UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

INSTITUTO DE QUÍMICA

TÉCNICAS MODERNAS DE SEPARAÇÃO E ANÁLISE DE EXTRATOS
VEGETAIS

FABIANA NOVAES FONSECA

Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Profa. Dra. Marina F. M. Tavares

SÃO PAULO
16/01/2002

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

F676t Fonseca, Fabiana Novaes
Técnicas modernas de separação e análise de extratos
vegetais / Fabiana Novaes Fonseca. -- São Paulo, 2002.
298p.

Tese (doutorado) – Instituto de Química da Universidade
de São Paulo. Departamento de Química Fundamental.
Orientador: Tavares, Marina Franco Maggi

1. Eletroforese capilar : Química analítica 2.
Cromatografia líquida de alta eficiência: Química
analítica I. T. II. Tavares, Marina Franco Maggi,
orientador.

543.0871 CDD

*“Técnicas Modernas de Separação e Análise
de Extratos Vegetais”*

FABIANA NOVAES FONSECA

*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 Ciências – Área: Química Analítica.*

Aprovada por:

Profa. Dra. MARINA FRANCO MAGGI TAVARES
IQ – USP
(Orientadora e Presidente)

Prof. Dr. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO
IQ – USP

Profa. Dra. CAROL HOLLINGWORTH COLLINS
IQ – UNICAMP

Profa. Dra. PIERINA SUELI BONATO
FCF RP – USP

Profa. Dra. ELFRIEDE MARIANNE BACCHI
FCF – USP

SÃO PAULO
16 DE JANEIRO 2002.

A Deus, Nosso Pai Criador, fonte eterna de amor e de luz.

Ao Mestre Jesus, por nos aceitar em seu rebanho
nos ensinando a caminhar para os braços do Pai.

Aos Bondosos Amigos do Plano Espiritual pelo acolhimento,
proteção e orientação em todos os passos da minha vida.

Ao meu Pai, José Elias da Fonseca, à minha Mãe, Eliana Novais Fonseca e à minha
Irmã, Maria Hemilia Fonseca, por todo o carinho, apoio, confiança, por me
compreenderem nesta fase de renúncia e por serem as luzes que Deus colocou no
meu caminho.

Ao Ivan, que chegou em uma hora muito importante da minha vida, me trazendo
amor, carinho, amizade e companheirismo.

À Profa. Dra. Marina F. M. Tavares, pela orientação, pelo carinho, pelo exemplo e por ter me dado a oportunidade de fazer parte do seu grupo, o que me possibilitou a realização deste grande sonho.

Ao Prof. Dr. Csaba Horváth dea Yale University por ter me aceitado em seu grupo e pela orientação nos experimentos de μ HPLC e CEC.

À Farma Service Indústria Farmacêutica, especialmente aos Senhores Nestor Pinto Neto e Levi Oliveira Junior, pelas amostras de extratos de camomila e pelo apoio a este trabalho.

Prof. Dr. Massuo Jorge Kato do Instituto de Química da Universidade de São Paulo por ter participado em cada etapa deste trabalho com suas preciosas críticas e sugestões.

Ao Senhor Langerton Neves da Silva e sua "Caravana do Arco-íris", à Senhora Ombretta Gori Sacco, aos Senhores Carlos Toschi Neto e Sebastião Rosa e aos funcionários e voluntários da Fazenda SEARA da Federação Espírita do Estado de São Paulo, por acreditarem neste sonho e pelo mutirão no plantio e colheita da camomila usada no preparo do extrato metanólico.

Aos Colegas do Lace, Alessandra, Clóvis, Bete Alves, Beth Lima, Edgar, Dona Fátima, Fernando, Gustavo, Marcone, Maria Helena, Maria de Lourdes, Neide, Wilson e aos demais colegas dos laboratórios de Produtos Naturais (LPN), da Prof^a. Dr^a. Helena Feraz, do Prof. Dr. João Valdir Comasseto e do Prof. Dr. Vicente Emerenciano, pelos socorros prestados nas horas de necessidades.

Ao Chico e ao Jailson por continuarem com a perfeição no xerox.

Aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, especialmente à Adriana e ao Ângelo.

À Fapesp pela bolsa concedida.

A todos aqueles que de uma forma ou de outra contribuíram para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

<i>Lista de Abreviaturas e Símbolos</i>	<i>iv</i>
<i>Sumário de Figuras</i>	<i>vi</i>
<i>Sumário de Tabelas</i>	<i>x</i>
<i>Resumo</i>	<i>xiv</i>
<i>Summary</i>	<i>xv</i>
 INTRODUÇÃO GERAL	 001
 1ª Parte: "Obtenção do Material Vegetal"	 007
1- Introdução	008
2- Obtenção do Material Vegetal	015
3- Preparo das Amostras	018
 2ª Parte: "Desenvolvimento de Metodologias para a Análise da Fração Fenólica de Extratos de <u>Matricaria recutita</u> L."	 020
Capítulo 1: Eletroforese Capilar em Solução Livre (FSCE)	
1- Introdução	021
2- Parte Experimental	034
3- Resultados e Discussões	037
4- Conclusões	064
Capítulo 2: Cromatografia Eletrocínética Micelar (MEKC)	
1- Introdução	065
2- Parte Experimental	074
3- Resultados e Discussões	077
4- Conclusões	098
Capítulo 3: Extração em Fase Sólida (SPE)	
1- Introdução	099
2- Parte Experimental	103

3- Resultados e Discussões	111
4- Conclusões	135
Capítulo 4: Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)	136
1- Introdução	
2- Parte Experimental	139
3- Resultados e Discussões	143
4- Conclusões	150
Capítulo 5: Empacotamento de Colunas Capilares	
1- Introdução	151
2- Parte Experimental	161
3- Resultados e Discussões	196
4- Conclusões	178
Capítulo 6: Cromatografia Líquida Capilar (μHPLC)	
1- Introdução	180
2- Parte Experimental	184
3- Resultados e Discussões	186
4- Conclusões	200
Capítulo 7: Eletrocromatografia Capilar (CEC)	
1- Introdução	201
2- Parte Experimental	215
3- Resultados e Discussões	219
4- Conclusões	256
Conclusões Gerais	258
3ª Parte: <i>“Proposta Metodológica para o Controle de Qualidade de Extratos de <u>Matricaria recutita</u> L. Baseada na Determinação de seus Teores de Apigenina Livre e Total</i>	267
Capítulo 1: Determinação da Concentração de Apigenina	
1- Introdução	268
2- Parte Experimental	274
3- Resultados e Discussões	277
4- Conclusões	287

Capítulo 2: Validação	
1- Introdução	288
2- Parte Experimental	292
3- Resultados e Discussões	295
4- Conclusões	296
Considerações Finais	297

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	Fator de separação	ExGlic	Extrato em propilenoglicol/glicerina/água
β	Razão entre v_{mc} e v_{aq}	ExEtOH	Extrato em etanol/água
β -CD	Ciclodextrina com cavidade tamanho β	FSCE	Eletroforese capilar em solução livre
λ	Comprimento de onda	H	Altura de pratos
$\bar{v}$	Volume parcial específico da micela	HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
μ_{eof}	Mobilidade do EOF	HPTLC	Cromatografia de alta eficiência em camada delgada
μ_{ef}	Mobilidade eletroforética	her	Herniarina
ζ	Potencial zeta	i. d.	Diâmetro interno
ACN	Acetonitrila	ITP	Isotacoforese
apg	Apigenina	kV	Quilovolt
apg-7-O-glic	Apigenina-7-O-glicosídeo	K	Coeficiente de distribuição
Ac clor	Ácido clorogênico	k'	Fator de retenção
Ac caf	Ácido cafêico	LLE	Extração líquido-líquido
CE	Eletroforese capilar	LC	Cromatografia líquida
CMC	Concentração micelar crítica	lut	Luteolina
CD	Ciclodextrina	lut-7-O-glic	Luteolina-7-O-glicosídeo
CEC	Eletrocromatografia capilar	LOD	Limite de detecção
CEC-OPT	Eletrocromatografia capilar em colunas abertas	LOQ	Limite de quantificação
CIEF	Eletroforese capilar por focalização isoelétrica	μ_{ef}	Mobilidade eletroforética
CGE	Eletroforese capilar em gel	MEKC	Cromatografia eletrocínética micelar
Csf	Concentração do surfactante	MEKC-CD	Cromatografia eletrocínética micelar com ciclodextrina
CV	Coeficiente de variação	MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido	MeOD	Metanol deuterado
EOF	Fluxo eletroosmótico	nar	Naringenina
E	Campo elétrico	N	Número de pratos
ExMeOH	Extrato em metanol e água	ODS	Octadecilsilica

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

psi	<i>Pressure per square inch</i>	V_{mc}	Volume das micelas
P.A.	Para análise	V_{aq}	Volume da fase aquosa
quer	Quercetina		
RMN 1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio		
RP	Fase reversa		
RP-18	Fase reversa a base de octadecilsilica		
RP-8	Fase reversa a base de octilsilica		
rut	Rutina		
Rs	Resolução		
SDS	Dodecilsulfato de sódio		
SPE	Extração em fase sólida		
S	Inclinação da curva de calibração		
S/N	Relação sinal/ruído		
SCX	Troca catiônica forte		
SAX	Troca aniônica forte		
THF	Tetrahidrofurano		
TBS	Tetraborato de sódio		
TLC	Cromatografia em camada delgada		
t_r	Tempo de retenção (cromatografia)		
t_0	Tempo zero (eletroforeze)		
t_m	Tempo de migração (eletroforeze)		
t_{mc}	Tempo de migração da micela		
UV	Ultravioleta		
umbel	Umbeliferona		
USP 24	<i>United States Pharmacopoeia</i> 24		
v/v	Volume por volume		
V_{eof}	Velocidade do EOF		

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 01:	Ilustração de um exemplar de <i>Matricaria recutita</i> L. Asteraceae e foto de um canteiro de <i>Matricaria recutita</i> pronta para ser colhida.	009
Figura 02:	Capítulos florais de <i>Matricaria recutita</i> L.	010
Figura 03:	Estruturas químicas das substâncias fenólicas estudadas neste trabalho.	014
Figura 04:	Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.	022
Figura 05:	Representação esquemática da estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida e de uma dupla camada elétrica.	025
Figura 06:	Representação esquemática da migração de analitos em CE.	026
Figura 07:	Perfil de velocidade do EOF.	027
Figura 08:	Testes de modalidades de injeção em FSCE.	038
Figura 09:	Efeito da variação do pH e da concentração do tampão em FSCE.	040
Figura 10:	Eletroferogramas ilustrando o efeito da temperatura e da voltagem em FSCE.	042
Figura 11:	Gráficos da mobilidade eletroforética x temperatura em FSCE	047
Figura 12:	Eletroferograma da condição otimizada em FSCE	050
Figura 13:	Ajuste da relação entre a concentração da amostra e tempo de injeção.	052
Figura 14:	Análise dos extratos metanólico, glicólico e etanólico em FSCE.	056
Figura 15:	Spikes no ExMeOH em FSCE.	059
Figura 16:	Spikes no ExGlic em FSCE.	061
Figura 17:	Spikes no ExEtOH em FSCE.	063
Figura 18:	Representação esquemática de um processo separativo em MEKC.	066
Figura 19:	Intervalo de eluição em MEKC.	067
Figura 20:	Ilustração esquemática de uma separação por MEKC-CD.	071
Figura 21:	Efeito da concentração do tampão e micelas em MEKC (ExGlic)	079.
Figura 22:	Efeito da adição de agentes modificadores MEKC I.	081
Figura 23:	Efeito da adição de agentes modificadores em MEKC II.	082
Figura 24:	Efeito da adição de agentes modificadores em MEKC III.	083
Figura 25:	Estudo de Eletrólitos: Efeito do tampão x micelas x aditivos em MEKC.	089
Figura 26:	Análise dos Compostos Fenólicos nas Condições Otimizadas em MEKC.	091
Figura 27:	Análise dos extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico nas condições otimizadas em MEKC.	093
Figura 28:	Spikes no ExMeOH em MEKC.	095
Figura 29:	Spikes no ExGlic em MEKC.	096
Figura 30:	Spikes no ExEtOH em MEKC.	097
Figura 31:	Ilustração esquemática de uma sequência de eliminação de interferentes por SPE.	100

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 32:	Ilustração esquemática dos dois processos estudados para a extração da fração fenólica de extratos de camomila em cartuchos com ODS.	105
Figura 33:	Ilustração esquemática da limpeza dos extratos metanólico e glicólico usando cartuchos Oasis HLB (testes de porcentagem de MeOH em H ₂ O).	108
Figura 34:	Desenho esquemático ilustrando a limpeza dos extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico em HLB.	110
Figura 35:	Cromatogramas mostrando a otimização da porcentagem de MeOH em H ₂ O na pré-purificação de extrato metanólico (cartuchos ODS).	111
Figura 36:	Cromatogramas ilustrando a otimização do volume de MeOH 70% necessário para a extração da apigenina em cartuchos ODS.	115
Figura 37:	otimização da porcentagem de MeOH em H ₂ O na pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico de camomila (cartuchos ODS).	117
Figura 38:	Cromatograma da fração aquosa usada para a retirada dos interferentes durante o processo de pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico de camomila (cartuchos ODS).	118
Figura 39:	Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato metanólico com cartuchos HLB.	120
Figura 40:	Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato metanólico ácido com cartuchos HLB.	122
Figura 41:	Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato glicólico com cartuchos HLB.	125
Figura 42:	Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato glicólico ácido com cartuchos HLB.	127
Figura 43:	Eletroferogramas das frações do extrato metanólico coletadas durante os experimento de limpeza do com cartuchos HLB.	129
Figura 44:	Eletroferogramas das frações do extrato etanólico coletadas durante os experimento de limpeza com cartuchos HLB.	130
Figura 45:	Eletroferogramas das frações do extrato glicólico coletadas durante os experimento de limpeza com cartuchos HLB.	131
Figura 46:	Espectro de RMN ¹ H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato metanólico, em cartuchos HLB. MeOD.	132
Figura 47:	Espectro de RMN ¹ H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato etanólico, em cartuchos HLB. MeOD.	133
Figura 48:	Espectro de RMN ¹ H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato glicólico, em cartuchos HLB. MeOD.	134

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 49:	Cromatogramas obtidos com os gradientes testados em HPLC, usando Purospher RP18.	144
Figura 50:	Cromatogramas obtidos com variação da velocidade do fluxo em HPLC.	145
Figura 51:	Cromatogramas obtidos com a variação do tipo e comprimento da coluna em HPLC.	146
Figura 52:	Cromatogramas ilustrando a variação do gradiente de eluição em HPLC.	146
Figura 53:	Análise das substâncias fenólicas na condição otimizada de HPLC.	148
Figura 54:	Identificação das substâncias analisadas nos extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico por HPLC.	149
Figura 55:	Representação esquemática de uma coluna capilar.	155
Figura 56:	Representação esquemática dos passos envolvidos no processo de fabricação de uma coluna capilar.	158
Figura 57:	Montagem do “reservoir” para empacotamento de colunas capilares.	163
Figura 58:	Sistema de empacotamento do protocolo 1.	164
Figura 59:	Esquema de empacotamento do protocolo 2.	166
Figura 60:	Esquema de empacotamento do protocolo 3.	168
Figura 61:	Posições do “reservoir” durante o empacotamento.	171
Figura 62:	Posição do capilar dentro do “reservoir”.	172
Figura 63:	Aspectos da linha de base e corrente em colunas cujas fritas do inlet e do outlet não estão completamente sinterizadas.	176
Figura 64:	Cromatogramas dos testes de desempenho de colunas empacotadas com Spherisorb.	178
Figura 65:	Ilustração esquemática de um cromatógrafo líquido adaptado para experimentos em cromatografia líquida com colunas capilares.	182
Figura 66:	Efeito da variação da proporção de ACN em μ HPLC.	187
Figura 67:	Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ x a porcentagem de ACN em μ HPLC.	189
Figura 68:	Efeito variação da concentração do tampão em μ HPLC.	191
Figura 69:	Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ x concentração do tampão e tabela relacionando tempo de retenção, eficiência número de pratos em μ HPLC.	193
Figura 70:	Efeito variação do pH em μ HPLC.	194
Figura 71:	Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ x o pH da fase móvel em μ HPLC.	196
Figura 72:	Efeito da adição de um agente modificante à fase orgânica em μ HPLC.	197
Figura 73:	Representação esquemática de uma coluna capilar empacotada para CEC.	202
Figura 74:	Ilustração esquemática de um capilar empacotado mostrando os perfis de um fluxo parabólico em HPLC e um fluxo eletroosmótico em CEC.	203
Figura 75:	Representação esquemática de um equipamento para eletroforese capilar (CE) adaptado para eletrocromatografia capilar (CEC).	204

SUMÁRIO DE FIGURAS

Figura 76:	Esquema de separação em eletrocromatografia capilar de espécies neutras e carregadas.	211
Figura 77:	Efeito da variação da proporção de ACN em CEC (Spherisorb).	220
Figura 78:	Valores de mobilidade do EOF e corrente x a porcentagem de ACN em CEC.	221
Figura 79:	Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ contra a porcentagem de ACN na fase móvel em CEC.	234
Figura 80:	Eletroferograma da mistura de padrões em FSCE, nas condições de análise usada para CE	234
Figura 81:	Efeito da variação da concentração do tampão em CEC (Spherisorb).	226
Figura 82:	Valores de mobilidade do EOF e corrente x a concentração do tampão em CEC (Spherisorb).	228
Figura 83:	Eletrocromatogramas ilustrando o efeito da temperatura e da voltagem na separação das substâncias fenólicas avaliadas em CEC (Spherisorb).	229
Figura 84:	Efeito da variação da proporção de ACN na fase móvel em CEC (SCX/C18).	236
Figura 85:	Gráfico dos valores de mobilidade de EOF e x a porcentagem de ACN em CEC (SCX/C18).	238
Figura 86:	Valores de log natural de k' x a porcentagem de ACN m CEC (SCX/C18).	240
Figura 87:	Efeito da variação da voltagem em CEC (SCX/C18).	241
Figura 88:	Análise das substâncias fenólicas na condição otimizada em CEC (SCX/C18).	244
Figura 89:	Identificação das substâncias analisadas no extrato metanólico da camomila em CEC (SCX/C18).	246
Figura 90:	Identificação das substâncias analisadas no extrato glicólico da camomila em CEC (SCX/C18).	247
Figura 91:	Identificação das substâncias analisadas no extrato etanólico de camomila em CEC (SCX/C18)	248
Figura 92:	Cromatogramas, eletroferogramas e eletrocromatogramas otimizados, mostrando a separação das substâncias fenólicas nas 5 técnicas estudadas.	263
Figura 93:	Apigenina e seus glicosídeos isolados de <i>Matricaria recutita</i> L.	270
Figura 94:	Eletroferograma do extrato metanólico antes e depois da hidrólise.	278
Figura 95:	Eletroferograma do extrato glicólico antes e depois da hidrólise.	280
Figura 96:	Eletroferograma do extrato etanólico antes e depois da hidrólise.	281
Figura 97:	Curva de calibração para apigenina em FSCE.	283
Figura 98:	Exemplo do cálculo da concentração de apigenina livre para o extrato metanólico.	286
Figura 99:	Exemplo do cálculo da concentração de apigenina livre para o extrato metanólico hidrolizado.	286

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 01:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 25°C, +25kV.	041
Tabela 02:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 11, 25°C, +25kV.	041
Tabela 03:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 15°C, +20kV.	043
Tabela 04:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 15°C, +25kV.	043
Tabela 05:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 15°C, +30kV.	044
Tabela 06:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 25°C, +20kV.	044
Tabela 07:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 25°C, +30kV.	045
Tabela 08:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 45°C, +20kV.	045
Tabela 09:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 45°C, +25kV.	046
Tabela 10:	Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, 45°C, +30kV.	046
Tabela 11:	Tabela relacionando tempo de migração, eficiência e altura de prato em FSCE.	048
Tabela 12:	Avaliação da reprodutibilidade do tempo de migração e área do pico da apigenina durante os experimentos de condicionamento do capilar.	054
Tabela 13:	Dados eletrocromatográficos obtidos nos testes de performance de colunas para CEC	177
Tabela 14:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 60:40. Spherisorb ODS em µHPLC.	188
Tabela 15:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS em µHPLC.	188
Tabela 16:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 40:60. Spherisorb ODS em µHPLC.	189
Tabela 17:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 20mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS em µHPLC.	192
Tabela 18:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 70mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS em µHPLC.	192

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 19:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência e o número e pratos com a variação do pH em μ HPLC.	194
Tabela 20:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 3,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS em μ HPLC.	195
Tabela 21:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 4,6/ACN 50:50. Spherisorb ODS em μ HPLC.	195
Tabela 22:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência e número de pratos com o tipo de agente modificante da fase móvel.	197
Tabela 23:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN/THF 50:48:2. Spherisorb ODS em μ HPLC.	198
Tabela 24:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN/MeOH 50:48:2. Spherisorb ODS em μ HPLC.	198
Tabela 25:	Avaliação dos valores de t_0 , velocidade linear da fase móvel e tempo de retenção. Spherisorb ODS em μ HPLC.	199
Tabela 26:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 40:60. Spherisorb ODS CEC.	221
Tabela 27:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	222
Tabela 28:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 60:40. Spherisorb ODS CEC.	222
Tabela 29:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência, e número de pratos com a porcentagem de ACN. Spherisorb ODS CEC.	223
Tabela 30:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência, e número de pratos com a concentração do tampão. Spherisorb ODS CEC.	226
Tabela 31:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 20mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	227
Tabela 32:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 70mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	227
Tabela 33:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	230
Tabela 34:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	230
Tabela 35:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	231
Tabela 36:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	231

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 37:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	232
Tabela 38:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	232
Tabela 39:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	233
Tabela 40:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Spherisorb ODS CEC.	233
Tabela 41:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência, e número de pratos com a voltagem e temperatura. Spherisorb ODS CEC.	234
Tabela 42:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 40:60. SCX/C18 CEC.	237
Tabela 43:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. SCX/C18 CEC.	237
Tabela 44:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 60:40. SCX/C18 CEC.	238
Tabela 45:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência, e número de pratos com a porcentagem de ACN. SCX/C18 CEC.	240
Tabela 46:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. SCX/C18 CEC.	242
Tabela 47:	Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH ₂ PO ₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. SCX/C18 CEC.	242
Tabela 48:	Tabela relacionando tempo de retenção, eficiência, e a altura dos picos referentes à umbeliferona	243
Tabela 49:	Avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade dos tempos e velocidade do EOF em Spherisorb ODS 1.	250
Tabela 50:	Avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade dos tempos e velocidade do EOF em SCX/C18.	253
Tabela 51:	Dados de repetibilidade dos tempos de retenção, valores de área e altura em SCX/C18 CEC.	255
Tabela 52:	Levantamento bibliográfico das técnicas de análise usadas para extratos de camomila.	261
Tabela 53:	Tabela comparativa dos parâmetros usados para a comparação das técnicas estudadas.	265
Tabela 54:	Tabela relacionando a média dos valores de área do pico da Apigenina no processo hidrolítico do extrato metanólico.	277

SUMÁRIO DE TABELAS

Tabela 55:	Dados relacionando os valores de área para o cálculo da curva de calibração em FSCE.	282
Tabela 56:	Dados de linearidade, limites de detecção e quantificação para apígenina em FSCE.	283
Tabela 57:	Concentração de apigenina livre em extratos metanólico, glicólico e etanólico de camomila.	284
Tabela 58:	Resultados dos cálculos de concentração de apigenina total nas três replicatas do extrato metanólico, nos extratos glicólico e etanólico de camomila.	285
Tabela 59:	Esquema de diluição para o preparo das amostras para o teste de exatidão.	294
Tabela 60:	Teste de recuperação para a verificação da exatidão do método proposto.	295
Tabela 61:	Parâmetros estatísticos para a determinação da precisão do método.	296

RESUMO

O uso das plantas medicinais confunde-se com a história do ser vivente. Desde a idade da pedra até meados do século XX elas constituíram a principal fonte medicamentosa para a nossa sociedade. Hoje o mercado de fitoterápicos e fitocosméticos vem movimentando bilhões de dólares a cada ano. Apesar de possuir representantes de cerca de 70% de toda a flora mundial, historicamente o Brasil não apresenta tradição científica no uso de medicamentos vegetais, sendo a fitoterapia praticada principalmente por caboclos, curandeiros e xamãs. Apenas recentemente, com a “biopirataria” e com o crescimento constante do interesse de grandes multinacionais na Amazônia e Mata Atlântica é que está se observando uma movimentação nacional no sentido da legalização e controle de fitoterápicos e da flora Nacional. Neste contexto o Governo Brasileiro formulou uma Resolução em Fevereiro de 2000, regulamentando a produção de fitoterápicos no País, a qual preconiza o controle de qualidade, tanto da matéria-prima quanto do produto acabado.

O presente trabalho propõe metodologias para análise de compostos fenólicos (cumarinas, fenilpropanóides e flavonóides) em extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico de camomila (*Matricaria recutita* L.) através das técnicas de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia líquida capilar (μ HPLC), eletroforese capilar de zona livre (FSCE), cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) e eletrocromatografia capilar (CEC). O desempenho de cada técnica foi avaliado comparativamente em termos de disponibilidade e tipo de coluna, número de pratos, fator de retenção, seletividade, resolução, tempo e custo de análise.

Um estudo de pré-purificação dos extratos foi feito utilizando extração em fase sólida (ODS e HLB) e RMN ^1H para acompanhamento das substâncias invisíveis no UV. Propõe-se ainda um protocolo para empacotamento de colunas capilares para μ HPLC e CEC. Os extratos foram doseados quanto ao teor de apigenina livre e total, utilizando metodologia validada segundo a USP 24.

SUMMARY

The use of medicinal plants for the cure of ailments is as old as mankind. From the Stone Ages throughout the first part of last century, they were the main sources of medicines for our society. Today, the commercial markets are investing billions of dollars every year into the research and development of medicinal plants. Despite having about 70% of the whole world flora, historically Brazil does not have a scientific tradition in the use of herbal medicines. Until very recently, mainly mestizos, healers and xamãs have practiced phytotherapy. But now, with the growth of the interest of pharmaceutical companies in the Amazonian and Atlantic rain forests, there has been a national movement in the way of legalization and control of the National flora. In this context, the Brazilian Government formulated a resolution in February 2000, regulating the production of phytomedicines in this country, which requires the quality control of such products.

The present work proposes methodologies for the analysis of the phenolic substances (coumarins, phenylpropanoids and flavonoids) present in methanolic, glycolic and ethanolic extracts of chamomile (*Matricaria recutita* L.) by the use of High Performance Liquid Chromatography (HPLC), micro Liquid Chromatography (μ HPLC), Free Solution Capillary Electrophoresis (FSCE), Micellar Electrokinetic Chromatography (MEKC) and Capillary Electrochromatography (CEC). These techniques were evaluated comparatively in terms of column performance, plate number, retention factor, selectivity, resolution, time and analysis cost.

Pre-purification studies using Solid Phase Extraction (SPE) cartridges (ODS and HLB Oassis) were also carried out and the collected fractions were analyzed by FSCE and RMN 1H. This latter technique was applied in order to monitor the presence of fat acids on the eluates.

A packing procedure for micro columns to use in μ HPLC and in CEC is also proposed.

Methanolic, glycolic and ethanolic extracts of *Matricaria recutita* L. were standardized relatively to the total apigenin contents and the CE methodology was thoroughly validated following the *United States Pharmacopoea* 24 protocol.

Introdução Geral

O uso dos vegetais, minerais e animais como alimento, medicamento ou cosmético, perde-se com a história do ser vivo, e hoje pode-se dizer que o hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais foi uma das primeiras manifestações do esforço do ser humano para compreender e utilizar a natureza. Essa prática, entretanto, caiu no esquecimento na Europa e nos EUA, quando aconteceu o advento da indústria farmacêutica na década de 40, a qual foi propulsionada pelo descobrimento da penicilina¹. A partir desta época a “fitoterapia” passou a ser praticada quase que exclusivamente pela população de baixa renda, sem condições financeiras para a aquisição dos novos medicamentos presentes no mercado.

Desde o início da década de 80, a população ocidental voltou novamente a prestar atenção nos produtos de origem vegetal e, atualmente, o mercado dos fitoterápicos chega a movimentar bilhões de dólares americanos por ano. Em 1996, o mercado mundial destes produtos girou em cerca de USD 14 bilhões, sendo a Europa o principal consumidor²; já em 1999, somente o mercado cosmético movimentou cerca de USD 12,7 milhões, apresentando um crescimento de cerca de 41% desde 1995³. A previsão para o ano de 2002 é que o mercado deste segmento chegue a USD 21 bilhões.

Todavia, apesar do interesse pelas plantas medicinais ter aumentado consideravelmente nas duas últimas décadas, a composição química das espécies vegetais, especialmente das plantas encontradas nas florestas tropicais, ainda está longe de ser descrita em sua totalidade. Além da enorme quantidade de constituintes naturais a serem isolados e estudados, do ponto de vista químico, uma grande quantidade de compostos com estrutura química determinada ainda não foi estudada, quanto às atividades biológicas, seja em relação às funções para a própria espécie vegetal, seja quanto às potencialidades farmacológicas⁴.

¹ P. Braquet, D. Hosford, J. Ethnopharmacol. 32 (1991) 135.

² S. H. Ferreira (Ed.), Medicamentos a partir de Plantas Medicinais no Brasil, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, 1998.

³ J. Vollhardt, M. Redmond, D. Fielder, Proceedings of the 21st IFSCC Congress, Berlin 2000.

⁴ W. C. Evans (Ed.), Trease and Evans' Pharmacognosy, W.B. Saunders Inc, New York, 1996.

A obtenção de medicamentos à base de plantas envolve a separação da fração medicinal de um tecido vegetal da matriz inativa e/ou inerte, através do uso de solventes seletivos, adotando um procedimento padrão. Os fitoterápicos e os fitocosméticos são produzidos a partir de plantas inteiras ou segmentadas, as quais podem estar secas, frescas ou preservadas de alguma outra forma. O processo de obtenção da fração ativa destes vegetais pode ser feito através da extração, destilação, dentre outras, e caracteristicamente, as substâncias ativas são retiradas da matriz vegetal juntamente com outros constituintes químicos ali presentes⁵.

Levando em consideração as formas farmacêuticas obtidas através da extração, estas podem ser classificadas em: decocto, infusão, tinturas e extratos fluidos, semi-sólidos e secos. Os decoctos são obtidos através do processo de decocção, as infusões através da infusão⁶ e as tinturas e extratos através de dois processos extrativos distintos, a percolação ou a maceração^{7,8}.

As definições dos processos extrativos variam nas diversas Farmacopéias existentes. Neste texto, tais definições foram extraídas das Farmacopéias Brasileiras 1ª a 3ª ed.⁶.

De acordo com a nomenclatura oficial farmacêutica, existem três tipos distintos de extratos de acordo com a sua constituição:

- 1- Extrato fluído ou líquido, onde 1 cm³ de solvente corresponde a 1g da planta seca ao ar;
- 2- Extratos semi-sólidos ou firmes, os quais possuem consistência de massa pilular e que, dessecados a 110° C, perdem de 15 a 20 por cento de seu peso;
- 3- Extratos secos ou pulverulentos, os quais se apresentam sob a forma de pó e não perdem, a 110° C, mais de 4 por cento de seu peso.

Na prática farmacêutica, esta nomenclatura é seguida à regra, entretanto, em alguns segmentos da cosmetologia, habituou-se a chamar de “extrato” qualquer forma extrativa em que se empregue a maceração ou a percolação. Uma vez que os processos extrativos aplicados neste trabalho não seguiram estas regras

⁵ P. H. List, P. C. Schmidt, *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press, Boca Raton, 2000, Cap. 1.

⁶ Farmacopéia Brasileira 1 (1927) a 3 (1971), Organização Andrei Editora S.A, São Paulo.

farmacopêicas, estes serão chamados simplesmente de “extratos” sem levar em consideração o processo pelo qual eles foram obtidos.

Os agentes extratores usados no preparo dos extratos vegetais devem ser eficientes na dissolução dos constituintes terapêuticos desejados, a fim de separá-los dos demais constituintes químicos ali presentes. Para isso, vários tipos de agentes extratores podem ser usados no preparo tanto dos extratos fitocosméticos quanto dos fitoterápicos. Os mais comuns deles estão listados abaixo:

Extratos Aquosos

Este tipo de extrato utiliza a água como solvente extrator. Estes são frágeis e bastante sensíveis à proliferação da população bacteriana e fúngica, sendo necessário o uso de conservantes para a manutenção de sua integridade. Sua compatibilidade com as diferentes formas cosméticas geralmente é boa, podendo também ser incorporados a veículos oleosos através de microemulsões⁷.

Extratos Alcoólicos

Os extratos alcoólicos são quase sempre hidro-alcoólicos, pois contêm quantidades variáveis de água. No caso, a água é adicionada a fim de aumentar a solubilidade dos princípios ativos desejados. Em alguns casos bem específicos, onde a solubilidade destes princípios se dá somente em etanol, usa-se etanol 96%.

A adição de extratos alcoólicos em preparações cosméticas é muito limitada devido à incompatibilidade deste solvente com certos tipos de emulsões^{5,7}.

Extratos Glicólicos e Hidro-glicólicos

Estes extratos possuem alta concentração de propilenoglicol, misturado à água em maior ou menor proporção. Uma das grandes vantagens deste tipo de extrato é sua ampla afinidade com formulações cosmiátricas, por possuir caráter emulsificante⁶.

Além da vantagem da fácil incorporação às formulações cosmiátricas, o propilenoglicol é um excelente agente umectante e desinfetante, além de inibir a fermentação e o crescimento de leveduras e ainda estabilizar vitaminas⁸.

⁷ J. Y. Vernin, I. Katz, B. Rochette, in: M. C. Martini, M. Seiller (Eds.), *Actifs & Additifs en Cosmétologie*, Technique & Documentation - Lavouzeier, Paris, 1992, p. 34.

⁸ Handbook of Pharmaceutical Excipients, American Pharmaceutical Association, Washington DC, 1986, p. 241.

Extratos Oleosos

Amplamente utilizados no passado, este tipo de extrato obtido, através do uso de óleos como solvente extrator, limita-se às plantas que necessitam de um solvente graxo, para a extração de glicerídeos, ácidos graxos, etc. Devido à natureza química destes constituintes, é necessário o uso de anti-oxidantes, além disso, do mesmo modo que os extratos aquosos, eles são bastante sensíveis ao ataque de patógenos, sendo necessária também a adição de conservantes⁷.

Tendo em vista a grande diversidade dos constituintes químicos presentes nas drogas e medicamentos vegetais e ainda a grande demanda destes produtos, torna-se necessário um aprimoramento contínuo das técnicas de análise para que possa ser feito então, de forma efetiva, o controle e o asseguramento da qualidade tanto dos fitoterápicos quanto dos fitocosméticos.

Atualmente a técnica usada para controlar a qualidade das matérias-primas e produtos acabados de origem vegetal, com maior citação nas Farmacopéias e Formulários Nacionais é, sem dúvida, a cromatografia em camada delgada (TLC), a qual é seguida pela cromatografia gasosa (GC) e pela espectroscopia de UV-vis, apesar de haver inúmeras publicações referentes à análise de metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).

Entretanto, a aplicação destas técnicas, tais como a cromatografia em papel, cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida em coluna e cromatografia gasosa, na separação e purificação de grande quantidade de compostos, é normalmente um procedimento que consome tempo razoável, podendo se tornar tedioso, especialmente quando envolver misturas complexas como extratos de plantas.

Desta forma, apesar do grande avanço das técnicas analíticas, principalmente no campo das micro-separações, o controle de qualidade de produtos vegetais ainda continua moroso. Talvez porque somente nesta última década, o mundo voltou a prestar atenção nestes produtos, ou talvez, ainda, porque sejam necessários maiores esforços no sentido de viabilizar a aplicação de técnicas analíticas modernas, tais como as técnicas de separações capilares, na análise de matrizes tão complexas.

O problema da qualidade dos extratos vegetais para uso terapêutico vem sendo apontado há muitos anos e, especialmente no Brasil, os poucos trabalhos publicados

afirmam uma má qualidade alarmante⁹. No caso de extratos com finalidades cosmiátricas, o problema da qualidade torna-se ainda mais evidente, pois o processo extrativo geralmente é feito com altas concentrações de propilenoglicol, misturado à água e álcool, no entanto, as referências bibliográficas dizem respeito apenas a extratos hidroalcolicos, possivelmente em razão da complexidade de tais produtos ou simplesmente, por sigilo industrial.

Tendo em vista a problemática da qualidade dos fitoterápicos no mercado nacional e, ainda, o grande enfoque das multinacionais na biodiversidade brasileira, o presente trabalho vem propor o estudo de novas técnicas analíticas tendo em vista avaliar a aplicação das mesmas no controle de qualidade de extratos vegetais, colaborando desta forma com a nova Resolução¹⁰ do Ministério da Saúde do Governo Brasileiro. Tal Resolução preconiza análises qualitativa e quantitativa na planta fresca ou seca usada como matéria-prima, bem como nas formas intermediárias (extratos, tinturas, etc.) e produtos acabados.

Este trabalho teve por objetivo específico avaliar a aplicação de técnicas analíticas de separação, especialmente técnicas capilares, no controle de qualidade de extratos metanólico, glicólico e etanólico de camomila (*Matricaria recutita* L.).

A camomila foi escolhida pois, do ponto de vista fitoquímico e farmacológico é uma das plantas mais bem estudadas, contando com mais de 100 componentes descritos na literatura e comprovada ação antiflogística, espasmolítica e fungicida. Dessa forma, foram selecionadas 11 substâncias oriundas do metabolismo fenólico da camomila.

As técnicas estudadas foram a eletroforese capilar em solução livre (FSCE), cromatografia eletrocínica micelar (MEKC), eletrocromatografia capilar (CEC), cromatografia líquida capilar (μ HPLC) e cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC); uma vez que as três últimas técnicas descritas fazem uso de colunas empacotadas com fase reversa, a qual apresenta incompatibilidade com certos componentes presentes nas matrizes vegetais, foi desenvolvido também um protocolo de pré-purificação da fração fenólica, usando extração em fase sólida (SPE).

⁹ M. G. I. Brandão, N. Freire, C. D. V. Soares, Cad. Saúde Pública. 14 (1998) 613.

¹⁰ Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução - RDC N° 17, de 24 de Fevereiro de 2000.

Uma vez que a presença e a concentração dos constituintes químicos presentes nos extratos podem variar de acordo com o tipo do veículo extrator, foram usados três tipos diferentes de extratos de camomila: extrato metanólico (ExMeOH), glicólico (ExGlic) e etanólico (ExEtOH). O primeiro veículo extrator foi escolhido por possuir melhor seletividade na extração da fração de interesse. Já o extrato glicólico, o qual é feito com uma mistura de água, propilenoglicol, glicerina e álcool, foi usado porque representa um extrato típico para formulações de uso externo, e por fim o extrato etanólico por ser usado internamente.

Esta tese foi dividida em três partes. A primeira discute a química e a farmacologia dos extratos de camomila, descrevendo ainda os procedimentos de plantio, cultivo e beneficiamento das flores de camomila usadas no preparo do extrato metanólico.

A segunda parte trata do desenvolvimento de metodologias analíticas qualitativas para a análise das substâncias escolhidas para monitorar a qualidade de extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico de camomila. Esta parte foi dividida em 7 capítulos independentes, cada qual tratando de uma técnica distinta; no final foi feita uma análise crítica das metodologias desenvolvidas de modo a eleger uma técnica a qual pudesse ser aplicada no controle de qualidade destes extratos.

A terceira parte propõe uma metodologia para o controle de qualidade baseado no teor de apigenina total presente nos extratos, a qual foi então validada, segundo o protocolo descrito pela United States Pharmacopoeia 24¹¹.

¹¹ United States Pharmacopoeia 24, United States Pharmaceutical Convention Inc., Rockville, MD, 2000.

1ª PARTE

Obtenção do Material Vegetal

1- INTRODUÇÃO

Espécies e Família

O nome “camomila” é usado para designar duas espécies vegetais diferentes, a romana ou inglesa (*Chamaemelum nobile* L. All.; sinonímia *Anthemis nobilis* L.), ou a alemã ou húngara (*Chamomila recutita* L. Rausch; sinonímia *Matricaria chamomila* L. e mais recentemente *Matricaria recutita* L.). Além dessas espécies existem várias outras dos mesmos gêneros também usadas com finalidades medicinais, sendo todas elas pertencentes à família Asteraceae (Compositae) ¹. A espécie utilizada nesta tese foi a *Matricaria recutita* L (camomila alemã ou húngara), apresentada na Figura 1.

Descrição

A *Matricaria recutita* é uma planta herbácea anual, glabra, com muito ramos desde a base, ascendente - difusa, de 20 a 40 centímetros de altura; folhas geralmente bipinatissectas de lacínias linear - filiformes; capítulos terminais, heterogâmicos (Figura 2). Cada capítulo está rodeado de um involúcro triplo de brácteas oblongas, verdes no meio e hialino - escariosas nas margens, receptáculo oco, primeiro semiesférico depois cônico, nu, sem brácteas interflorais (distinção da camomila romana); flores marginais femininas liguladas, de lígulas brancas, tridentadas, com quatro nervuras e arqueadas para baixo; flores do disco mais numerosas, hermafroditas, amarelas, cilíndricas, com um estilete saliente e dois estigmas curvos; cinco estames com as anteras unidas; flores tubulosas pentadentadas, menos vezes, quatro. Cheiro aromático, agradável; sabor acre e amargo².

As autenticações macro e microscópica podem ser feitas seguindo as orientações das Farmacopéias Européia ³ e Britânica de 1988⁴.

¹ N. G. Bisset (Ed.), Herbal Drugs and Phytopharmaceuticals. A Handbook for Practice on a Scientific Basis, CRC-Press, London, 1994, p. 322.

² A. F. Costa, Farmacognosia v.I, 4ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, Portugal, p. 579.

