uma informação espectral – espectro de UV) torna a identificação quase que inequívoca, ou seja, as duas técnicas podem ser utilizadas como ferramentas complementares em estudos fitoquímicos. Além do desenvolvimento de metodologias específicas para flavonóides presentes no Neem (“a planta modelo”), algumas informações obtidas neste trabalho, assim como, alguns métodos de análise, podem ser generalizados e potencialmente úteis na aplicação a outras espécies vegetais, como os sistemas cromatográficos ortogonais (Capítulo 2), a metodologia de separação desenvolvida por RF-MEKC (Capítulo 3) e o método de separação e hidrólise desenvolvido para análise de agliconas (Capítulo 4).

7.2 Perspectivas futuras

- Desenvolvimento de descritores moleculares para retenção de flavonóides em HPLC e cromatografia eletrocinética micelar em fluxo normal e reverso.
- Ampliação dos estudos de ortogonalidade para separações de flavonóides, envolvendo fases estacionárias ciano e fenil, assim como, avaliação da ortogonalidade de separações efetuadas em HPLC e RF-MEKC utilizando-se diferentes tensoativos e modificadores orgânicos.
- Hifenação do sistema antioxidante “on line” em HPLC com espectrômetro de massas.