³ European Pharmacopoeia, 2ª ed., Maisonneuve SZ, Saint Ruffine, 1980.

⁴ British Pharmacopoeia, Her Majesty's Stationery Office, London, 1988.

Figura 1: Ilustração de um exemplar de *Matricaria recutita* L. Asteraceae⁵ (à esquerda); Foto de um canteiro de *Matricaria recutita* pronta para ser colhida⁵ (à direita).

⁵ SELEÇÕES DO READER'S DIGEST, Segredos e Virtudes das Plantas Medicinais, SARL, Lisboa, 1983, p. 104.

Figura 2: Capítulos florais de *Matricaria recutita* L. A) Capítulo floral com as língulas das flores marginais estendidas horizontalmente. B) Representação esquemática de um capítulo floral já velho cortado longitudinalmente, com algumas flores tubulares².

Origem

É uma planta nativa do Sul e Leste Europeu e Oeste Asiático, porém hoje ela se espalhou por toda a Europa, América do Norte e Austrália. Sua produção comercial é geralmente feita na Argentina, Egito, Bulgária, Hungria, Espanha, República Tcheca e Alemanha¹ e no Brasil, onde o cultivo é feito principalmente no estado do Paraná.

Parte Utilizada

Segundo a *Brithish Herbal Pharmacopoeia*, a droga Matricaria é obtida a partir das flores da espécie *Matricaria recutita* L. (Asteraceae), as quais devem ser colhidas quando completamente maduras e expandidas⁶.

⁶ British Herbal Pharmacopoeia, British Herbal Medicine Association, Bournemouth, 1989, p. 139.

Constituintes Químicos

Do ponto de vista fitoquímico, esta é uma das espécies vegetais mais bem estudadas, possuindo mais de 100 componentes diferentes descritos⁷.

Sua fração lipofílica é composta basicamente por terpenos, possuindo de 0,3 a 1,5% de óleo essencial, o qual contém principalmente (-)- α -bisabolol, ($\pm$)- α -bisabolol, óxidos de bisabolona A, B e C, camazuleno (obtido através da saponificação, perda de água e descarboxilação da matricinina), espatulenol, *cis*- e *trans*-enieno diciclo éteres (espiroéteres, poliacetilenos). As principais lactonas sesquiterpênicas são a matricina, matricarina e a desacetilmatricarina.

Já a fração hidrofílica é composta basicamente por substâncias derivadas da rota do ácido chiquímico, tais como flavonóides, cumarinas e fenilpropanóides. Seus principais flavonóides são a apigenina, luteolina, quercetina, canferol, naringenina, rutina, quercitrina, apiina, apigenina- e luteolina-7-O-glicosídeos, e outros diversos 7-mono-, 7-di glicosídeos e 7-mono glicosídeos acetilados na porção do açúcar. As principais cumarinas são a herniarina e a umbeliferona e, os principais representantes dos fenilpropanóides são os ácidos clorogênico e cafêico^{8,9,10,11,12}.

Usos

O infuso e os extratos seco, hidro-alcoólico, e mais recentemente extratos obtidos com misturas de propilenoglicol/glicerina/etanol e água são geralmente usados sob a forma de pomadas, cremes, loções, xampus, cataplasmas, géis e, em alguns casos, como cápsulas e comprimidos.

⁷ Banco de dados da "Agricultural Research Service" contendo bases de dados sobre fitoquímica e etnobotânica [<http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke>]

⁸ J. A. Duke, CRC Handbook of Medicinal Herbs, CRC Press, Boca Raton, 1985, p. 501.

⁹ E. Luppold, Pharm. Unsere Zeit. 3 (1984) 65.

¹⁰ C. Redaelli, L. Formentini, J. Chromatogr. 209 (1981) 110. C. Redaelli, L. Formentini, Phytochemistry 19 (1980) 985. C. Redaelli, L. Formentini, Herba Hung. 3 (1980) 323. C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, Panta Med. 43 (1981) 412. F. Dondi, Y. D. Kahie, Anal. Chim. Acta 191 (1986) 261.

¹¹ H. Becker, J. Reichling, Dtsch. Apoth. Ztg. 121 (1981) 1285.

¹² E. Flaskamp, G. Nonnenmacher, O. Issac, Naturforschg. 36b (1981), 114. R. Carle, O. Isaac, Dtsch. Apoth. Ztg. 125 (Suppl. 1) (1985) 3.

Estes são indicados como antiflogísticos (antinflamatórios), bactericidas, bacteriostáticos, fungicidas, espasmolíticos, carminativos e estomáquicos^{1,6,13}. As atividades antiflogísticas, espasmolítica, bactericida e fungicida já estão bem documentadas em vários ensaios clínicos em humanos, tanto em animais quanto em humanos^{11,14,15,16,17}. Internamente, a camomila é usada para desordens do trato gastro-intestinal (gastrite, enterite, colite, flatulências) e como antiespasmódico¹⁶. Externamente é usada em casos que afetam a pele e as mucosas, tais como inflamações e eritrema⁶.

O efeito antiflogístico foi primeiramente atribuído à fração lipofílica da planta. Vários estudos mostraram que o (-)- α -bisabolol e em menor extensão os óxidos de bisabolona A, B e C e os enieno-diciclo éteres, possuem marcante ação anti-inflamatória^{9, 14,18}.

Entretanto, observando que as preparações mais comuns obtidas a partir das flores de camomila (extratos hidroalcoólicos e infusos) continham essencialmente a fração hidrofílica, e que esta, por sua vez, apresentava baixos teores de substâncias lipofílicas tais como (-)- α -bisabolol e camazuleno, Della Loggia e colaboradores¹⁹ testaram a ação antiinflamatória das frações hidrofílica e lipofílica extraída das flores secas e de vários flavonóides purificados. Os autores observaram que a primeira fração apresentou maior ação antiinflamatória que a segunda e que a apigenina e a luteolina possuíam ação semelhante à da indometacina¹⁹. Além disso, considerando que a fração flavonoídica chega a perfazer 24% do extrato total contra 7% da fração lipofílica, foi deduzido que a atividade antiinflamatória atribuída à planta seja devida principalmente à presença dos flavonóides, ao contrário do que se acreditava^{19,20}.

¹³ M. Repcak, B. Smajda, Biol. Plantar. 6 (1980) 420.

¹⁴ O. Isaac, Dtsch. Apoth. Ztg. 120 (1980) 567.

¹⁵ A. Dettler, Pharm. Ztg. 126 (1981) 1140.

¹⁶ H. B. Foster, H. Niklas, S. Lutz, Planta Med. 40 (1980) 309.

¹⁷ R. Carle, O. Isaac, Phytother. 8 (1987) 67.

¹⁸ A. M. Fleischner, Cosmet. Toiletries 100 (1985) 45. U. Achteratk-Tuckermann, D. Kunde, Planta Med. 39 (1980) 39. V. Jakovlev, O. Isaac, Planta Med. 2 (1979) 125.

¹⁹ R. Della Loggia, A. Tubaro, P. Dri, C. Zilli, P. Del Negro, Prog. Clin. Biol. Res. 213 (1986) 481.

²⁰ A. Tubaro, C. Zilli, C. Redaelli, R. Della Loggia, Planta Med. 51 (1985) 359.

Reações alérgicas de contato a flores de camomila já foram relatadas, principalmente no globo ocular^{21,22}. A cumarina herniarina tem sido apontada como um dos possíveis alergen²³.

Escolha das Substâncias de Referência

A escolha das substâncias presentes na fração fenólica de extratos de camomila a serem usadas como referência foi feita levando em consideração dois fatores: a atividade farmacológica (anti-inflamatória, anti-fúngica, anti radicais livres e espasmolítica) e a disponibilidade comercial.

Foram escolhidas onze substâncias: duas cumarinas, dois fenilpropanóides, quatro flavonas, dois flavonóis e uma flavanona conforme mostrado na **Figura 3**.

As cumarinas escolhidas foram a herniarina (her)^{24,25} e a umbeliferona (umbel)²⁶; os fenilpropanóides foram os ácidos caféico (ac caf)^{27,28} e clorogênico (ac clor)^{24,28,29}. Dentre as flavonas foram escolhidas a apigenina (apg), a luteolina (lut) e seus -7-O-glicosídeos (apg-7-O-glic e lut-7-O-glic); dentre os flavonóis, a quercetina (quer) e a rutina (rut), e por último, a naringenina (nar), representando a classe das flavanonas^{9-12,30}.

²¹ L. Bossuyt, L. Dooms-Goosen, Contact Dermatitis 31 (1994) 131. N. W. Jong, A. M. Vermeulen, R. G. Wijk, H. Groot, Allergy 53 (1998) 204.

²² W. G. Ketel, Contact Dermatitis 16 (1987) 50.

²³ E. Hegyu, M. Sarsunova, K. Traubnerova, Farm. Obz. 55 (1986) 29; CA 104, 146939 (1986).

²⁴ G. Paganga, N. Miller, R.C.A. Evans, Free Radic. Res. 30 (1999) 153.

²⁵ Y. Sasaki, H. Imanishi, T. Ohta, Y. Shirasu, Mutat. Res. 189 (1987) 313. B.N. Meyer, M.E. Wall, M.C. Wani, H.L. Taylor, J. Nat. Prod. 48 (1985) 952.

²⁶ M. Szalonta, P.G. Verzar, E. Florian, Parfuem. Kosmet. 58 (1977) 121. M. Williams, J.M. Cassady, J. Pharm. Sci. 65 (1976) 912.

²⁷ A.H. Conney, T. Lysz, T. Ferraro, T.F. Abidi, P.S. Manchand, J.D. Laskin, M.T. Huang, Adv. Enzyme Regul. 31 (1991) 385.

²⁸ R.M. Facino, M. Carini, G. Aldini, L. Saibene, P. Pietta, P. Mauri, Planta Med. 61 (1995) 510.

²⁹ E. Pelle, D. Maes, G.A. Padulo, E.K. Kim, W.P. Smith, Arch. Biochem. Biophys. 283 (1990) 234.

³⁰ D. Pathak, K. Pathak, A.K. Singla, Fitoterapia 57 (1991) 371. A. Saija, M. Scalese, M. Lansà, D. Marzullo, F. Bonina, F. Castelli, Free Rad. Biol. Med. 19 (1995) 481. M.D. Herrera, E. Marhuenda, Phytother. Res. 10 (1996) 523. B. Havsteen, Biochem. Pharmacol. 32 (1983) 1141. G. Sichel, C. Corsaro, M. Scalia, A.J. Di Bilio, P. Bonomo, F. Castelli, Free Rad. Biol. Med. 11 (1991) 1. B. Li, D. Birt, Pharm. Res. 13 (1996) 1710. J. V. Formica, W. Regelson, Food. Chem. Toxic. 33 (1995) 1061.

Cumarinas	Fenilpropanóides
<p>(1) herniarina R = Me (2) umbeliferona R = H</p>	<p>(3) ácido cafeeiro R₁ = R₂ = R₃ = OH (4) ácido clorogênico R₁ = O-glu-COOH R₂ = R₃ = OH</p>
Flavonóides
<p>(5) apigenina R₁ = H R₂ = H (7) luteolina R₁ = H R₂ = OH</p>	<p>Flavonas</p> <p>(6) apigenina-7-O-glicosídeo R₁ = glu R₂ = H (8) luteolina-7-O-glicosídeo R₁ = glu R₂ = OH</p>
<p>Flavonóis</p> <p>(9) quercetina R = H (10) rutina R = ramnosil-glicosídeo</p>	<p>Flavanona</p> <p>(11) naringenina</p>

Figura 3: Estruturas químicas das substâncias fenólicas estudadas neste trabalho.

2- OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Plantio

A fim de se obter flores de camomila de fonte confiável, o plantio destas foi feito na Fazenda S.E.A.R.A., no município de Jacupiranga, SP. As sementes foram adquiridas da Fazenda Demétria no município de Botucatu SP. Ambas as fazendas são praticantes da agricultura biodinâmica, não utilizando defensivos agrícolas, tampouco fertilizantes sintéticos. A correção do pH do solo foi feita com calcário; como fertilizante foi utilizado húmus de minhoca e, em alguns casos, esterco curtido de frango. Visando o controle de pragas, os canteiros foram feitos dentro de uma área cercada por arruda (*Ruta graveolens*) e cravo de defunto (*Tagetes minuta*), os quais são conhecidos pelas propriedades de afugentar insetos predadores. Como em várias situações estes não foram efetivos, utilizou-se a aspersão de calda de fumo (*Nicotiana tabacum*) sobre a cultura³¹. Entretanto, de um modo geral, não houveram grandes problemas com pragas, tampouco com ervas daninhas, as quais eram retiradas manualmente toda semana.

Para o plantio foram feitos quatro canteiros de 25 m de comprimento por 1 m de largura, os quais foram cobertos com plástico preto durante quatro dias, a fim de esterilizar o solo. Os canteiros foram então preparados com uma mistura contendo 10% de areia, 50% de húmus de minhoca e 50% de terra solta.

A semeadura da camomila, a qual deve ser feita durante o inverno, de preferência nos meses de Maio a Agosto³², foi feita no final do mês de Julho. Para isto 200 g de sementes (cada grama tem cerca de 10.000 sementes), com menos de 8 meses de idade³¹, foram diluídos em 10 partes de uma mistura de areia e terra 1:1 e distribuída em um canteiro de 25 m x 1 m, previamente umedecido. Esta mistura foi distribuídas com o auxílio de uma peneira, tomando-se cuidado para não sobrecarregar uma área específica do canteiro com muita semente. Depois disso, uma fina camada de terra foi distribuída sobre as sementes e o solo do canteiro foi compactado, com o auxílio de um rolo compressor de cimento.

³¹ M. R. Furlan, Cultivo das Plantas Medicinais, Coleção Agroindústria, SEBRAE, Cuiabá, 1998, p. 68.

³² M. C. Scheffer, *Matricaria chamomilla*, L.: Compositae, Fundação Caetano Munhoz da Rocha, Curitiba, 1989, p. 3.

Cerca de 3 semanas após o plantio, as sementes germinaram. A primeira colheita foi feita em meados de Setembro, quando as sumidades florais estavam completamente abertas, conforme a indicação da Brithish Herbal Pharmacopoeia⁶. No final do mesmo mês e em meados de Outubro, foi possível realizar outras duas coletas.

Colheita

A colheita foi feita manualmente, retirando apenas as sumidades florais, sem a presença de folhas e outras partes da planta. Procurou-se evitar a colheita em dias chuvosos e/ou muito úmidos. Em dias ensolarados, a colheita foi feita entre 8 e 12 horas. As flores colhidas eram levadas de hora em hora para a sala de secagem.

No Brasil, o cultivo de camomila é feito basicamente com a espécie alemã devido à sua melhor aclimação. O Estado do Paraná é hoje um dos maiores produtores desta espécie no País. Em um trabalho sobre a presença de princípios ativos em amostras comercializadas no Estado de Minas Gerais oriundas de cultivares brasileiros, foi verificado que só cerca da metade das amostras analisadas continham os compostos procurados³³. Matos e colaboradores³⁴ verificaram que a constituição do óleo essencial da camomila cultivada no Paraná era muito semelhante a amostras importadas, cultivadas segundo padrões europeus. Sendo assim, a ausência destas substâncias nas amostras comerciais foi atribuída à má qualidade dos processos de beneficiamento (colheita e secagem), bem como ao armazenamento inadequado.

³³ M. G. I. Brandão, N. Freire, C. D. V. Soares, Cad. Saúde Pública 14 (1998) 613.

³⁴ F. J. A. Matos, M. I. L. Machado, J. W. Alencar, A. A. Craveiro, J. Essent. Oil Res. 5 (1993) 337.

Atualmente existem vários trabalhos científicos sobre técnicas de cultivo desta espécie. Franz e colaboradores³⁵ estudaram a influência das condições climáticas naturais sobre a produção de óleo essencial em quatro diferentes áreas do continente Europeu (Turquia, Finlândia, Áustria e Alemanha) entre 1976 e 1984. Eles observaram que não houve nenhuma diferença qualitativa significativa. Entretanto, do ponto de vista quantitativo, os teores de farneseno e camazuleno presentes nos óleos essenciais obtidos a partir das espécies da Finlândia e Turquia eram menores que aqueles obtidos a partir das espécies alemãs. Já Holzi e Demuth³⁶ observaram que fatores ecológicos influenciaram apenas a composição do óleo essencial, enquanto que na fração fenólica (cumarinas e flavonóides), ocorreu apenas uma pequena variação.

Redaelli e colaboradores³⁷ observaram variações quantitativas na fração fenólica, principalmente na concentração de apigenina livre e total. Em um estudo envolvendo a análise de extratos obtidos a partir de flores frescas, submetidas ao líquido extrator imediatamente após a colheita, Schreiber e colaboradores³⁸ constataram a completa ausência de apigenina livre e uma grande quantidade de apigenina glicosilada. Segundo eles, isto explicaria o fato da grande variação dos teores dos flavonóides nos extratos analisados, sendo a presença da aglicona no extrato, atribuída a ação de enzimas hidrolíticas sobre os glicósidos. Entretanto, este resultado ainda gera controvérsias pois Carle e colaboradores³⁹ ao analisarem flores frescas, observaram a presença de apigenina livre.

Além de variáveis ecossistêmicas tais como local de plantio, Franz e colaboradores também avaliaram o efeito de luz e temperatura sobre cultivares de camomila⁴⁰. Neste estudo, os autores observaram que ambos os cultivares testados reagiram à variação da quantidade de horas de luz e da temperatura tanto no crescimento quanto na composição quantitativa dos óleos essenciais, entretanto do

³⁵ C. Franz, E. Mueller, H. Pelzmann, K. Hardh, S. Haelvae, A. Ceylan, *Acta Hort.* 188 (1986) 157.
³⁶ J. Holzi, G. Demuth, *Planta Med.* 27 (1975) 37.
³⁷ C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, *Planta Med.* 42 (1981) 288.
³⁸ A. Schreiber, R. Carle, E. Reinhard, *Planta Med.* 56 (1990) 179.
³⁹ R. Carle, B. Dölle, E. Reinhard, *Planta Med.* 55 (1989) 540.
⁴⁰ C. Franz, D. Fritz, F. J. Schorder, *Planta Med.* 27 (1975) 46.

ponto de vista qualitativo, não houveram diferenças significativas. Saleh⁴¹ também observou que a quantidade total de óleo essencial e camazuleno aumentava com o aumento da intensidade luminosa.

Secagem

As sumidades florais foram secas a peso constante através de um sistema de ar quente circulante, mantido a cerca de 40^o C. Dos quatro canteiros plantados, foi possível colher cerca de 10 kg de inflorescências seca.

Apesar do uso do ar circulante aquecido a 40^o C ser consagrado pela prática, Carle e colaboradores³⁹ observaram que temperaturas acima de 20^o C não devem ser usadas a fim de evitar a perda de compostos presentes no óleo essencial.

3 - Preparo das Amostras

Extrato Metanólico

A fim de se obter uma fração rica em substâncias fenólicas, o seguinte procedimento foi realizado: 16 g de capítulos florais secos foram extraídos em 400 mL de uma mistura de MeOH/H₂O 1:1, em banho ultrassônico durante 1 hora. Este procedimento foi repetido mais três vezes e o conjunto das frações recolhidas foi filtrado e evaporado à secura, sob vácuo. O resíduo foi ressuspensionado em 24 mL de MeOH e 10 mL desta solução foi diluída em 20 mL de água para se obter uma solução estoque. O restante foi novamente evaporado e depois liofilizado, a fim de se obter um extrato seco. Este extrato seco obtido guardado a -0^oC para análises futuras.

As amostras submetidas à análise foram preparadas pesando-se 5 g da solução estoque, a qual foi diluída com uma mistura de MeOH/H₂O 1:1, em balão volumétrico de 10 mL.

⁴¹ M. Saleh, *Planta Med.* 24 (1973) 337.

Extratos Glicólico e Etanólico

Os extratos glicólico e etanólico foram fornecidos pela indústria Farma Service Indústria Farmacêutica SA.

Entretanto, caso o leitor necessite uma outra forma de preparo de extratos, diferente da descrita para o extrato metanólico, um excelente modo de preparo, tanto do extrato fluido quanto do extrato mole, está descrito na Farmacopéia Brasileira 1ª ed.⁴².

⁴² Farmacopéia Brasileira 1 (1927) a 3 (1971), Organização Andrei Editora S.A, São Paulo.

2ª PARTE

Desenvolvimento de Metodologias para a Análise da Fração Fenólica de Extratos de Matricaria recutita L.

1- Introdução

1.1. Conceitos Gerais sobre Eletroforese Capilar (CE)

Eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico¹.

A eletroforese capilar é uma técnica relativamente nova, sendo idealizada por Hjertén² em 1967. Os primeiros trabalhos publicados datam da década de 70, entretanto, a primeira análise desenvolvida com sucesso, no que diz respeito a injeção e detecção em linha, foi publicada por Everaerts³ e seus colaboradores em 1979, sendo seguido por Jorgenson e Lucas em 1981⁴. Desde então, a eletroforese capilar tem se mostrado uma potente ferramenta analítica, em diversas áreas de aplicações tais como farmacêutica, química forense, análises clínicas e ambientais, etc⁵.

A década de 80 foi uma época de inovações na parte de detecção, sendo empregados pela primeira vez detectores de absorção óptica, no ultravioleta, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas e eletroquímicos⁶. O primeiro instrumento comercial foi introduzido no mercado em 1988 pela Bob Brownlee's Company (Microphoretics), utilizando detecção por fluorescência direta⁵.

Já a década de 90 foi marcada pelo o avanço dos *microchips*⁷ e da eletrocromatografia capilar, técnica mista entre a CE e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)⁸.

Um aspecto bastante importante da eletroforese capilar é a simplicidade da instrumentação (**Figura 4**). O sistema consiste em uma fonte de alta tensão, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (geralmente de platina), e um detector apropriado. A fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar. Esta, pode ser operada com tensão constante e/ou

¹ M. F. M. Tavares, Quim. Nova 19 (1996) 173

² S. Hjertén, J. Chromatogr. 374 (1985) 191.

³ F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, Th. P. E. M., J. Chromatogr. 69 (1979) 11.

⁴ J. W. Jorgenson, K. D. Lukacs, Anal. Chem. 53 (1981) 1298.

⁵ M. F. M. Tavares, V. L. McGuffin, Anal. Chem. 53 (1981) 1298; M. Piatak Jr., K. C. Luk, B. Williams, J. D. Lifson, Biotechniques 14 (1993) 70.

⁶ H. I. Issaq, Electrophoresis 21 (2000) 1921

⁷ G. J. M. Bruin, Electrophoresis 21 (2000) 3931.

⁸ K. D. Bartle, P. Myers, J. Chromatogr. A 916 (2001) 3.

corrente constante, com valores típicos de voltagem no intervalo de 5 - 30kV e corrente de 5 - 200 μ A. Todo o sistema fica incluso em uma caixa de acrílico a fim de proteger o operador contra a alta voltagem. A fonte de alta tensão é conectada através de eletrodos de platina a dois reservatórios contendo o eletrólito de corrida, nos quais também se encontram imersas as extremidades do capilar, preenchido com o eletrólito. Quando o potencial é aplicado, estabelece-se um campo elétrico ao longo do capilar, provocando a movimentação das espécies presentes. O registro do sinal do detector em função do tempo é chamado de eletroferograma¹.

Figura 4: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar⁹.

⁹ CdROM tutorial da Agilent Technologies para o equipamento HP^{3D}CE.

Uma das grandes versatilidades da eletroforese capilar é a possibilidade da utilização de uma ampla gama de detectores, pois, praticamente, todos aqueles usados na HPLC podem ser acoplados ao formato capilar da eletroforese. Tais detectores podem ser de absorção no UV-vis¹⁰, fluorescência e fluorescência induzida por laser¹¹, RMN¹², espectrometria de massas¹³, condutividade¹⁴, amperometria¹⁵, radioatividade¹⁶, índice de refração¹⁷, dicroísmo circular¹⁸ e Raman¹⁹.

A introdução da amostra é feita através do posicionamento de uma das extremidades do capilar dentro do recipiente contendo a mesma e pode ser praticada de três modos: hidrodinâmica (por pressão reduzida ou pressão), sifonagem e eletrocinética. A injeção hidrodinâmica é feita aplicando-se pressão pela introdução de um gás inerte ao reservatório contendo a amostra ou, ainda, pela aplicação de vácuo no reservatório que contém a solução tampão, transferindo um certo volume de amostra para dentro do capilar. A injeção por sifonagem é feita pelo deslocamento de líquido provocado pela diferença de altura dos reservatórios de amostra e tampão. A injeção eletrocinética, por sua vez, é feita pela aplicação de voltagem, geralmente entre 5 a 15kV, durante alguns segundos. Este método de injeção é discriminatório, uma vez que a amostra injetada dependerá da relação carga/massa dos solutos presentes, diferentemente do que é observado nas injeções hidrodinâmicas, onde ocorre uma simples transferência de volume.

1.2. Princípios Básicos

Como já foi dito, a eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis em um campo elétrico.

¹⁰ Q. Xue, E. S. Yeung, J. Chromatogr. B 667 (1996) 233.

¹¹ Y. Walbroehl, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 315 (1984) 135; M. Albin, R. Weinberger, E. Sapp, S. Moring, Anal. Chem. 63 (1991) 417.

¹² K. Albert, J. Chromatogr. A 703 (1995) 123.

¹³ D. Y. Chen, H. P. Swerdlow, H. R. Harke, J. Z. Zhang, N. J. Dovichi, J. Chromatogr. 559 (1991) 237.

¹⁴ M. A. Moseley, L. J. Deterding, K. B. tomer, J. W. Jorgenson, J. Chromatogr. 63 (1991) 109.

¹⁵ M. T. Ackermans, F. M. Everaerts, J. L. Beckers, J. Chromatogr. 593 (1991) 289.

¹⁶ X. Huang, R. N. Zare, S. Loss, A. G. Ewing, Anal. Chem. 63 (1991) 189.

¹⁷ K. D. Altría, C. F. Simpson, A. K. Bharing, A. E. Theovald, Electrophoresis 11 (1990) 732.

¹⁸ A. E. Bruno, B. Krattiger, F. Maystre, H. M. Widmer, Anal. Chem. 63 (1991) 2689.

¹⁹ P. L. Christensen, E. S. Yeung, Anal. Chem. 61 (1989) 1344.

Ânions (espécies negativamente carregadas) são atraídos para o ânodo (terminal positivo da fonte de alta tensão) enquanto que, cátions migram em direção ao cátodo, sendo em ambos os casos, a velocidade desta migração dependente do valor da proporção carga/massa dos analitos em questão. Íons pequenos migrarão mais rapidamente que íons maiores, quando estes possuírem mesma carga. Íons com cargas maiores migrarão mais rápido do que aqueles com cargas menores, ou seja, íons divalentes serão mais rápidos que um íon monovalente do mesmo tamanho. Os analitos iônicos são então separados devido as suas diferentes *mobilidades eletroforéticas*, sendo este um dos parâmetros mais importantes influenciando a separação. Já moléculas neutras não são influenciadas pelo campo elétrico²⁰.

Além dos solutos, o eletrólito também se move através do capilar sob a influência de um campo elétrico, fenômeno conhecido como *Fluxo Eletroosmótico* (EOF). No caso de capilares de sílica fundida, o EOF tem origem na dissociação das espécies ácidas da parede interna do capilar, pois quando esta entra em contato com o eletrólito de corrida ($\text{pH} \geq 2-3$), os silanóis ali presentes se dissociam parcialmente²¹.

Dessa forma, as cargas negativas da parede (**Figura 5A**) interna do capilar são neutralizadas por um excesso de íons positivos oriundos do eletrólito de corrida, atraídos à superfície da parede preferencialmente pela ação de forças eletrostáticas e/ou de coesão. Estas cargas negativas e positivas formam uma dupla camada elétrica na superfície do capilar a qual pode ser dividida em duas partes: uma interna, a qual é compacta e uma externa, a qual é difusa (**Figura 5B**). O modelo combinado de Gouy-Chapman-Stern-Grahame²² descreve a região imediatamente adjacente à superfície, como ocupada por camadas de moléculas de água orientadas e alguns íons, provavelmente desidratados, os quais são fortemente atraídos pela superfície do capilar. Os íons hidratados se aproximam da superfície a uma distância correspondente aos seus raios de hidratação. Estes íons são mais

²⁰ D. R. Baker, *Capillary Electrophoresis*, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, p.3

²¹ K. Altria, *Chromatographia Supplement*, 51 (2000) S-28.

²² A. J. Bard, L. R. Faulkner, *Eletrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, John Wiley & Sons, New York, 1980, Chapter 12.

fracamente ligados à superfície, e a interação é dependente das propriedades químicas dos íons. O plano definido pelo centro dos íons hidratados delimita a camada compacta da dupla camada elétrica. Devido a um movimento térmico randômico, alguns íons difundem, se afastando da superfície. A concentração de íons de carga oposta à superfície decresce com a distância e, eventualmente, se aproxima do valor da concentração dos íons na solução. Esta região é conhecida como a camada difusa da dupla camada elétrica¹.

Quando um campo elétrico é imposto tangencialmente à superfície, forças elétricas atuam nas cargas da camada difusa, causando um movimento unilateral de íons em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, gerando então o EOF. A distância na qual uma fração da camada difusa consegue escapar às forças de atração da superfície é caracterizada como o plano de cisalhamento, o qual delimita por sua vez a parte imóvel da região difusa da dupla camada elétrica.

Figura 5: A) Representação esquemática da estrutura química da superfície de um capilar de sílica fundida; b) Representação esquemática da dupla camada elétrica na interface entre a superfície do capilar e a solução¹.

O potencial desenvolvido no plano de cisalhamento é conhecido como o potencial eletrocinético ou potencial zeta ζ^1 . O EOF é proporcional ao potencial zeta, que se relaciona com a espessura da dupla camada elétrica, a qual por sua vez é inversamente proporcional a concentração do tampão de corrida²⁰.

1.3. Princípios da Separação

Como já foi dito, em CE os analitos são separados devido suas diferentes mobilidades eletroforéticas e tenderão a migrar em direção ao eletrodo que possui carga oposta. Ânions migrarão para o polo positivo, e caso não houvesse nenhum EOF, eles simplesmente não atravessariam o capilar e conseqüentemente não passariam pelo detetor. Entretanto, na grande maioria das vezes, a velocidade do EOF gerado é maior que a velocidade eletroforética dos ânions. Dessa forma, uma vez que os ânions são arrastados em direção ao polo positivo, eles se movimentarão com uma velocidade menor que a do EOF (**Figura 6**), os solutos neutros não serão influenciados pelo campo elétrico, migrando com a mesma velocidade do EOF, já os cátions migrarão em direção ao polo negativo, sob a influência tanto do EOF quanto do campo elétrico, apresentando assim velocidade maior que a do fluxo eletroosmótico¹⁹.

Figura 6: Representação esquemática da migração de analitos neutros (N), positivos (+) e negativos (-) com diferentes tamanhos em um capilar de sílica fundida⁹.

O uso do EOF em processos separativos apresenta várias vantagens. Uma vez que ele arrasta todos os solutos dentro do capilar, cátions e ânions podem ser separados em uma mesma análise onde íons com pequenas diferenças entre massa/carga podem ser separados em um tempo razoável de análise. Outro fator importante é o seu perfil laminar (**Figura 7**), o qual ao contrário do perfil radial de fluxos gerados por pressão, não contribui para o alargamento de bandas^{1,19,20}.

Figura 7: Perfil de velocidade em um A) fluxo laminar (obtido com o EOF) e em um B) fluxo radial (obtido com bombeamento).

O parâmetro fundamental que governa as separações em CE é a mobilidade eletroforética. Para soluções de eletrólitos compostos de um ácido ou base fracos, existem pelo menos duas espécies em equilíbrio, a molécula não ionizada (com mobilidade zero) e a base ou ácido conjugado (cada qual com seu valor particular de mobilidade). Assim, da mesma forma que íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica, o conceito de mobilidade eletroforética é utilizado para descrever a migração de eletrólitos fracos. Esta migração pode ser definida a grosso modo como sendo proporcional à densidade de carga do analito e está relacionada com a velocidade eletroforética (v_{ef}) e com o campo elétrico (E).

$$\mu_{ef} = v_{ef} / E \quad [1]$$

A velocidade eletroforética é definida como a razão da relação entre a distância do ponto de injeção até a janela de detecção (L_{det}) e o tempo de migração (t_m).

$$v_{ef} = L_{det} / t_m \quad [2]$$

A intensidade do campo elétrico é expressa pelo valor máximo do gradiente de potencial por unidade de comprimento (equação 3), onde V é a voltagem e L o comprimento total do capilar.

$$E = V / L \quad [3]$$

A migração de todas as substâncias em CE é também influenciada pelo EOF. A mobilidade observada de um analito (μ_{obs}) pode ser expressa como a soma da mobilidade eletroforética do analito (μ_{ef}) com a mobilidade do EOF (μ_{eof}).

$$\mu_{obs} = \mu_{eof} + \mu_{ef} \quad [4]$$

A mobilidade do EOF é constante e depende das propriedades da solução, como a constante dielétrica e a viscosidade^{1,20}. A velocidade do fluxo eletrosmótico pode ser experimentalmente calculada através da equação [5], a qual relaciona o tempo em que um soluto neutro (o qual migra com a velocidade do EOF (t_{nr})) leva para chegar ao ponto de detecção.

$$v_{eof} = L_{det} / t_{nr} \quad [5]$$

1.4. Parâmetros de Separação

Em CE a eficiência (N) pode ser expressa pelo número de pratos, onde D é o coeficiente de difusão do soluto:

$$N = \mu_{ef} V / 2D \quad [6]$$

Desta equação podemos verificar que quanto maior a voltagem aplicada, maior o número de pratos, incrementando a eficiência. Há entretanto, um limite para o aumento da voltagem, e este limite é a ineficiência da dissipação do calor oriundo

do efeito Joule²⁰. Este aquecimento por sua vez irá depender do diâmetro do capilar, da concentração do tampão e do campo elétrico aplicado.

Assim como em sistemas cromatográficos, a eficiência pode ser calculada experimentalmente através dos valores do tempo de migração (t_m) e da largura do pico medida na base (w)

$$N = 16 (t_m/w)^2 \quad [7]$$

Se a largura do pico for medida na sua meia altura ($w_{1/2}$) a equação [8] também pode ser usada.

$$N = 5.54 (t_m/w_{1/2})^2 \quad [8]$$

Em CE a seletividade (α) pode ser expressa como:

$$\alpha = \frac{t_2 - t_{nr}}{t_1 - t_{nr}} \quad [9]$$

onde t_2 e t_{nr} são os tempos de migração do último soluto e do marcador (soluto neutro) respectivamente.

Em qualquer problema analítico envolvendo separação, o objetivo fundamental é o de atingir a completa resolução (R_s) entre todos os componentes da mistura. Assim como nas técnicas cromatográficas a resolução entre as bandas de dois solutos adjacentes é definida pela diferença entre o tempo de migração (t), dividida pelo valor médio entre as larguras de base de cada banda (w), expressas nas mesmas unidades dos tempos de migração (equação [10]):

$$R_s = \frac{2(t_2 - t_1)}{w_2 + w_1} \quad [10]$$

Em CE, a resolução pode ainda ser expressa conforme a equação [11], onde $\Delta v/v_{\text{média}}$ é a diferença da velocidade relativa dos dois analitos em questão (equação [12])

$$R_s = \frac{1}{4} (N)^{1/2} \Delta v/v_{\text{média}} \quad [11]$$

$$\Delta v/v_{\text{média}} = \frac{\mu_2 - \mu_1}{\mu_{\text{média}} - \mu_{\text{EOF}}} \quad [12]$$

1.5. Mecanismos Eletroforéticos de Separação

Atualmente considera-se que a eletroforese capilar possa ser dividida em 5 modos a saber²³:

1. Eletroforese capilar de zona ou em solução livre (FSCE);
2. Cromatografia eletrocínética micelar (MEKC);
3. Eletroforese capilar em gel (CGE);
4. Eletrocromatografia capilar (CEC);
5. Eletroforese capilar por focalização isoelétrica (CIEF);
6. Isotacoforese (CITP);

Eletroforese Capilar de Zona ou em Solução Livre (FSCE)²¹

A eletroforese capilar de zona (CZE), a qual também é conhecida como eletroforese capilar em solução livre (FSCE). Neste modo a amostra é injetada dentro da coluna capilar (diâmetro interno variando entre 20µm - 100µm) previamente preenchida com eletrólito de corrida, e a voltagem é então aplicada gerando o campo elétrico, fazendo com que os solutos migrem dentro do capilar como se fossem zonas (**Figura 3**). Dessa forma os solutos são separados de acordo com suas diferentes velocidades de migração, as quais dependerão das

²³ M. F. M. Tavares, Química Nova, 20 (1997) 493.

suas diferentes mobilidades eletroforéticas. Todas as discussões sobre EOF e mobilidade eletroforética apresentadas anteriormente se aplicam diretamente à FSCE, sendo desnecessária a repetição.

A FSCE pode ser usada para a separação de praticamente todos os compostos ionizáveis, os quais são solúveis no eletrólito de corrida. A separação de diversos tipos de amostras tais como moléculas pequenas, íons, biomoléculas já foram descritas. Até mesmo compostos insolúveis em água podem ser analisados em eletrólitos não aquosos.

Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)²⁴

A eletrocromatografia micelar ou cromatografia eletrocinética micelar se aplica principalmente na análise de substâncias neutras. Neste mecanismo de separação, assim como na cromatografia líquida, a separação é baseada na partição diferenciada dos solutos entre a fase móvel (eletrólito de corrida) e uma “pseudo” fase estacionária (composta por micelas), cuja migração é feita segundo a influência do EOF e da mobilidade eletroforética da própria micela.

Como a MEKC foi objetivo de estudo neste trabalho, a descrição pormenorizada desta técnica será feita no Capítulo 2 da 2ª Parte.

Eletroforese Capilar em Gel (CGE)²⁴

CGE é o análogo do CE para a tradicional eletroforese em gel. Ela é usada para a separação baseada no tamanho de macromoléculas biológicas como oligonucleotídeos, fragmentos de DNA e proteínas, onde a separação é obtida em um capilar preenchido com uma matriz polimérica como poliacrilamida ou agarose. A maior vantagem sobre a eletroforese de gel em placas é a disponibilidade de um maior número de matrizes, análises quantitativas mais exatas e a possibilidade de automação de todo o processo.

Eletrocromatografia capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar (CEC) é uma técnica recente de separação que combina as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a

eletroforese capilar (CE). Nesta técnica, o transporte do solvente (fase móvel) é feito através da geração de um fluxo eletroosmótico ao longo da coluna, eluindo os solutos ali injetados²⁴. Esta técnica também foi objeto de estudo desta tese e está descrita no Capítulo 7 da 2ª Parte.

Eletroforese Capilar por Focalização Isoelétrica (CIEF)^{21,24}

A CIEF é geralmente utilizada na análise de biomoléculas, principalmente de proteínas, sendo o processo de separação baseado no ponto isoelétrico das mesmas. Neste modo, o capilar é preenchido com uma mistura de anfólitos e da amostra de modo a promover um gradiente de pH. Colocando uma solução básica no cátodo e uma solução ácida no anodo e em seguida aplicando-se o campo elétrico, os anfólitos e os solutos irão migrar até que eles encontrem uma região onde sua carga total é zero. Desta forma, os anfólitos e as zonas de solutos permanecem focalizadas e apresentam-se extremamente estreitas, desde que a difusão para zona de diferentes pHs resulte na geração de carga e, conseqüentemente na sua migração de volta para a região de focalização.

*Isotacoforese (ITP)*²⁴

A isotacoforese é uma técnica a qual emprega dois tipos diferentes de sistema de eletrólito. Os solutos da amostra ficam confinados entre duas regiões composta de eletrólitos, um chamado de líder (cuja mobilidade deve ser maior que a mobilidade do componente mais veloz da amostra) e outro chamado terminador (cuja mobilidade é menor que a mobilidade do componente mais lento da amostra), criando, desta forma, um estado estacionário no qual as zonas de solutos migram uma depois da outra, em ordem decrescente de mobilidade. Dois aspectos são bastante importantes na ITP, na qual além de todas as zonas migrarem na mesma velocidade, elas adotam a concentração do eletrólito líder. Esta característica faz com que a isotacoforese seja bastante útil na análise de soluções diluídas, as quais podem ser concentradas em muitas ordens de magnitude.

²⁴ K. D. Bartle, P. Myers, J. Chromatogr. A, 916 (2001) 3.

1.6. FSCE na Análise de Metabólitos Secundários

A eletroforese capilar foi introduzida na análise de metabólitos secundários nos últimos 10 anos, possibilitando a análise simultânea de analitos catiônicos e aniônicos. Flavonóides, fenilpropanóides, cumarinas, fenólicos ácidos e alcalóides já foram todos caracterizados por esta técnica²⁵.

Pietta e colaboradores²⁶ foram os primeiros a descreverem uma separação de flavonóides por CE, e desde então tem surgido um grande número de publicações descrevendo a análise de tais substâncias. Até o presente momento, inúmeros extratos vegetais já foram caracterizados usando CE em seus diversos modos, entretanto, segundo o nosso conhecimento, a composição de extratos de *Matricaria recutita* L. ainda não foi investigada nem por FSCE e nem por MEKC.

Esta fase do trabalho objetivou a observação do comportamento das substâncias fenólicas selecionadas (**Figura 3**), bem como a identificação destas nos extratos metanólico, glicólico e hidroalcoólico de camomila.

²⁵ F.A.T. Barberán, Phytochem. Anal. 6 (1995) 177. H.J. Isaaq, Electrophoresis 18 (1997) 2438.

²⁶ P. Pietta, P. Mauri, G. Rava, J. Sabbatini, J. Chromatogr. 459 (1991) 367.

2- Parte Experimental

Eletrólitos de corrida

Os eletrólitos de corrida (cuja composição esta especificada em cada eletroferograma) foram preparados diariamente e filtrados com membrana filtrante 0,45 μ m (Millipore), antes do uso. O pH dos eletrólitos com tetraborato de sódio (TBS) (Riedel de Haen) foi ajustado com solução de hidróxido de sódio (Carlo Erba) 1M. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema de membrana filtrante Milli-Q com membrana de 0,45 μ m.

Equipamento

Todos os experimentos em FSCE foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detetor do tipo “*diode array*” fixado em 337nm, controle de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). Com exceção dos experimentos onde o tipo de injeção foi testado, em todos os demais, as amostras foram injetadas hidrodinamicamente (condições especificadas em cada eletroferograma). O sistema eletroforético foi operado com polaridade normal e condições de voltagem constante a +25kV, a menos que seja especificado. Foi usado capilar de sílica fundida com 63cm de comprimento (54,5cm de comprimento efetivo), e 75 μ m de diâmetro interno (375 μ m de diâmetro externo).

Padrões e Amostras

Os padrões 2-5 e 7-9 (**Figura 3**) foram obtidos da Sigma, os 6, 8 e 11 da Extrasynthése e o 1, da Fluka. Para os experimentos, soluções estoque dos padrões, com 1mg/mL em DMSO/MeOH 1:9, foram preparadas semanalmente e estocados em freezer. Cerca de 100 μ L de cada uma destas soluções foram misturados para obter uma solução (1100 μ L total) com todos os padrões.

Exatamente 5,0g da solução estoque do extrato metanólico (obtida conforme descrito na Parte 1) foi pesada e diluída para 10mL, em uma mistura de MeOH/H₂O 1:1. Esta solução foi usada diretamente nos experimentos em CE.

Exatamente 2,5g do extrato glicólico e 5,0g/mL do extrato etanólico foram pesados e diluídos separadamente para 10 mL em MeOH/H₂O 1:1. As soluções obtidas foram usadas para as análises.

Otimização das Condições de Injeção

A modalidade de injeção mais eficiente para este tipo de amostras foi verificada. Para tais testes foi utilizado como amostra extrato metanólico 5,0g/10mL (3,0s/50mbar). O eletrólito de corrida usado foi TBS 20 mM, pH10, +25kV, +25 °C.

Foram testadas injeções do tipo hidrodinâmica (3,0s/50mbar), eletrocinética (3,0s/+5kV; 3,0s/+6kV; 3,0s/+10kV; 10,0s/+10kV).

Uma vez observado o melhor tipo de injeção, novos testes foram feitos com o intuito de encontrar qual a melhor relação diluição da amostra e tempo de injeção.

Estudo das Condições de Análises

A otimização das condições de análise foi feita variando a concentração do tampão, voltagem, temperatura e pH. Todas as análises foram feitas usando a mistura de padrões (2,0s/50mbar) como amostra. O tampão para as análises em FSCE foi tetraborato de sódio (TBS).

Condicionamento do Capilar

A fim de se obter uma condição de análise com reprodutibilidade de tempos de migração satisfatória, foram feitos 5 experimentos de condicionamento de capilar entre as corridas. Para isso, a mesma amostra foi injetada 10 vezes consecutivas em cada um dos experimentos, onde o procedimento de condicionamento do capilar foi variado:

- *Condição A:* 5 minutos com eletrólito (900 mbar);
- *Condição B:* 1 minuto com NaOH 1 M;
1 minuto com H₂O;
5 minutos com tampão (900 mbar);

- Condição C: 1 minuto com H₂O;
1 minuto com H₂O/ACN 1:1;
5 minutos com ACN;
1 minuto com H₂O;
5 minutos com tampão (pressão de 900 mBar)
- Condição D: 1 minuto com tampão (pressão de 900 mBar)
4 minuto com tampão (voltagem, +25 kV);

O condicionamento do capilar no início do dia foi feito através da lavagem consecutiva de:

- 1 min com H₂O;
- 5 min com NaOH 1 M;
- 1min com H₂O;
- 15 min com eletrólito (pressão de 900mBar);
- 25 min com eletrólito (+25kV, 25⁰C).

No final do dia o capilar foi lavado com água durante 10 minutos.

Identificação das Substâncias de Interesse

A identificação das substâncias de interesse foi feita através do conjunto das técnicas de *spiking*²⁷, comparação dos tempos de retenção e dos espectros obtidos a partir dos padrões, onde soluções padrões com 1 mg/mL foram injetadas individualmente (2,0 s/50 mbar) e em mistura. Os espectros foram agrupados em uma biblioteca de espectros.

Como amostra foram utilizados extratos metanólico (ExMeOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar), glicólico (ExGlic) 2,5g/10mL (3,0s/50mbar) e etanólico (ExEtOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar). Como eletrólito de corrida foi escolhido TBS20 mM pH10, +25kV e +25⁰C.

²⁷ L. R. Syder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons Inc, 1997, p. 660.

3- Resultados e Discussão

3.1. Determinação do tipo de injeção.

Das condições de injeção testadas (**Figura 8**) aquela que apresentou melhor resultado foi a hidrodinâmica. A falha das injeções eletrocinéticas foi atribuída ao fato das substâncias fenólicas estarem dissociadas em pH 10, o que as fazem migrar em direção ao ânodo ou seja, na direção contrária ao EOF, sendo portanto transferidas para o capilar em proporção menores. Além disso, a injeção eletrocinética reflete a reprodutibilidade do EOF.

Figura 8: Testes de modalidades de injeção em FSCE: A) Injeção eletrocinética 3,0s/+5kV; B) injeção eletrocinética 3,0s/+6kV; C) injeção eletrocinética 10,0s/+10kV; D) injeção hidrodinâmica 3,0s/50mbar. Amostra: ExMeOH 5,0g/10mL. Eletrólito de corrida TBS 20mM, pH10,0, +25kV, +25°C.

3.2. Otimização das condições de análises

A identificação dos padrões nas diversas condições eletroforéticas testadas foi feita através da comparação dos espectros de UV-vis e dos tempos de migração obtidos nestes eletroferogramas e aqueles obtidos em corridas individuais para cada substância na mesma condição.

Nos primeiros experimentos, foram observados a variação do pH do eletrólito e a variação da concentração do tampão tetraborato de sódio (**Figura 9**). As **Tabelas 1 e 2** trazem os valores de tempo de migração (t_m) e mobilidade eletroforética (μ_{ep}) das substâncias analisadas nestas condições e os valores de seletividade (α) e resolução (R_s) para os pares de substâncias por ordem de eluição, de acordo com os eletroferogramas mostrados na **Figura 9**.

Estes eletroferogramas mostram que a separação dos compostos fenólicos é possível por FSCE. Neste caso, quando o pH do meio é superior a 9 (valor típico do pK_a de fenóis) ocorre a dissociação das hidroxilas. Consequentemente, os compostos se tornam negativos e migram contra o fluxo eletrosmótico, condição na qual moléculas grandes e mono-carregadas migram primeiro. No eletroferograma **A** da **Figura 9** é possível observar que apenas com o aumento da concentração do tampão foi possível separar o par crítico formado pelos compostos 6 e 8 (**Figura 3**), o que também aumentou consideravelmente o tempo de análise.

O aumento do pH de 10 para 11 aumentou o tempo de análise além de promover a co-eluição dos pares de 11/4 e 7/9. A mudança do tempo de migração dos solutos em pH alto foi marcante depois de 10 minutos de eluição, apesar da mudança do fluxo eletrosmótico não variar muito nestas condições. Uma possível explicação para este comportamento é que, os solutos que eluem depois de 10 minutos possam estar sofrendo maior dissociação, exibindo assim, maior quantidade de cargas negativas. Uma vez que a migração destes ocorre no contra-fluxo, um aumento na mobilidade eletroforética resulta no aumento do tempo de eluição.

A **Figura 10**, seguida das **Tabelas 3 a 10** mostram a variação da temperatura e voltagem na melhor condição encontrada (**Figura 9A**). A **Figura 11** compila as variações de mobilidade com a temperatura em + 25kV.

Figura 9: Efeito da variação do pH e da concentração do tampão do eletrólito de corrida. A) TBS 20mM, pH 10, B) TBS 20mM, pH 11, C) TBS 100mM, pH 10. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 50mbar/2,0seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Tabela 1: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 25°C, voltagem: +25kV, injeção: 2,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5}$ cm ² /Vs)	α	R_s^{**}
1	3,80	-21,81	1,54	8,59
8	5,87	-26,87	1,00	0,00
6	5,87	-26,87	1,20	10,97
10	7,02	-28,39	1,13	11,57
2	7,93	-29,28	1,07	5,76
11	8,50	-29,74	1,05	4,37
4	8,91	-30,04	1,13	11,43
7	10,04	-30,72	1,10	8,64
5	11,02	-31,20	1,13	9,31
9	12,50	-31,79	1,08	4,82
3	13,50	-32,11		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 2: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 11, temperatura: 25°C, voltagem: +25kV, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5}$ cm ² /Vs)	α	R_s^{**}
1	4,06	-20,42	1,49	9,81
8	6,06	-24,86	1,00	0
6	6,06	-24,86	1,24	11,7
10	7,53	-26,62	1,15	9,53
2	8,66	-27,57	1,08	6,72
4	9,32	-28,01	1,00	0
11	9,32	-28,01	1,24	12,99
7	11,52	-29,13	1,00	0
5	11,52	-29,13	1,10	5,85
9	12,66	-29,56	1,34	16,94
3	16,97	-30,65		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Figura 10: Eletroferogramas ilustrando o efeito da temperatura e da voltagem na separação das substâncias fenólicas estudadas. Condições de análises: TBS 20mM, pH 10, A) 15°C a 20kV, B) 15°C a 25kV, C) 15°C a 30kV, D) 25°C a 20kV, E) 25°C a 25kV, F) 25°C a 30kV, G) 45°C a 20kV, H) 45°C a 25kV, I) 45°C a 30kV. Amostra: mistura de padrões; injeção: 2s/50mbar; $\lambda=337\text{nm}$. Numeração de acordo com a Figura 3.

Tabela 3: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 15°C, voltagem: +20kV, injeção: 2,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5}$ cm ² /Vs)	α	R_s^{**}
1	6,59	-17,79	1,56	10,27
8	10,25	-20,74	1,00	0
6	10,25	-20,74	1,22	11,03
10	12,50	-21,70	1,13	12,03
2	14,15	-22,21	1,07	7,39
11	15,13	-22,46	1,01	1,1
4	15,31	-22,50	1,19	13,03
7	18,15	-23,06	1,09	6,97
5	19,75	-23,30	1,13	9,91
9	22,32	-23,62	1,14	10,08
3	25,49	-23,92		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 4: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 15°C, voltagem: +25kV, injeção: 2,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5}$ cm ² /Vs)	α	R_s^{**}
1	4,66	-17,79	1,54	10,19
8	7,19	-21,91	1,00	0
6	7,19	-21,91	1,22	11,54
10	8,75	-23,26	1,13	12,45
2	9,89	-23,98	1,08	6,67
4	10,67	-24,38	1,01	1,12
11	10,81	-24,45	1,17	14,66
7	12,64	-25,18	1,10	8,23
5	13,85	-25,55	1,13	10,97
9	15,71	-26,02	1,12	8,67
3	17,59	-26,39		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 5: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 15°C, voltagem: +30kV, injeção: 2,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	Rs^{**}
1	3,28	-18,31	1,55	9,18
8	5,08	-24,21	1,00	0
6	5,08	-24,21	1,19	10,52
10	6,02	-25,90	1,13	11,7
2	6,79	-26,92	1,07	5,8
4	7,27	-27,45	1,06	5,72
11	7,73	-27,90	1,11	10,28
7	8,57	-28,59	1,10	9,14
5	9,42	-29,16	1,15	10,78
9	10,80	-29,90	1,06	4,12
3	11,46	-30,19		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 6: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 25°C, voltagem: +20kV, injeção: 2,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	Rs^{**}
1	5,34	-21,96	1,53	7,41
8	8,16	-25,49	1,00	0
6	8,16	-25,49	1,20	9,54
10	9,82	-26,62	1,13	10,05
2	11,08	-27,25	1,06	5,28
11	11,76	-27,53	1,01	1,07
4	11,91	-27,59	1,19	11,77
7	14,15	-28,32	1,08	5,36
5	15,28	-28,60	1,10	6,58
9	16,87	-28,94	1,14	7,36
3	19,24	-29,33		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 7: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 25°C, voltagem: +30kV, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	R_s
1	2,65	-22,61	1,54	10,22
8	4,09	-29,82	1,00	0
6	4,09	-29,82	1,20	14,02
10	4,91	-32,05	1,13	12,45
2	5,53	-33,30	1,07	4,85
4	5,93	-33,96	1,05	3,42
11	6,21	-34,38	1,13	13,26
7	7,02	-35,39	1,05	4,91
5	7,38	-35,77	1,04	4,18
9	7,68	-36,06	1,23	18,11
3	9,42	-37,37		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 8: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 45°C, voltagem: +20kV, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	R_s
1	3,89	-21,30	1,57	10,53
8	6,11	-26,38	1,00	0
6	6,11	-26,38	1,19	10,75
10	7,28	-27,81	1,13	10,29
2	8,25	-28,70	1,05	1,99
4	8,68	-29,03	1,08	3,09
9	9,35	-29,48	1,03	3,18
11	9,64	-29,65	1,10	7,65
7	10,58	-30,16	1,11	8,08
5	11,71	-30,65	1,23	12,5
3	14,36	-31,51		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 9: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 45°C, voltagem: +25kV, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	R_s^{**}
1	3,72	-31,5	1,15	8,42
8	4,26	-33,3	1,00	0
6	4,26	-33,3	1,19	10,9
10	5,08	-35,4	1,13	10,9
2	5,74	-36,6	1,06	2,87
4	6,08	-37,1	1,10	5,09
11	6,68	-38,0	1,11	8,28
7	7,41	-38,8	1,07	5,07
5	7,95	-39,3	1,03	2,72
9	8,20	-39,5	1,24	15,8
3	10,2	-40,8		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Tabela 10: Dados eletroforéticos dos compostos estudados na condição: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, temperatura: 45°C, voltagem: +30kV, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_m (min)	μ_{ep} ($\times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{Vs}$)	α	R_s^{**}
1	2,48	-24,2	1,64	13,1
8	4,05	-32,8	1,00	0
6	4,05	-32,8	1,00	0
10	4,05	-32,8	1,20	7,54
4	4,88	-35,1	1,14	6,98
2	5,56	-36,4	1,08	3,5
11	6,02	-37,2	1,18	6,78
7	7,11	-38,6	1,21	9,54
5	8,59	-39,9	1,00	0
9	8,59	-39,9	1,06	2,76
3	9,07	-40,2		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado

Figura 11: Gráfico da mobilidade eletroforética (μ_{ef}) das substâncias analisadas contra as condições de temperatura em +25kV. Condições de análise: conforme descrito na **Figura 10**.

O gráfico da **Figura 11** mostrou que o aumento da temperatura, leva ao aumento da mobilidade eletroforética (μ_{ef}) das substâncias estudadas.

Com exceção do par 4/11 (ácido clorogênico/naringenina), o qual foi completamente resolvido em 45°C, a resolução (R_s) diminuiu tanto com o aumento da voltagem quanto da temperatura (**Tabelas 2 a 10**). Com relação a seletividade (α) apenas os pares 4/11 e 5/9 (apigenina/quercetina) parecem ter sofrido maior influência, os quais tiveram suas ordens de migração alteradas nas várias situações.

A **Tabela 11** traz a correlação dos tempos de migração da umbeliferona (2) com os seus respectivos valores de eficiência (N) e altura de prato ($H = L_{det}(\mu m)/N$). Esta substância foi usada para expressar N e H , pois foi a única, dentre as 11 analisadas, que apresentou t_m e t_r presentes em tempos intermediários nos

cromatogramas e eletroferogramas, e que ainda, não foi co-eluída na maioria das análises.

Com exceção das condições representadas pelos números 3 e 9 da **Tabela 11**, a eficiência aumentou com a velocidade do EOF. Na condição 9 da mesma tabela, este fato poderia ser explicado pela ineficiência da dissipação do calor oriundo do efeito Joule²⁰.

Tabela 11: Tabela relacionando tempo de migração (t_m) com a eficiência (N) e número de prato (H) observada em FSCE para a umbeliferona. Condições de análises:

<i>Condições de análise</i>	t_m	N	H (μm)
1 (TBS 20mM pH 10, +20kV, 15 ⁰ C)	14,2	173413	3,14
2 (TBS 20mM pH 10, +25kV, 15 ⁰ C)	9,89	190560	2,86
3 (TBS 20mM pH 10, +30kV, 15 ⁰ C)	6,79	163183	3,34
4 (TBS 20mM pH 10, +20kV, 25 ⁰ C)	11,1	106352	5,12
5 (TBS 20mM pH 10, +25kV, 25 ⁰ C)	7,93	146499	3,72
6 (TBS 20mM pH 10, +30kV, 25 ⁰ C)	5,53	188241	2,90
7 (TBS 20mM pH 10, +20kV, 45 ⁰ C)	8,25	110689	4,92
8 (TBS 20mM pH 10, +25kV, 45 ⁰ C)	5,74	156191	3,49
9 (TBS 20mM pH 10, +30kV, 45 ⁰ C)	5,56	77276	7,05
10 (TBS 20mM pH 11, +25kV, 25 ⁰ C)	8,66	125726	4,33

O uso do DAD mostrou-se de grande valia na identificação das substâncias fenólicas analisadas nos extratos de camomila. A **Figura 12** mostra a associação dos espectros em UV em linha com os picos dos padrões com aquisição em 337 nm, onde os espectros das substâncias 6 e 8, as quais coeluíram em todas as condições testadas, foram obtidos separadamente. Este comprimento de onda foi particularmente útil na análise de traços das substâncias fenólicas.

A complexação do borato com hidroxilas vicinais em carboidratos já é tão conhecida quanto o uso deste como eletrólito, nas análises de açúcares em CE²⁸. Da mesma forma, flavonóides com hidroxilas orto no anel A e B, (luteolina [7] e quercetina [9]), e ainda, os glicosilados que possuem o mesmo padrão com hidroxilas 1,2-*cis* (anel ramnosil na rutina) complexam de forma mais intensa com o borato presente no tampão. Sendo assim é esperado que tais substâncias migrem em tempos menores que aquelas semelhantes e que não possuam tais grupamentos. Este parece ser o caso dos solutos apigenina-7-O-glicosídeo (6) e luteolina-7-O-glicosídeo (8) os quais migram em tempos diferentes da rutina (**Figura 10A**).

²⁸ S. H. Kuhn, A Paulus, E. Gassmann, H. M. Widmer, Anal. Chem. 63 (1991) 1541.

Figura 12: Eletroferograma das substâncias fenólicas na condição otimizada. Condições de análise: Tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, +25kV, 25°C, injeção: 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$.

3.3. Otimização da diluição para os extratos

A **Figura 13** mostra a otimização da diluição dos extratos na condição otimizada descrita no item anterior.

Figura 13: Ajuste da relação entre concentração da amostra e tempo de injeção (usando 50mbar de pressão): A) ExMeOH 2,5g/10mL (10s); B) ExMeOH 5,0g/10mL (1s); C) ExMeOH 5,0g/10mL (7s); D) ExMeOH 5,0g/10mL (3s); E) ExGlic 2,5g/10mL (3s); F) ExGlic 5,0g/10mL (3s); G) ExGlic 5,0g/10mL (5s); H) ExGlic 5,0g/10mL (10s). Eletrólito de corrida TBS 20mM, pH 10,0, +25kV, +25°C.

Foi observado que a melhor diluição e tempo de injeção para os extratos metanólico e glicólico foram respectivamente 5,0g/10mL, injetando 3,0 segundos e 2,5g/10mL, injetando 3,0s, ambos com 50mbar de pressão. Como a concentração do extrato etanólico era semelhante à do extrato metanólico, a mesma diluição foi utilizada.

3.3. Otimização da metodologia de condicionamento do capilar.

Durante os experimentos anteriores foram encontrados diversos problemas associados a repetibilidade do perfil eletroforético, da mobilidade eletroforética das substâncias estudadas e ainda da velocidade do EOF.

A velocidade do EOF é um parâmetro crucial em CE. É esta velocidade que determina tanto a faixa de mobilidade aparente dos analitos quanto o tempo total de corrida. Dessa forma, variações no EOF, observadas em capilares diferentes e/ou entre corridas, são as principais causas da perda de reprodutibilidade e repetibilidade observadas nos tempos de eluição em CE. A princípio, a mobilidade eletrosmótica é predominantemente governada pelas condições químicas da parede interna do capilar e pela composição do eletrólito de corrida usado na separação²¹. Quando um capilar de sílica fundida é deixado em contato por muito tempo com o eletrólito de corrida, diferentes processos, tais como a formação de um camada de gel, trocas iônicas ou adsorção de íons podem alterar o potencial zeta do sistema, afetando conseqüentemente a velocidade do EOF²⁹.

Com o intuito de se obter reprodutibilidade do tempo de migração e dos valores de área, várias metodologias de condicionamento do capilar foram testadas. As condições testadas e os resultados observados estão descritos na **Tabela 12**, a qual foi calculada tendo como base os tempos de migração e valores de área da apigenina (substância 5 da **Figura 3**).

A precisão de cada experimento foi dada em termos de coeficiente de variação (CV %). A reprodutibilidade dos tempos de migração da apigenina, e área deste mesmo pico para 10 corridas consecutivas do extrato metanólico foi comparada nos experimentos A, B, C e D. A simples lavagem do capilar com

²⁹ C. Schwer, E. Kenndler, Anal. Chem. 63 (1991) 1801.

eletrólito durante 1 minuto à 900 mbar seguido da lavagem eletrocinética a +25kV, durante 4 minutos, aumentou consideravelmente a reprodutibilidade do sistema, sendo adotado como condicionamento padrão no restante do trabalho.

Tabela 12: Avaliação da reprodutibilidade do tempo de migração e área do pico da apigenina durante os experimentos de condicionamento do capilar.

Condições de condicionamento	Procedimento			
	A	B	C	D
NaOH 1 M	não	1 min	não	não
H ₂ O	não	1 min	1 min	não
H ₂ O:ACN 1:1	não	não	1 min	não
ACN	não	não	5 min	não
H ₂ O	não	não	1 min	não
Eletrólito ^a				
900 mbar	5 min	5 min	5 min	1 min
+ 25kV	não	não	não	4 min

	t _m (min)	área do pico	t _m (min)	área do pico	t _m (min)	área do pico	t _m (min)	área do pico
Média ^b	9,5	52,72	9,69	52,3	9,18	47,4	8,66	53,87
SD ^c	0,5	5,4	1,0	5,4	0,37	3,1	0,32	0,88
CV ^d (%)	5,4	10,3	10,08	10,4	4,0	6,6	3,7	1,6

^a Eletrólito de corrida: 20mM de tetraborato de sódio pH 10. Outras condições: + 25kV, injeção 50mbar/0.3s, $\lambda = 337\text{nm}$.

^b 10 injeções consecutivas de extrato metanólico (repetibilidade).

^c Desvio padrão.

^d Coeficiente de variação.

3.4. Identificação das substâncias de interesse.

A identificação das substâncias de interesse foi feita através do conjunto das técnicas de *spiking*²⁵, comparação dos tempos de retenção e espectros obtidos a partir dos padrões (**Figura 12**). Os espectros foram agrupados em uma biblioteca de espectros.

Como amostra foram utilizados extratos metanólico (ExMeOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar), glicólico (ExGlic) 2,5g/10mL (3,0s/50mbar) e etanólico (ExEtOH)

5,0g/10mL (3,0s/50mbar). Soluções padrões com 1mg/mL foram injetadas individualmente (2,0s/50mbar) e em mistura. Como eletrólito de corrida foi escolhido TBS 20mM pH 10, +25 kV e +25°C.

Apesar de terem sido obtidos de material vegetal diferentes, os perfis dos três extratos foram bastante semelhantes (**Figura 14**). Entretanto vale notar que a migração de substâncias com estruturas semelhantes, luteolina (7), apigenina (5) e quercetina (9) aumenta consideravelmente do extrato metanólico para o glicólico e etanólico (nesta ordem), o que pode ter ocorrido devido a formação de algum complexo. Não foi possível identificar a naringenina nos extratos analisados.

Os extratos etanólico e glicólico estudados são industrializados e, portanto, possuem conservantes, o quais estão assinalados com um asterístico (*) na **Figura 14**.

Para a identificação dos componentes majoritários nos extratos, o uso da biblioteca de espectros foi satisfatória. Como exemplo, no extrato metanólico, a pureza dos picos testados apresentou um índice maior que 998 para os solutos 10, 2, 4, 5, 8, 3 e de 818 para o pico referente ao par 6/8. Entretanto, quando a abundância do componente é baixa a identificação espectral pode não ser conclusiva. Nestes casos o uso da técnica de fortificação é fundamental. As **Figuras 15 a 17** mostram os experimentos de fortificação feitos nos três extratos analisados.

Uma exemplo interessante do uso do DAD na identificação de picos em amostras complexas foi o caso do pico assinalado (+) na **Figura 14**. Neste caso, a comparação do tempo de migração deste pico com os padrões (**Figura 12**) poderia levar a atribuição à naringenina. Entretanto, o espectro deste pico foi significativamente diferente, sendo bastante parecido com o do pico adjacente (ácido clorogênico [4]). Para a confirmação de sua identidade, o extrato foi fortificado com padrão de ácido clorogênico. Isto mostrou que o pico (+), de fato, não era a naringenina, sugerindo a presença de um outro componente, isômero de posição, ou cuja a estrutura química seja bastante semelhante ao ácido clorogênico.

Figura 14: Análise dos extratos A) metanólico, B) glicólico e C) etanólico nas condições otimizadas em FSCE. As condições foram as mesmas descritas na **Figura 12**, com exceção das condições de injeção (3s/50mbar). A numeração dos picos seguiu a ordem apresentada na **Figura 3**. O [*] representa o pico dos conservantes. Comentários sobre o pico assinalado com [+] estão no texto.

Figura 15: Spikes no ExMeOH em FSCE: A) ácido cafêico; B) ácido clorogênico; C) naringenina; D) luteolina, E) apigenina; F) luteolina-7-O-glicosídeo; G) quercetina; H) rutina; I) umbeliferona; J) herniarina; L) água. Condições de análise: ExMeOH 5,0g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito na **Figura 12**.

Figura 16: Spikes no ExGlic em FSCE: A) ácido cafêico; B) ácido clorogênico; C) naringenina; D) luteolina, E) apigenina; F) quercetina; G) rutina; H) umbeliferona; I) água. Condições de análise: ExGlic 2,5g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito na **Figura 12**.

Figura 17: Spikes no ExEtOH em FSCE: A) ácido cafêico; B) ácido clorogênico; C) naringenina; D) luteolina, E) apigenina; F) apigenina-7-O-glicosídeo; G) quercetina; H) rutina; I) umbeliferona; J) água. Condições de análise: ExEtOH 5,0g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito na **Figura 12**.

4- Conclusões

FSCE mostrou-se ser bastante interessante na análise das substâncias fenólicas ionizáveis estudadas.

A reprodutibilidade da mobilidade do EOF mostrou-se bastante dependente da metodologia de condicionamento utilizada entre as corridas onde o uso do condicionamento eletrocinético levou a uma melhora significativa na reprodutibilidade do sistema.

Esta técnica foi bastante interessante na análise de extratos vegetais, uma vez que foi possível obter razoável repetibilidade tanto do tempo de retenção quanto dos valores de área sem haver a necessidade da limpeza prévia dos extratos para a retirada de materiais interferentes.

1- Introdução

1.1. Conceitos Gerais sobre Cromatografia Eletrocinética Micelar (MEKC)

A limitação primária dos métodos eletroforéticos em solução livre é a impossibilidade de separar compostos neutros, a menos que existam diferenças significativas de massa molecular. Em geral, estes compostos migram no capilar por ação exclusiva do fluxo eletroosmótico, não havendo discriminação espacial e/ou temporal dos solutos na chegada ao detector¹. A cromatografia eletrocinética micelar, desenvolvida por Terabe e colaboradores², é um tipo de cromatografia similar a uma partição líquido-líquido, a qual através da partição dos solutos entre as micelas e o eletrólito é possível separar moléculas que não apresentam cargas.

Neste tipo de CE, agentes tensoativos iônicos, em condições apropriadas para formação de micelas, são adicionados ao eletrólito de corrida, proporcionando um sistema cromatográfico de duas fases. O eletrólito representa a fase primária, a qual é transportada eletroosmoticamente sob ação do campo elétrico, enquanto que as micelas representam a fase secundária, ou pseudo-estacionária, a qual é transportada por uma combinação dos fenômenos de eletroforese e eletroosmose³.

Micelas são agregados moleculares de surfactantes, onde os analitos fazem partição baseados na hidrofobicidade, atração iônica e ligação de hidrogênio. Os surfactantes são moléculas que apresentam em sua estrutura uma parte com características hidrofóbicas e uma outra com características hidrofílicas. Quando estas moléculas estão em meio aquoso acima da concentração micelar crítica (CMC), suas partes hidrofóbicas se alinham, enquanto que as partes carregadas (chamadas de cabeça) se orientam formando a superfície de um agregado⁴.

Sob a ação do campo elétrico observa-se tanto o aparecimento do EOF como também o fluxo das micelas. No caso de uma separação em meio micelar com dodecilsulfato de sódio (SDS) cujo caráter é fortemente aniônico, as micelas tendem a migrar na direção do ânodo, enquanto que o EOF se move na direção do cátodo. Entretanto, como o EOF é superior à mobilidade eletroforética das micelas, teremos

¹ M. F. M. Tavares, Quim. Nova 19 (1996) 173.

² S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, T. Ando, Anal. Chem. 56 (1984) 111.

³ M. F. M. Tavares, Quim. Nova 20 (1997) 493.

⁴ D. R. Baker, Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons, Inc., New York, 1995, p.33.

como movimento fina, a lenta migração das micelas na direção do cátodo⁵ (Figura 18).

A associação diferenciada entre os diversos solutos e a fase micelar é obviamente um requisito básico para o sucesso da separação. Dependendo da natureza do sistema, a incorporação do soluto pela micela pode envolver diferentes regiões da mesma, sob a ação de diferentes mecanismos. Solutos apolares, ou moderadamente polares se associam ao núcleo hidrofóbico da micela, através de interações dispersivas do tipo dipolo induzido-dipolo induzido, enquanto que solutos polares se associam à superfície da micela, através de interações do tipo dipolo - dipolo ou íon - dipolo com os grupos polares (ou iônicos) da extremidade do tensoativo. Neste último caso, fortes interações coulômbicas (atrativas ou repulsivas) podem ocorrer quando o soluto apresentar carga. Solutos anfifílicos tendem a se alinhar com a micela, de forma a interagir dispersivamente com o núcleo hidrofóbico e eletrostaticamente com a cabeça do tensoativo. A extensão com que a associação soluto/micela ocorre determina a ordem de eluição do soluto⁶.

Figura 18: Representação esquemática de um processo separativo em MEKC. Os círculos (-) e retângulos em alaranjado-escuro representam a parede do capilar e aqueles em alaranjado-claro (+), os íons positivos do eletrólito. Os quadrados (azul) representam os solutos que não interagem com as micelas, migrando com a velocidade do EOF; os círculos em vermelhos e os losângulos em verde representam solutos com diferentes polaridades interagindo com a micela e o eletrólito; o triângulo (lilás) representa um soluto apolar, o qual fica retido na parte hidrofóbica da micela, sem interagir com o eletrólito.

⁵ G. M. Janini, H. J. Isaaq, J. Liq. Chromatogr. A 15 (1992) 927.

⁶ J. P. Landers, Handbook of Capillary Electrophoresis, CRC, Boca Raton, 1996, p.50

Dentre os eletrólitos estudados em MEKC até a presente data, os que têm produzido melhores resultados são aqueles que formam micelas, cuja migração eletroforética se opõe ao fluxo eletrosmótico, apesar de apresentarem menor mobilidade. Um exemplo de surfactante amplamente usado em MEKC é o dodecilsulfato de sódio (SDS), também chamado de lauril sulfato de sódio [$\text{CH}_3\text{-(CH}_2\text{)}_{11}\text{-O-SO}_3$], para o qual o CMC em meio aquoso é 8mM (a presença de sais e solventes orgânicos diminui este valor). Além de surfactantes anônicos, também pode ser usado detergentes catiônicos e anfotéricos.

Os agentes tensoativos que apresentam altos valores de CMC são inadequados para MEKC, pois as micelas formadas coexistem com grande quantidade de monômero livre, levando a uma sobrecarga térmica (aumento de calor a ser dissipado pelo capilar).

Comparada a outras técnicas eletroforéticas, a MEKC possui uma baixa capacidade de picos o que limita seu uso a misturas não muito complexas. Isto porque nesta técnica, a fase secundária (micelas) está em movimento e conseqüentemente todos os solutos, mesmo aqueles totalmente retidos pela micela, serão eluídos. Isso limita o tempo com que a separação deve ocorrer em um intervalo característico. Como pode ser observado na **Figura 19**, os solutos só podem eluir entre os tempos t_0 (solute não retido pela micela) e t_{mc} (tempo de migração das micelas). Sendo assim, o fator t_0/t_{mc} expressa convenientemente o intervalo útil de separação em MEKC³.

Figura 19: Intervalo de eluição em MEKC.

1.2. Parâmetros da Separação³⁻⁴

Em MEKC o fator de retenção pode ser expresso a partir do coeficiente de distribuição (K) como mostra a equação a seguir:

$$k' = K \left[\frac{V_{mc}}{V_{aq}} \right] = K\beta \quad [1]$$

onde β é a razão entre as fases e V_{mc} e V_{aq} são os volumes da micela e da fase aquosa, respectivamente. O fator de retenção, é aproximadamente relacionado à concentração do surfactante pela relação:

$$k' = K \bar{v} (C_{sf} - CMC) \quad [2]$$

onde $\bar{v}$ é o volume parcial específico médio da micela e C_{sf} é a concentração do surfactante.

Dessa relação tiramos que o fator de capacidade aumenta linearmente com o aumento da concentração do surfactante sugerindo que podemos afetar o fator de capacidade, ajustando a concentração do surfactante, uma vez que se conheça a CMC do surfactante em questão. A faixa de concentração de surfactantes usados em MEKC é de 20 a 200mM.

Experimentalmente k' pode ser calculado usando a equação [3]

$$k' = \frac{t_r - t_0}{1 + t_0 / t_{mc}} \quad [3]$$

onde t_0 é o tempo do EOF ou do tempo de migração de um soluto não retido, t_r é o tempo de retenção do soluto e t_{mc} é o tempo de migração da micela.

Esta equação também pode ser usada para compostos carregados. Neste caso o único termo que irá mudar é o t_0 pois os compostos carregados, os quais não interagem com a micela, migrarão com sua velocidade própria.

A eficiência (N) em MEKC, pode ser experimentalmente calculada segundo descrito para FSCE (ver equações [7] e [8] do Capítulo 1 da 2ª Parte). Da mesma

forma quanto maior a voltagem aplicada, maior será o número de pratos a menos que o valor aplicado gere muito calor devido ao efeito Joule.

A seletividade (α) é a razão de k_2'/k_1' onde k_1' e k_2' são os fatores de capacidade dos analitos 1 e 2, respectivamente.

A equação descrita abaixo para resolução em MEKC nos mostra que nesta técnica, R_s também é afetado pela eficiência (N), seletividade (α) e pelo fator de capacidade (k').

$$R_s = \left[\frac{N^{1/2}}{4} \right] \left[\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2'}{1 + k_2'} \right] \left[\frac{1 - t_o / t_{mc}}{1 + (t_o / t_{mc}) k_1'} \right] \quad [4]$$

1.3. Adição de agentes modificadores

Agentes modificadores podem ser adicionados ao eletrólito de migração, juntamente com as micelas, com o intuito de ajustar o fator de migração e ainda manipular a seletividade e/ou a extensão da janela de eluição⁶. Estes aditivos influenciam diretamente os coeficientes de partição entre solutos e micelas e também modulam a velocidade do EOF e/ou o tempo de migração das micelas. Em HPLC, a modificação da fase móvel é uma prática bastante difundida e documentada, da mesma forma, muitos destes agentes também podem ser aplicados à MEKC. Todavia, a fim de se obter vantagens no uso destes solventes, é importante considerar que existem importantes diferenças entre a fase micelar em MEKC e a fase estacionária em HPLC.

Atualmente existem 5 diferentes classes de agentes modificadores para MEKC:

- Solventes orgânicos⁷
- Ciclodextrinas (CDs)⁸
- Uréia⁹

⁷ J. Gorse, A. T. Balchunas, D. F. Swaile, M. J. Sepaniak, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 11 (1988) 554.

⁸ S. Terabe, H. Ozaki, K. Otsuka, T. Ando, J. Chromatogr. 332 (1985) 211.

⁹ S. Terabe, Y. Ishihama, H. Nishi, T. Fukuyama, K. Otsuka, J. Chromatogr. 545 (1991) 359

- Reagentes de pareamento iônico¹⁰
- Sais metálicos¹¹

O uso de solventes orgânicos, uréia e ciclodextrinas tem sido amplamente relatados na literatura e serão descritos resumidamente a seguir.

Solventes orgânicos^{6,7,12}

A adição de solventes orgânicos ao eletrólito de corrida em MEKC tem sido usada para promover a melhoria da separação de analitos hidrofóbicos, os quais eluem próximo ao tempo de migração das micelas (ou seja, analitos cujo t_m é muito próximo do t_{mc}). Quando a adição de solventes é feita, a interação dos solutos com as micelas irá diminuir e conseqüentemente k' também irá diminuir. Além disto, a presença de um solvente no eletrólito de corrida também irá reduzir o EOF, estendendo a janela de tempos de migração. Como resultado, a resolução entre solutos altamente hidrofóbicos pode ser aumentada mas as custas de tempos de análises mais longos.

Entretanto, há vários casos em que a seletividade dos analitos pode não variar com a adição de solventes. Em outras palavras, o aumento da resolução nesta situação será devido ao ajuste do k' e ao aumento da janela e não devido ao aumento da seletividade propriamente dito, o que é o principal objetivo quando se adiciona um modificador orgânico em HPLC. A fim de se compreender o papel do agente modificador em MEKC é muito importante que se diferencie este comportamento.

Infelizmente, ainda não se tem muito conhecimento do efeito da adição de solventes orgânicos no processo de partição entre solutos - micela - fase móvel e de como isto afeta a seletividade. Por definição, em MEKC a força do eletrólito aumenta com a adição do agente orgânico, isto é, a partição do soluto com a micela e k' diminui. Todavia, o tempo total de análise diminui devido à redução da velocidade do EOF e das micelas. Este efeito é o contrário ao observado em HPLC,

¹⁰ H. Nishi, N. Tsumagari, S. Terabe, Anal. Chem. 61 (1989) 2434.

¹¹ J. Snopek, I. Jelinek, E. Smolkova-Keulmansova, J. Chromatogr. A 452 (1998) 554.

¹² I. Bjornsdottir, S. H. Hansen, J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 13 (1995) 1473.

onde o aumento da força do solvente é acompanhado por uma diminuição dos tempos de retenção e conseqüentemente de análise.

Ciclodextrinas^{3,8,13}

A adição de ciclodextrinas -CD- (α , β ou γ) ao eletrólito de corrida foi descrito pela primeira vez por Terabe e colaboradores¹³ com o intuito de melhorar a separação de analitos hidrofóbicos. A **Figura 20** ilustra esquematicamente uma separação em MEKC-CD.

Figura 20: Ilustração esquemática de uma separação por MEKC-CD. Os círculos (-) e retângulos em alaranjado-escuro representam a parede do capilar e aqueles em alaranjado-claro (+), os íons positivos do eletrólito. Os copos representam as ciclodextrinas e as figuras em rosa os solutos.

As CDs usadas em MEKC-CD são eletricamente neutras, portanto não possuem mobilidade eletroforética. Os analitos e as próprias CDs migram com a mesma velocidade do EOF. Elas não se incorporam às micelas devido a natureza hidrofílica de sua camada externa. A adição de CD reduz o coeficiente de distribuição possibilitando a separação de analitos altamente hidrofóbicos, os quais em outras circunstâncias, seriam totalmente incorporados às micelas.

¹³ S. Terabe, Y. Miyashita, O. Shibata, E. R. Barnhart, L. R. Alexander, D. G. Patterson, B. L. Karger, K. Hosoya, N. Tanaka, J. Chromatogr. A 516 (1990) 23.

Quanto maior a concentração de CD, menor o fator de capacidade, isto porque o interior hidrofóbico destas moléculas são um sítio a mais no processo de partição entre soluto - micela - fase móvel, característico da MEKC. Em MEKC-CD, o fator de capacidade pode ser modulado através da variação da concentração de ambos os surfactantes quanto da CD.

Uma importante característica desta técnica é que o complexo entre os solutos e as ciclodextrinas dependem do tamanho e tipo das últimas assim como do tamanho de suas cavidades. Dessa forma, as CD oferecem seletividade adicional podendo até separar isômeros geométricos, estruturais e óticos.

Uréia^{3,6}

Uma outra forma de estender a aplicação de MEKC a compostos hidrofóbicos é através da adição de uréia ao meio micelar. A uréia aumenta a solubilidade de compostos hidrofóbicos em meio aquoso e reduz a interação destes com as micelas. Dessa forma, o uso de uréia em MEKC pode levar a redução do fator de retenção de compostos hidrofóbicos, e ainda ao aumento da janela de eluição.

1.4. MEKC em extratos vegetais

A MEKC tem sido aplicada com sucesso para separar várias classes de metabólitos vegetais como compostos fenólicos, alcalóides e terpenóides¹⁴.

- *Substâncias Fenólicas*

Os primeiros metabólitos secundários a serem analisados por CE foram os fenilpropanóides ácidos, através de FSCE¹⁵. Mais tarde, fenilpropanóides ácidos e neutros foram analisados por MEKC¹⁶, onde foi possível observar que os solutos neutros migravam mais rápido que os aniônicos, indicando que a separação de tais compostos envolve não somente interações hidrofóbicas, mas também mobilidade eletroforética.

¹⁴ F. A. T. Barberán, *Phytochem. Anal.* 6 (1995) 177.

¹⁵ S. Fujiwara, S. Honda, *Anal. Chem.* 58 (1986) 1811.

¹⁶ P. Morin, M. Dreux, P. André, *JIEP* 16 (1992), 201.

Em MEKC, agliconas flavonoídicas são separadas por uma combinação de dois fatores: carga e hidrofobicidade. Quando na presença do eletrólito com pH alto (acima de seu valor de pK_a), as hidroxilas de tais moléculas estão dissociadas, forçando-as a migrem de acordo com o número de cargas negativas formadas: quanto mais cargas negativas maior o tempo de migração, uma vez que estas migram no contra-fluxo. Além disso, ocorre também a interação da molécula do soluto com a micela. Sendo assim, a mudança da concentração do surfactante, pode levar a separação de diferentes pares de flavonóides¹⁷. A adição de 10% de metanol ao eletrólito aumenta consideravelmente a resolução do eletroferograma, uma vez que este solvente aumenta a solubidade dos flavonóides no eletrólito e diminui o EOF, o que conseqüentemente leva ao aumento do tempo de migração de solutos aniônicos¹⁴.

MEKC tem sido amplamente usada para a análise de glicosídeos flavonoídicos, onde micelas aniônicas como SDS geralmente são usadas. Neste caso a separação é baseada em três fatores: na mobilidade eletroforética dos analitos (a qual pode ser diminuída em pH ~7), na mobilidade do EOF e na mobilidade eletroforética das micelas¹⁴.

Cumarinas também foram analisadas por MEKC¹⁶ com SDS, em pH 7,0. O mecanismo de retenção neste tampão neutro baseia-se principalmente nas interações hidrofóbicas entre o soluto e a porção hidrofóbica da micela.

O objetivo do presente trabalho foi avaliar o comportamento de substâncias fenólicas em MEKC, MEKC-CD, MEKC com solvente orgânico e com uréia a fim de otimizar uma condição de análise onde fosse possível separar as 11 substâncias estudadas em uma única corrida e identificá-las em extratos de camomila.

¹⁷ C. Delgado, T. F. A. Barberán, T. Talou, A. Gaset, *Chromatographia* 38 (1994) 71.

2- Parte Experimental

Eletrólitos de corrida

Os eletrólitos de corrida (cuja composição está especificada em cada eletroferograma) foram preparados diariamente e filtrados com membrana filtrante 0.45 μ m (Millipore), antes do uso. O tetraborato de sódio (TBS) foi adquirido da Riedel de Haen, o dodecil sulfato de sódio (SDS), uréia e a β -ciclodextrina (β CD) da Sigma. Os solventes orgânicos (Merck) foram de grau cromatográfico. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema de membrana filtrante Milli-Q com membrana de 0,45 μ m.

No caso dos eletrólitos com pH 10, este foi ajustado antes da adição do SDS bem como dos outros agentes modificadores.

Equipamentos

Os experimentos em MEKC foram conduzidos em dois sistemas para CE distintos. Parte das análises foi realizada em um sistema de eletroforese capilar (modelo 270^A-HT, Perkin Elmer, Applied Biosystems Div.), equipado com detector UV e coluna capilar de sílica fundida de 72 cm de comprimento total e 52 cm até o detector e 325 μ m e 75 μ m de diâmetros externo e interno, respectivamente, com temperatura de forno mantida em 30^oC e comprimento de onda de 337 nm.

Outra parte das análises foi conduzida em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detector do tipo arranjos de diodos fixado em 337nm, controle de temperatura mantido em 25^oC, programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). As análises foram feitas usando capilar de sílica fundida com 63 cm de comprimento (54,5 cm de comprimento efetivo), e 75 μ m de diâmetro interno (325 μ m de diâmetro externo). O equipamento utilizado foi especificado em cada eletrocromatograma.

Em ambos os casos as amostras foram injetadas hidrodinamicamente (condições especificadas em cada eletrocromatograma), e o sistema foi operado com polaridade normal (voltagem descrita em cada eletrocromatograma).

Padrões e Amostras

Os padrões 2-5 e 7-9 (**Figura 3**) foram obtidos da Sigma, os 6, 8 e 11 da Extrasynthèse e o 1, da Fluka. Para os experimentos, soluções estoque dos padrões com 1mg/mL em DMSO/MeOH 1:9, foram preparadas cada semana e estocados em freezer. Cerca de 100 μ L de cada uma destas soluções foram misturados para obter uma solução com todos os padrões.

Exatamente 5,0g da solução estoque do extrato metanólico (obtida conforme descrito na 1ª Parte) foi pesada e diluída para 10mL em uma mistura de MeOH/H₂O 1:1. Esta solução foi usada diretamente nos experimentos em CE.

Exatamente 2,5g do extrato glicólico e 5,0g do extrato etanólico foram pesados e diluído para 10mL em MeOH/H₂O 1:1.

Condicionamento do capilar

O condicionamento do capilar no início do dia foi feito através da lavagem consecutiva de:

- 1 min com H₂O;
- 5 min com NaOH 1 M;
- 1min com H₂O;
- 15 min com eletrólito (900 mbar);
- 25 min com eletrólito (+25kV, 25^oC).

O condicionamento entre-corridas foi feito lavando o capilar com eletrólito durante 1 minuto (900 mbar), seguido da aplicação de voltagem (+25kV) durante 4 minutos a 25^oC.

No final do dia o capilar era lavado com água durante 10 minutos.

Estudo das Condições de Análises

A otimização das condições de análise foi feita variando a concentração do tampão e das micelas, voltagem, aditivos (solventes orgânicos, β -ciclodextrina, uréia). Estas análises foram feitas usando tanto a mistura de padrões quanto os extratos como amostra, estando as condições de injeção especificadas em cada

eletrocromatograma. O tampão usado foi o tetraborato de sódio (TBS) e a fase micelar foi obtida com dodecilssulfato de sódio (SDS).

Identificação das Substâncias de Interesse

A identificação das substâncias de interesse foi feita através do conjunto das técnicas de *spiking*¹⁸, comparação dos tempos de retenção e espectros obtidos a partir dos padrões. Os espectros foram agrupados em uma biblioteca de espectros.

Como amostra foram utilizados extratos metanólico (ExMeOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar), glicólico (ExGlic) 2,5g/10mL (3,0s/50mbar) e etanólico (ExEtOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar). Soluções padrões com 1mg/mL foram injetadas individualmente (2,0s/50mbar) e em mistura. Como eletrólito de corrida foi escolhido TBS 20mM pH 10/ SDS 20mM/ β -CD 15mM, +25 kV e +25°C.

¹⁸ L. R. Syder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York, 1997.

3- Resultados e Discussão

3.1. Otimização das condições de análises.

Os efeitos da variação da concentração do tampão (TBS) e da micela (SDS) foram estudados no extrato glicólico e estão mostrados na **Figura 21**.

Figura 21: Efeito da concentração do tampão (TBS) e micelas (SDS) no ExGlic 2,5g/10mL: A) TBS 50mM + SDS 50mM; B) 25 TBS mM + 25 SDS mM; C) TBS 25 mM + SDS 50 mM; D) TBS 50 mM + SDS 25 mM; E) TBS 50 mM + SDS 100 mM; F) TBS 100 mM + 50 SDS mM; G) TBS 100 mM + SDS 100 mM. Equipamento: Perkin Elmer. Injeção: 0,5s (cromatogramas a ao f) e 1,0s (cromatogramas g e h) / 5'' de Hg. Voltagem +20 kV. pH 9,8.

As **Figuras 22, 23 e 24** mostram o efeito da adição de agentes modificadores ao eletrólito de corrida contendo TBS 50 mM/SDS 50 mM, TBS 50 mM/SDS 25 mM e TBS 25 mM/SDS 50 mM respectivamente. Os estudos mostrados foram feitos com o intuito de verificar o perfil e o comportamento dos extratos em meio micelar.

Pôde-se observar que altas concentrações tanto de tampão quanto de surfactante apresentaram efeitos deletérios na separação, onde os melhores eletrocromatogramas foram aqueles obtidos com 25 mM a 50 mM de tampão e de surfactante.

A adição de solvente orgânico e uréia ao eletrólito de corrida não melhorou o perfil dos extratos. Por outro lado, 15mM de β -CD foi o suficiente para aumentar o número de picos separados em todas as condições usadas.

Dessa forma novos testes foram feitos, a fim de testar concentrações mais baixas de tampão e de surfactantes e a adição de acetonitrila e de β -CD. Nesta segunda fase, o pH dos eletrólitos de corrida foi alterado para 10 mantendo todas as substâncias em suas formas ionizadas, promovendo assim uma separação regida tanto pela mobilidade eletroforética quanto pelas interações hidrofóbicas destas com as micelas.

Os novos experimentos foram feitos usando o extrato metanólico e a mistura de padrões.

A **Figura 25** traz os eletrocromatogramas obtidos com as variações descritas a cima.

Figura 22: Efeito da adição de agentes modificadores ao eletrólito de corrida em MEKC: TBS 50 mM / SDS 50 mM. A) TBS 50 mM + SDS 50 mM + EtOH 6 % (v/v); B) TBS 50 mM + SDS 50 mM + MeOH 5 % (v/v); C) TBS 50 mM + SDS 50 mM + β CD 15 mM. pH 9,8. Equipamento: Perkin Elmer; amostra: ExMeOH; injeção: 0.5s/5" de Hg.

Figura 23: Efeito da adição de agentes modificadores ao eletrólito de corrida em MEKC TBS 50 mM / SDS 25 mM. A) TBS 50 mM + SDS 25 mM + β CD 15 mM; B) TBS 50 mM + SDS 35 mM + β CD 15 mM + uréia 4M. Equipamento: Perkin Elmer; amostra: ExMeOH; injeção: 0.5s/5" de Hg. pH 9.8.

Figura 24: Efeito da adição de agentes modificadores ao eletrólito de corrida em MEKC: TBS 25 mM / SDS 50 mM A) TBS 50 mM + SDS 25 mM + MeOH 5%; B) TBS 50 mM + SDS 35 mM + βCD 15 mM. Equipamento: Perkin Elmer; amostra: ExMeOH; injeção: 0.5s/5" de Hg. pH 9,8.

C)
ExMeOH

TBS 5mM/SDS 20mM

D)
Padrões

TBS 20mM/SDS 20mM

ExMeOH

E)

Padrões

TBS 5mM / SDS 5mM / 10% ACN

F)

Padrões

TBS 5mM / SDS 5mM / 20% ACN

ExMeOH

G)

Padrão

TBS 5mM / SDS 5mM / 30% ACN

ExMeOH

H)

Padrões

TBS 5mM / SDS 5mM / 40% ACN

ExMeOH

0 2.5 5 7.5 10 12.5 15 min

I)

Padrões

TBS 5mM / SDS 5mM / 50% ACN

ExMeOH

J)

Padrões

TBS 20mM / SDS 20mM / 5% ACN

Figura 25: Estudo de Eletrólitos: Efeito do tampão, surfactante e aditivos em MEKC. A) TBS 20mM + SDS 5mM; B) TBS 5mM + SDS 5mM; C) TBS 5mM + SDS 20mM; D) TBS 20mM, pH 10 + SDS 20mM; E) TBS 5mM + SDS 5mM + 10% ACN; F) TBS 5mM + SDS 5mM + 20% ACN; G) TBS 5mM + SDS 5mM + 30% ACN; H) TBS 5mM + SDS 5mM + 40% ACN; I) TBS 5mM + SDS 5mM + 50% ACN; J) TBS 20mM, pH 10 + SDS 20mM + 5% ACN; L) TBS 20mM, pH 10 + SDS 20mM + β -CD 15mM. Equipamento: HP^{3D}CE; voltagem: +25kV; temperatura: 25°C; amostras: mistura de padrões e ExMeOH 5,0g/10mL ambos 2,0s/50mbar

Com base nestes experimentos observamos que a separação das substâncias fenólicas estudadas também é possível por MEKC. Neste caso um surfactante aniônico (SDS) foi introduzido no eletrólito de corrida formando uma “pseudo” fase estacionária a qual migra lentamente em direção ao cátodo por imposição do EOF (neste caso porque o pH está alto). Alguns aditivos foram considerados com o intuito de aumentar a solubilidade ou prover uma fase auxiliar objetivando o aumento da seletividade do sistema.

Muito embora a separação do par crítico 6/8 (formas glicosiladas da apigenina e luteolina, respectivamente) não tenha sido possível em FSCE (**Figura 12**) a não ser com o uso de situações extremas de concentração do tampão, a MEKC foi uma alternativa interessante, por explorar dois tipos distintos de mecanismo de separação simultâneos: a migração e a partição.

A **Figura 25** apresenta a separação das 11 substâncias analisadas em diversas condições. Sem levar em consideração os aditivos, a adição de 20mM de SDS à 20 mM de tampão parece ter sido a melhor das condições de análise obtida (**Figura 25D**). Todavia, esta não foi eficiente na separação dos componentes da mistura de padrões. Esta situação piorou ao adicionar acetonitrila, indicando que a adição de solvente orgânico não foi favorável neste caso. Na maior parte dos eletrocromatogramas obtidos com este solvente orgânico, foi observado a co-eluição de diversas substâncias, o decréscimo da velocidade do EOF e ainda alargamento e distorção de diversos picos. A adição de β -ciclodextrina (**Figura 25L**) foi mais satisfatória e a separação do par crítico 6/8 foi finalmente obtida num tempo razoável de análise.

A **Figura 26** mostra a associação dos espectros obtidos em linha na separação das 11 substâncias na condição ótima encontrada nos experimentos descritos anteriormente (tampão tetraborato de sódio 20mM/ SDS 20mM/ β -CD 15mM, pH 10, +25kV, 25°C). Nesta condição foi possível obter a separação de todos os analitos, apesar da resolução das substâncias 11, 2, 5, 4 e 7 terem diminuído quando comparadas com aquelas obtidas em FSCE.

Uma vez que em MEKC existem dois mecanismos distintos de separação, a ordem de eluição não foi a mesma que a observada em FSCE.

Figura 26: Análise dos Compostos Fenólicos nas Condições Otimizadas em MEKC. Tampão tetraborato de sódio 20mM pH 10, SDS 20mM e β -CD 15mM, +25kV, 0,2s/50mbar, 337nm.

Comparando a **Figura 12** com a **Figura 26** é possível observar que os espectros obtidos em linha nas duas condições foram bastante semelhantes, apesar da adição de SDS e β -CD ao eletrólito de corrida da segunda condição. Este fato é muito conveniente principalmente nas análises de matrizes complexas como extratos vegetais, pois facilita a identificação das substâncias analisadas diminuindo a necessidade de técnicas trabalhosas como a adição de padrão.

3.2. Identificação das substâncias de interesse.

A **Figura 27** mostra os eletrocromatogramas dos extratos metanólico, glicólico e etanólico com os picos identificados, nas condições otimizadas em MEKC.

Como amostra foram utilizados extratos metanólico (ExMeOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar), glicólico (ExGlic) 2,5g/10mL (3,0s/50mbar) e etanólico (ExEtOH) 5,0g/10mL (3,0s/50mbar). Como eletrólito de corrida foi escolhido TBS 20mM/SDS 20mM/ β -CD 15 mM pH 10, +25 kV e +25°C. Os experimentos foram realizados no equipamento HP^{3D}CE.

Todos os picos foram identificados por comparação direta dos espectros de UV, pela biblioteca de espectros e finalmente por *spiking* (**Figuras 28 a 30**). A identificação preliminar através dos espectros estava correta, o que mostra que o uso do DAD como ferramenta de identificação é bastante válido.

As informações obtidas no que diz respeito à composição dos extratos analisados foi bastante similar com aquelas obtidas em FSCE (**Figura 12** do Capítulo 1 da 2ª Parte).

Figura 27: Análise dos extratos A) metanólico, B) glicólico e C) etanólico nas condições otimizadas em MEKC. As condições foram as mesmas descritas na **Figura 26**. A numeração dos picos seguiu a ordem apresentada na **Figura 03**. O * representa o pico dos conservantes.

Figura 28: Spikes no ExMeOH em MEKC: A) ácido clorogênico; B) naringenina; C) luteolina; D) rutina; E) luteolina-7-O-glucosídeo; F) água. Condições de análise: ExMeOH 5,0g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito nas **Figura 26**.

Figura 29: Spikes no ExGlic em MEKC: A) ácido caféico; B) quercetina; C) rutina; D) água. Condições de análise: ExGlic 2,5g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito na **Figura 26**.

Figura 30: Spikes no ExEtOH MEKC: A) quercetina; B) rutina; C) água. Condições de análise: ExHid 5,0g/10mL (3,0s/50mbar); solução estoque de padrões 1mg/mL (0,2 a 0,5s/50mbar); eletrólito de corrida: o mesmo descrito na **Figura 26**.

4- Conclusões

A metodologia descrita para MEKC permitiu a separação das substâncias estudadas, bem como a identificação destas em extratos de camomila, fornecendo informações complementares.

Esta técnica parece ser uma alternativa analítica interessante, pois explora dois mecanismos distintos de separação: a migração diferenciada dos compostos carregados e a partição destes tanto com as micelas quanto com a β -CD. Estes fatores levaram ao aumento da resolução do par crítico apigenina-7-O-glicosídeo e luteolina-7-O-glicosídeo (6+8), promovendo entretanto a perda de resolução entre apigenina/umbeliferona (5/2) e apigenina/ácido caféico (5/4).

O sistema de detecção forneceu informações espectrais semelhante às observadas em FSCE, permitindo a identificação da maioria dos componentes de interesse.

Assim como na FSCE, a MEKC apresenta a vantagem de poder ser usada na análise de extratos vegetais sem a necessidade prévia da pré-purificação da fração de interesse.

1- Introdução

Os extratos vegetais são misturas complexas, contendo altas concentrações de substâncias tais como clorofila, ácidos graxos, esteróides, sais de metais, as quais apresentam alta afinidade por fases estacionárias apolares à base de sílica¹.

Tendo em vista que as demais técnicas a serem abordadas neste estudo, fazem uso de colunas empacotadas com este tipo de fase estacionária, foi necessário desenvolver uma metodologia de limpeza ou pré-purificação da fração fenólica dos extratos de camomila estudados.

Durante muitos anos a extração líquido-líquido (LLE) foi a técnica de escolha para este tipo de procedimento, entretanto o surgimento dos cartuchos para extração em fase sólida (SPE)² mudou esta prática.

A SPE é um processo extrativo que compreende uma fase sólida e uma líquida. A sua aplicação não se limita a eliminação de interferentes e contaminantes, uma vez que estes cartuchos também são usados como concentradores, para troca de solvente, e ainda como meio de estocagem e transporte³.

Esta técnica se baseia no princípio da retenção dos analitos de interesse em um adsorvente especial localizado em uma mini-coluna de extração (cartuchos), onde é possível trabalhar com diferentes polaridades de solventes de modo a concentrar, limpar ou guardar a matriz a ser analisada.

O uso dos cartuchos com a finalidade de eliminação de interferentes geralmente envolve três passos (**Figura 31**)⁴:

- 1- Condicionamento do cartucho, preparando-o para interagir com a amostra;
- 2- Aplicação da amostra, forçando-a através do adsorvente contido no cartucho. Nesta fase, os componentes de interesse da amostra e alguns dos compostos interferentes permanecem adsorvidos na fase estacionária;
- 3- Lavagem do cartucho, para a retirada dos interferentes da matriz que possam ser eluídos com solventes fortes na próxima etapa;

¹ K. Glowinski, G. Zgórk, M. Kozyra, J. Chromatogr. A 730 (1996) 25.

² M. C. Hennion, J. Chromatogr. A 856 (1999) 3.

³ W. J. Lough, I. W. Wainer (Eds.) High Performance Liquid Chromatography. Fundamental Principles and Practice, Blackie Academic & Professional, London, 1997, p. 171.

⁴ L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, 2nd ed., John Wiley & Sons Inc., New York, Cap. 4.

4- Recuperação da amostra, através da eluição seletiva dos compostos de interesse.

Figura 31: Ilustração esquemática de uma sequência de eliminação de interferentes por SPE. A) Passo 1: condicionamento do cartucho; B) Passo 2: introdução da amostra; C) Passo 3: o analito (A) fica retido e as impurezas (I) são eluídas do cartucho com o solvente W; D) o analito (A) é então eluído com o solvente E; E) uma outra forma de proceder a separação é reter os interferentes e eluir o analito com um solvente Z⁴.

De fato, a SPE apresenta uma série de vantagens sobre a LLE. Além do menor gasto de solvente e maior eficiência no processo extrativo, ela possibilita o acoplamento direto com outras técnicas como a HPLC². Outros pontos positivos desta técnica são a facilidade de manejo e a grande versatilidade dos tipos de adsorventes disponíveis no mercado².

Os adsorventes mais populares são aqueles do tipo fase reversa à base de sílica, onde apenas pequenas porções de solventes orgânicos são necessários para a eluição, o que mantém a concentração do analito mais alta. Como não há a necessidade de separação de fases (como na LLE), a coleta da fração total do analito é mais fácil, eliminando assim, erros associados às diversas variáveis e às medidas de volumes inacurados.

Há, entretanto, algumas desvantagens da SPE com relação à LLE. Os solventes usados na última são geralmente puros e bem definidos, fazendo com que esta técnica seja bastante reprodutiva; por outro lado, no passado os cartuchos de SPE tendiam a variar de lote para lote, o que acaba ocasionando baixa reprodutibilidade. Além disso, da mesma forma que nas colunas de HPLC, pode ocorrer a adsorção irreversível de alguns analitos na fase estacionária⁴. Nos últimos anos, entretanto, o avanço na síntese de adsorventes veio trazer uma nova geração de cartuchos muito mais reprodutivos⁵.

Com relação à tecnologia de adsorventes, muitos foram elaborados para serem usados com uma ampla gama de analitos de polaridades diferentes. Este é o caso das sílicas C18 do tipo não capeada e as monofuncionais, às quais possuem em suas partículas, porções de caráter polar, oferecendo também sítios para interações com constituintes polares².

Todavia, uma das maiores limitações para este tipo de adsorvente e, também para aqueles à base de outros tipos de polímeros (p.e. estireno-divinilbenzeno), é a baixa afinidade destes pela água, gerando a necessidade do condicionamento prévio com um solvente orgânico antes do carregamento de um solvente aquoso².

⁵ C. W. Huck, G. K. Bonn, J. Chromatogr. A 885 (2000) 51.

O avanço da química de polímeros trouxe novos tipos de fases estacionárias, desenvolvidas especialmente para serem usadas com substâncias de diversas polaridades e para melhorarem o problema da afinidade pela água.

Geralmente, estes adsorventes apresentam bom balanço entre suas porções hidrofílicas e lipofílicas, aumentando a afinidade do suporte pela água, o que possibilita a secagem do cartucho antes do carregamento de solventes aquosos. Como exemplo destes tipos de cartuchos podemos citar a série Oasis da Waters e a Absolut da Varian⁵.

A aplicação da SPE para a pré-extração da fração fenólica de extratos vegetais é um prática bastante difundida, sendo os cartuchos recheados com ODS, os mais utilizados. Entretanto, até o presente momento, não foi possível encontrar nenhuma referência quanto ao uso destes cartuchos em extratos glicólicos. Uma vez que este tipo de veículo extrator apresenta maior polaridade que os extratos obtidos com MeOH/H₂O e EtOH/H₂O, pode-se esperar que seu comportamento seja diferente daquele apresentado pelos extratos até então descritos.

O objetivo desta parte do trabalho foi desenvolver uma metodologia para pré-purificação da fração fenólica dos extratos de camomila, para que esta pudesse ser analisada em colunas empacotadas com ODS.

Para isso foram utilizados dois tipos de cartuchos distintos, um empacotado com sílica do tipo ODS e outro empacotado com uma fase estacionária polimérica a base de N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno, comercializado pela Waters sob o nome de Oasis HLB.

2- Parte Experimental

2.1- Reagentes e Padrões

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para a extração de limpeza dos extratos, foi utilizado solvente grau PA da Merck e/ou Carlo Erba; para as análises em HPLC e FSCE foram usados solventes das mesmas marcas grau cromatográfico.

Os padrões 2-5 e 7-9 (**Figura 3**) foram obtidos da Sigma, os 6, 8 e 11 da Extrasynthèse e o 1, da Fluka. Para os experimentos, soluções estoque dos padrões com 1mg/mL em DMSO/MeOH 1:9 foram preparadas semanalmente e estocados em freezer. Cerca de 100µL de cada uma destas soluções foram misturadas para obter uma solução (1100µL total) com todos os padrões.

Os eletrólitos e tampões foram preparados com reagentes das marcas Sigma, Fluka, Merck e Riedel de Haen.

A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema filtrante Milli-Q com membrana 0,45 µm. Os eletrólitos foram filtrados em membrana filtrante de 0,45 µm (Millipore) antes de serem utilizados.

2.2- Cartuchos de Extração e Equipamentos

Os experimentos relatados a seguir podem ser divididos em duas fases. Uma descrevendo a otimização do processo extrativo em cartuchos empacotados com ODS e outra, descrevendo este procedimento para cartuchos Oasis HLB (Waters). Os experimentos realizados na primeira etapa foram monitorados com HPLC, enquanto o monitoramento da segunda fase foi feita por FSCE e RMN ¹H.

Em ambos os casos utilizou-se uma bomba de vácuo acoplada a um kitassato, o qual foi adaptado para receber os cartuchos. O vácuo foi mantido de forma a não permitir que os cartuchos secassem e que a velocidade de eluição não ultrapassasse 1mL/min.

A. Extração usando cartuchos empacotados com ODS

As frações obtidas foram monitoradas por um cromatógrafo líquido, modelo LC-10AD, Shimadzu, equipado com três bombas, detetor do tipo UV em 337nm, coluna analítica ODS (125mm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno) Purospher RP-18 capeado (Merck), com partículas de 5µm e pré coluna Purospher RP-18 capeado (Merck), com partículas de 5µm, 10mm de comprimento e 4mm de diâmetro interno. A fase móvel usada foi uma mistura de tampão fosfato 10mM, pH 2,8 (solvente A) e ACN (solvente B), com o seguinte gradiente de eluição: 7% B durante 2 min.; 7% a 15% B em 6 min.; 15% a 75% B em 17 min.; 75% a 80% B em 2 min.; 80% B durante 2 min.; 80% a 100% B em 4 min.; 100% B durante 5 min. Totalizando 29 min. de análise e 100% a 7% B em 2 min.; 7% B durante 10 min para possibilitar o início da próxima corrida.

Foram usados cartuchos Sep-Pak RP-18 (Waters) de 500mg e 1g conforme especificado nos experimentos.

Em primeiro lugar foi testada qual a melhor porcentagem de MeOH em água para a eluição da fração de interesse. Para isso, um cartucho contendo 500mg de fase estacionária foi condicionado com 5mL de MeOH, seguido de 5mL de H₂O (**Figura 32A**) e carregado com 1mL de extrato metanólico. O cartucho foi eluído com 5mL de H₂O, visando a retirada dos interferentes polares, e depois com 5mL de uma mistura de 30% de MeOH em água, seguido de outra com 50%, 70% e por fim outra com 100%. As frações foram analisadas separadamente.

Observada qual a melhor concentração de MeOH em água (70%), para a retirada dos componentes de interesse, verificou-se qual o melhor volume da solução em questão a ser usada. Neste segundo experimento, o cartucho foi condicionado e carregado conforme descrito acima e depois eluído com 5mL de H₂O. A fração retida no cartucho foi eluída com 10mL de MeOH 70% (**Figura 32B**), e as frações foram coletadas separadamente de 1 em 1 mL e analisadas.

Uma vez definida o melhor volume de MeOH 70% a ser usado, o mesmo procedimento foi aplicado ao extrato glicólico.

Figura 32: Ilustração esquemática dos dois processos estudados para a purificação da fração fenólica de extratos de camomila em cartuchos com ODS. A) procedimento para a otimização da porcentagem de MeOH em H₂O; B) procedimento para a otimização do volume de MeOH 70% a ser utilizado.

B. Extração usando cartuchos empacotados com *N*-vinilpirrolidona/divinilbenzeno

Uma vez que cartuchos empacotados com ODS não foram efetivos na pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico, optou-se por testar uma nova fase estacionária, com caráter ligeiramente mais apolar que a primeira. A fase estacionária escolhida foi aquela contida nos cartuchos Oasis HLB da Waters, que apresenta maior afinidade pela água, além de outras vantagens.

A limpeza dos extratos se deu em cartucho contendo 60mg de adsorvente, e as frações obtidas foram monitoradas por FSCE e por RMN ¹H. Nesta segunda fase, optou-se por utilizar a FSCE, pois ela permite a análise dos extratos sem a necessidade da pré-purificação, possibilitando a comparação direta das diversas fases

do processo extrativo, sem o risco de dano à coluna. A RMN foi usada com o intuito de observar a presença de ácidos graxos, os quais são invisíveis no UV.

Nas análises em FSCE foi usado um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detetor do tipo arranjo de diodo fixado em 337nm, controle de temperatura, programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

A condição de análise foi aquela considerada como ótima no Capítulo 1 da 2ª Parte: tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, +25kV, 25°C; as dimensões da coluna capilar foi de 63cm com 54,5cm de comprimento efetivo e 75µm e 375µm de diâmetro interno e externo, respectivamente. As amostras foram injetadas hidrodinamicamente, com 3,0s/50mbar. Os experimentos em RMN ¹H foram feitos em um equipamento Bruker 500MHz (Bruker). O MeOD, DMSO e tubos para análises em ressonância usados nos experimentos de RMN ¹H foram comprados da Aldrich.

Foram realizados dois experimentos nesta fase.

O primeiro teve por objetivo observar o comportamento dos extratos metanólico e glicólico nestes cartuchos, ao serem eluídos com a mesma série eluotrópica de MeOH em H₂O apresentada anteriormente e verificar se a redução do pH das amostras para cerca de 2,0 estimularia a interação de seus componentes com o adsorvente.

O objetivo do segundo experimento foi verificar a presença de ácidos graxos em frações que não foram analisadas no primeiro experimento e, ainda, aplicar a metodologia desenvolvida para o extrato etanólico.

Experimento 1

A primeira leva de experimentos (**Figura 33A e B**) foi conduzida com o extrato metanólico e glicólico paralelamente, conforme descrito abaixo.

1º Passo: Preparo das amostras.

a) Cerca de 5,0g da solução estoque do extrato metanólico e 2,5g do glicólico foram pesados separadamente e diluídos para 10mL com água.

b) Os extratos foram divididos em 4 frascos: 2 frascos contendo 5 mL cada de ExMeOH e outros 2 contendo 5 mL cada de ExGlic;

c) Um dos frascos com ExMeOH foi acidificado a pH 2,5 com 300 μ L de ácido acético glacial, enquanto que no outro (pH 5,0) foi adicionado 300 μ L de H₂O de modo a seguir a diluição do anterior preservando o pH da amostra;

d) Um dos frascos com ExGlic foi acidificado a pH 1,5 com 100 μ L de HCl concentrado, enquanto que no outro (pH 6,0) foi adicionado 100 μ L de água.

2º Passo: Carregamento dos cartuchos.

a) 4 cartuchos OASIS HLB foram condicionados com 1mL de MeOH seguido de 1mL de H₂O, conforme especificações da Waters.

b) Os cartuchos foram carregados com 2mL dos extratos preparados conforme descrito abaixo:

CARTUCHO 1: 2 mL de ExMeOH (M);

CARTUCHO 2: 2mL de ExMeOH acidificado (Mac);

CARTUCHO 3: 2mL de ExGlic (G);

CARTUCHO 4: 2mL de ExGlic acidificado (Gac).

c) O excesso dos extratos carregados foram recolhidos separadamente e analisados.

3º Passo: Retirada dos interferentes polares.

a) Cada um dos cartuchos foi lavado com 2 mL de solução aquosa de ácido acético glacial 3% v/v (pH 2,8); as frações foram recolhidas separadamente e analisadas.

4º Passo: Determinação da melhor porcentagem de MeOH em H₂O na eluição dos compostos de interesse.

a) Os 4 cartuchos foram então lavados na seguinte seqüência, onde as frações novamente foram recolhidas separadamente e analisadas.

2 mL de 30% de MeOH em H₂O (MeOH 30%);

2mL de 50% de MeOH em H₂O (MeOH 50%);

2mL de 70% de MeOH em H₂O (MeOH 70%);

2mL de MeOH 100%(MeOH 100%)

Figura 33: Ilustração esquemática da limpeza dos extratos metanólico (A) e glicólico (B) usando cartuchos Oasis HLB, para os testes de porcentagem de MeOH em H₂O. *Não retido.

Experimento 2

No segundo experimento com os cartuchos HLB (**Figura 34**), repetiu-se parte da série eluotrópica estudada anteriormente, sendo adicionada uma lavagem a mais com clorofórmio. Nesta fase, os três extratos, metanólico, glicólico e etanólico foram trabalhados paralelamente, conforme descrito abaixo.

1º Passo: Preparo das amostras.

a) Os extratos metanólico e glicólico foram pesados e diluídos conforme descrito no 1º passo do experimento 1. Cerca de 7,0g do extrato etanólico foi pesado e diluído para 10mL de H₂O.

2º Passo: Carregamento dos cartuchos

a) 3 cartuchos OASIS HLB foram condicionados com 1mL de MeOH seguido de 1mL de H₂O, conforme especificações da Waters.

b) Os cartuchos foram carregados com 2mL dos extratos, conforme descrito abaixo:

CARTUCHO 1: 2 mL de ExMeOH;

CARTUCHO 2: 2mL de ExGlic;

CARTUCHO 3: 2mL de ExEtOH.

c) O excesso dos extratos carregados foi recolhido separadamente, sendo o do ExEtOH o único analisado nesta etapa.

3º Passo: Retirada dos interferentes polares.

a) Cada um dos cartuchos foram lavados com 2 mL de solução aquosa de ácido acético glacial 3% v/v (pH 2,8). As frações foram recolhidas separadamente.

4º Passo: Eluição dos compostos de interesse.

a) Os 3 cartuchos foram lavados individualmente com MeOH 30%, 70% e MeOH 100% e em seguida com CHCl₃. As frações de MeOH 30%, 70% e 100% foram recolhidas em conjunto (este conjunto de frações será chamada de “*fração conjugada*”) e a de CHCl₃ individualmente. Todas as frações foram secas e ressuspensas em 100µL de MeOH.

Figura 34: Desenho esquemático ilustrando a limpeza dos extratos metanólico, glicólico e etanólico em HLB. *Não retido.

3- Resultados e Discussões

3.1. Extração em cartuchos contendo ODS

Estes experimentos foram feitos com cartuchos Sep-Pak C18 empacotados com ODS e a primeira variável estudada foi a porcentagem de MeOH em H₂O a ser utilizada. Este experimento foi conduzido com o extrato metanólico.

A **Figura 35** mostra os cromatogramas obtidos na otimização deste parâmetro.

Figura 35: Cromatogramas mostrando a otimização da porcentagem de MeOH em H₂O a ser utilizada na pré-purificação da fração fenólica em extrato metanólico de camomila, usando cartuchos ODS. A) MeOH 30%; B) MeOH 50%; C) MeOH 70%. Coluna: Purospher C18 *endcapped*. Condições de análise: tampão fosfato 10mM, pH 2,8 (solvente A) e ACN (solvente B), com o seguinte gradiente de eluição: 7% B durante 2 min.; 7% a 15% B em 6 min.; 15% a 75% B em 17 min.; 75% a 80% B em 2 min.; 80% B durante 2 min.; 80% a 100% B em 4 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 7% B em 2 min.; 7% B durante 10 min. Injeção: 20µL, $\lambda=337\text{nm}$. Numeração de acordo com a **Figura 3**.

De acordo com os cromatogramas A, B e C, referentes às frações eluídas com 30% , 50% e 70% de MeOH em H₂O respectivamente, é possível observar que cada fração possui uma faixa de substâncias com polaridade semelhantes. Dessa forma, MeOH 30% eluiu um conjunto de substâncias mais polares que MeOH 50%, que, por sua vez, eluiu outro conjunto de substâncias com polaridade intermediária entre 30% e 70%.

Dentre as substâncias analisadas, uma das mais apolares é a apigenina, eluída apenas com 70% de MeOH (**Figura 35**). Dessa forma, os próximos passos foram determinar se MeOH 70% seria eficiente na extração da fração de interesse e ainda, qual o volume necessário para eluir completamente a apigenina, a substância de maior interesse para posterior padronização do extrato metanólico.

Neste processo, outro cartucho previamente condicionado foi carregado com o extrato metanólico e a fração fenólica foi eluída com 10mL de MeOH 70%. As frações foram coletadas separadamente de 1 em 1 mL e analisadas por HPLC. A **Figura 36** mostra os cromatogramas obtidos nestas análises.

Com base na intensidade do pico da apigenina, optou-se por usar 8mL de MeOH 70%, o que ao nosso ver, representou um bom compromisso entre extração e diluição. Este parâmetro só foi adotado, porque este experimento não teve finalidade quantitativa. Caso a nossa finalidade fosse esta, um teste de recuperação e a determinação do volume de *breakthrough* seriam recomendados.

A comparação dos cromatogramas **36A** e **B** com os **35A**, **B** e **C** confirma que MeOH 70% não se mostrou eficiente na extração de todos os componentes, sendo seletivo apenas para os componentes cuja polaridade esteja próxima da apigenina.

A) MeOH 70%_{F1}

B) MeOH 70%_{F2}

C) MeOH 70%_{F3}

D) MeOH 70%_{F4}

E) MeOH 70%_{F5}

F) MeOH 70%_{F6}

G) MeOH 70%_{F7}

H) MeOH 70%_{F8}

I) MeOH 70%_{F9}

J) MeOH 70%_{F10}

L) MeOH 100%

Figura 36: Cromatogramas ilustrando a otimização do volume de MeOH 70% necessário para a extração da apigenina (pico marcado com uma seta) em cartuchos ODS. A) MeOH 70%_{F1}; B) MeOH 70%_{F2}; C) MeOH 70%_{F3}; D) MeOH 70%_{F4}; E) MeOH 70%_{F5}; F) MeOH 70%_{F6}; G) MeOH 70%_{F7}; H) MeOH 70%_{F8}; I) MeOH 70%_{F9}; J) MeOH 70%_{F10}; L) MeOH 100%. Condições de análise: vide **Figura 35**.

Estes experimentos mostraram que nestas condições, o melhor procedimento para a purificação da fração fenólica do extrato metanólico baseia-se no uso de uma série eluotrópica de MeOH em água, conforme descrito a seguir:

1. Condicionamento de um cartucho de 500mg com 5mL de MeOH seguido de 5mL de água;
2. Carregamento deste cartucho com 1mL de extrato;
3. Eluição de 2mL de água para a retirada dos interferentes polares e sais de metais;
4. Eluição com a seguinte série eluotrópica, recolhendo as frações em conjunto: 5mL de 30% de MeOH em H₂O, 5mL de 50% de MeOH em H₂O e 5mL de 70% de MeOH em H₂O;
5. Evaporação da fração obtida.

Tendo em vista a ampla faixa de polaridade abrangida pelas substâncias estudadas, é compreensível a necessidade do uso de uma série eluotrópica com a combinação das frações obtidas, pois enquanto substâncias polares como o ácido caféico e a rutina não puderam ser eluídos apenas com MeOH 70%, as substâncias mais apolares comparativamente com a apigenina também permaneceram retidas quando houve a eluição com MeOH 30 e 50%.

O maior inconveniente desta prática é a necessidade da evaporação do solvente da fração obtida e a ressuspensão em um volume conhecido.

Uma vez definido o melhor procedimento de limpeza para o extrato metanólico, a mesma metodologia foi aplicada ao extrato glicólico. Como já era esperado houve variação nos resultados, devido às características químicas dos veículos extratores usados neste extrato.

A **Figura 37** mostra os cromatogramas das frações obtidas com a eluição do extrato glicólico com de MeOH 30, 50, 70 e 100%, nos quais podemos observar a total ausência das substâncias estudadas, indicando que estas poderiam ter sido completamente eluídas já na primeira passagem de água, usada para a retirada dos interferentes.

Dessa forma, a referida fração aquosa foi analisada (**Figura 38**) e de fato pode-se observar que com exceção dos componentes mais apolares, que apareceram na

fração com 100% de MeOH, todos os outros componentes apresentaram pouca afinidade pelo suporte de ODS, sendo liberados já na primeira passagem de H₂O. Este fato pode ser atribuído à presença de propilenoglicol e glicerina na composição do extrato, os quais possivelmente poderiam estar modificando a polaridade do sistema, impedindo as interações hidrofóbicas entre os analitos e as cadeias carbônicas da ODS.

Figura 37: Cromatogramas mostrando a otimização da porcentagem de MeOH em H₂O a ser utilizada na pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico de camomila, usando cartuchos ODS. A) MeOH 30%; B) MeOH 50%; C) MeOH 70%; D) MeOH 100%. Condições de análise: vide **Figura 35**.

Figura 38: Cromatograma da fração aquosa usada para a retirada dos interferentes durante o processo de pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico de camomila, usando cartuchos ODS. Condições de análise: vide **Figura 35**.

3.2. Extração usando cartuchos empacotados com N-vinilpirrolidona/divinilbenzeno

Tendo em vista que cartuchos empacotados com ODS não foram efetivos na pré-purificação da fração fenólica do extrato glicólico, optou-se por testar outros cartuchos, contendo partículas de polímeros de N-vinilpirrolidona e divinilbenzeno, comercializado pela Waters sob o nome de Oasis HLB. A limpeza dos extratos foi realizada em cartucho contendo 60mg (3cc) de adsorvente e, as frações obtidas foram monitoradas por FSCE e por RMN ^1H .

A comparação do perfil eletroforético dos extratos brutos antes e depois da acidificação (**Figuras 39A e 40A**) mostrou que estes foram completamente diferentes, indicando que a adição do ácido pode ter hidrolisado ou degradado a amostra.

A ausência de picos nos eletroferogramas **B** das **Figuras 39 e 40** indicou que no carregamento de ambos os extratos, todos os constituintes com absorção em 337nm ficaram retidos no cartucho.

Com relação ao uso da água acidificada para a retirada dos interferentes (**Figuras 39C e 40C**), observou-se que em ambos os casos ocorreram perdas do ácido clorogênico (4) e de uma outra substância não identificada. É interessante notar, que esta perda foi maior no extrato acidificado (ver intensidade relativa dos picos), o que foi confirmado no eletroferograma da fração Mac30% (**Figura 40D**), pois esta, ao contrário da fração M30% (**Figura 39D**), praticamente não apresentou ácido clorogênico (4).

Figura 39: Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato metanólico com cartuchos HLB. Condições de análise: tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10, +25kV, 250C. Injeção hidrodinâmica 3,0s/50mbar, $\lambda=337\text{nm}$. O nome entre parêntesis em cada eletroferograma refere-se ao nome abreviado de cada fração, o qual será usado no texto.

Figura 40: Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato metanólico ácido com cartuchos HLB. Condições de análise: vide **Figura 39**.

No extrato não acidificado, as frações com MeOH 30 e 50% (**Figuras 39E e F**) foram as mais efetivas na eluição do ácido clorogênico e rutina (10), enquanto que 70% (**Figuras 39F e 40F**) eluiu o restante das substâncias mais apolares com exceção da apigenina, a qual só foi eluída com MeOH 100%.

As **Figuras 41 e 42** mostram os eletroferogramas das frações obtidas no processo de pré-purificação dos extratos glicólico e glicólico acidificado, respectivamente.

Ao contrário do observado nos cartuchos ODS, os cartuchos HLB foram eficientes no fracionamento tanto do extrato metanólico quanto do glicólico. O comportamento apresentado pelos extratos glicólico (**Figura 41**) e glicólico acidificado (**Figura 42**), neste processo extrativo, foi semelhante ao comportamento dos extratos metanólico (**Figura 39**) e metanólico acidificado (**Figura 40**), no que se refere aos componentes apolares: enquanto que em ambos os extratos, a apigenina só foi eluída com a passagem de MeOH 100%, o ácido clorogênico (4), no extrato acidificado, começou a ser liberado logo na primeira passagem de água (**Figura 42C**).

A impossibilidade da identificação do ácido clorogênico nas frações do extrato glicólico acidificado leva a crer que a acidificação deste, no início dos experimentos, pode ter ocasionado a degradação de seus constituintes.

Figura 41: Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato glicólico com cartuchos HLB. Condições de análise: vide **Figura 39**.

Figura 42: Eletroferogramas das frações coletadas por ordem de eluição durante os experimento de limpeza do extrato glicólico ácido com cartuchos HLB. Condições de análise: vide **Figura 39**.

Com base nestas observações pode-se concluir que a metodologia ideal para este sistema seria carregar o cartucho com extrato não acidificado e lavá-lo com água acidificada, sendo a eluição dos componentes de interesse feita com a passagem de MeOH 30, 70 e 100%, recolhendo as frações em conjunto (fração conjugada). Todavia, até este ponto ainda não estava claro se MeOH 100% estaria sendo efetivo na eluição dos componentes de polaridade semelhante à apigenina.

A presença destes componentes no cartucho, mesmo após a eluição com MeOH 100%, foi confirmada através da aplicação de 1mL de CHCl_3 logo após MeOH 100%. O CHCl_3 foi escolhido por ser apolar o suficiente para a eluição das substâncias em questão.

Sendo assim, o objetivo deste segundo bloco de experimentos foi avaliar se a série eluotrópica com 30, 70 e 100% de MeOH, reunidas em uma só fração (a qual foi chamada de fração conjugada) seria efetiva na eluição das substâncias fenólicas e se MeOH 100% foi capaz de eluir totalmente a apigenina, uma das substâncias mais apolares da série.

O comportamento do eluato metanólico frente a sequência eluotrópica testada pode ser visto na **Figura 43**, onde é possível observar que tal sequência foi parcialmente eficiente, pois a apigenina e os compostos neutros do extrato apareceram na fração clorofórmica (**Figura 43B**).

O extrato etanólico (**Figura 44**) seguiu o mesmo padrão de comportamento do extrato glicólico (**Figura 45**). Ambos extratos tiveram parte da quantidade total dos ácidos clorogênico e cafêico e dos glicosídeos flavonoídicos eluídos na primeira passagem de água, fato atribuído à provável presença de propilenoglicol e/ou glicerina no veículo extrator⁶.

De fato estes solventes parecem diminuir de maneira geral a polaridade do sistema, pois em ambos os extratos glicólico e etanólico, a apigenina e demais substâncias apolares (ver pico do EOF o qual contém os compostos neutros da

⁶ Ao tentar fazer a evaporação do restante do carregamento dos extratos, para que estes pudessem ser concentrados e analisados, foi observado que o extrato etanólico não evaporou à secura indicando a presença de um solvente não volátil na sua composição. Devido a semelhança de comportamento deste extrato com o glicólico quando submetido ao processo extrativo, acredita-se que estes possam ter glicerina e/ou propilenoglicol.

amostra) foram mais eficientemente eluídas com MeOH 100%, do que na mesma fração do extrato metanólico.

A análise de RMN ^1H da fração clorofórmica do extrato metanólico (**Figura 46**) confirmou a presença de hidrogênios aromáticos na região entre 6 e 8ppm. O mesmo não aconteceu nos espectros do extrato glicólico (**Figura 47**), onde somente os hidrogênios alifáticos foram observados.

Comparando estes resultados com aqueles obtidos anteriormente, pode-se observar que a fase estacionária do Oasis HLB é mais hidrofóbica que a ODS, o que possibilitou a limpeza dos extratos contendo glicerina e/ou propilenoglicol com uma relativa margem de perda dos compostos mais polares das amostras. Entretanto, nos casos em que o composto de interesse é a apigenina, este sistema torna-se efetivo.

Já para o extrato metanólico, os cartuchos com ODS parecem ser a melhor escolha, pois nos cartuchos HLB a apigenina só é eluída com a passagem de CHCl_3 o que acaba por eluir os ácidos graxos também.

Figura 43: Eletroferogramas das frações do extrato etanólico coletadas durante os experimento de limpeza do extrato glicólico ácido com cartuchos HLB. A) Fração conjugada: fração compostas pelo agrupamento das frações obtidas com MeOH 30, 70 e 100%; B) fração clorofórmica. Condições de análise: vide **Figura 35**.

Figura 44: Eletroferogramas das frações do extrato glicólico coletadas durante os experimento de limpeza do extrato glicólico ácido com cartuchos HLB. Condições de análise: vide **Figura 39**.

Figura 45: Eletroferogramas das frações do extrato metanólico coletadas durante os experimento de limpeza com cartuchos HLB. Condições de análise: vide **Figura 39**.

Figura 46: Espectro de RMN ^1H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato metanólico, em cartuchos HLB. MeOD.

Figura 47: Espectro de RMN ^1H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato etanólico, em cartuchos HLB. MeOD.

Figura 48: Espectro de RMN ^1H (500MHz) da fração clorofórmica obtida na pré-purificação do extrato glicólico, em cartuchos HLB. MeOD.

4- Conclusões

Apesar de não ter sido possível desenvolver uma única metodologia satisfatória para a limpeza dos três extratos usando o mesmo tipo de cartucho, foi proposta uma metodologia para a limpeza do extrato metanólico usando cartuchos com ODS e outra usando cartuchos Oasis HLB, para os extratos glicólico e etanólico.

Uma possível razão para esta diferença de comportamento entre os extratos pode ser a maior hidrofobicidade da fase estacionária dos cartuchos HLB, alta o suficiente para reter os compostos fenólicos mesmo na presença de propilenoglicol. Esta observação pode ser reforçada pelo fato desta fase estacionária necessitar CHCl_3 para eluir a apigenina no extrato metanólico, sendo que em cartuchos recheados com ODS esta foi completamente eluída com MeOH 70%.

Estas metodologias, entretanto, foram satisfatórias apenas para análises qualitativas, pois ficou clara a perda do ácido clorogênico e da rutina e, ainda, porque não foram feitos nenhum teste para verificar a porcentagem de perda das outras substâncias de interesse.

Nos dois cartuchos testados, a purificação da fração fenólica foi baseada nas interações hidrofóbicas entre os solutos e a fase estacionária. Tendo em vista que 10 dentre as 11 substâncias em estudo são ionizáveis, provavelmente o uso de cartuchos recheados com fase estacionária do tipo “modo misto”⁵, contendo tanto sítios para troca iônica quanto para as interações hidrofóbicas (para a retenção da herniarina), seria a melhor solução.

O acompanhamento dos experimentos usando RMN ^1H foi bastante providencial, podendo-se monitorar o aparecimento dos ácidos graxos nas frações clorofórmicas.

1- Introdução

Nos últimos 20 anos, a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) vem sendo aplicada amplamente na análise de extratos vegetais, substituindo a cromatografia em camada delgada (TLC) e a cromatografia gasosa (GC)¹. Nesta técnica, ao contrário da GC, a amostra pode ser injetada diretamente no equipamento sem a necessidade prévia de derivatizações, favorecendo a análise de compostos não voláteis sem provocar a decomposição térmica. Estas e várias outras vantagens² fizeram com que a HPLC se tornasse uma valiosa ferramenta na determinação de substâncias de origem natural.

Várias substâncias fenólicas presentes no metabolismo vegetal possuem uma ou mais hidroxilas livres, o que as tornam ionizáveis (existem inúmeras exceções como é o caso da herniarina). Na HPLC, a separação de amostras iônicas tende a ser um pouco mais complicada e difícil de entender do que a separação de substâncias neutras não ionizáveis. Por outro lado, o ajuste do espaçamento das bandas neste caso é muito mais fácil de se manipular, o que acaba por melhorar as chances de se obter melhor resolução entre os componentes da mistura³.

Na análise de substâncias ionizáveis é possível usar 3 tipos diferentes de HPLC: fase reversa (RP), pareamento iônico e troca iônica, sendo que dentre as três, a primeira é de longe a mais utilizada⁴.

No caso da RP, a otimização da separação e o controle da seletividade das substâncias é feita geralmente ajustando a força do solvente orgânico, variando o tipo de fase estacionária, o tampão e sua capacidade tamponante, a qual é modulada pelo pH, pKa e concentração do tampão^{3,4}. Nestes casos, tipicamente, a concentração do tampão gira em torno de 1 a 5mM, pois apesar das concentrações mais altas aumentarem a capacidade tamponante do sistema, no caso de tampão fosfato, estas diminuem a solubilidade do sal na fase orgânica, especialmente se for usado solvente orgânico em porcentagem alta⁴.

¹ J. B. Harborne, J. J. Mabry, H. Mabry, *The Flavonoids*, Chapman and Hall, London, 1975, p. 5.

² K. R. Markhan, *Techniques of Flavonoids Identification*, Academic Press, New York, 1982 p. 52.

³ L. R. Snyder, J. J. Kirkiland, J. L. Glajch, *Practical HPLC Method Development*, 29ed. John Wiley & Sons Inc., 1997, p. 127.

⁴ M. W. Hajnos, *J. Chromatogr. B* 717 (1998) 93.

O pH da fase móvel em separações com colunas de fase reversa à base de sílica deve permanecer entre 2 e 8; os tampões mais comuns usados nestas análises são os fosfato (pH 2,1-3,1 e 6,2-8,2), acetato (pH 3,8-4,8), citrato (pH 2,1-6,4) e carbonato (pH 3,8-5,8) dentre outros⁴.

Um dos fatores mais importantes para a separação de substâncias ionizáveis é o pH da fase móvel: o fator de retenção (k') de uma molécula neutra pode decrescer com um fator de 10 ou mais quando a mesma se encontra em sua forma ionizada. Dessa forma é indicado que, em experimentos de otimização de separação de moléculas ionizáveis, o pH da fase móvel seja considerado juntamente com a força do solvente orgânico, a fim de se obter valores de k' razoáveis^{3,4}.

Todavia não se pode assumir que a retenção destas substâncias seja dependente apenas do pH e da composição da fase móvel. Esta também dependerá de outros processos físico-químicos resultantes da ionização dos silanóis residuais livres, geralmente presentes na superfície das fases estacionárias à base de sílica³.

A literatura é vasta quando se trata da análise de fenilpropanóides, cumarinas e flavonóides por HPLC, sendo ODS o principal tipo de fase estacionária usada⁴. Neste caso, a fase móvel é geralmente constituída de uma combinação de MeOH ou ACN com solução aquosa de ácido acético glacial ou tampão com pH em torno de 2,5 a 3,0. Este pH é usado para manter as substâncias em suas formas neutras, o que, além de estimular as interações com as cadeias hidrofóbicas, melhora consideravelmente a reprodutibilidade do sistema⁵.

Segundo Pietta⁶, todos os flavonóides podem ser analisados por HPLC, usando colunas do tipo ODS ou octilsílica. Mas, apesar do amplo uso destas colunas, outros tipos de fases estacionárias a base de ciano, diol, sílica⁷ e divinilbenzeno/estireno⁸ também podem ser usadas.

⁵ J. B. Harbone (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry* Vol.1: Plant Phenolics, Academic Press, New York, 1987, Cap. 3.

⁶ P. Pietta, *Flavonoids in Medicinal Plants*. In: C. A. R. Evans, L. Parker (Eds.) *Flavonoids in Health and Disease*, Marcel Dekker Inc., New York, 1998, p. 61.

⁷ M. W. Hajnos, R. Nowak, H. D. Smolarz, *Chem. Anal.* 45 (2000) 795.

⁸ T. Hanai, H. F. Walton, J. D. Navratil, D. Warren, *J. Chromatogr.* 155 (1978) 261.

Nesta técnica, as fórmulas para cálculo de N , R_s e α são semelhantes às aquelas descritas nas equações 8, 11 e 10 respectivamente, apresentadas no Capítulo 1 da 2ª Parte, para as quais deverão serem feitas as seguintes correções: o valor do tempo do soluto neutro (t_n) deverá ser substituído pelo valor do soluto não retido (t_0), e ao invés de tempo de migração (t_m) deverá ser usado o tempo de retenção (t_r) do (s) soluto (s) em questão.

Uma vez que a HPLC vem sendo amplamente usada na análise de substâncias fenólicas em extratos vegetais, foi nosso objetivo desenvolver uma metodologia com esta técnica para a análise dos três extratos estudados. Sendo assim, poderíamos comparar as vantagens e as desvantagens das técnicas capilares de separação, propostas neste estudo, com esta técnica, já bem aceita tanto no meio científico quanto no meio industrial.

2- Parte Experimental

Materiais, Reagentes e Instrumentos Utilizados

As análises em HPLC foram feitas com solventes de grau HPLC da Merck e/ou Carlo Erba. Para as demais finalidades foram utilizados solventes dos mesmos fornecedores grau P.A. O fosfato monobásico de sódio usado para o preparo do tampão da fase móvel foi adquirido da Merck. O pH do tampão fosfato foi ajustado com ácido fosfórico 85% (Merck).

A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema filtrante Milli-Q com membrana 0,45 µm.

Os experimentos em HPLC foram realizados em cromatógrafo líquido (Shimadzu), equipado com bomba quaternária, detetor do tipo arranjo de diodos fixado em 337nm e sistema de tratamento de dados (Class VP, Shimadzu). A aquisição dos cromatogramas foi feita em 337nm e os espectros de UV-Vis foram obtidos com varredura de 200 - 450nm.

Como, até o momento em que as análises descritas neste capítulo, ainda não havia sido desenvolvido uma metodologia satisfatória para a limpeza dos extratos de camomila, estes foram injetados na forma bruta. A fim de minimizar o problema de adsorção do material alifático na fase estacionária, foi adotado o procedimento de lavar a coluna com ACN durante cerca de 60 minutos no final de cada dia de trabalho.

Padrões e Amostras

Os padrões (**Figura 03**) de apigenina, ácido cafêico, ácido clorogênico, luteolina, quercetina, rutina, umbeliferona (Sigma), naringenina, apigenina-7-O-glucosídeo, luteolina-7-O-glucosídeo (Extrasynthese) e herniarina (Fluka), foram preparados em DMSO/MeOH 10:90, na concentração de 1mg/mL, e estocados em temperatura abaixo de 0°C por não mais que uma semana.

Cerca de 5,0g da solução estoque do extrato metanólico (obtida conforme descrito na 1ª Parte) foi pesada e diluída para 10mL com uma mistura de MeOH/H₂O 1:1.

Cerca de 2,5g do extrato glicólico e 5,0g do extrato etanólico foram pesados e diluídos para 10mL em MeOH/H₂O 1:1. As soluções obtidas foram usadas para as análises depois de filtradas com membrana filtrante de 0,45µm (Millipore).

Fase Estacionária

Como fase estacionária, foram testados dois tipos de colunas analíticas ODS:

a)- 125 mm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno (Purospher - Merck), ODS capeada, (partículas de 5µm) e pré-coluna (Purospher - Merck) ODS capeada (partículas de 5µm) com 10 mm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno;

b)- 250 mm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno (Lichrospher - Merck) ODS, (partículas de 5µm) e pré-coluna (Lichrospher - Merck), ODS, (partículas de 5µm) com 10 mm de comprimento por 4 mm de diâmetro interno.

Fase Móvel

Como fase móvel foram testados dois tipos diferentes de mistura de solventes, em vários gradientes de eluição: tampão fosfato 10mM pH 2,8 (solvente A) / ACN (solvente B) e água acidificada com ácido acético glacial 3% pH 2,6 (v/v) (solvente A) e ACN (solvente B). A vazão variou conforme o experimento.

Como padronização, o gradiente de eluição será expresso em porcentagem do solvente B no solvente A, com o respectivo tempo de eluição. Dessa forma ao ler "2,5% a 100% B em 7 min.", significa que a porcentagem do solvente B (ACN) no solvente A (tampão fosfato) variou de 2,5% até 100% em 7 min.

Para que o texto não fique repetitivo, segue abaixo, a lista de alguns dos gradientes testados, cujos resultados foram mais expressivos.

• *Gradiente 1*

Fase móvel: tampão fosfato pH 2,8 (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 2,5% a 100% B em 7 min.; 100% B durante 13 min.; 100% a

2,5% B em 10 min.; 2,5% de B em A durante 10 min.

Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

- *Gradiente 2*

Fase móvel: tampão fosfato pH 2,8 (A) e ACN (B)

Gradiente de eluição: 40% a 100% B em 15 min.; 100% de B durante 15 min.; 100% a 40% B em 10 min.; 40% B durante 10 min.

Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

- *Gradiente 3*

Fase móvel: tampão fosfato pH 2,8 (A) e ACN (B)

Gradiente de eluição: 2,5% a 35% B em 5 min.; 35% a 100% B em 5 min.; 100% B durante 15 min.; 100% a 2,5% B em 10 min.; 2,5% durante 15 min.

Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

- *Gradiente 4*

Fase móvel: tampão fosfato pH 2,8 (A) e ACN (B)

Gradiente de eluição: 7% B durante 2 min.; 7% a 15% B em 6 min.; 15% a 75% B em 17 min.; 75% a 80% B em 2 min.; 80% B durante 2 min.; 80% a 100% B em 4 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 7% B em 2 min.; 7% B durante 10 min.

Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

- *Gradiente 5*

Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 7% B durante 2 min.; 7% a 15% B em 6 min.; 15% a 75% B em 17 min.; 75% a 80% B em 2 min.; 80% B durante 2 min.; 80% a 100% B em 4 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 7% B em 2 min.; 7% B durante 10 min.

Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

- *Gradiente 6*

Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 5,5% B durante 2 min.; 5,5% a 24% B em 18 min.; 24% a 25% B em 10 min.; 25% a 100% B em 3 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 5,5% B em 2 min.; 5,5% B durante 13 min.

a) Coluna: 125mm

Vazão: 0,5 mL/min.

b) Coluna: 125mm

Vazão: 1,0 mL/min.

- *Gradiente 7*

Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 5,5% B durante 2 min.; 5,5% a 15% B em 9 min.; 15% a 30% B em 22 min.; 30% a 100% B em 5 min.; 100% B durante 7 min.; 100% a 5,5% B em 1 min.; 5,5% B durante 7 min.

a) Coluna: 125mm

Vazão: 1,0 mL/min.

b) Coluna: 250mm

Vazão: 1,5 mL/min.

- *Gradiente 8*

Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 4% B durante 2 min.; 4% a 35% B em 28 min.; 35% a 100% B

em 3 min.; 100% B durante 5 min.; 100% B a 5,5 em 2 min.; 5,5% B durante 13 min.

a) Coluna: 250mm

Vazão: 1,5 mL/min.

- *Gradiente 9*

Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B).

Gradiente de eluição: 5% B durante 2 min.; 5% a 20% B em 16 min.; 20% a 25% B em 2,5 min.; 25% a 30% B em 24,5 min.; 30%

a 100% B em 5,5 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 5% B em 3 min.; 5% B durante 10 min.

a) Coluna: 250mm

Vazão: 1,5 mL/min.

Condicionamento e Limpeza da Coluna

A coluna, quando fora de uso, foi acondicionada em acetonitrila. Antes das análises diárias, ela foi lavada durante 30 min com ACN e depois com a fase móvel a ser utilizada, até a completa estabilização da linha de base. No final de cada dia de trabalho, a coluna foi lavada com ACN durante cerca de 60 min.

Identificação dos Componentes de Interesse

Os experimentos de identificação foram feitos através do método de fortalecimento³, e pela comparação dos tempos de retenção e espectros dos picos de interesse com as amostras e padrões.

3- Resultados e Discussões

3.1. Otimização da metodologia de análise

Nesta técnica, a otimização da metodologia de análise foi feita levando em consideração a força de solvente orgânico, a vazão de bombeamento da fase móvel, o tipo da fase aquosa (e o seu pH), e o tipo e tamanho da coluna.

Os 4 primeiros cromatogramas da **Figura 49** mostram os resultados obtidos para os gradientes 1, 2, 3 e 4, onde foi variada a força do solvente orgânico. Aquele cujo resultado foi mais satisfatório foi o gradiente 4 (letra **D** da **Figura 49**), o qual apresentou, entretanto, a co-eluição da umbeliferona (2) com a rutina (10). A troca do tampão fosfato (pH 2,6) por água acidificada com ácido acético (pH 2,8), foi o suficiente para aumentar a resolução deste par crítico para 1,9 (**Figura 49E**).

Mas apesar da troca do tampão por água acidificada ter sido suficiente para a resolução do par crítico 2/10 (umbeliferona/rutina), esta não o foi para os outros solutos.

Figura 49: Cromatogramas obtidos com os gradientes testados em HPLC. Fase móvel: conforme especificado em cada cromatograma, para valores dos gradientes, vide Parte experimental; coluna: Purospher ODS, 125mm; amostras: extrato metanólico; vazão: 0,5mL/min.; injeção: 20 μ L; λ =337nm.

O cromatograma da **Figura 50A** mostra uma nova tentativa, a qual, apesar do bom espaçamento entre a maioria dos picos, ainda apresentou dois pares críticos formados pelas substâncias 10/8 (rutina/luteolina-7-O-glicosídeo) e 9/7 (quercetina/luteolina). Com o intuito de observar o efeito da vazão da fase móvel nestas condições, esta foi diminuída de 1,0 para 0,5mL/min. O cromatograma obtido (**Figura 50B**) mostra que, apesar da resolução entre a maior parte das substâncias ter aumentado, os pares críticos 10/8 e 7/9 permaneceram inalterados.

Figura 50: Cromatogramas obtidos com variação da vazão da fase móvel em HPLC. A) Gradiente 6b (1,0mL/min); B) Gradiente 6a (0,5mL/min). Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% v/v, para valores dos gradientes, vide Parte experimental; coluna: Purospher ODS, 125mm; amostras: mistura de padrões; vazão: conforme descrito nos cromatogramas.; injeção: 20 μ L; λ =337nm. Numeração: vide **Figura 3**.

Na tentativa de resolver a separação do par 9/7, foi proposto um outro gradiente onde a rampa de subida da concentração do solvente orgânico fosse menos inclinada. A **Figura 51A** mostra o novo cromatograma. Uma vez que o comprimento da coluna e o tipo de fase estacionária também podem oferecer um ajuste fino na seletividade, o mesmo gradiente descrito foi aplicado a uma coluna Lichrospher ODS não capeada com 250 mm de comprimento. O cromatograma é mostrado na **Figura 51B**. Novamente a resolução entre 8/10 foi alcançada, mas os solutos 9/7 ainda continuaram a co-eluir.

Figura 51: Cromatogramas obtidos com a variação do tipo e comprimento da coluna em HPLC. A) Gradiente 7a (Purospher ODS ec, 1250mm); B) Gradiente 7b (Lichrospher ODS nec, 250mm). Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% v/v; para valores dos gradientes, vide Parte experimental; coluna: conforme especificado em cada cromatograma; amostras: mistura de padrões; vazão: 1,0mL/min. injeção: 20 μ L; λ =337nm. Numeração: vide **Figura 3**.

Ainda foram feitas várias tentativas com o intuito de aumentar a resolução entre os solutos 7 e 9, o que infelizmente não foi possível. Estas tentativas estão ilustradas na **Figura 52**, a qual mostra dois dos cromatogramas obtidos nestes testes.

Figura 52: Cromatogramas ilustrando a variação do gradiente de eluição em HPLC. Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% v/v, para valores dos gradientes, vide Parte experimental; coluna: Lichrospher ODS, 250mm; amostras: mistura de padrões; vazão: 1,5mg/mL; injeção: 20µL; $\lambda=337\text{nm}$. Numeração: vide **Figura 3**.

De todas as condições testadas, aquela que ofereceu a melhor separação das 11 substâncias em estudo, dentro do menor espaço de tempo, foi a descrita no Gradiente 9, considerada então como ótima. A **Figura 53** mostra o cromatograma obtido nesta condição, juntamente com os espectros de UV dos picos.

Figura 53: Análise das substâncias fenólicas na condição otimizada de HPLC. Condições de análise: Fase móvel: solução aquosa de ácido acético glacial 3% (v/v) (A) e ACN (B). Gradiente de eluição: 5% B durante 2 min.; 5% a 20% B em 16 min.; 20% a 25% B em 2,5 min.; 25% a 30% B em 24,5 min.; 30% a 100% B em 5,5 min.; 100% B durante 5 min.; 100% a 5% B em 3 min.; 5% B durante 10 min. Coluna: Lichrospher ODS 250mm. Vazão: 1,5 mL/min. Injeção: 20µL. $\lambda = 337\text{nm}$. Numeração de acordo com a Figura 3.

3.2. Identificação das substâncias de interesse nos extratos metanólico, glicólico e etanólico de camomila.

A **Figura 54** traz a identificação das substâncias fenólicas estudadas, apresentando cromatogramas dos extratos metanólico, glicólico e etanólico, na condição otimizada descrita na **Figura 53**.

Figura 54: Identificação das substâncias analisadas nos extratos metanólico (A), glicólico (B) e etanólico (C). Condições de análises: vide **Figura 53**. Numeração de acordo com a **Figura 3**.

4- Conclusões

O presente capítulo propõe uma metodologia para a análise de substâncias fenólicas farmacologicamente ativas em extratos metanólico, glicólico e etanólico por HPLC em fase reversa.

Apesar de não ter sido possível separar o par crítico formado pela quercetina/luteolina (9/7), foi possível identificar a maioria das substâncias analisadas, onde os resultados obtidos foram bastante semelhantes àqueles observados em FSCE (**Figura 12**) e MEKC (**Figura 26**).

A HPLC possibilitou a identificação da herniarina (1), a qual devido a sua ausência de mobilidade eletroforética e total interação com a β -ciclodextrina, não foi possível ser observada nas técnicas de FSCE e MEKC respectivamente.

De uma forma geral pode-se concluir que o uso da HPLC na análise de extratos metanólico, glicólico e etanólico de camomila foi bastante satisfatória.

1- Introdução

Desde o seu surgimento, em meados dos anos 60, a HPLC tem mostrado uma história de sucesso, entretanto esta técnica apresenta alguns problemas e limitações que ainda persistem, como por exemplo, o seu poder de resolução, o qual geralmente está vinculado a um tempo de análise excessivamente longo, quando comparado, por exemplo, à cromatografia gasosa e a eletroforese capilar.

A introdução de uma gama de técnicas de separação em sistemas líquidos miniaturizados, com valores de eficiência muitas vezes semelhantes àqueles alcançados na cromatografia gasosa (GC), vem mostrar o início de uma nova era no capítulo das técnicas analíticas de separações¹.

Estas técnicas analíticas podem ser classificadas em¹:

1. Cromatografia líquida capilar, utilizando colunas recheadas, a qual também é conhecida pelas abreviações: μ LC (*micro liquid chromatography*), μ HPLC (*micro high performance liquid chromatography*), nanoLC (*nano liquid chromatography*), dentre outras;
2. Cromatografia líquida com colunas abertas, usando fluxo hidráulico;
3. Cromatografia líquida com colunas abertas, usando fluxo eletroosmótico, também conhecida como eletrocromatografia capilar em colunas abertas - "CEC-OPT (*capillary electrochromatography in open tubes*)"
4. Cromatografia líquida com colunas empacotadas usando fluxo eletroosmótico, conhecida como CEC (*capillary electrochromatography*);
5. Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

De acordo com a tecnologia de produção de colunas capilares podemos classificar as colunas em 3 tipos: aquelas que apresentam um segmento empacotado (técnicas 1 e 4, acima); aquelas que possuem o interior aberto e as paredes internas modificadas, oferecendo sítios para as interações com os solutos^{2,3} (técnicas 2 e 3) e por fim, aquelas em que uma coluna capilar é preenchida com uma

¹ H. Poppe, J. Chromatogr. A 778 (1997) 3.

² J. J. Pesek, M. T. Matyska, Electrophoresis 18 (1997) 2228.

³ X. Huang, J. Zhang, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 858 (1999) 91.

pseudo-fase estacionária, constituída de micelas, sendo trocada a cada nova corrida (técnica 5, também objeto de estudo nesta tese, estando descrita em pormenores no 2º Capítulo da 2ª parte).

O texto a seguir tratará apenas dos aspectos relativos às colunas empacotadas para as técnicas 1 e 4. Lembrando que material relativo a produção e aplicações de colunas abertas pode ser encontrado em vários artigos de revisão^{2,4,5}.

1.1. Colunas para μ HPLC

Vários autores têm se dedicado a explorar as possibilidades de aumento da velocidade das separações em cromatografia líquida, diminuindo o diâmetro interno das colunas usadas. Desde 1967⁶, quando Horváth e colaboradores introduziram o uso de colunas de alumínio com 0,5 - 1,0 mm de diâmetro interno para cromatografia líquida, vários trabalhos têm surgido, descrevendo análises em colunas com diâmetro interno cada vez menor.

O primeiro trabalho a introduzir o uso de coluna capilares de sílica fundida com 20 a 50 μ m de diâmetro interno foi publicado por Kennedy e Jorgenson em 1989⁷. Desde então, colunas com estes diâmetros e vários diferentes comprimentos têm sido usadas com partículas que variam entre 3 a 5 μ m de diâmetro.

Praticamente todas as fases estacionárias usadas na HPLC convencional podem ser empacotadas em micro-escala⁸ e, além disso, dentre as várias vantagens de se usar colunas capilares, uma delas é a possibilidade de explorar o uso de fases estacionárias exóticas, geralmente muito caras.

⁴ U. Pyell, J. Chromatogr. 892 (2000) 257

⁵ R. Tijssen, J. Bos, M. E. van Kreveld, Anal. Chem. 58 (1986) 3036.

⁶ Cs. Horváth, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, Anal. Chem. 39 (1967) 1422

⁷ Robert T. Kennedy, J. W. Jorgenson, Anal. Chem. 61 (1989) 1128.

⁸ G. Crescentini, A. R. Mastrogiacomo, J. Microcol. Sep. 3 (1991) 539.

1.2. Colunas para CEC

A eletrocromatografia capilar (CEC) é uma técnica relativamente nova entre as diversas técnicas eletroforéticas de separação, a qual utiliza o fluxo eletroosmótico-EOF (ver Capítulo 1 da 2ª Parte) para eluir os solutos dentro de uma coluna empacotada, diferentemente do fluxo gerado por força hidráulica, o qual é característico da HPLC ou μ HPLC.

Problemas inerentes à própria técnica de CEC (discutidos a seguir no Capítulo 7 desta Parte), levaram ao rápido avanço no desenvolvimento de tecnologia de colunas, que podem ser divididas em três tipos distintos, de acordo com as características de seus segmentos empacotados:

1. Colunas empacotadas com material particulado, semelhantes às aquelas descritas para μ HPLC^{4,9};
2. Colunas preenchidas com uma mistura de monômeros que posteriormente são polimerizados *in situ*, formando um bloco único também conhecidas como *monolíticas*¹⁰.
3. Colunas cuja fase estacionária fica “imobilizada” no interior do capilar. Estas colunas são obtidas com a união das duas técnicas descritas acima^{11,12}.

Destas 3 classes mencionadas, a primeira é sem dúvida a mais utilizada. Entretanto, com o contínuo avanço no campo de tecnologia de coluna, este quadro deve mudar num futuro breve, especialmente no que diz respeito a segunda técnica mencionada (despontando nitidamente nas recentes publicações sobre CEC). Como apenas a técnica descrita no item 1 foi usada na parte experimental deste estudo, somente ela será abordada neste texto.

O material cromatográfico usado no empacotamento destas colunas geralmente é semelhantes àqueles usados na HPLC, ou seja, fase estacionária do tipo fase reversa com o tamanho das partículas variando entre 1,5 a 10 μm ¹³. As

⁹ P. D. Angus, C. W. Demarest, T. Catalano, J. F. Stoubaugh, J. Chromatogr. A 887 (2000) 347.

¹⁰ F. Svec, E. C. Peters, D. Sýnkora, M. J. Fréchet, J. Chromatogr. A 887 (2000) 3.

¹¹ R. Asiae, X. Huang, D. Farnan, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 806 (1998) 251.

¹² G. Chirica, V. T. Remcho, Electrophoresis 20 (1999) 50.

¹³ L. A. Colón, T. D. Maloney, A. M. Fermier, J. Chromatogr. A 887 (2000) 43.

colunas, feitas com sílica fundida, em geral possuem cerca de 25cm de segmento empacotado e 20 a 100 μ m de diâmetro interno.

Apesar dos diversos protocolos de empacotamentos descritos, a opinião geral é que o empacotamento destas colunas ainda é uma arte, a qual requer pessoal com experiência e muita prática¹³.

A reprodutibilidade apresentada por estas colunas irá depender da sua fabricação, sendo assim, colunas mal empacotadas podem levar a obtenção de baixos valores de eficiência, baixa resolução e picos assimétricos, principalmente quando ocorre a formação de falhas nas interfaces entre o segmento empacotado e as fritas.

1.3. A Fase estacionária

Devido à pequena dimensão destas colunas, é muito importante que a distribuição das partículas seja bastante compactada, pois de outro modo verifica-se a formação das referidas falhas, logo no início das primeiras análises.

A principal diferença entre as colunas capilares para CEC e μ HPLC é que, nas primeiras, a fase estacionária precisa ser capaz de gerar e suportar o EOF, ou seja, que este material deve, necessariamente, estar ionizado durante as análises.

Dessa forma, partículas cujos silanóis estejam cobertos (como as tão difundidas capeado), não encontram serventia em CEC, por serem incapazes de gerar um EOF aceitável. Caso não haja o EOF, apenas analitos com mobilidade eletroforética extremamente alta irão conseguir alcançar o detector. Dentre todas as fases reversas, as mais usadas em CEC são a Hypersil ODS 1 (também chamada de Hypersil CEC C18) e a Spherisorb ODS 1, por serem capazes de suportar EOF mais velozes. Estas fases estacionárias são as mesmas usadas na HPLC; no entanto estas não tiveram seus silanóis encapados.

Os tipos de fases estacionárias usadas tanto em μ HPLC quanto em CEC serão discutidos mais detalhadamente nos capítulos 6 e 7 desta parte, respectivamente.

1.4. A Coluna

Uma coluna capilar típica é constituída de dois segmentos, um empacotado e outro não empacotado (**Figura 55**)¹⁴, ficando o primeiro confinado dentro de um espaço delimitado por blocos de sílica sinterizada, também conhecidos como “filtros”.

Dessa forma, um filtro é feito logo na entrada do capilar e outra geralmente próximo ao detector. Por convenção neste texto, o primeiro será chamada de “filtro da entrada” e o segundo, “filtro da saída”.

A janela de detecção é feita retirando alguns milímetros da camada de poliimida próxima ao filtro da saída, entretanto há casos em que a coluna é empacotada em toda sua extensão. Quando isso acontece, a camada de poliimida é então retirada e a detecção é feita através do segmento empacotado. Esta prática porém, diminui consideravelmente a detecção e, geralmente, só é utilizada quando pretende-se usar tubos conectores ligando a coluna a um detector (do tipo espectrômetro de massas por exemplo), ou ainda, nos casos de uso de celas do tipo “Z” ou do tipo “bolha”¹⁵.

Figura 55: Representação esquemática de uma coluna capilar.

1.5. Os Filtros

Os filtros, usados para reter o segmento empacotado dentro da coluna, são consideradas o “calcanhar de Aquiles” da eletrocromatografia capilar e da μ HPLC.

¹⁴ A. S. Rathore, Cs. Horváth, Anal. Chem. 70 (1998) 3069.

¹⁵ H. Rebscher, U. Pyell, Chromatographia 42 (1996) 171.

O maior problema referente à produção de colunas capilares são os filtros, e isto ocorre principalmente devido a três fatores. Primeiro, a sinterização destes causa a remoção da cobertura de poliimida, formando dois pontos extremamente frágeis no capilar. Segundo, não existe reprodutibilidade satisfatória nestes processos de sinterização e por fim, porque o calor aplicado acaba por alterar as características da fase estacionária no ponto de sinterização, criando um segmento não homogêneo, o qual por sua vez apresentará diferenças na dupla camada elétrica, o que acaba por contribuir para a falta de homogeneidade do EOF^{13,16,17}.

Um filtro ideal deve possuir estabilidade mecânica suficiente para suportar a pressão aplicada durante o empacotamento e o condicionamento, deve ser de fácil preparo e o mais importante, não deve interferir no processo eletrocromatográfico.

A maneira mais simples de se fazer um filtro é através da sinterização de partículas de sílica com a parede do capilar através do uso de uma fonte de calor, a qual pode ser uma chama ou ainda um fio de platina ligado a um resistor^{9,16,18}.

Uma outra maneira é sinterizar a própria fase estacionária usada para o empacotamento. Esta opção, apesar de ser a mais usada, apresenta dois inconvenientes. Primeiro, ela só é possível no caso de fases estacionárias à base de sílica, tais como as fases reversas e, em segundo, por apresentar baixa estabilidade mecânica em colunas com diâmetro interno relativamente grandes (150µm), estabilidade que aumenta porém, com a redução do diâmetro interno.

O tempo de calor usado na sinterização, que refletirá na qualidade do filtro, dependerá do diâmetro interno da coluna, do tamanho das partículas e ainda, do tipo de fase estacionária a ser sinterizada¹⁹. Foi observado que fases estacionárias contendo altas concentrações de sódio produzem filtros mais estáveis²⁰.

¹⁶ H. J. Cortes, C. D. Pfeiffer, B. E. Richter, T. S. Stevens, J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun. 10 (1987) 446.

¹⁷ S. E. van den Bosch, S. Heemstra, J. C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A 755 (1996) 165.

¹⁸ B. Behnke, E. Grom, E. Bayer, J. Chromatogr. A 716 (1995) 207.

¹⁹ M. Mayer, E. Rapp, C. Marck, G. J. M. Bruin, Electrophoresis 20 (1999) 43. C. Yang, Z. El Rassi, Electrophoresis 20 (1999) 18.

²⁰ R. M. Seifar, J. C. Kraak, W. Th. Kok, H. Poppe, J. Chromatogr. A 808 (1998) 71

1.6. A Fabricação das Colunas

Até o presente momento, existem inúmeros protocolos de empacotamento. Todavia, de uma forma geral, todos eles seguem alguns passos básicos os quais são descritos a seguir. A fabricação de uma coluna típica é mostrada na **Figura 56**.

O primeiro passo é cortar um pedaço de capilar de sílica fundida com cerca de 10 a 15cm a mais do comprimento da coluna desejada e depois fazer um filtro em uma das extremidades. Este filtro, pode ser feita seguindo uma das metodologias descritas acima. A maneira mais fácil de se introduzir as partículas de sílica dentro do capilar é batendo a extremidade deste em um recipiente contendo o material sólido.

Uma vez que esta extremidade contenha cerca de 1mm da fase estacionária (o que pode ser facilmente visualizado em um microscópio), a sinterização é feita com uma fonte de calor^{13,19}.

A coluna é então empacotada no comprimento desejado, e um segundo filtro é sinterizada (geralmente 20 a 30cm a partir do filtro de entrada). Existem várias formas de fazer o empacotamento, ou seja, de fazer com que as partículas fluam para dentro da coluna. Isto pode ser feito através do emprego de uma suspensão de fase estacionária, a qual é bombeada para dentro da coluna usando solventes orgânicos típicos da HPLC²¹, ou ainda, empregando-se fluído supercrítico²² e forças eletrocinética²³, centrípeta^{13,24} ou gravitacional²⁵.

De todas as técnicas descritas, aquela que emprega o bombeamento da suspensão de fase estacionária através do uso de solventes é de longe a mais utilizada e será a única abordada neste texto.

²¹ R. J. Boughtflower, T. Underwood, C. J. Paterson, *Chromatographia* 40 (1995) 329. N. W. Smith, M. B. Evans, *Chromatographia* 38 (1994) 649. R. J. Boughtflower, T. Underwood, J. Maddin, *Chromatographia* 41 (1995) 398.

²² M. M. Robson, S. Roulin, S. M. Shariff, M. W. Raynor, K. D. Bartle, A. A. Clifford, P. Myers, M. R. Euerby, C. M. Johnson, *Chromatographia* 43 (1996) 313.

²³ C. Yan, US Pat. 5 453 163 (26 September 1995).

²⁴ A. M. Fermier, L. A. Colón, *J. Microcol. Sep.* 10 (1998) 439.

²⁵ K. J. Reynolds, T. D. Maloney, A. M. Fermier, L. A. Colón, *Analyst* 123 (1998) 1493.

Figura 56: Representação esquemática dos passos envolvidos no processo de fabricação de uma coluna capilar, usando a técnica em que a suspensão é bombeada para dentro da coluna usando uma bomba e solventes típicos da HPLC. A) formação do filtro da entrada; B) empacotamento da coluna; C) formação do filtro da saída; D) inversão da coluna para retirada do excesso de fase estacionária após o filtro da saída; E) retirada da polimida para a janela de detecção.

1.7. Empacotamento de colunas capilares usando pressão

O empacotamento de colunas capilares através do bombeamento de uma suspensão de fase estacionária para dentro de uma coluna capilar pode ser dividido em 5 passos consecutivos²⁶:

1. Preparo da suspensão de fase estacionária;
2. Transferência da suspensão para um recipiente que será ligado à bomba (contendo o solvente de empacotamento) e à coluna a ser empacotada;
3. Bombeamento da suspensão para dentro da coluna, a fim de formar o segmento empacotado;
4. Compactação do segmento empacotado;

²⁶ J. P. C. Vissers, M. A. Hoeben, J. Laven, H. A. Claessens, C. A. Cramers, J. Chromatogr. A 883 (2000) 11.

5. Condicionamento do segmento empacotado.

Dentro destes passos descritos, os principais parâmetros a serem considerados são o tipo de solventes empregados no preparo da suspensão e no empacotamento, o tipo de bomba usada no bombeamento do solvente, a pressão aplicada e ainda o tamanho e o tipo da fase estacionária usada⁹.

A seleção do tipo de bomba a ser usada no empacotamento irá influenciar na uniformidade e na estabilidade da camada empacotada. Dessa forma, as bombas capazes de gerar fluxos velozes e pressão constante são as melhores escolhas. Dentre as disponíveis no mercado, as bombas de seringa pneumática são as que produzem colunas mais estáveis⁹.

A pressão usada para o empacotamento também é muito importante, pois uma vez que partículas da ordem de 1 a 10µm respondem a propriedades químicas e não às forças gravitacionais²⁷, se faz necessário o uso de elevados valores de pressão, a fim de evitar a possível repulsão entre as partículas. O valor de pressão a ser usado irá depender do tamanho e da porosidade das partículas, do diâmetro interno do capilar e mais importante, da estabilidade do filtro de entrada da coluna. Alguns autores chegam a sugerir que o limite da pressão seja dado pela estabilidade do filtro²⁸. Mas de qualquer forma, a pressão deve ser mantida o tempo suficiente para permitir que o segmento seja compactado e o sistema despressurizado o mais lentamente possível, para evitar que a camada empacotada se mova^{9,13}.

De todos os parâmetros mencionados, a escolha dos solventes de empacotamento e da suspensão são provavelmente os mais importantes. Do ponto de vista da química coloidal, existem dois tipos de solventes para suspensões: os floculantes e os defloculantes^{28,29,30}. Nos solventes floculantes, a atração entre as partículas é mais forte que a repulsão, o que faz com que estas se aglomerem formando um segmento solto e cheio de espaços livres entre as partículas. Já nos defloculantes, a repulsão é maior que a atração, fazendo com que partículas fiquem

²⁷ H. Schott, in A. R. Gennaro (Editor) Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack, 1995, 19ª ed, Cap. 20.

²⁸ M. Verzele, C. Dervale, in: F. J. Yang (Ed.) Microbore Columns Chromatography, Marcel Dekker, Inc, New York, NY, 1989. Cap. 2.

²⁹ T. Wang, R. A. Hartwick, N. T. Miller, D. C. Shelly, J. Chromatogr. 523 (1990) 23.

³⁰ D. C. Shelly, T. J. Edkins, J. Chromatogr. 411 (1987) 185.

dispersas, levando à formação de uma camada densa e compacta, com pouco espaço livre entre as partículas. A aplicação destas propriedades na sedimentação e compactação de camadas empacotadas de colunas capilares foi objeto de estudo de várias publicações de Shelly^{29,30} e Vissers^{26,31}.

De uma forma geral, propõem-se que seja usado um solvente defloculante no preparo da suspensão e durante o empacotamento, pois dessa forma as partículas ficarão em suspensão todo o tempo do empacotamento, formando um segmento denso. Uma vez obtida uma camada empacotada com estas características, promove-se então a floculação através do uso de um solvente que promova as interações entre as partículas de fase estacionária³⁰.

De modo geral, não existem regras para a escolha destes solventes, e isto acaba sendo feito de modo empírico, uma vez que tais propriedades irão depender mais das propriedades químicas da fase estacionária do que das características do solvente. Dessa forma, um solvente que exerça ação floculante para uma dada ODS pode ser defloculante para outra oriunda de outro fabricante, nos levando a concluir que para cada fase estacionária, se faz necessário otimizar um protocolo de empacotamento, a fim de se obter colunas cromatográficas estáveis.

O objetivo desta fase do trabalho foi desenvolver um protocolo para o empacotamento de colunas para CEC, as quais também pudessem serem usadas em μ HPLC.

³¹ J. P. C. Vissers, H. A. Claessens, J. Laven, C. A. Cramers, Anal. Chem. 67 (1995) 2103.

2- Materiais e Métodos

2.1. Reagentes, Fases Estacionárias e Instrumentos Utilizados

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Os solventes usados no empacotamento foram de grau analítico, enquanto que os usados para os testes de desempenho das colunas foram de grau cromatográfico.

O preparo dos eletrólitos de corrida nos experimentos em CEC foi feito com fosfato monobásico de sódio monohidratado (J. T. Baker, Inc.) e o pH ajustado com ácido o-fosfórico 1M, 85% de pureza, grau cromatográfico (Fischer Scientific). Estes foram preparados diariamente e filtrados com membrana filtrante 0,45 μ m (Millipore), antes do uso.

As fases estacionárias utilizadas foram Hypersil ODS1, partículas de 5 μ m, 120Å de diâmetro de poro, 170m²g⁻¹ de área de superfície e 9,5% de carbono (Keystone Scientific Inc.), e Spherisorb ODS1, partículas com 5 μ m de diâmetro, 80 Å de diâmetro de poro, 220m²g⁻¹ de área de superfície e 6,2% de carbono (Waters).

As colunas foram empacotadas com uma bomba de HPLC Altex, Modelo 100A da Beckman Couter, e ainda com uma bomba de seringa pneumática Haskel Modelo MLP-46 (Haskel Inc.), com sistema de ar comprimido. As dimensões das colunas empacotadas foram 33,5cm de comprimento, com 25cm empacotado e 75 μ m e 325 μ m de diâmetro interno e externo, respectivamente.

Os experimentos para verificação do desempenho das colunas foram feitos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detetor do tipo arranjo de diodos fixado em 214nm, controle de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (12bar/14s), o sistema foi operado com polaridade normal a +25kV e temperatura mantida a 25⁰C.

Os experimentos em μ HPLC foram feitos em um equipamento para cromatografia líquida da Hewlett-Packard HP 1090 Series (Wilmington) modificado (ver **Figura 65** do Capítulo 6 da 2ª Parte), equipado com amostrador automático e detetor UV Modelo 2000 e célula para colunas capilares do tipo na coluna (Thermo Separation Products) sendo o comprimento de onda ajustado em 337nm. O controle do sistema cromatográfico e da aquisição de dados foi feito com o sistema HP

ChemStation (Hewlett Packard - número do produto G2170AA). O controle de fluxo foi feito através do acoplamento de uma junção de aço inoxidável tipo “T” da Upchurch Scientific (Oak Harbor), colocada depois da válvula de injeção (Valco), a um capilar de sílica fundida, o qual conferiu efeito constritor. Dessa forma o ajuste da vazão da fase móvel foi feito através de variações no comprimento e diâmetro do capilar e da pressão aplicada.

Como amostra para os testes de desempenho, foi usada uma mistura de tiouréia, benzoferila e benzofenona (33,3µg/mL) em NaH₂PO₄ 20mM pH 8,0/MeOH 2:8.

2.2. Procedimentos testados para o empacotamento de colunas capilares

Foram testadas três metodologias básicas para empacotamento, e dentro destas três metodologias, foram testadas pequenas variações. A fim de evitar um texto extensivamente repetitivo, estas pequenas variações (dentro de cada protocolo de empacotamento) serão relatadas durante as discussões destes experimentos.

Protocolo de empacotamento 1

a) Preparo do filtro de entrada:

Foi cortado cerca de 40 - 45 cm de capilar de 75µm.

Com o auxílio de uma tocha de butano, cerca de 1mm da cobertura de poliimida foi retirada de uma das extremidades do capilar.

Cerca de 1g de sílica Spherisorb S5W, diâmetro de partícula 5 µm, diâmetro médio de poro 80Å (Phase Separation) foi previamente seca a 120⁰C durante 40min.

Bateu-se a extremidade queimada do capilar dentro do vial contendo a sílica até que cerca de 2mm do espaço interno estivesse preenchido. Este valor foi medido usando o sistema métrico da objetiva de um microscópio.

Limpou-se a parte externa do capilar com um papel toalha macio, para evitar a fusão do excesso de sílica durante a queima da frita. Nesta fase, movimentos

bruscos provocam a perda do material empacotado dentro da coluna capilar, podendo levar a filtros fracos e instáveis.

Com o auxílio de uma tocha de butano queimou-se a extremidade preenchida com sílica, até que ocorresse a fusão desta com a parede interna do capilar.

b) Montagem do reservatório e do sistema de empacotamento.

O reservatório foi montado (**Figura 57**) usando adaptadores de final de colunas para HPLC, com baixo volume interno (Parker Hannifin Corporation) acoplado a tubo de aço inoxidável de 1/4" de diâmetro externo (Parker Hannifin Corporation). Na extremidade oposta àquela acoplada à coluna capilar, foi introduzida um filtro de aço inoxidável de 1/4" de diâmetro com malha de 2 µm (Parker Hannifin Corporation). O volume interno foi de 800 µL.

Figura 57: Montagem do reservatório para empacotamento de colunas capilares.

O sistema de empacotamento (**Figura 58**) foi montado, acoplando-se o reservatório a uma bomba de HPLC, pela extremidade onde foi colocado o filtro. Na outra extremidade foi acoplada a coluna capilar, usando sistema de adaptadores da Upchurch Scientific.

Figura 58: Sistema de empacotamento do protocolo 1.

c) Preparo da suspensão da fase estacionária:

Foram suspensos 80 μ g da fase estacionária Hypersil ODS1 em 800 μ L de diferentes solventes. Estas suspensões foram sonicadas durante 15 min antes do empacotamento.

d) Empacotamento e condicionamento da camada empacotada

O empacotamento foi feito a 400bar (5700psi) em bomba de HPLC, usando MeOH deaerado como solvente de prepulsão. O sistema foi mantido sob pressão até que a camada empacotada atingisse cerca de 25cm de extensão. Posteriormente, a coluna foi mantida sob pressão durante uma hora e o fluxo desligado. Depois da queda total da pressão o sistema foi aberto e a camada empacotada foi condicionada com H₂O desaerada durante 1 hora.

e) Manufatura do filtro de saída:

O filtro de saída foi feito no final da camada empacotada, utilizando um sistema de aquecimento caseiro, que consistiu de uma fonte de alta tensão, contendo dois eletrodos e um fio de platina, responsável pelo contato elétrico do sistema.

A aplicação de determinada tensão gerava um aquecimento no fio de contato, que por sua vez, sinterizava um plug de sílica com a parede do capilar. Esta fonte foi usada na potência de 140W. Todos os filtros produzidos foram testados quanto à estabilidade, aplicando um mínimo de 6000psi.

f) Manufatura da janela de detecção:

Pronto o filtro de saída, a janela de detecção foi feita através da queima da cobertura de poliimida, a cerca de 2mm do mesmo.

Protocolo de empacotamento 2

a) Preparo do filtro de entrada e montagem do reservatório:

Neste protocolo ambos os passos foram os mesmos descritos no protocolo 1.

b) Preparo da suspensão de fase estacionária:

Foram empacotadas colunas com Spherisorb ODS1. A partir deste ponto, utilizou-se somente THF desaerado como solvente para a suspensão. A suspensão foi sonicada durante 15 min antes do empacotamento.

c) Empacotamento e condicionamento da camada empacotada:

Neste protocolo (**Figura 59**) as colunas foram empacotadas com acetona a 7.000 psi, usando bomba pneumática, até que a camada atingisse cerca de 30cm a 35cm. Em alguns experimentos, mergulhou-se a coluna em banho ultra-sônico durante o empacotamento. Uma vez despressurizado o sistema, a camada empacotada foi condicionada com água de 10 a 32 horas, em bomba de HPLC.

d) Manufatura do filtro de saída:

Para a sinterização deste filtro foi aplicado calor brando com 3Ω (durante 3s) cerca de 20 vezes. Muito cuidado foi tomado para não deixar o fio de platina incandescer. Para a retirada do excesso de fase estacionária após o filtro de saída (**Figura 59**), a coluna foi acoplada pela extremidade da saída, a uma bomba de HPLC e lavada com H₂O com no máximo 100bar (1500psi).

e) Manufatura da janela de detecção:

A janela de detecção foi feita da mesma forma descrita no protocolo 1.

Figura 59: Esquema de empacotamento do protocolo 2.

Protocolo de empacotamento 3

a) Preparo do filtro temporário da saída:

Ao invés da sinterização da sílica, desta vez foi usada um filtro temporário de aço inoxidável com malha de 2 μ m.

b) Montagem do reservatório e preparo da suspensão de fase estacionária:

Ambos os passos foram iguais ao descrito no Protocolo 2.

c) Empacotamento e condicionamento da camada empacotada e manufatura do filtro de saída:

As colunas foram empacotadas com Spherisorb ODS1, usando acetona a 10000 psi, com bomba de pneumática, até que a camada atingisse cerca de 40 a

45cm. As colunas foram mantidas sob pressão em acetona de 3 a 6h, e depois de decorrido este tempo a pressão foi desligada. Uma vez despressurizado o sistema, condicionou-se a camada empacotada com água de 20 a 24 h.

Para a sinterização do filtro aplicou-se 3Ω (3s) cerca de 20 vezes, tomando muito cuidado para não deixar o fio de platina incandescer.

e) Re-condicionamento da camada empacotada e manufatura do filtro de saída:

Para a retirada do excesso de fase estacionária, após o filtro de saída (**Figura 60**), a coluna foi acoplada, pela extremidade da saída, a uma bomba de HPLC e lavada com H_2O com no máximo 100bar (1500 psi).

A camada empacotada foi novamente condicionada durante 10 horas com água com 100bar (1500 psi). Depois deste período, o filtro de entrada foi sinterizada cerca de 40 vezes, ainda sob pressão, nas mesmas condições do filtro de saída. Assim que o sistema foi despressurizado, a coluna foi novamente acoplada a bomba pela extremidade da saída, para a retirada do excesso de fase estacionária, após a filtro de entrada.

f) Manufatura da janela de detecção:

A janela de detecção foi feita com um bisturi cirúrgico, cerca de 2mm depois da frita de saída.

g) Regeneração da camada empacotada:

Depois de concluído todo o processo, a coluna foi lavada com ACN durante cerca de 12 h com no máximo 15 bar (207 psi).

Antes das análises, cerca de 1mm da cobertura de poliimida de ambas as extremidades da coluna foram retiradas.

2.3. Testes para a Verificação do Desempenho das Colunas

O primeiro teste para verificar a estabilidade das colunas empacotadas era aplicar 4h de voltagem entre +5 a +30kV, usando NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 30:70 como eletrólito de corrida; caso o sistema continuasse a apresentar corrente e uma linha de base estáveis, mesmo após este tempo, a coluna era inspecionada sob microscópio à procura de possíveis deformidades, tais como falhas na camada empacotada.

Figura 60: Esquema de empacotamento do protocolo 3

Se a coluna estivesse intacta, ela era submetida a análises tanto em CEC quanto em μ HPLC. Nestas análises, usava-se como padrões uma mistura de tiouréia, bifenila e benzofenona e como fase móvel, 70% de acetonitrila em tampão fosfato 50mM, pH 2,8.

Em CEC o sistema foi operado a +25kV, enquanto que na μ HPLC foi usado um divisor de fluxo de 30cm por 50 μ m com 0,03mL/min de vazão; em ambos os casos, a temperatura foi mantida a 25°C e a aquisição dos dados feita em 214nm.

3- Resultados e Discussões

3.1. Empacotamento das colunas capilares

Protocolo de empacotamento 1

A primeira dificuldade encontrada na produção das colunas capilares foi o próprio corte do capilar, o que requer bastante treino, quando este é feito manualmente.

O filtro de entrada foi feita através da sinterização da sílica, colocada como um *plug* dentro de uma extremidade do capilar.

Foi observado que um dos fatores mais importantes para a produção de uma boa frita é a aplicação de calor brando no início da queima, pois se este for intenso, as partículas tendem a mover dentro do capilar e o processo de fusão ocorre de modo irregular.

Nesta fase, o empacotamento foi conduzido em uma bomba de HPLC com a aplicação de 400bar (5700psi). O solvente usado para o bombeamento da suspensão de fase estacionária para dentro do capilar (chamado de solvente de pressurização ou propulsão) foi o MeOH.

A suspensão foi inicialmente preparada adicionando-se 10 μ g de Hypersil ODS1 a 100 μ L de uma mistura de MeOH/tolueno 1:1. Foram empacotadas 7 colunas³² com estes solventes, as quais apresentaram camadas empacotadas instáveis, formando falhas já nas primeiras horas de aplicação de voltagem. Este fato foi então atribuído a três possíveis fatores: o solvente da suspensão, o solvente de empacotamento e a relação solvente/tempo de condicionamento (ou floculação) da camada empacotada²⁷. Dessa forma foram feitos vários testes usando acetona, iso-propanol, THF, CHCl₃ e ACN como solvente da suspensão. No primeiro teste, foram adicionados cerca de 10 μ g a 20 μ g de fase estacionária, em um vial contendo o solvente em questão, onde observou-se o tempo que o material sólido levava para formar uma suspensão homogênea. Acetona e THF foram os que mostraram

³² Estas colunas mencionadas foram as 7 empacotadas com sucesso dentre cerca de 20 colunas empacotadas, que apresentaram problemas durante uma ou mais fase do processo de empacotamento.

melhores resultados seguidos pelo iso-propanol. Nove colunas foram empacotadas usando os três solventes mencionados (3 colunas para cada solvente³³).

Dentre todas as colunas empacotadas, as que apresentaram “falhas menores” entre a camada empacotada e o filtro de saída foram aquelas empacotadas com THF.

Uma vez otimizado o melhor solvente para a suspensão, testou-se então o melhor solvente para a pressurização. Os solventes usados nesta fase foram escolhidos com base nas suas propriedades flocculantes ou deflocculantes^{27,29}, observadas no experimento para a escolha do solvente de suspensão. Foram escolhidos dessa forma acetona, THF e iso-propanol. Das 9 colunas empacotadas (3 para cada solvente), as que apresentaram empacotamento mais rápido e menores falhas entre a camada empacotada e a frita do outlet foram aquelas empacotadas com acetona. Para verificar se este procedimento poderia ser melhorado com o uso de outro solvente de suspensão, empacotou-se outras 4 colunas, 2 com acetona e 2 com iso-propanol. Foi observado que a melhor combinação era THF e acetona como solventes de suspensão e empacotamento, respectivamente.

Nesta fase, foram encontrados dois principais problemas: a velocidade de empacotamento e o entupimento do reservatório. Nos empacotamentos com MeOH, a fase estacionária era bombeada para dentro da coluna capilar com uma velocidade mais lenta, possibilitando o controle do comprimento da camada empacotada. Dessa forma, quando a camada chegava próxima aos 25cm, a pressão era desligada e o reservatório era invertido verticalmente de modo que a saída da coluna ficasse para cima (**Figura 61**).

Esta prática, na maioria das vezes, era suficiente para estancar o fluxo de fase estacionária para dentro da coluna. Nos casos em que a camada empacotada excedia 26cm, o filtro de saída era cortado e o material sólido era retirado sob pressão, com acetona.

³³ Mais uma vez foi necessário empacotar cerca de 6 colunas para cada solvente até se conseguir três que puderam ser levadas para testes no equipamento.

Figura 61: Posições do reservatório durante o empacotamento.

O problema do entupimento do capilar foi resolvido quando o reservatório foi mantido na posição **A** da **Figura 61** e a coluna inserida dentro do mesmo, conforme mostra a **Figura 62**. Apesar destas práticas serem extremamente simples, houve um progresso significativo no tempo e na facilidade de empacotamento.

Figura 62: Posição do capilar dentro do reservatório.

Depois de empacotadas, as colunas eram mantidas sob pressão (400bar), com o solvente de empacotamento, durante cerca de 1h. O sistema era despressurizado vagarosamente, a fim de evitar a formação de pressão negativa, desestabilizando a camada empacotada dentro do capilar.

Uma vez despressurizado o sistema, a coluna era então lavada com água (400bar) durante 1h, antes da sinterização do filtro de saída.

É muito importante que o filtro seja feito enquanto a coluna está sendo lavada com água a 400bar, pois a presença de um líquido percorrendo a camada empacotada, ajuda na transferência de calor, evitando a formação de falhas. Da mesma forma que a do filtro de entrada, o filtro de saída é muito sensível ao calor e qualquer variação brusca na temperatura, pode desestabilizar a camada que já, teoricamente, deveria estar compactada. A otimização da sinterização do filtro de saída foi feita nas primeiras 20 colunas empacotadas. Dentre as condições

testadas, as que produziram colunas mais estáveis foram aquelas em que o calor aplicado era brando e prolongado. Os filtros passaram então a ser feitos com 5 aplicações de calor no mesmo local (5Ω (3 s cada) seguido de 9Ω (3 s cada)).

As janelas de detecção foram feitas através da queima da camada de poliimida com o mesmo sistema de aquecimento para a produção dos filtros, entretanto, foi observado que este aquecimento era suficientemente forte para provocar a formação de falha entre o filtro de saída e a camada empacotada.

Como as colunas produzidas por este protocolo ainda estavam instáveis foi idealizado o protocolo 2.

Protocolo de empacotamento 2

Nesta fase do trabalho de empacotamento, a fase estacionária usada (Hypersil), já estava quase acabando. Devida à dificuldade de reposição desta amostra e ainda, devido ao fato de que ao mudar a fase estacionária (mesmo que seja de lote para lote), pode também ser necessário alterar o protocolo de empacotamento, optou-se por continuar os experimentos com Spherisorb ODS1, outra ODS presente no mercado, com baixa porcentagem de carbono e disponível em grande quantidade no laboratório. Dessa forma, todo o protocolo 2 foi desenvolvido com esta nova fase estacionária.

A bomba de empacotamento também foi trocada por uma bomba pneumática pois esta, além de não apresentar oscilações de vazão, característico das bombas reciprocantes, também possibilita o uso de pressões até 12000psi. A partir de então as colunas foram empacotadas com 7000psi, pressão máxima suportada pelo filtro de saída.

A fim de adaptar o protocolo otimizado para a fase Spherisorb ODS1, empacotou-se 2 (dentre 6) colunas usando THF/acetona, 1 (dentre 3) com acetona/acetona e 1 (dentre 4) com THF/THF como solventes de suspensão e empacotamento, respectivamente. Foi observado que a combinação THF/acetona, coincidentemente, também foi a mais efetiva para o empacotamento da Spherisorb ODS1. Outra variável testada foi a imersão da coluna em banho ultra-sônico durante o processo de empacotamento (15, 10 e 3min) e condicionamento com acetona

(5min). Em todos os casos, as colunas foram demasiadamente compactadas, diminuindo cerca de 13 a 16% do seu comprimento total. Dessa forma o ultra-som não foi mais usado.

Assim que a camada empacotada atingiu cerca de 35cm, o reservatório foi invertido e, a pressão foi mantida por mais uma hora antes de ser desligada. Uma vez despressurizado o sistema, a coluna foi condicionada em água a 7000psi de 10 a 32h. Foi observado que este tempo influenciava bastante a estabilização da camada empacotada, chegando a diminuí-la de 10 a 17% do seu comprimento total. Foi observado que cerca de 20 h foi o melhor tempo de condicionamento, pois mais que isto, a camada de fase estacionária se compacta de tal forma que chega a impedir qualquer vazão de solvente.

Uma vez despressurizado o sistema, acoplou-se a coluna a uma bomba de HPLC pela extremidade do filtro de entrada, para a retirada do excesso de fase estacionária após o filtro de saída (**Figura 59**). Devido à fragilidade do filtro de entrada, este passo foi bastante delicado, pois caso a força exercida na fixação do adaptador da coluna à tubulação da bomba fosse um pouco mais intensa, era o suficiente para quebrar o filtro. Este fato, aliado ao trabalho descrito por Angus e colaboradores⁹, mostrando que as falhas em CEC tendem a seguir a direção do fluxo de empacotamento, levaram à elaboração de um novo protocolo.

Outro problema encontrado nas colunas com Spherisorb ODS1 foi que a sinterização do filtro de saída não era reprodutiva. Dessa forma, foram feitas sinterizações sucessivas³⁴, até observar que cerca 20 aplicações de calor (3 Ω , 3s cada) no mesmo local, produzia filtros estáveis.

Protocolo de empacotamento 3

No protocolo 3 foi adotado o uso de filtros metálicos temporários, o que permitiu o uso de 10000 psi para o processo de enchimento das colunas, diminuindo o tempo de empacotamento de cerca de 3 a 5 minutos para menos de 1 minuto. A permanência da camada empacotada sob pressão em acetona, por mais de 1, hora

³⁴ Estes testes foram feitos com colunas velhas, empacotadas com Spherisorb ODS1. As filtros eram sinterizadas e a coluna era submetida a um pressão de no máximo 6000psi. Dessa forma, com uma única coluna, podia-se fazer vários testes.

fez com que a camada ficasse excessivamente compactada impedindo a vazão do solvente.

A **Figura 63** mostra os registros da corrente e da linha de base para uma coluna com o problema no filtro de entrada descrito acima, e de outra, com o mesmo problema no filtro de saída. Na primeira, o fato que mais chamou atenção foi a oscilação constante e característica da linha de base e da corrente, enquanto que na segunda foi o excesso de ruído da linha de base, ocasionado pela passagem de partículas de fase estacionária pelo detector.

O filtro de entrada foi finalmente feito com sucesso ao se aplicar calor (3Ω) durante 3s, cerca de 40 vezes, com um fio de platina novo para cada filtro de entrada sinterizado, pois foi observado que quando se ultrapassava este limite, o calor formado no fio de platina já não era mais reprodutivo.

A fim de não desestabilizar a camada de sílica próxima a saída do capilar, ao se aplicar o calor para a abertura da janela de detecção, esta foi feita com o auxílio de um bisturi cirúrgico.

Foram então empacotadas 19 colunas com esta metodologia descrita. Uma vez prontas, as colunas eram submetidas a 4 horas sob voltagem com o eletrólito NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 30:70, +25kV, 25°C. Caso as colunas suportassem estas 4 horas, injetava-se então uma mistura de padrões (**Figura 64**) contendo tiouréia, bifenila e benzofenona, a fim de se avaliar o tempo de retenção (t_r) e a eficiência (**Tabela 13**). Das 19 colunas empacotadas apenas duas puderam ser usadas nos experimentos em CEC e uma nos de μHPLC ³⁵.

³⁵ Esta coluna não foi submetida aos testes para colunas CEC.

Figura 63: Aspectos da linha de base e corrente em colunas cujos filtros de entrada (A) e saída(B) não estejam completamente sinterizados.

A **Tabela 13** e a **Figura 64** mostram os tempos de retenção, eficiência e valores de área e altura dos solutos da solução teste, usados para no teste de desempenho das colunas empacotadas. Apesar do fato de ter sido obtido apenas 2 colunas entre 19 empacotadas ser um forte indicativo de irreprodutibilidade no processo de empacotamento, os números obtidos foram relativamente próximos.

2ª PARTE - CAPÍTULO 5 - Empacotamento de Colunas Capilares

Tabela 13: Dados eletrocromatográficos obtidos nos testes de desempenho de colunas para CEC. Condições de análise: Fase móvel: 50% de ACN em NaH₂PO₄ 70mM pH 2,8, + 25kV, 25°C.

Coluna 1

Soluto	t _r , min	Área	Altura	N
Tiouréia	7,69	841.6129	106.6000	30223
Bifenila	12,6	539.3579	55.60000	22483
Benzofenona	16,5	320.1957	22.20000	19568

Coluna 2

Soluto	t _r , min	Área	Altura	N
Tiouréia	7,09	874.3477	100.6000	29573
Bifenila	12,1	521.3659	52.7000	25092
Benzofenona	17,0	337.6956	28.2900	20574

Figura 64: Cromatogramas dos testes de performance de colunas empacotadas com Spherisorb. Condições de análise: vide **Tabela 13**.

4- Conclusões

Com base em todos estes experimentos, foi possível observar que o empacotamento de colunas capilares, especialmente para CEC, é um trabalho que requer bastante destreza manual, perspicácia e persistência. De fato, não é exagero dizer que o empacotamento destas colunas é, antes de tudo, uma arte. Isto, aliado ao fato de que cada tipo de fase estacionária necessita um protocolo otimizado para solventes de suspensão/empacotamento e de sinterização dos filtros, faz com que o processo de desenvolvimento do protocolo seja extremamente moroso.

De todas as dificuldades encontradas, a produção dos filtros foi a mais problemática, pois este foi o único passo de todo o processo para o qual não se obteve reprodutibilidade, sendo necessário o empacotamento total de 19 colunas para se obter 3 com filtros resistentes.

Isto acontece provavelmente por vários motivos. Um deles é a baixa quantidade de silicato nas fases estacionárias a base de sílica que foram quimicamente modificadas, fazendo com que a fusão das partículas com a parede do capilar seja mais fraca.

Outro provável problema é a baixa sensibilidade do aparato usado para a sinterização dos filtros. Isto é, caso não seja aplicado calor suficiente o *plug* de fase estacionária não é sinterizado e, caso seja aplicado calor demais, a camada empacotada move-se, deixando um espaço vazio próximo ao local onde foi aplicado o calor.

Neste contexto, acredita-se que o uso de um equipamento com maior sensibilidade no controle do calor aplicado, pode vir a aumentar a reprodutibilidade do processo de sinterização das fritas, facilitando todo o processo de empacotamento.

O protocolo otimizado ainda necessita de ajustes finais a fim de se obter colunas estáveis, mesmo quando sob alta temperatura. Uma possível sugestão seria o uso de temperatura durante o processo de empacotamento.

1- Introdução

Aspectos gerais

O crescente interesse em cromatografia capilar líquida pode ser visto no grande número de artigos de revisão publicados nos últimos anos, cobrindo aspectos gerais da técnica, instrumentação e tecnologia de coluna^{1,2,3}.

A introdução da μ HPLC tem sido atribuída a Horváth e colaboradores em 1967^{4,5}, os quais usaram colunas de alumínio, com 0,5-1,0 mm de diâmetro interno, empacotadas com partículas peliculares, para a separação de nucleotídeos. Foi entretanto, em meados da década de 70 quando o mundo científico novamente tornou a prestar atenção nesta técnica, depois que Ishii e colaboradores publicaram uma série de artigos demonstrando o uso da técnica de empacotamento com suspensões de fase estacionária (também chamada de técnica de suspensão)⁶. Desde então vários autores descreveram empacotamentos, usando colunas cada vez mais diminutas¹.

Atualmente, a sociedade científica ainda não chegou a um consenso sobre a nomenclatura usada na cromatografia líquida capilar. Abreviações tais como μ HPLC, “microbore” LC, μ LC tem sido usadas aleatoriamente para colunas com diferentes diâmetros internos, apesar da existência de várias propostas de normatização¹. Neste trabalho, optou-se por usar a nomenclatura “ μ HPLC” para designar colunas capilares com diâmetro interno entre 20 μ m a 100 μ m. Esta nomenclatura foi adotada pois é a utilizada no laboratório do Prof. Csaba Horváth, onde este trabalho foi realizado.

¹ J. P. C. Vissers, H. A. C., C. A. Cramers, J. Chromatogr. A 779 (1997) 1.

² M. V. Novotny, J. Chromatogr. B 689 (1997) 55.

³ M. B. O. Anderson, L. G. Blomberg, J. Sep. Sci. 24 (2001) 304.

⁴ Cs. Horváth, B. A. Preiss, S. R. Lipsky, Anal. Chem. 39 (1967) 1422.

⁵ Cs. Horváth, S. R. Lipsky, Anal. Chem. 41 (1969) 1227.

⁶ D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, M. Nagayama, J. Chromatogr. 144 (1977) 157. D. Ishii, K. Asai, K. Hibi, T. Jonokuchi, J. Chromatogr. 151 (1978) 147. D. Ishii, K. Hibi, K. Asai, M. Nagaya, J. Chromatogr. 152 (1978) 341. D. Ishii, K. Hibi, K. Asai, M. Nagaya, K. Mochizuki, Y. Mochida, J. Chromatogr. 156 (1978) 173. D. Ishii, A. Hirose, K. Hibi, Y. Iwasaki, J. Chromatogr. 157 (1978) 43. D. Ishii, A. Hirose, I. Horiuchi, J. Radioanal. Chem. 45 (1978) 7.

Instrumentação

Até o presente momento, existem pouquíssimos cromatógrafos comerciais no mercado específicos para cromatografia líquida capilar. Isto pode ser atribuído ao fato da técnica estar em desenvolvimento e, ainda, devido às diferentes necessidades requeridas para a conexão da coluna com a bomba, usando vazões tão reduzidas. Para colunas capilares com diâmetro $\leq 15\mu\text{m}$, a vazão da fase móvel é geralmente da ordem de $\mu\text{L}/\text{min}$, ou seja, menor que nL/s . Neste caso, torna-se difícil atingir as especificações para a produção de bombas que operem de forma constante, pois o menor deslocamento de volume de fase móvel pode influenciar na magnitude da vazão final⁷.

Além disso, o tamanho das tubulações presentes no equipamento (detector, sistema injetor, tubos conectores) influenciam de forma direta no alargamento de bandas e devem ser o menor possível, para que a resolução e a eficiência no cromatograma final não seja afetada⁸.

A **Figura 65** mostra o exemplo de um cromatógrafo convencional adaptado para análises com colunas capilares, com diâmetro interno de $20\mu\text{m}$ a $100\mu\text{m}$. Neste caso foi incluído um divisor de fluxo entre o injetor e a coluna, o que possibilitou operar a bomba no regime de vazão para o qual ela foi fabricada (mL/min).

Colunas capilares

O diâmetro das colunas capilares usadas na cromatografia líquida capilar varia de acordo com a nomenclatura adotada, podendo ir de 50 a $500\mu\text{m}$. O empacotamento de colunas capilares pode ser feito mediante o uso de diversas técnicas tais como fluído super-crítico⁹ e ainda através da técnica de suspensão. Nesta última técnica, uma suspensão contendo a fase estacionária a ser empacotada é bombeada para dentro da coluna através de um solvente, também chamado de solvente de pressurização⁶.

⁷ M. Krejčí, Trace Analysis with Microcolumn Liquid Chromatography. Marcel Dekker, Inc, New York, 1992, Caps. 1 e 2.

⁸ P. Kucera (Ed.), Microcolumn High-Performance Liquid Chromatography, Journal of Chromatography Library, Elsevier, Amsterdam, 1984.

⁹ G. Crescentini, A. R. Mastrogiamomo, J. Microcol. Sep. 3 (1991) 539.

Figura 65: Ilustração esquemática de um cromatógrafo líquido, adaptado para experimentos em cromatografia líquida com colunas capilares.

A teoria da cromatografia líquida diz que todos as separações realizadas por métodos convencionais, também podem ser realizadas em sistemas miniaturizados⁷ e existem várias vantagens em se usar esta técnica na forma miniaturizada^{1,7,8}.

A alta pressão aplicada em colunas capilares permite realizar separações mais rápidas do que as obtidas com colunas convencionais⁶ e, além do grande decréscimo no consumo de solvente, neste sistema ainda há um aumento na sensibilidade de massa^{1,8,10}. Assim sendo, o acoplamento destas colunas com detectores de massas é bem mais simples devido a menor velocidade da vazão da fase móvel⁸.

A separação em μ HPLC pode ser avaliada da mesma forma que na HPLC convencional, ou seja, os conceitos de R_s (resolução), seletividade (α), fator de retenção (k') e eficiência (N) são os mesmos descritos anteriormente para cromatografia¹¹.

Apesar das várias vantagens apresentadas por esta técnica, foi possível encontrar apenas um trabalho sobre a análises de substâncias fenólicas naturais em μ HPLC¹⁰. Neste trabalho, um total de 15 substâncias (fenilpropanóides, agliconas e glicosídeos flavonoídicos) foram identificadas em suco de maçã, usando eluição em modo gradiente com um sistema binário usando ácido fosfórico e metanol. Neste trabalho foi usado uma coluna de 0,30 mm de diâmetro interno e 250 mm de comprimento; o tempo de análise foi de 18 minutos.

Foi nosso objetivo observar o comportamento das 11 substâncias fenólicas selecionadas em μ HPLC, a fim de comparar com os resultados obtidos com os da eletrocromatografia capilar (CEC), a ser discutida no Capítulo 7 desta 2ª parte. Ainda foi objetivo avaliar a possível aplicação desta técnica com colunas de 75 μ m de diâmetro interno na análise da fração fenólica de extratos de camomila.

¹⁰ D. B. Gomis, N. F. Palomino, J. J. M. Alonso, Anal. Chim. Acta, 426 (2001) 111.

¹¹ A. S. Rathore, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 743 (1996) 231.

2- Parte Experimental

Fase móvel e Fase estacionária

Todos os solventes orgânicos usados nas análises foram de grau cromatográfico. O preparo da fase móvel, cuja composição está especificada em cada cromatograma, foi feito com fosfato monobásico de sódio monohidratado (J. T. Baker Inc.) e o pH ajustado com ácido *o*-fosfórico 85%, 1M (Fischer Scientific). Estas soluções foram preparadas diariamente e filtradas com membrana filtrante 0,45 μ m (Millipore), antes do uso.

Foram utilizadas colunas Spherisorb ODS1, empacotadas conforme descrito no Capítulo 5. As especificações desta fase estacionária foram: partículas com 5 μ m de diâmetro, 80Å de diâmetro de poro, 220m²g⁻¹ de área de superfície e 6,2% de carbono (Waters). A dimensão da coluna empacotada foi 25cm de comprimento e 75 μ m e 375 μ m de diâmetro interno e externo, respectivamente.

Equipamento

Os experimentos em μ HPLC foram feitos em um equipamento para cromatografia líquida da Hewlett-Packard HP 1090 Series modificado (**Figura 65**), equipado com amostrador automático e detetor UV Modelo 2000 e célula para colunas capilares do tipo “na coluna” (Thermo Separation Products), sendo o comprimento de onda ajustado em 337nm. O controle do sistema cromatográfico e da aquisição de dados foi feito com o sistema HP ChemStation (Hewlett Packard - número do produto G2170AA). O controle de vazão foi feito através do acoplamento de uma junção de aço inoxidável tipo “T” da Upchurch Scientific, depois da válvula de injeção (Valco), a um capilar de sílica fundida o qual conferiu efeito constritor. Dessa forma o ajuste da vazão da fase móvel foi feito através de variações no comprimento e diâmetro do capilar e da pressão aplicada.

Padrões

Os padrões 2-4 e 8-10 (**Figura 3**) foram obtidos da Aldrich enquanto que os 5-7 da Extrasynthèse e o 1, da Fluka. Foram preparadas soluções estoques individuais dos padrões na concentração de 1mg/mL, usando uma mistura de NaH_2PO_4 20mM pH 8,0/MeOH 2:8 como diluente. Uma vez solubilizadas, as soluções estoques foram desaeradas por borbulhamento com hélio e acondicionadas a 0°C. A solução de mistura de padrões foi preparada semanalmente misturando 100 μ L de cada solução estoque. Esta mistura foi mantida ao abrigo da luz durante os experimentos, e no final de cada dia ela era mantida a 0°C. Esta prática evitou a isomerização dos ácidos caféico e clorogênico além da decomposição dos demais. A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema de membrana filtrante Milli-Q, com membrana de 0,45 μ m.

Otimização da metodologia de análise.

O primeiro parâmetro a ser otimizado foi a relação vazão/dimensões do *split* e em seguida, o volume de injeção. Uma vez encontrados os melhores valores partiu-se para o desenvolvimento do método, o qual foi constituído de diversas análises, variando-se a proporção de ACN na fase móvel, a concentração do tampão, o pH do tampão e por fim o efeito da adição de MeOH, e THF na fase móvel. Todas as corridas foram feitas em condições isocráticas.

A identificação dos padrões foi feita através da comparação dos tempos de retenções de compostos injetados individualmente.

3- Resultados e Discussão

3.1. Otimização da metodologia de análise

O primeiro parâmetro otimizado foi a relação dimensões do *split* (capilar constritor)/velocidade da fase móvel. Foram testados *splits* de 20 μ m, 50 μ m e 75 μ m de diâmetros internos por 15cm, 20cm, 30cm, 50cm e 60cm de comprimento, com a vazão variando entre 0,0005mL/min a 0,08mL/min, dependendo das dimensões do divisor de fluxo. De uma maneira geral procurou-se não exceder uma pressão de 180 bar. Dentre as condições testadas, foi escolhida a vazão de 0,03mL/min com divisor de fluxo de 60cm de comprimento por 50 μ m de diâmetro interno.

A **Figura 66** mostra a variação da porcentagem da fase orgânica na fase móvel, sendo testadas 3 diferentes concentrações de acetonitrila: 40%, 50% e 60%. É possível observar que o aumento da concentração de ACN diminui a interação entre soluto/fase estacionária, o que conseqüentemente diminui o k' (**Tabelas 14 a 16 e Figura 67A**) das substâncias analisadas e o tempo total de análise. A seletividade (α) e resolução (R_s) (**Tabelas 14 a 16**) também foram afetadas. A **Figura 67B** mostra os valores de N e H obtidos para a umbeliferona nos três cromatogramas da **Figura 66**, onde é nítido o alargamento de banda na condição com menor porcentagem de solvente orgânico.

É interessante também notar que o efeito da variação na concentração do solvente orgânico foi mais acentuado para os glicosídeos flavonoídicos (10, 8 e 6) do que para os demais compostos, variando da completa co-eluição (cromatograma **A**) até a inversão da ordem de eluição, mostrada nos cromatogramas **B** e **C** da **Figura 66**.

Das três condições testadas, aquela descrita para o cromatograma da letra **B** da **Figura 66** foi a escolhida como ótima, por mostrar melhor resolução entre os compostos 10/ 4/8/6 (rutina, ácido clorogênico, luteolina-7-O-glicosídeo e apigenina-7-O-glicosídeo) e 2/7/9 (umbeliferona, luteolina e quercetina) que as demais, com um bom compromisso entre tempo e eficiência.

Figura 66: Efeito da variação da proporção de ACN na fase móvel em μ HPLC. Fase móvel NaH_2PO_4 50mM, pH 2.8/ACN. Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d., vazão: 0,03mL/min. Injeção: 6 μ L. Temperatura: 25°C. Numeração de acordo com **Figura 3**.

Tabela 14: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 40:60. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 10 μ L; Temperatura: 25°C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,51	0,17	1,00	0
6	3,51	0,17	1,00	0
8	3,51	0,17	1,71	1,5
3	3,87	0,29	2,02	2,38
4	4,76	0,58	2,23	6,84
2	6,91	1,30	1,54	5,18
7	9,03	2,01	1,00	0
9	9,03	2,01	1,28	2,76
11	10,7	2,57	1,37	4,75
5	13,6	3,52	1,04	0,79
1	14,0	3,65		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 15: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 6 μ L; Temperatura: 25°C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,15	0,05	1,75	0,82
4	3,27	0,09	1,55	0,59
8	3,41	0,14	1,72	0,89
6	3,71	0,23	1,61	1,26
3	4,13	0,38	2,28	5,23
2	5,58	0,86	1,17	1,75
7	6,00	1,00	1,00	0
9	6,00	1,00	1,42	2,69
11	7,25	1,42	1,11	5,65
5	7,71	1,57	1,34	4,45
1	9,33	2,11		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 16: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 40:60. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 6 μ L; Temperatura: 25°C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,17	0,06	1,21	1,06
4	3,21	0,07	1,29	0,2
8	3,27	0,09	1,67	0,89
6	3,45	0,15	1,65	1,9
3	3,74	0,25	2,22	5,66
2	4,64	0,54	1,00	0
7	4,64	0,54	1,00	0
9	4,64	0,54	1,30	2,09
11	5,13	0,71	1,19	1,62
5	5,54	0,84	1,49	6,3
1	6,77	1,25		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Figura 67: A) Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ contra a porcentagem de ACN na fase móvel.; B) Tabela relacionando tempo de retenção (tr) com a eficiência (N) e a altura de pratos (H) observada para o pico da umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 66**.

Na **Figura 68** foi possível observar o efeito da variação da concentração do tampão em μ HPLC. Como nesta condição, a grande maioria dos compostos está na sua forma neutra, esta variável afetou basicamente os k' (**Figura 69A**) e α dos compostos 4/10/8 na condição de 20mM, sendo esta variação atribuída à baixa capacidade tamponante da fase móvel com 20mM de fosfato. Os demais parâmetros cromatográficos permaneceram semelhantes (**Tabelas 15, 17, 18 e Figura 69B**). Observou-se que o ótimo das três condições testadas foi 50mM, por apresentar boa resolução entre os pares 2 e 7/9 e, ainda, pelo fato que durante os experimentos de identificação, foi observada a falta de reprodutibilidade dos tempos de retenção para as substâncias polares 4 e 3 (ácidos clorogênico e cafêico) o que não aconteceu nas condições com 50mM e 70mM de tampão.

Conforme mostra a **Figura 70**, a variação do pH afetou a substância cujo pKa era o mais baixo: o ácido clorogênico (4). Os demais, especialmente os mais apolares, não apresentaram variações significativas nos demais parâmetros cromatográficos (**Tabelas 15, 20 e 21**), a não ser no número de pratos os quais aumentaram levemente com o aumento do pH (**Tabela 19**). A condição considerada como ótima foi a de pH 2,8, pois nesta a manutenção do pH baixo mantém os compostos preferencialmente em suas formas neutras, aumentando tanto a interação soluto-fase estacionária, quanto a reprodutibilidade do sistema.

Figura 68: Efeito da concentração do tampão em μ HPLC. Fase móvel NaH_2PO_4 , pH 2.8/ACN 50:50. Coluna: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μm i.d. Vazão: 0,03mL/min. Injeção: 6 μL ; Temperatura: 25 $^\circ\text{C}$. Numeração de acordo com **Figura 3**.

Tabela 17: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 20mM, pH 2,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 15 μ L; Temperatura: 25°C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,09	0,03	1,68	0,84
8	3,15	0,05	1,76	0,55
4	3,26	0,09	2,09	0,91
6	3,54	0,18	1,72	1,14
4	3,93	0,31	2,35	4,57
2	5,17	0,72	1,19	1,36
7	5,60	0,86	1,00	0
9	5,60	0,86	1,62	1,6
11	7,2	1,40	1,03	2,32
5	7,31	1,43	1,30	3,18
1	8,61	1,87		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 18: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 70mM, pH 2,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 20 μ L; Temperatura: 25°C, λ = 337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,22	0,07	1,55	1
4	3,34	0,11	1,35	0,59
8	3,46	0,15	1,65	0,99
6	3,76	0,25	1,66	1,4
3	4,26	0,42	2,10	4,44
2	5,65	0,88	1,15	1,11
7	6,04	1,01	1,00	0
9	6,04	1,01	1,40	2,17
11	7,27	1,42	1,14	1,07
5	7,89	1,63	1,31	3,55
1	9,39	2,13		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

A)

B)

μ HPLC			
tampão (mM)	tr (min)	N	H (μ)
20mM	5,174	13376	18,69
50mM	5,578	14623	17,10
70mM	5,646	12487	20,02

Figura 69: Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ contra a concentração do tampão na fase móvel (A); Tabela relacionando tempo de retenção (tr) com a eficiência (N) e a altura de pratos (H) observada para o pico da umbeliferona (B). Condições de análise conforme descrito na Figura 68.

Figura 70: Efeito variação do pH em μ HPLC. Fase móvel NaH_2PO_4 50 mM /ACN 50:50. Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μm i.d. Vazão: 0,03mL/min. Injeção: 6 μL ; Temperatura: 25°C. Numeração de acordo com **Figura 3**.

Tabela 19: Tabela relacionando tempo de retenção (tr) com a eficiência (N) e a altura de pratos (H) observada para o pico da umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 70**.

μ HPLC			
pH	tr (min)	N	H (μ)
2,8	5,578	14623	17,10
3,8	5,541	16302	15,34
4,6	5,542	18285	13,67

Tabela 20: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 3,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 10 μ L; Temperatura: 25 $^\circ$ C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,14	0,05	1,00	0
4	3,14	0,05	2,83	0,99
8	3,41	0,13	1,78	0,88
6	3,72	0,24	1,52	1,26
3	4,09	0,36	2,34	5,88
2	5,54	0,85	1,21	2,25
7	6,08	1,02	1,00	0
9	6,08	1,02	1,39	4,48
11	7,29	1,43	1,16	2,29
5	7,98	1,66	1,28	4,55
1	9,37	2,12		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 21: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 4,6/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 10 μ L; Temperatura: 25 $^\circ$ C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
4	3,09	0,03	1,75	0,62
10	3,15	0,05	2,82	1,67
8	3,42	0,14	1,77	1,12
6	3,74	0,24	1,32	1,02
3	3,98	0,32	2,61	8,07
2	5,54	0,85	1,20	1,61
7	6,06	1,02	1,00	0
9	6,06	1,02	1,38	2,41
11	7,21	1,40	1,17	1,47
5	7,91	1,63	1,29	3,65
1	9,31	2,10		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Figura 71: Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ contra o pH da fase móvel. Condições de análise conforme descrito na **Figura 70**.

A adição de THF e MeOH à fase móvel também foi avaliada. A **Figura 72** mostra o cromatograma obtido com tampão fosfato 50 mM, pH 2,8 com 50% de ACN (**Figura 72A e Tabela 22**) com aqueles obtidos com a adição de THF (**Figura 72B e Tabela 23**) e de MeOH (**Figura 72C e Tabela 24**) à fase orgânica. Ambos agentes modificadores afetaram α e k' da rutina (10), ácido clorogênico (4) apigenina-7-O-glucosídeo (6), luteolina-7-O-glucosídeo e ácido cafêico (3). Comparando-se os valores de N e H mostrados na **Tabela 22**, foi possível observar que a adição de THF e de MeOH diminuíram a eficiência do pico da umbeliferona.

Figura 72: Efeito da adição de um agente modificante à fase orgânica em μ HPLC. Fase móvel 50% de NaH_2PO_4 50 mM pH 2,8 em fase orgânica. Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Vazão: 0,03mL/min. Injeção: 6 μ L; Temperatura: 25°C. Numeração de acordo com **Figura 3**.

Tabela 22: Tabela relacionando tempo de retenção (tr) com a eficiência (N) e a altura de pratos (H) observada para o pico da umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 72**.

μ HPLC			
fase orgânica	tr (min)	N	H (μ)
ACN	5,578	14623	17,10
ACN/THF	5,536	13961	18,71
ACN/MeOH	5,683	13403	18,65

Tabela 23: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN/THF 50:48:2. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 20 μ L; Temperatura: 25°C, λ = 337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,16	0,05	1,71	1,21
4	3,27	0,09	2,62	1,19
8	3,71	0,23	1,35	1,27
6	3,95	0,32	1,29	1
3	4,23	0,41	2,07	3,4
2	5,54	0,84	1,23	1,21
7	6,12	1,04	1,00	0
9	6,12	1,04	1,42	1,91
11	7,44	1,48	1,14	0,96
5	8,06	1,68	1,18	1,99
1	8,99	1,99		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 24: Dados cromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN/MeOH 50:48:2. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μ m i.d. Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m i.d. Injeção: 20 μ L; Temperatura: 25°C, λ =337nm.

Ordem de saída*	t_m (min)	k'	α	R_s^{**}
10	3,29	0,10	1,23	0,64
4	3,36	0,12	2,53	2,67
8	3,91	0,30	1,24	1,15
6	4,13	0,38	1,15	0,38
3	4,30	0,43	2,07	5,65
2	5,68	0,89	1,24	1,74
7	6,32	1,10	1,00	0
9	6,32	1,10	1,39	2,48
11	7,60	1,53	1,17	1,36
5	8,36	1,79	1,23	2,66
1	9,62	2,20		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

3.2. Considerações sobre o desempenho da coluna

Todos os experimentos mostrados acima foram realizados em uma única coluna, a qual não apresentou nenhuma alteração durante a análise. Durante todos os experimentos, a coluna não apresentou problemas com a linha de base, excesso ou perda de pressão. Os valores de N (**Figura 69B** e **Tabelas 19 e 22**) mantiveram-se relativamente constantes e o valor de t_0 (**Tabela 25**) foi reprodutivo.

Depois de terminados os experimentos, a coluna foi retirada do equipamento e observada sob microscópio (10X) o que revelou a existência de uma falha de cerca de 3mm na camada empacotada logo após o filtro da entrada. Baseado nos valores de reprodutibilidade mostrados na **Tabela 25** e ainda nos valores de N, esta falha pareceu não ter afetado o desempenho da coluna.

Tabela 25: Avaliação dos valores de t_m para MeOH, velocidade linear da fase móvel e tempo de retenção para o pico do DMSO. O t_m foi verificado com base na deflexão da linha base devido a presença de MeOH no preparo das amostras.

	t_m (min)	vazão (mm/s)	DMSO (min)
	3,00	1,39	4,12
	3,01	1,39	4,13
	3,08	1,35	4,12
	3,08	1,35	4,13
	3,07	1,36	4,11
	3,05	1,37	4,13
	3,06	1,36	4,08
	3,06	1,36	4,12
	3,08	1,35	4,12
	3,08	1,35	4,13
	3,08	1,35	4,09
	3,07	1,36	4,17
Média ^a	3,06	1,36	4,12
SD ^b	0,0	0,0	0,0
CV ^c (%)	0,9	0,7	0,5

^a Fase móvel: 50% de ACN em NaH_2PO_4 70mM, pH 2,8. Outras condições: Divisor de fluxo: 60cm/50 μ m, 25°C, $\lambda=214$, injeção: 6 μ L. Média obtida com os valores mostrados acima;

^b Desvio padrão;

^c Coeficiente de variação

4- Conclusões

A μ HPLC mostrou ser uma técnica bastante rápida, quando comparada à HPLC convencional, possibilitando uma separação parcial (os pares 10/4, 4/8 e 7/9 não foram resolvidos) das substâncias sob investigação em cerca de 10 minutos, sob condição isocrática. Apesar de não ter sido testado nenhum gradiente, pode-se concluir que caso este fosse aplicado, a separação destas substâncias poderia ser alcançada em tempos diminutos.

Os números de pratos observados nos cromatogramas foram relativamente baixos, quando comparados com aqueles encontrados na literatura¹¹. Este fato pode ser atribuído tanto à pequena falha encontrada próxima ao filtro de saída quanto a tubulação excessivamente longa usada entre o injetor e a entrada da coluna.

O presente trabalho mostrou a viabilidade do uso da μ HPLC, com colunas de 75 μ m, na análise de substâncias fenólicas presentes no metabolismo secundário da camomila.

1- Introdução

1.1. Conceitos Gerais sobre Eletrocromatografia Capilar (CEC)

A eletrocromatografia capilar (CEC) é uma técnica recente de separação que combina as vantagens da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com a eletroforese capilar (CE). Nesta técnica, o transporte do solvente (fase móvel) é feito através da geração de um fluxo eletroosmótico (EOF) ao longo da coluna, que elui os solutos ali injetados¹.

Em CEC, as separações são geralmente conduzidas num tampão aquoso misturado a um ou mais solventes orgânicos, tais como acetonitrila e metanol. Os materiais geralmente usados na produção das colunas são as sílica fundidas. Estas colunas possuem diâmetro interno variando de 20 μ m a 100 μ m. O empacotamento pode ser feito com partículas pequenas que variam de 0,5 a 5 μ m².

Ao contrário da HPLC e da μ HPLC, o uso de partículas tão diminutas em CEC só é possível devido ao EOF, pois uma vez que a formação do fluxo é induzida pelo campo elétrico, não há queda de pressão ao longo do capilar. Dessa forma, o uso de partículas com 0,5 μ m em colunas com 250mm não é tão problemático quanto nas técnicas de cromatografia líquida convencionais¹.

Assim como em CE (ver introdução do Capítulo 1 da 1ª Parte), o EOF em CEC se origina com a formação da dupla camada elétrica, que por sua vez, é formada na interface sólido-líquido da coluna empacotada, quando esta entra em contato com uma solução eletrolítica, sob a ação de um campo elétrico.

A **Figura 73** esquematiza um capilar de sílica fundida preenchido com uma dada fase estacionária, a qual possui grupamentos eletronegativos em sua estrutura (similar aos grupamentos negativos presentes na parede do capilar - ver **Figura 5** do Capítulo 1 da 1ª Parte).

¹ K. D. Bartle, P. Myers, J. Chromatogr. A, 916 (2001) 3.

² M. G. Cikalo, K. D. Bartle, M. M. Robson, P. Meyers, M. E. Euerby, Analyst, 123 (1998) 87R.

Figura 73: Representação esquemática de uma coluna capilar empacotada para CEC³.

Na situação apresentada acima, caso a coluna seja preenchida com um eletrólito, cujo pH permita que estes grupamentos estejam ionizados, ao se aplicar a tensão, haverá a formação do EOF que migrará para o pólo negativo passando pelo detector³.

O uso do EOF no transporte de solvente em sistema cromatográfico líquido foi descrito pela primeira vez por Pretorius et al em 1974⁴. Neste trabalho, os autores usaram partículas de 75 μ m a 125 μ m numa coluna de vidro com 1mm de diâmetro interno e, conseguiram provar, que o alargamento de bandas, num fluxo eletrocineticamente gerado, era bem menor que aquele obtido em um fluxo hidráulico, o que conseqüentemente, levou à obtenção de maiores valores de eficiência.

³ M. M. Dittmann, G. P. Rozing, J. Chromatogr. A, 744 (1996) 63.

⁴ V. Pretorius, B. J. Hopkins, J. D. Schieke, J. Chromatogr., 99 (1974) 23.

Quinze anos mais tarde, Knox e Grant⁵ demonstraram tanto na teoria, quanto na prática⁶ a possibilidade de se fazer “eletrocromatografia capilar”. Atualmente é possível obter separações com eficiência de 150.000/200.000 pratos/metro ou valores de 1,7 a 2,2 número de pratos reduzidos^{7,8}.

A combinação dos efeitos produzidos pelas partículas de tamanho reduzido, com o aumento do tamanho da coluna e o perfil do fluxo eletroosmótico, pode ser a possível razão dos altos valores de eficiências apresentadas por esta técnica; enquanto, a seletividade é a base de separação mais freqüentemente explorada em HPLC, em CEC, é também possível separar misturas complexas graças à possibilidade de obtenção de altos números de pratos¹.

Em CEC, picos com alta eficiência podem ser obtidos. Tal fato ocorre pois como na FSCE, o EOF não apresenta o perfil parabólico típico dos fluxos obtidos com pressão (**Figura 74**). Esta diferença do perfil do fluxo leva a uma grande redução da dispersão axial (termo A da equação de van Deemter) dos compostos separados, o que por sua vez leva a picos muito mais finos do que aqueles obtidos em HPLC⁸.

Figura 74: Ilustração esquemática de um capilar empacotado mostrando os perfis de um A) fluxo parabólico característico da HPLC e B) fluxo eletroosmótico em CEC⁸.

⁵ J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia* 24 (1987) 135.

⁶ J. H. Knox, I. H. Grant, *Chromatographia* 32 (1991) 317.

⁷ H. Yamamoto, H. Baumann, F. Erni, *J. Chromatogr. A* 593 (1992) 313.

⁸ E. Wen, R. Asiaie, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 855 (1999) 349.

O equipamento

A princípio, qualquer equipamento para CE (ver **Figura 4** do Capítulo 1 da 1ª Parte), seja industrial ou caseiro pode ser usado para executar análises em CEC. Todavia, foi mostrado na literatura a necessidade de pressurizar os recipientes contendo o eletrólito de corrida com cerca de 5 a 10bar^{5,6,9}. Esta necessidade se origina pelo fato de que, um dos maiores problemas encontrados no uso do EOF em colunas empacotadas é a formação de bolhas dentro do sistema.

A origem da formação destas bolhas ainda não está completamente esclarecida, entretanto, sabe-se que é de fundamental importância a sua supressão para que as análises em CEC possam ser realizadas.

Recentemente, Eurby e colaboradores mostraram que o uso de tampões com baixa condutividade, associado ao emprego de baixa voltagem (< 15kV), possibilita o uso de CEC com colunas capilares empacotadas em sistemas não pressurizados. A **Figura 75** mostra o esquema de um equipamento usado em CEC.

Figura 75: Representação esquemática de um equipamento para eletroforese capilar (CE) adaptado para eletrocromatografia capilar (CEC).

⁹ N. W. Smith, M. B. Evans, *Chromatographia* 38 (1994) 649; R. J. Boughtflower, T. Underwood, C. J. Paterson, *Chromatographia* 40 (1995) 329.

Atualmente, a detecção em CEC tem sido realizada principalmente por UV-vis, através da retirada de um pedaço da capa de poliimida do capilar. Esta prática, porém, possui algumas limitações: a fragilidade imposta pela remoção da poliimida e o diminuto tamanho do caminho óptico. Para evitar este problema, existem no mercado celas com caminho óptico estendido do tipo “bolha” e em “Z”². Praticamente todos os tipos de detectores úteis em CE podem ser usados em CEC. Existem vários artigos relatando o uso de detectores de fluorescência¹⁰, espectrometria de massas¹¹ e RMN¹².

A coluna

Como já foi discutido no Capítulo 5 desta 2ª Parte, uma coluna empacotada para CEC consiste tipicamente em dois segmentos: um empacotado e outro não empacotado (ver **Figura 55**). Cada segmento possui velocidade de EOF diferente¹³, fazendo com que a velocidade final, seja uma combinação da velocidade apresentada pelos dois segmentos. Na maioria dos casos, uma janela de detecção é feita logo após o fim do segmento empacotado através da retirada da camada de poliimida.

O papel do comprimento total da coluna, bem como o comprimento do segmento empacotado ainda necessita de maiores esclarecimento. Choudary e Horváth¹⁴ indicaram a ocorrência de mudanças abruptas na força do campo elétrico na interface dos segmentos empacotados e abertos de uma coluna capilar e a existência de diferentes temperaturas nas duas seções. Neste trabalho, além de enfatizarem a necessidade de maiores estudos sobre o tema, ainda, acentuam que a natureza mista da coluna pode ser a responsável pelos problemas encontrados na avaliação da velocidade do EOF em CEC.

¹⁰ H. Rebscher, U. Pyell, *Chromatographia* 42 (1996) 171.

¹¹ C. Rentel, P. Gfrörer, E. Bayer, *Electrophoresis* 20 (1999) 2329.

¹² P. Gfrörer, J. Schewitz, K. Puseker, L. H. Teng, K. Albert, E. Bayer, *Electrophoresis* 20 (1999) 3.

¹³ A. S. Rathore, Cs. Horváth, *Anal. Chem.* 70 (1998) 3069.

¹⁴ G. Choudhary, Cs. Horváth, *J. Chromatogr. A* 781 (1997) 161.

Na prática observa-se grande preferência para colunas com 25cm de empacotamento, sendo o comprimento do segmento aberto dependente do tipo de instrumento a ser utilizado nas análises.

1.2. A origem do EOF em colunas capilares empacotadas e fatores que o afetam.

Como já foi discutido no Capítulo 1 da 2ª parte deste trabalho, o EOF em FSCE resulta da presença do potencial zeta na superfície de um capilar de sílica fundida. Desta forma, é então esperado que em colunas empacotadas, tanto a parede do capilar quanto o material de empacotamento contribuam para a geração deste fenômeno.

Foi demonstrado entretanto, que em colunas empacotadas, a geração do EOF é feita principalmente pela fase estacionária¹. O fato da velocidade do EOF em uma coluna empacotada ser menor do que a velocidade do EOF em uma coluna aberta, com as mesmas dimensões da anterior, pode ser explicado se levarmos em consideração que o empacotamento, apesar de não apresentar nenhum efeito adverso, traz consigo tortuosidades e porosidades, resultando assim em irregularidades as quais as moléculas de solvente precisam vencer¹.

A equação de Smoluchowski [1] conceitua a velocidade do EOF como sendo¹⁵:

$$v_{\varepsilon_0} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_r \zeta E}{\eta} \quad [1]$$

onde, ε_0 é a permissividade do vácuo, ε_r é a constante dielétrica do eletrólito, ζ é o potencial zeta, η a viscosidade do eluente e E a força do campo elétrico aplicado. Para potenciais pequenos, ζ pode ser expresso de acordo com a equação [2]:

$$\zeta = \frac{\sigma}{\varepsilon_0 \varepsilon_r \kappa} \quad [2]$$

¹⁵ R. J. Hunter, Zeta Potential in Colloid Sciences, Academic Press, London, 1981, Chapter 2.

onde σ é a densidade da carga da superfície na camada de cisalhamento e κ é o parâmetro de Debye-Hückel (para eletrólitos monovalentes fortes)²:

$$\kappa = \left[\frac{2cF^2}{\epsilon_0 \epsilon_r RT} \right]^{1/2} \quad [3]$$

onde c é a concentração do tampão, F a constante de Faraday ($9,65 \times 10^4 \text{ C. mol}^{-1}$), R a constante dos gases ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$) e T a temperatura absoluta¹⁶.

A combinação das equações 1 e 2 nos dá a equação [4] a qual descreve a velocidade do EOF como:

$$v_{\epsilon_0} = \frac{\sigma \left[\frac{\epsilon_0 \epsilon_r RT}{2cF^2} \right]^{1/2} E}{\eta} \quad [4]$$

De acordo com a equação [4], a velocidade do EOF dependerá de fatores, tais como, a densidade de carga na fase estacionária, da constante dielétrica, força iônica do tampão, da viscosidade do eluente e da temperatura.

A composição da fase estacionária é de extrema importância em CEC, pois é nela aonde ocorre o processo separativo e é ela ainda que irá gerar o EOF. Dessa forma o material usado no empacotamento deve ser capaz de gerar e sustentar o EOF, não apenas para compostos neutros, mas também para arrastar compostos dissociados, uma vez que é ele o responsável pelo transporte dos analitos¹⁷.

Várias fases estacionárias típicas da HPLC já foram usadas em CEC¹⁸, sendo as fases reversas as mais utilizadas. Dentro as octadecilsílicas, a Hypersil ODS1 e a Spherisorb ODS1 são as mais usadas por serem capazes de gerar EOF mais velozes. Estas fases estacionárias são suportes usados em HPLC, os quais não passaram pelo capeamento dos grupamentos silanois (também chamados de não

¹⁶ M. M. Dittmann, K. Wienand, F. Bek, G. P. Rozing, LC•GC 13 (1995) 800.

¹⁷ L. A. Colón, T. D. Maloney, A. M. Fermier, J. Chromatogr. A 887 (2000) 43.

¹⁸ M. M. Robson, M. G. Cikalo, P. Myers, M. R. Euerby, K. D. Bartle, J. Microcol. Sep. 9 (1997) 357.

capeados), pois dessa forma ainda há considerável quantidade de silanóis livres capazes de gerar e manter o EOF.

Uma das maiores desvantagens da octadecilsílica em CEC é a dependência da v_{eof} frente ao pH da fase móvel. Em certas ocasiões, é necessário usar eletrólitos com pH baixo e nestes casos, a velocidade do EOF é desfavoravelmente baixa¹⁹. Entretanto, Cikalo e colaboradores²⁰ relataram que foi possível realizar a análise de uma mistura de ácidos salicílico e acetil salicílico usando ODS1 (não capeada) e fase móvel com pH 2,5 em 6 minutos.

Além dos diversos tipos de ODS utilizados, outros grupamentos podem ser ligados ao esqueleto básico de sílica. Dessa forma, grupos fenila, propila, octila dentre outros, também podem ser usados na funcionalização^{21,22}. Outros suportes que não são à base de sílica, também já foram utilizados²³.

Smith e Evans²⁴ avaliaram a separação de substâncias básicas em CEC, usando coluna do tipo SCX (troca iônica forte) especialmente preparada para CEC, através do acoplamento de cadeias propil-sulfônicas a um esqueleto de sílica gel. Com este suporte, os autores obtiveram eficiências extremamente altas, indicando a existência de um efeito de focalização, o qual não foi observado nem na cromatografia convencional nem na eletroforese capilar. Até o presente momento, este efeito de focalização ainda está sob investigação²⁵.

Enquanto o uso de colunas do tipo SCX demonstra claramente a importância de grupamentos sulfônicos no aumento da velocidade eletroosmótica, mesmo em pH baixos, eles não permitem separações baseadas em interações hidrofóbicas, como acontece na fase reversa. Com o intuito de realizar CEC usando uma fase estacionária a qual permitisse usufruir da versatilidade de uma fase reversa e ainda apresentasse EOF cuja velocidade fosse relativamente alta e independente do pH,

¹⁹ U. Pyell, J. Chromatogr. A 892 (2000) 257.

²⁰ M. G. Cikalo, K. D. Bartle, P. Myers, J. Chromatogr. A 836 (1999) 35.

²¹ K. D. Bartle, R. A. Carney, A. Cavanza, M. G. Cikalo, P. Myers, M. M. Robson, S. C. P. Roulin, K. Sealey, J. Chromatogr. A 892 (2000) 279.

²² N. Smith, M. B. Evans, J. Chromatogr. A 832 (1999) 41.

²³ S. Fanali, J. Chromatogr. A 735 (1996) 77. S. Kitagawa, A. Tsuji, H. Watanabe, M. Nakashima, T. Tsuda, J. Microcol. Sep. 9 (1997) 347.

²⁴ N. W. Smith, M. B. Evans, Chromatographia 41 (1995) 197;

²⁵ M. G. Cikalo, K. D. Barte, P. Myers, Anal. Chem. 71 (1999) 1820. M. Moffatt, P. A. Cooper, K. M. Jessop, Anal. Chem. 71 (1999) 1110.

Zhang e El Rassi²⁶ introduziram uma nova fase estacionária à base de sílica e grupamentos sulfônicos. Esta fase era constituída de uma sub-camada com grupos sulfônicos, ligada covalentemente a um suporte de sílica e a uma camada superior com grupamentos octadecilas. Desta forma, as cargas da sub-camada estavam permanentemente ionizadas, mesmo em pH baixo. Os autores verificaram a aplicação desta nova fase estacionária a vários solutos e constataram que em certas condições, a seletividade apresentada diferenciava significativamente daquela obtida com octadecilsílica convencional²⁷. Além do Prof. El Rassi, diversos autores também descreveram a síntese de fases estacionárias do tipo “modo misto”, reagindo grupamentos sulfônicos com diversos tipos de grupamentos alquilas^{17,28}.

Huang e colaboradores²⁹ desenvolveram uma outra forma de lidar com o problema das análises onde o eletrólito de corrida deve apresentar um pH baixo. Eles usaram uma fase do tipo modo-misto, a qual continha, ambos grupamentos octadecila e dialquil-amina, ou seja, grupamentos para as interações hidrofóbicas e grupamentos para gerarem EOF, já que mesmo em pH baixo os grupamentos amina estavam ionizados. Neste caso, a velocidade do EOF permaneceu praticamente constante na faixa de pH que vai de 2 a 5, e começou a diminuir para pH acima de 5,2. Um fator importante é que quando se usa pH baixo neste sistema, a direção do EOF é invertida ou seja, o EOF move-se na direção contrária daquela observada quando o excesso de cargas da fase estacionária é negativa.

Yuang e El Rassi³⁰ também descreveram a síntese de um novo tipo de ODS cuja superfície foi coberta com uma baixa porcentagem de grupamentos alquilas. Esta fase estacionária foi especialmente elaborada com o intuito de deixar o maior número possível de silanóis livres, permitindo assim uma velocidade de EOF relativamente alta. Apesar de 75% dos silanóis da superfície estarem intactos, a fase estacionária apresentou comportamento característico de fase reversa.

²⁶ M. Zhang, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 19 (1998) 2068.

²⁷ M. Zhang, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 20 (1999) 31.

²⁸ M. M. Dittmann, G. P. Rozing, J. Microcol. Sep. 9 (1997) 399. Th. Adam, S. Lüdtke, K. K. Unger, *Chromatographia* 49 (1999) S49.

²⁹ P. Huang, X. Jin, Y. Chen, J. R. Srinivasan, D. M. Lubman, *Anal. Chem.* 71 (1999) 1786.

³⁰ C. Yang, Z. El Rassi, *Electrophoresis* 19 (1999) 2061.

Além das propriedades da fase estacionária e do pH do eletrólito de corrida, um outro fator importante influenciando a v_{eof} é a força iônica do tampão utilizado. Em CEC, assim como em CE, a espessura da dupla camada elétrica e conseqüentemente, o potencial zeta e a mobilidade eletrosmótica são proporcionais à força iônica do tampão^{1,8,16,20}. O tipo e a proporção do solvente orgânico usados na fase móvel também afetam a v_{eof} , pois influenciam a razão permitividade/viscosidade do sistema^{1,8,16}. No caso de separações de solutos neutros, o aumento da porcentagem de acetonitrila na fase móvel provoca uma queda linear do fator de retenção dos mesmos, mostrando que neste caso, a teoria da HPLC convencional pode ser aplicada^{8,20}.

Na FSCE, enquanto os analitos com cargas são separados através de suas diferentes mobilidades eletroforética (μ_{ef}), os analitos neutros não são discriminados, e acabam por migrar com a velocidade do EOF. Na CEC, os analitos neutros são separados pelas interações hidrofóbicas que realizam com a fase estacionária, e se movem na mesma direção que o EOF. Esta situação é mostrada na letra **A** da **Figura 76**.

Todavia, caso o soluto seja carregado, sua migração pode ocorrer de três modos distintos, de acordo com ambas as magnitudes do μ_{ef} e do μ_{eof} . A **Figura 76** mostra estas diferenças. No caso da letra **B**, ocorre uma migração co-direcional do soluto catiônico com o EOF, onde a velocidade de migração das espécies carregadas é sempre maior que a velocidade do EOF. Isto faz com que num eletrocromatograma, os picos referentes a estes solutos saiam sempre com tempo de retenção menor que o pico do marcador (EOF).

A letra **C** mostra o exemplo de um soluto aniônico migrando de forma contra-direcional. Neste caso a velocidade do EOF é maior que a velocidade eletroforética das espécies dissociadas “arrastando-as” para o detector.

A letra **D** também mostra um exemplo de migração contra-direcional onde a velocidade do EOF é menor que a velocidade eletroforética. Neste caso, a detecção do componente carregado só é possível caso ocorra a inversão da polaridade do

sistema; todavia o marcador do EOF não pode ser detectado, uma vez que estará migrando para o lado inverso do detector^{1,31}.

A letra **E** apresenta uma outra solução para ânions que necessitam serem analisados em pH baixo. Neste caso, a fase estacionária apresenta um excesso de cargas positivas e a polaridade do sistema é então invertida. Desta forma, o analito migrará de forma co-direcional com o EOF e o resultado visto no detector será semelhante àquele apresentado na letra **B**.

Sendo assim, a seqüência de eluição de analitos em uma coluna CEC irá depender tanto da magnitude de suas diferentes interações com a fase estacionária, quanto da magnitude de suas μ_{ef} (no caso de espécies dissociáveis).

Figura 76: Esquema de separação em eletrocromatografia capilar de espécies neutras e carregadas. Legenda: (0) solutos neutros, (+) solutos catiônicos, (-) solutos aniônicos. Na parte direitas são mostrados os eletrocromatogramas correspondentes.

³¹ J. Zhang, X. Huang, S. Zhang, Cs. Horváth, Anal. Chem. 72 (2000) 3022.

Em CEC, a mobilidade eletroforética de uma espécie carregada pode ser expressa de acordo com a equação [5]^{32,33}.

$$\mu_{cec} = (\mu_{eof} \pm \mu_{ef}) / (1 + k_{LC}') \quad [5]$$

onde μ_{eof} é a mobilidade do EOF, μ_{ef} é a mobilidade eletroforética do soluto em questão e k_{LC}' é o fator de retenção cromatográfico. O sinal do numerador à direita é então positivo, em análises co-direcionais e negativos em análises contra-direcionais.

Uma outra forma de expressar μ_{cec} é dada pela equação [6]:

$$\mu_{cec} = \mu_{eof} / (1 + k_{cec}') \quad [6]$$

onde k_{cec}' é o fator de migração para CEC^{34,35} do soluto sob investigação.

Apesar de tantos esforços pode-se dizer que a CEC ainda não é utilizada em aplicações de rotina. As razões podem estar ligadas entre outros fatores, aos problemas técnicos associados à técnica, quais sejam:

- baixa reprodutibilidade na manufatura dos filtros, os quais retêm a fase estacionária;
- falta de uniformidade na interface do segmento empacotado com o filtro sinterizado;
- falta de uniformidade na camada empacotada o que leva à formação de “falhas” na mesma. Estas falhas, que podem aparecer depois de um certo tempo de uso da coluna, influenciam de forma direta a resolução e eficiência de separações de compostos neutros e iônicos^{13,36};

³² A. S. Rathore, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 743 (1996) 231.

³³ S. Zhang, X. Huang, J. Zhang, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A, 887 (2000) 465.

³⁴ Ch. Schwer, E. Kenndler, Anal. Chem. 64 (1991) 1801. M. M. Dittman, K. Masuch, G. P. Rozing, J. Chromatogr. A 887 (2000) 209.

³⁵ S. Zhang, J. Zhang, Cs. Horváth, J. Chromatogr. A 914 (2001) 189.

³⁶ A. S. Rathore, Cs. Horváth, Anal. Chem. 70 (1998) 3271.

- formação de bolhas que podem ser causadas pela desgaseificação ineficiente da fase móvel, heterogeneidade estrutural no filtro de saída e ainda, queda excessiva da pressão no filtro de entrada³⁷.
- fragilidade da coluna devido à abertura da camada de poliimida para a janela de detecção;
- limitação na escolha do material de empacotamento devido à necessidade imperativa da produção dos filtros.

Nos últimos anos, uma nova alternativa encontrada não só para a geração de EOF rápidos, mas também para resolver os problemas comuns relacionados aos filtros e “falhas” nas camadas empacotadas, são as chamadas colunas “monolíticas”. Tais colunas são formadas através de reações de polimerização *in situ* dentro do capilar, formando uma estrutura inteiriça com canais, por onde o solvente corre e microporos, onde são efetuados os processos de partição entre a fase estacionária e os solutos. As colunas monolíticas dispensam o uso de filtros, não são suscetíveis à formação de bolhas e falhas na camada empacotada e ainda são mais versáteis no que diz respeito à modificação da composição química, o que exige entretanto um profundo conhecimento de química de polímeros.

Nos três últimos anos, vários artigos de revisão sobre CEC foram publicados, incluindo aspectos práticos, campo de aplicação, materiais, técnicas de empacotamento e desenvolvimento de fase estacionária^{1,2,18,38}.

Até o presente momento, existem pouquíssimos artigos descrevendo o uso de CEC na análise de produtos naturais. Em nossas compilações bibliográficas foi possível encontrar apenas os quatro trabalhos citados a seguir.

Lurie e colaboradores³⁹ demonstraram a utilidade de CEC na identificação de canabinóides em extratos de *Cannabis sativa* e em *haxixe*, usando uma coluna do tipo ODS. Neste trabalho os autores também avaliaram a reprodutibilidade das

³⁷ S. E. Van den Bosch, S. Heemstra, J. C. Kraak, H. Poppe, J. Chromatogr. A 755 (1996) 165.

³⁸ K. D. Altria, J. Chromatogr. A 865 (1999) 443. L. A. Colón, K. J. Reynolds, A. R. Maldonado, A. M. Fermier, Electrophoresis 18 (1997) 2162. K. D. Altria, N. W. Smith, C. H. Turnbull, Chromatographia 46 (1997) 664. C. Fujimoto, Trends Anal. Chem. 18 (1999) 291. J. Pesek, M. T. Matyska, Electrophoresis 18 (1997) 2228. A. Dermaux, P. Sandra, Electrophoresis 20 (1999) 3027.

³⁹ I. S. Lurie, R. P. Meyers, T. S. Conner, Anal. Chem. 70 (1998) 3255.

análises e usaram uma cela do tipo “bolha” para a detecção em UV das substâncias analisadas, o que aumentou consideravelmente a altura dos picos.

Triglicerídeos também foram analisados e identificados com sucesso em óleo de *Sardina pilchardus* usando colunas ODS⁴⁰.

Eimer e colaboradores⁴¹ descreveram a separação dos flavonóides polares hesperidina e hesperetina usando “pseudo”-CEC. Este nome foi adotado pois não ocorreram interações entre os solutos e a fase-estacionária, mas a separação foi obtida através das diferentes mobilidades eletroforéticas dos solutos em questão.

Por fim, Kvasnicková e colaboradores⁴² conseguiram analisar lignanas em *Schisandra chinensis* usando colunas do tipo monolítica acrílica, com ácido vinilsulfônico como gerador de EOF.

O objetivo deste capítulo foi desenvolver uma metodologia para a separação das substâncias fenólicas sob investigação, avaliando o comportamento das mesmas, frente às diversas variáveis que afetam a separação em CEC.

⁴⁰ A. Dermaux, A. Medvedovici, M. H. Ksir, M. Talbi, P. Sandra, J. Microcol. Sep. 11 (1999) 451. A. Dermaux, M. H. Ksir, K. F. F. Zarrouck, P. Sandra, J. High Resolut. Chromatogr. 21 (1998) 545.

⁴¹ T. Eimer, K. K. Unger, K. van der Greef, Trends Anal. Chem. 15 (1996) 463.

⁴² L. Kvasnicková, Z. Glatz, H. Šterbová, V. Kahle, J. Slanina, P. Musil, J. Chromatogr. A 916 (2001) 265.

2- Parte Experimental

Materiais, Reagentes, Fase móvel e Fase estacionária

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para extração e limpeza dos extratos, foi utilizado solventes de grau P.A. da Merck e/ou Carlo Erba. Nas análises em CEC e FSCE foram usados solventes com grau cromatográfico.

No preparo dos eletrólitos de corrida nos experimentos em CEC, cujas composições estão especificadas em cada cromatograma, foi utilizado fosfato monobásico de sódio monohidratado (J. T. Baker Inc.) e o pH foi ajustado com ácido o-fosfórico 85%, 1M, grau cromatográfico (Fischer Scientific). As soluções foram preparadas diariamente e filtradas com membrana filtrante 0,45 μ m (Millipore), antes do uso. Nos experimentos em FSCE, o tetraborato de sódio decahidratado foi da marca Riedel-Haën. O eletrólito de corrida também foi preparado diariamente e filtrado com membrana filtrante 0.45 μ m (Millipore), antes do uso. O pH do eletrólito de tetraborato de sódio foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 1M (Carlo Erba).

Nas análises em FSCE para a determinação do estado de dissociação dos compostos estudados nas condições de CEC, foi usado capilar de sílica fundida (Quadrex) com as mesmas dimensões das colunas CEC: 33,5/25cm de comprimento e 75 μ m/ 325 μ m de diâmetro interno e externo respectivamente.

Foram usadas colunas empacotadas com dois tipos distintos de fase estacionária. As colunas contendo Spherisorb ODS 1, partículas com 5 μ m de diâmetro, 80Å de diâmetro de poro, 220m²g⁻¹ de área superficial e 6,2% de carbono (Waters) foram empacotadas conforme descrito e discutido no Capítulo 5 da 2ª Parte. As dimensões destas colunas empacotadas foram 33,5/25cm de comprimento e 75 μ m e 375 μ m de diâmetro interno e externo respectivamente. O segundo tipo de coluna usada foi recheada com Hypersil SCX/C18 (Keystone Scientific) com 33,5/25cm de comprimento e 50 μ m e 375 μ m de diâmetro interno e externo respectivamente. Esta coluna foi adquirida comercialmente.

Padrões e Amostras

Os padrões 2-5 e 7-9 (**Figura 3**) foram obtidos da Sigma, os 6, 8 e 11 da Extrasynthèse e o 1, da Fluka. Para os experimentos, soluções estoque dos padrões com 1mg/mL em DMSO/MeOH 1:9 foram preparadas semanalmente e estocados em freezer. Cerca de 100 μ L de cada uma destas soluções foram misturados para obter uma solução (1100 μ L total) com todos os padrões.

Para as análises em CEC, a limpeza dos extratos foi feita em cartucho para SPE Oasis HLB (Waters) 60mg. Quando as análises em CEC foram realizadas, os experimentos em SPE ainda não haviam terminado. Dessa forma, as amostras usadas nestes experimentos foram constituídas de uma mistura das frações obtidas no primeiro bloco de experimento com Oasis HLB, conforme é mostrado na **Figura 33**.

Equipamento

Todos os experimentos em CEC e FSCE foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detector do tipo arranjo de diodos fixado em 337nm, controle de temperatura, programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01). As amostras foram injetadas hidrodinamicamente (condições especificadas em cada eletrocromatograma), o sistema foi operado com polaridade normal e invertida dependendo do tipo de análise; a voltagem e os valores de temperatura usados se encontram relacionados nos eletrocromatogramas.

Estudo das Condições de Análises

O condicionamento de todas as colunas usadas foi realizado da seguinte maneira:

- Início do dia:

A coluna foi lavada com eletrólito de corrida durante 2 horas em bomba de HPLC com cerca de 40bar, sendo em seguida aplicado +5kV durante cerca de

1 hora. Uma vez estabilizada a linha de base e a corrente, a voltagem foi aumentada de 5 em 5 kV, sendo mantida durante 10min em cada passo.

- Entre corridas:

A coluna foi condicionada com eletrólito a 12bar durante 20min, seguido da aplicação de +5kV, +15kV e +25kV, durante 5min em cada passo.

Análises em Spherisorb ODS1

Primeiramente, otimizou-se as condições de injeção a fim de observar se as injeções eletrocínéticas seriam superiores às hidrodinâmicas. . Uma vez encontrado os melhores valores partiu-se para o desenvolvimento do método, o qual foi constituído de diversas análises variando a proporção de ACN na fase móvel, a concentração do tampão, temperatura e voltagem.

As faixas testadas foram: % de ACN: 40 a 60%; concentração do tampão: 20 a 70mM; temperatura: 15⁰C a 45⁰C e voltagem +20kV a +30kV.

A identificação dos padrões foi feita através da comparação dos tempos de retenções de compostos injetados individualmente e/ou em mistura e, ainda, pela comparação dos espectros em linha com biblioteca de espectros.

Análises em SCX/C18.

O desenvolvimento do método foi conduzido a partir do ótimo da segunda. Neste caso, as únicas variáveis testadas foram o efeito da proporção de ACN na fase móvel e da voltagem.

Mais uma vez, a identificação foi feita através da comparação dos espectros obtidos em linha com biblioteca de espectros.

Estudo de repetibilidade e reprodutibilidade do EOF

O estudo de repetibilidade do EOF foi feito com um mínimo de 3 medidas do t_0 nas condições otimizadas de corrida em Spherisorb ODS e SCX/C18, sendo também avaliada a reprodutibilidade entre-dias.

Os estudos foram conduzido na condição otimizada a saber: NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50, +25kV, 25⁰C.

A identificação dos compostos estudados foi feita através da comparação direta dos picos com os espectros armazenados em biblioteca e ainda pela técnica de *spikeing*, usando a condição otimizada descrita anteriormente.

Análises em FSCE para a observação do grau de dissociação das substâncias estudadas nas condições de CEC.

A fim de observar se as 11 substâncias estudadas estavam realmente sob suas formas neutras nas análises em CEC, optou-se por analisa-las em FSCE em condições idênticas àsquelas usadas em CEC, sendo a única diferença o uso do capilar não empacotado. Dessa forma, caso algumas das substâncias estivessem (parcialmente) dissociadas, estas migrariam com velocidade diferente dos analitos neutros, os quais sairiam no mesmo tempo que o EOF.

As análises foram feitas em um capilar com as mesmas dimensões das colunas de CEC, cobrindo as mesmas variáveis estudadas tanto em Spherisorb ODS 1 quanto em SCX/C18, com exceção da variação da concentração do tampão.

3- Resultados e Discussão

3.1. Análises em Spherisorb ODS 1

A **Figura 77** e as **Tabelas 26 a 28** mostram o efeito da porcentagem de ACN no eletrólito de corrida. A **Figura 78** traz um gráfico mostrando a correlação da mobilidade eletroosmótica e dos valores de corrente com as porcentagens de ACN na fase móvel.

O efeito da porcentagem de ACN na mobilidade da fase móvel ainda é pouco compreendido e necessita maiores esclarecimentos. Neste caso estudado como em vários outros³, a mobilidade do eluente aumenta com o aumento da porcentagem de acetonitrila. Este fato, entretanto, tem sido controverso. Enquanto Lurie e colaboradores⁴⁰ observaram que o aumento de ACN de 70% a 80% em tampão fosfato 25mM pH 2,57 praticamente não afetou a μ_{eof} , outros autores⁴⁴ relataram que o aumento de ACN na fase móvel acabou por diminuir a mobilidade do EOF.

Em um estudo sobre o comportamento do EOF mediante a adição de solventes orgânicos, Schwer e Kenndler³⁴ observaram que em colunas de sílica fundida a mobilidade do eluente também diminui com o aumento da concentração de ACN. Se fosse levando em consideração apenas as mudanças na viscosidade e na constante dielétrica do eletrólito depois da adição do referido agente orgânico, o resultado esperado deveria ser o inverso. Os autores concluíram que ocorre uma mudança do potencial zeta (ζ), o que é ocasionado pela variação da constante dielétrica na dupla camada elétrica e pela alteração da adsorção de íons, por influência do solvente orgânico.

A **Tabela 29** compila os valores de N e H obtidos com a variação de ACN na fase móvel, os quais se mantiveram constantes nas três condições testadas.

⁴⁴ H. Yamamoto, H. Baumann, F. Erni, J. Chromatogr. 593 (1992) 313. C. Yan, D. Schaufelberger, E. Erni, J. Chromatogr. A 670 (1994) 15.

Figura 77: Efeito da variação da proporção de ACN na fase móvel em CEC (Spherisorb). Eletrólito: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Outras condições de análise: voltagem: +25kV; temperatura: 25°C; injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Figura 78: Valores de mobilidade do EOF (μ_{eof}) e corrente obtida com as variações da porcentagem de ACN na fase móvel, CEC. Condições de análise: conforme descrito na **Figura 77**.

Tabela 26: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 40:60 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25 $^\circ\text{C}$; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	8,58	0,20	1,17	1,21
8	8,83	0,23	0,98	1,19
4	8,83	0,23	1,23	1,27
6	9,17	0,28	1,20	1
3	9,58	0,34	1,68	3,4
2	11,22	0,57	1,00	1,21
7	11,22	0,57	1,00	0
9	11,22	0,57	1,23	1,91
11	12,17	0,70	1,20	0,96
5	13,15	0,84	1,42	1,99
1	15,67	1,19		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrita na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 27: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	11,21	0,19	1,31	1,8
8	11,76	0,25	1,29	1,58
6	12,42	0,32	1,38	2,71
3	13,57	0,44	1,68	5,46
4	16,38	0,74	1,08	0,66
2	16,90	0,79	1,14	1,48
7	17,91	0,90	1,00	0
9	17,91	0,90	1,29	2,74
11	20,35	1,16	1,19	2,24
5	22,40	1,38	1,31	4,07
1	26,41	1,80		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 28: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 60:40 (CEC). Condições de análise: Coluna: Spherisorb ODS 1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	18,51	0,30	1,00	0
8	18,51	0,30	1,00	0
6	18,51	0,30	1,54	2,33
4	20,81	0,46	1,86	4,97
3	26,48	0,86	1,08	0,85
2	27,45	0,93	1,30	3,72
7	31,44	1,21	1,00	0
9	31,44	1,21	1,20	5,52
11	34,94	1,45	1,31	6,73
5	41,27	1,90	1,04	0,66
1	42,47	1,98		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 29: Tabela relacionando tempo de retenção (t_r) com a eficiência (N) e o número de pratos (H) observada para o pico da umbeliferona em CEC. Condições de análise conforme descrito na **Figura 76**.

<i>Porcentagem de Acetonitrila</i>			
	t_r (min)	N	H (μm)
60%	11,22	19600	12,76
50%	16,90	2000	125,0
40%	27,45	18900	13,23

A retenção (**Figura 79**), seletividade e resolução (**Tabelas 26 a 28**) dos padrões analisados também variaram com a concentração de ACN. Os valores do fator de retenção, k' , diminuíram com o aumento de ACN, o que foi atribuído à diminuição do EOF.

O ácido clorogênico se comportou de maneira bastante distinta. Além de ficar retido na condição com 60% de ACN, seu comportamento não seguiu um padrão como as outras substâncias. O fato da ordem de eluição desta substância ter variado de maneira tão drástica, quando comparado com os resultados em μHPLC , nos levou a especular se ele não estaria dissociado no pH da fase móvel usada.

A **Figura 80** mostra um eletroferograma da mistura de padrões em FSCE obtidos com um capilar aberto, nas mesmas condições usadas em CEC, o qual mostra que mesmo em pH 2,8, o ácido clorogênico se encontra de fato, parcialmente dissociado, migrando com velocidade diferente dos demais componentes que se encontram neutros.

Figura 79: Gráfico relacionando valores de $\ln k'$ e a porcentagem de ACN na fase móvel em CEC. Condições de análise: conforme descrito na **Figura 78**.

Figura 80: Eletroferograma da mistura de padrões em FSCE, usando condições idênticas às usadas em CEC. Capilar de 75 μm de diâmetro interno, com 33,5/25,0 cm de comprimento total e efetivo respectivamente. Eletólito de corrida: NaH_2PO_4 50mM pH 2,8 ACN 50:50, +25kV, 25°C. Injeção 50mbar/2,0s. Os traçados em azul e vermelho correspondem a aquisição em 337nm e 214 nm, respectivamente. Numeração de acordo com a **Figura 3**.

Com base neste dado, optou-se por não testar a variação do pH, pelo menos em um primeiro momento. Como era de interesse explorar primeiramente apenas os parâmetros cromatográficos (interações entre soluto e fase estacionária) da separação, o aumento do pH teria um efeito indesejado na análise destas substâncias (algumas com pka em torno de 3,5).

Levando em consideração o melhor balanço entre tempo de análise e resolução dos pares críticos, a condição com 50% de ACN foi usada nos outros experimentos de otimização.

O efeito da variação da concentração do tampão fosfato na separação das substâncias fenólicas de camomila é mostrado nas **Figuras 81 e 82** e nas **Tabelas 27 e 30 a 32**.

A **Figura 82** mostra que o aumento da concentração do tampão diminui a mobilidade do EOF, levando conseqüentemente, ao aumento dos tempos de retenção das substâncias analisadas.

O comportamento dos analitos luteolina-7-O-glicosídeo (8), rutina (10), apigenina-7-O-glicosídeo (6) e ácido cafêico (3) com o aumento da concentração do tampão, mostrou-se semelhante àquele observado quando a concentração de acetonitrila foi abaixada para 40% (**Figura 77**). Nestas duas situações, é possível observar a perda total da resolução destas substâncias. Até o momento não foi encontrada uma explicação plausível para explicar esta súbita perda de resolução, mesmo considerando que a diminuição do fluxo eletroosmótico promova alargamento de bandas.

As demais substâncias com caráter mais hidrofóbico (2, 7, 9, 11, 5 e 1) se comportaram conforme o esperado. O ácido clorogênico porém, o qual se encontra parcialmente dissociado nesta condição, se comportou com um padrão diferente dos demais.

Figura 81: Efeito da variação da concentração do tampão em CEC (Spherisorb) . Eletrólito: NaH_2PO_4 , pH 2,8/ACN. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Outras condições de análise: voltagem: +25kV; temperatura: 25°C; injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Tabela 30: Tabela relacionando tempo de retenção (t_r) com a eficiência (N) e altura de pratos (H) em Spherisorb observada para o pico da umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 81**.

Concentração do tampão			
	t_r (min)	N	H (μm)
20mM	11,61	18900	13,23
50mM	16,90	20000	12,50
70mM	17,51	19300	12,95

Tabela 31: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 20mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25 $^\circ\text{C}$; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	7,18	0,04	2,30	1,7
8	7,50	0,08	1,89	1,62
6	8,01	0,15	1,84	5,47
4	8,91	0,28	1,10	0,95
3	9,11	0,31	2,15	6,11
2	11,61	0,67	1,20	1,75
7	12,55	0,81	1,00	0
9	12,55	0,81	1,19	0,83
11	13,61	0,96	1,37	2,96
5	16,10	1,32	1,30	3,8
1	18,87	1,72		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 32: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 70mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25 $^\circ\text{C}$; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	14,31	0,44	1,00	0
8	14,31	0,44	1,00	0
6	14,31	0,44	1,00	0
3	14,31	0,44	1,73	8,78
2	17,51	0,76	1,14	1,98
7	18,59	0,87	1,00	0
9	18,59	0,87	1,09	1,11
4	19,34	0,95	1,25	1,61
11	21,74	1,19	1,23	2,11
5	24,42	1,46	1,23	3,78
1	27,81	1,80		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Figura 82: Valores de mobilidade do EOF (μ_{eof}) e corrente obtidos com a variações da concentração do tampão. Condições de análise: conforme descrito na **Figura 81**.

Uma vez que a velocidade do EOF depende tanto do campo elétrico como da viscosidade do eletrólito de corrida (dentre outros fatores)¹, optou-se por testar o efeito da temperatura e da voltagem na separação das substâncias fenólicas da camomila. A **Figura 83** mostra os eletrocromatogramas obtidos com a variação da temperatura de 15 a 45°C, juntamente com a variação da voltagem de 20 a 30kV nas temperaturas mencionadas. As **Tabelas 27, 33 a 40** trazem os valores dos parâmetros eletrocromatográficos obtidos nestas análises.

A subida da temperatura de 15 para 45°C diminuiu o tempo total de análise em pelo menos de 35% nas três condições de voltagem testadas. A resolução por outro lado diminuiu com o aumento da temperatura para a maioria dos compostos.

Assim como ocorreu com a voltagem, a temperatura não interferiu de maneira significativa no número de pratos (**Tabela 41**) ao contrário do que se observa na HPLC na maioria dos casos⁴⁷. Este fato também foi observado por outros autores⁴⁰.

Desta forma assumiu-se como condição otimizada: NaH₂PO₄ 50mM pH 2,8 com 50% de ACN, + 25kV, 25°C. Esta condição foi a escolhida por ser o melhor compromisso entre resolução e tempo total de análise apesar dos resultados obtidos em 45°C serem mais promissores. O motivo para esta temperatura não ter sido usado foi porque ela provocou o colapso do segmento empacotado da coluna, o que será discutido em pormenores nas próximas páginas deste texto.

Figura 83: Eletro cromatogramas ilustrando o efeito da temperatura e da voltagem na separação das substâncias fenólicas avaliadas em CEC. Condições de análise: 50% de ACN em tampão fosfato 50mM, pH 2,8 a) 20kV a 15°C, b) 25kV a 15°C, c) 30kV a 15°C, d) 20kV a 25°C, e) 25kV a 25°C, f) 30kV a 25°C, g) 20kV a 45°C, h) 25kV a 45°C, i) 35kV a 45°C. Amostra: mistura de padrões, injeção: 12bar/0,15 min, $\lambda=337\text{nm}$.

Tabela 33: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +20kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	14,67	0,19	1,33	2,31
8	15,43	0,25	1,29	1,83
6	16,30	0,32	1,38	2,9
3	17,78	0,44	1,66	5,27
4	21,38	0,73	1,09	0,88
2	22,16	0,79	1,15	1,65
7	23,61	0,91	1,00	0
9	23,61	0,91	1,29	2,97
11	26,86	1,17	1,19	2,44
5	29,62	1,40	1,30	4,95
1	34,81	1,82		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 34: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +30kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	9,10	0,19	1,22	1,92
8	9,41	0,23	1,37	2,31
6	10,06	0,31	1,37	2,71
3	10,94	0,43	1,62	4,8
4	12,97	0,69	1,11	0,68
2	13,54	0,77	1,14	1,53
7	14,35	0,87	1,00	0
9	14,35	0,87	1,27	2,55
11	16,19	1,11	1,19	2,27
5	17,81	1,33	1,31	4,51
1	21,01	1,74		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 35: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +20kV; Temperatura: 15°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	16,79	0,20	1,36	2,83
8	17,81	0,28	1,24	1,72
6	18,72	0,34	1,45	3,69
4	20,85	0,49	1,15	1,89
3	21,90	0,57	1,60	6,35
2	26,67	0,91	1,16	2,42
7	28,72	1,06	1,00	0
9	28,72	1,06	1,31	4,23
11	33,31	1,39	1,19	2,96
5	36,89	1,64	1,27	4,64
1	43,10	2,09		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 36: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 15°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	13,03	0,20	1,32	1,8
8	13,72	0,27	1,25	1,51
6	14,46	0,33	1,44	3,38
4	16,06	0,48	1,21	1,8
3	17,17	0,58	1,52	4,21
2	20,43	0,89	1,15	2,25
7	21,91	1,02	1,00	0
9	21,91	1,02	1,31	4,1
11	25,30	1,33	1,19	2,94
5	28,00	1,58	1,28	4,73
1	32,79	2,03		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 37: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +30kV; Temperatura: 15°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	10,37	0,19	1,29	1,61
8	10,85	0,25	1,33	1,99
6	11,57	0,33	1,41	3,77
3	12,74	0,47	1,44	5,23
4	14,51	0,67	1,27	3,79
2	16,09	0,85	1,15	2,16
7	17,20	0,98	1,00	0
9	17,20	0,98	1,30	4,01
11	19,75	1,27	1,19	3,19
5	21,84	1,51	1,29	5,48
1	25,68	1,95		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 38: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +20kV; Temperatura: 45°C; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	12,11	0,16	1,39	2,51
8	12,77	0,23	1,23	1,23
6	13,30	0,28	1,28	1,48
3	14,11	0,35	1,44	3,11
4	15,73	0,51	1,27	2,45
2	17,16	0,65	1,14	1,26
7	18,10	0,74	1,00	0
9	18,10	0,74	1,25	2,25
11	20,01	0,92	1,21	2,32
5	22,02	1,11	1,33	3,38
1	25,89	1,48		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 39: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 45 $^\circ\text{C}$; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	9,21	0,19	1,34	2,39
8	9,71	0,26	1,21	0,9
6	10,13	0,31	1,24	1,08
3	10,70	0,38	1,46	3,24
4	12,07	0,56	1,22	1,82
2	13,01	0,68	1,13	1,04
7	13,69	0,77	1,00	0
9	13,69	0,77	1,24	1,39
11	15,11	0,95	1,20	1,43
5	16,62	1,15	1,34	2,86
1	19,66	1,54		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 40: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC). Condições de análise: Spherisorb ODS1; 33,5/25 cm, 75 μm i.d. Voltagem: +30kV; Temperatura: 45 $^\circ\text{C}$; Injeção: 12bar/0,15seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	7,44	0,16	1,32	2,47
8	7,77	0,22	1,31	1,44
6	8,19	0,28	1,24	1,21
3	8,62	0,35	1,51	4,46
4	9,75	0,53	1,20	1,46
2	10,44	0,63	1,13	1,04
7	10,96	0,72	1,00	0
9	10,96	0,72	1,24	1,71
11	12,05	0,89	1,21	1,79
5	13,21	1,07	1,35	3,08
1	15,59	1,44		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 41: Tabela relacionando tempo de migração (t_m) com a eficiência (N) e altura de pratos observados para o pico da umbeliferona. Condições de análises: 50% de ACN em tampão fosfato 50mM, pH 2,8 1) 20kV a 15°C, 2) 25kV a 15°C, 3) 30kV a 15°C, 4) 20kV a 25°C, 5) 25kV a 25°C, 6) 30kV a 25°C, 7) 20kV a 45°C, 8) 25kV a 45°C, 9) 35kV a 45°C. Demais condições de acordo com a **Figura 82**.

<i>Condições</i>		t_r (min)	N	H (μm)
	<i>de análise</i>			
1	(20kV/15°C)	26,67	15900	15,72
2	(25kV/15°C)	20,43	14600	17,12
3	(30kV/15°C)	16,09	18300	13,66
4	(20kV/25°C)	22,16	19300	12,95
5	(25kV/25°C)	16,90	20000	12,50
6	(30kV/25°C)	13,54	21000	11,90
7	(20kV/45°C)	17,16	19500	12,82
8	(25kV/45°C)	13,01	20300	12,32
9	(30kV/45°C)	10,44	18000	13,89

3.2. Análises em SCX/C18

Uma vez encontrada uma metodologia satisfatória para a separação das substâncias estudadas em Spherisorb ODS1, optou-se por testar outro tipo de fase estacionária. Como um dos maiores inconvenientes da Spherisorb foi a diminuta velocidade do EOF (cerca de 0,44 mm/s) no pH usado, escolheu-se então um material do tipo “modo misto”, contendo grupamentos sulfônicos ligados a octadecilas^{26,27}, reconhecidos por prover maior velocidade de EOF mesmo em pH baixo como 2,8.

A coluna escolhida foi uma Hypersil SCX/C18, com 33,5/25 cm de comprimento total e empacotado respectivamente, 50µm de diâmetro interno e partículas de 3µm. Infelizmente não foi possível obter comercialmente uma coluna com este tipo de recheio a qual possuísse partículas com 5µm e 75µm de diâmetro, para que pudesse se fazer uma comparação com a Spherisorb ODS1. No entanto, como o principal objetivo do trabalho foi a obtenção de uma metodologia válida para a análise de substâncias fenólicas em extrato de camomila e avaliar sua possível aplicação no controle de qualidade dos mesmos, o processo de otimização foi continuado com a coluna descrita. Além disso, espera-se que o maior efeito destas diferenças de dimensões seja refletido principalmente nos valores de N, uma vez teoricamente o tamanho da partícula não deve influenciar na velocidade do EOF^{1,21}.

Como a maioria das substâncias se encontram na forma neutra (com exceção do ácido clorogênico), no pH de corrida usada, acredita-se que a principal força regendo a separação nestas condições sejam as interações hidrofóbicas entre fase estacionária e os solutos. Dessa forma, o próximo passo, foi observar o efeito da porcentagem de acetonitrila no eletrólito de corrida pois sabe-se que a força do solvente orgânico afeta de modo direto o coeficiente de partição entre os analitos e a fase estacionária⁴⁷.

A **Figura 84** e as **Tabelas 42 a 44** mostram os resultados da variação da porcentagem de ACN no eletrólito de corrida em SCX/C18, onde a mobilidade do EOF (**Figura 85**) foi bem maior do que a observada em Spherisorb em condições semelhantes de análise.

Figura 84: Efeito da variação da proporção de ACN na fase móvel em CEC (SCX/C18). Eletrólito: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Condições de análise: Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Tabela 42: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8/ACN 40:60 (CEC, SCX/C18). Condições de análise: SCX/C18; 33,5/25 cm, 50µm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; λ=337nm.

Ordem de saída*	t _r (min)	k'	α	Rs**
10	2,60	0,04	1,58	0,98
8	2,65	0,06	1,60	1,27
6	2,74	0,09	1,56	1,99
3	2,87	0,15	1,55	3,69
4	3,07	0,23	1,76	6,12
2	3,51	0,40	1,00	0
7	3,51	0,40	1,00	0
9	3,51	0,40	1,24	3,32
11	3,75	0,50	1,00	0
5	3,75	0,50	1,25	4,14
1	4,05	0,62		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 43: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC, SCX/C18). Condições de análise: SCX/C18; 33,5/25 cm, 50µm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; λ=337nm.

Ordem de saída*	t _r (min)	k'	α	Rs**
10	3,63	0,14	1,12	1,47
8	3,68	0,15	1,12	1,2
6	3,74	0,17	1,42	10,27
3	3,97	0,25	1,17	0,71
4	4,10	0,29	1,85	6,54
2	4,88	0,53	1,28	3,72
7	5,35	0,68	1,05	0,63
9	5,45	0,71	1,17	2,1
11	5,84	0,83	1,30	4,52
5	6,64	1,08	1,12	2,2
1	7,03	1,21		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 44: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 60:40 (CEC, SCX/C18). Condições de análise: SCX/C18; 33,5/25 cm, 50 μm i.d. Voltagem: +25kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Ordem de saída*	t_r (min)	k'	α	R_s^{**}
10	4,46	0,19	1,00	0
8	4,46	0,19	1,17	1,1
3	4,58	0,22	1,05	2,76
6	4,62	0,23	1,39	0,42
4	4,95	0,32	1,84	12,46
2	5,95	0,58	1,70	11,62
7	7,47	0,99	1,00	0
9	7,47	0,99	1,24	4,55
11	8,38	1,23	1,33	7,17
5	9,90	1,63	1,03	1,11
1	10,11	1,68		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Figura 85: Gráfico dos valores de mobilidade de EOF e corrente obtidos nos experimentos de variação da porcentagem de ACN em CEC (SCX/C18). Valores obtidos com a deflexão da linha base causada pelo MeOH presente nas amostras. Condições de análise conforme descrito na **Figura 84**.

A adição dos grupamentos sulfônicos afetou o k' (**Figura 86**) e a seletividade (**Tabelas 42 a 44**) de modo bastante sensível, principalmente quando da adição de 40% de ACN (**Figura 84C**). Dentre todas as substâncias, aquelas mais afetadas foram a apigenina (5), a luteolina (7) e seus -7-O-glicosídeos (6 e 8, respectivamente). Nestas condições, o k' da substância 5 foi maior que o da substância 1 e o de 6, maior que o de 3. As substâncias 2, 7 e 9 também responderam sensivelmente a estas variações chegando a um ótimo de separação na condição com 50% de ACN.

Esta alteração da seletividade em SCX/C18 também foi observada pelo Prof. El Rassi^{27,28}. A presença dos grupamentos sulfônicos ligados às cadeias carbônicas apolares, faz com que o caráter da fase estacionária seja bem mais ácido do que as ODS convencionais, o que diminui a interação soluto/fase estacionária no caso de solutos neutros levemente apolares²¹. Um outro fator que poderia estar influenciando na separação do par crítico 7/9 é o sensível aumento do número de pratos constatado para esta coluna. Entretanto, tal especulação só poderia ser confirmada, caso houvesse sido feito uma análise usando Spherisorb ODS1 com partículas de 3 μ m.

O número de pratos (**Tabela 45**) aumentou consideravelmente quando comparado com aqueles obtidos em Spherisorb ODS1, o que foi atribuído ao tamanho das partículas desta fase estacionária. Os valores encontrados estavam de acordo com o descrito na literatura⁴⁰. Comparando-se o número de pratos com a variação da porcentagem de ACN no eletrólito, observou-se que N diminuiu com a redução da porcentagem da ACN de 50% para 40%. Entretanto, este valor novamente caiu quando a porcentagem foi aumentada de 50 para 60%, o que pode ter ocorrido devido à co-eluição da umbeliferona (2) com a luteolina (6) e a quercetina (9).

Uma vez que foi possível alcançar a resolução satisfatória de todos os componentes em menos de 10 minutos (**Figura 84B**), optou-se então por testar apenas o efeito da voltagem nesta condição.

Figura 86: Valores de log natural de k' referentes às variações da % de ACN em CEC (SCX/C18). Demais condições vide **Figuras 84**. Numeração de acordo com a **Figura 3**.

Tabela 45: Tabela relacionando tempo de retenção (t_r) com a eficiência (N) e altura de pratos (H) em CEC (SCX/C18) observado para o pico da umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 84**.

Porcentagem de Acetonitrila			
	t_r (min)	N	H (μm)
60%	3,51	52400	4,77
50%	4,88	56900	4,39
40%	5,95	45300	5,52

A **Figura 87** mostra os eletrocromatogramas obtidos com a variação da voltagem em CEC com a coluna SCX/C18. Nestas condições, o k' , a seletividade (α) e a resolução (**Tabelas 43, 48 e 47**) manteve-se semelhantes, a não ser para o composto 4, na condição com +30kV a 25°C. Os valores observados para N (**Tabela 48**) não variaram significativamente.

Figura 87: Efeito da variação da voltagem em CEC (SCX/C18). Eletrólito: NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Tabela 46: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC, SCX/C18). Condições de análise: SCX/C18; 33,5/25 cm, 50µm i.d. Voltagem: +20kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; λ=337nm.

Ordem de saída*	t _r (min)	k'	α	Rs**
10	4,78	0,29	1,07	1,36
8	4,86	0,31	1,07	1,46
6	4,94	0,34	1,41	10,79
3	5,46	0,48	1,05	1,04
4	5,54	0,50	1,50	7,79
2	6,47	0,75	1,23	4,09
9	7,12	0,92	1,04	0,79
7	7,25	0,96	1,14	2,5
11	7,74	1,09	1,28	5,27
5	8,88	1,40	1,10	2,15
1	9,39	1,54		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 47: Dados eletrocromatográficos dos compostos estudados na condição: NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8/ACN 50:50 (CEC, SCX/C18). Condições de análise: SCX/C18; 33,5/25 cm, 50µm i.d. Voltagem: +30kV; Temperatura: 25°C; Injeção: 12bar/0,4seg; λ=337nm.

Ordem de saída*	t _r (min)	k'	α	Rs**
10	3,06	0,05	1,37	1,59
8	3,12	0,07	1,40	1,52
6	3,20	0,10	1,34	1,23
3	3,30	0,14	1,28	2,3
4	3,41	0,17	2,25	6,58
2	4,05	0,39	1,33	3,53
9	4,42	0,52	1,05	0,66
7	4,50	0,55	1,19	1,97
11	4,81	0,66	1,35	4,14
5	5,47	0,88	1,14	2,39
1	5,83	1,01		

*Substâncias apresentadas por ordem de saída; numeração conforme descrito na **Figura 3**.

**Entre a substância e o próximo indicado.

Tabela 48: Tabela relacionando tempo de retenção (t_r) com a eficiência (N) e altura de pratos (H) observada para os picos referentes à umbeliferona. Condições de análise conforme descrito na **Figura 87**.

<i>Voltagem</i>			
	t_r (min)	N	H (μm)
20kV	6,47	54900	4,55
25kV	4,88	56900	4,39
30kV	4,05	56300	4,44

A condição mais rápida de análise foi obtida com NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50, +30kV, +25°C onde foi possível separar os 11 componentes em menos de 6 minutos. Entretanto, optou-se pela condição com +25kV como otimizada, para evitar a geração excessiva de calor, o que na prática observou-se exercer um efeito deletério a mesma.

A **Figura 88** mostra a condição otimizada em CEC (SCX/C18) com os respectivos espectros UV, tomados em linha, pico a pico.

Figura 88. Análise das substâncias fenólicas na condição otimizada em CEC. Eletrolito de corrida: 50% de ACN em tampão fosfato 50mM pH 2,8, +25kV, 25°C. Injeção: 12bar/0,14 min. $\lambda = 337\text{nm}$. Numeração de acordo com a Figura 3.

3.3. Identificação das substâncias de interesse nos extrato metanólico, glicólico e hidroalcoólico de camomila.

As **Figura 89, 90 e 91** trazem os eletrocromatogramas dos extratos metanólico, glicólico e etanólico respectivamente.

A identificação das substâncias fenólicas analisadas foi feita através da comparação dos espectros dos picos com aqueles obtidos na biblioteca de espectro e, nos casos em que não foi possível obter um espectro, devido a baixa concentração do analito, usou-se a técnica de fortificação (substâncias 6, 8, 9, 10 e 11). Com exceção destes picos mencionados, todos os outros apresentaram índice de pureza maior que 998. Mais uma vez, o DAD, foi útil apenas para analitos abundantes nos extratos.

A análise dos extratos por CEC com colunas SCX/C18 mostrou que a concentração da apigenina-7-O-glicosídeo (6), luteolina-7-O-glicosídeo (8), rutina (10) e ácido clorogênico (4) foram bem menores do que nas demais técnicas estudadas. Isto pode ser explicado pelo fato que tais amostras foram submetidas a um processo de pré-purificação por extração em fase sólida, ainda em fase experimental. Dessa forma, parte destes constituintes deve ter-se perdido durante o processo de pré-purificação.

Figura 89: Identificação das substâncias analisadas no extrato metanólico da camomila. A) Extrato metanólico; B) Extrato metanólico fortificado com 1, 2, 3, 4 e 5; C) Extrato metanólico fortificado com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Condições de análise: SCX/C18; NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50, +25kV, 25°C. Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Figura 90: Identificação das substâncias analisadas no extrato glicólico da camomila. A) Extrato glicólico; B) Extrato glicólico fortificado com 1, 2, 3, 4 e 5; C) Extrato glicólico fortificado com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Condições de análise: SCX/C18; NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50, +25kV, 25°C. Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

Figura 91: Identificação das substâncias analisadas no extrato etanólico de camomila. A) Extrato etanólico; B) Extrato etanólico fortificado com 1, 2, 3, 4 e 5; C) Extrato etanólico fortificado com 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 e 11. Numeração de acordo com a **Figura 3**. Condições de análise: SCX/C18; NaH_2PO_4 50mM, pH 2,8/ACN 50:50, +25kV, 25°C. Injeção: 12bar/0,4seg; $\lambda=337\text{nm}$.

3.3. Considerações sobre o desempenho das colunas para CEC.

Spherisorb ODS1

Estas considerações se basearam na experiência adquirida com as duas colunas usadas nos experimentos em CEC até agora descritas, as quais foram empacotadas de acordo com o protocolo descrito no Capítulo 5 desta 2ª Parte.

De uma forma geral, ambas colunas se mantiveram estáveis depois de mais de cerca de 50 análises consecutivas, em diversas condições de voltagem. No entanto, a primeira coluna usada sucumbiu após a aplicação de 45°C, quando uma falha com cerca de 1,5cm foi formada na interface do segmento empacotado com filtro de saída.

Como este procedimento não foi repetido para a segunda coluna empacotada, não ficou claro se esta falha foi realmente formada pelo calor ou pelo uso prolongado da mesma. Entretanto, como a segunda coluna capilar suportou um número maior de análises que a primeira especula-se que o problema ocorrido tenha realmente sido devido ao tempo de exposição à 45°C. Em estudos sobre o efeito da temperatura na sedimentação de colunas para cromatografia líquida, Wang e colaboradores⁴⁵ observaram que o aumento de 3 a 5°C sobre a temperatura de empacotamento promoveu a melhora da sedimentação da camada empacotada, levando ao aumento da eficiência da coluna. Estes resultados indicam que a coluna usada nos experimentos poderia não estar com sua camada empacotada devidamente sedimentada.

O uso da temperatura no empacotamento de colunas para CEC parece não estar difundido, talvez por motivos práticos, uma vez que os eluentes empregados no empacotamento são geralmente solventes orgânicos, cujos pontos de ebulição são relativamente baixos.

A **Tabela 49** traz dados de repetibilidade (*entre-dias*) e repetibilidade (*entre-corridas*) da velocidade do EOF (usando MeOH como marcador) observados durante os experimentos de desenvolvimento de método e identificação.

⁴⁵ T. Wang, R. A. Hartwick, N. T. Miller, D. C. Shelly, J. Chromatogr. 523 (1990) 23.

Pode-se observar que a repetibilidade (CV = 2,5, 1,18, 0,63 nos dias 1, 2 e 3 respectivamente) foi melhor que a reprodutibilidade (CV= 3,7). Estes resultados estão de acordo com aqueles encontrados na literatura, onde vários autores^{21,40} observaram que a reprodutibilidade seja compiladas em alguns dias ou em períodos mais longos, foi bem menor que aquela observada em um único dia de análise. Em estudos sobre a vida útil de colunas para CEC, Walhagen e colaboradores⁴⁶ encontraram CV < 6% para o k' de compostos neutros (n = 50). Este número caiu para cerca de 0,5% quando o número de análises foi diminuído para 6.

Tabela 49: Avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade dos tempos e velocidade do EOF durante os experimentos em Spherisorb ODS 1.

<i>"Repetibilidade"</i> ^a						
	dia 1 ^b (n = 3)		dia 2 ^b (n = 10)		dia 3 ^b (n = 4)	
	t ₀	V _{eof} (mm/s)	t ₀	V _{eof} (mm/s)	t ₀	V _{eof} (mm/s)
média	9,43	0,44	9,68	0,43	10,40	0,40
SD ^d	0,24	0,01	0,11	0,00	0,07	0,00
CV ^e (%)	2,50	2,49	1,18	1,16	0,64	0,64

<i>"Repetibilidade"</i> ^{a,b,c}		
	(n = 17)	
	t ₀	V _{eof} (mm/s)
média	9,81	0,43
SD ^d	0,37	0,02
CV ^e (%)	3,78	3,70

^a Fase móvel: 50% de ACN em NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8, +25kV, 25°C, λ=337, injeção: 12bar/0,15min.

^b Dados obtidos com a primeira coluna empacotada;

^c Dados obtidos com a segunda coluna empacotada;

^d Desvio padrão;

^e Coeficiente de variação.

⁴⁶ K. Walhagen, K. K. Unger, M. T. W. Hearn, J. Chromatogr. A 894 (2000) 35.

SCX/C18

Foram usadas duas colunas para a conclusão deste trabalho. A primeira foi usada para os experimentos de otimização de injeção (hidrodinâmica x eletrocinética), e da variação da porcentagem de ACN no eletrólito. Já no quinto dia de uso consecutivo pode-se observar, sob exame ao microscópio, que uma falha próxima à frita da saída havia se formado. Entretanto, como a falha no empacotamento não estava afetando a corrente e a linha de base, as quais apresentavam os mesmos valores dos testes iniciais, optou-se por continuar com os experimentos.

Como nesta fase já havia sido observada a dependência do condicionamento para a manutenção da reprodutibilidade, optou-se por automatizar o processo de condicionamento, através da aplicação de voltagem e pressão apenas na extremidade do polo positivo do equipamento. Já na primeira aplicação, começaram os problemas com a corrente, a qual não se mantinha estável. Depois de um série de tentativas não foi mais possível usar a coluna devido a instabilidade da linha base e corrente. O exame ao microscópio revelou que a coluna estava quebrada próxima ao filtro de entrada (ou do *inlet*), enquanto a camada de poliimida ao redor estava intacta.

O fato deste mesmo fenômeno ter ocorrido sob as mesmas condições com a segunda coluna Spherisorb, nos chamou a atenção e, depois de discussões com o pessoal técnico da Agilent - EUA, foi concluído que ao aplicar a voltagem e a pressão simultaneamente estaria sendo gerado uma espécie de turbilhão dentro do reservatório do tampão, o que estaria introduzindo bolhas dentro do capilar e promovendo a cristalização do tampão dentro do mesmo. Estas bolhas poderiam então estar aterrando o sistema, impedindo a passagem da corrente de forma homogênea, levando assim ao aquecimento excessivo daquela parte do capilar, o que por sua vez explicaria o fato do capilar estar quebrando “por dentro”⁴⁷.

O tipo de queda da corrente observado foi característico para colunas entupidas⁴⁸, pois não havia ruído e sim, apenas a queda abrupta, depois do que a corrente continuava constante. Segundo o suporte técnico da Agilent, a aplicação de

⁴⁷ Uma vez que não há rupturas na camada de poliimida

⁴⁸ CE Partner. CdROM interativo da Agilent Technologies, o qual acompanha o equipamento HP^{3D}CE.

voltagem em rampa de 0kV a 25kV pode evitar o fato. Para este trabalho entretanto optou-se por continuar fazendo o condicionamento manualmente.

Por precaução, depois da constatação deste fato, todas as vezes que foi observada uma variação na corrente sob qualquer contexto, foram aplicados cerca de 15 minutos de pressão na extremidade do polo negativo do equipamento, seguido do aumento da voltagem com polaridade invertida, a fim de expulsar qualquer bolha que por ventura estivesse retida próxima à extremidade do filtro de entrada.

A segunda coluna utilizada só apresentou uma minúscula compactação próxima ao filtro de saída no final dos experimentos. Cabe aqui dizer que quando este trabalho foi realizado, as colunas Hypersil SCX/C18 só eram empacotadas sob encomenda e a empresa, pedia um prazo de 20 dias para o empacotamento, o que mostra o caráter artesanal até mesmo das colunas comerciais.

A reprodutibilidade nas colunas SCX/C18 foi avaliada através dos valores de EOF nas diversas condições analisadas e ainda através dos valores dos tempos de retenção, área e altura obtidos para as substâncias analisadas em 10 corridas sequenciais na condição otimizada.

A **Tabela 50** mostra os dados de repetibilidade intra e inter dias do EOF em SCX/C18.

Tabela 50: Avaliação da repetibilidade e reprodutibilidade dos tempos e velocidade do EOF durante os experimentos em SCX/C18.

<i>"Repetibilidade"</i> ^a						
	dia 1 (<i>n</i> = 10)		dia 2 (<i>n</i> = 10)		dia 3 (<i>n</i> = 10)	
	<i>t</i> ₀	<i>V</i> _{eof} (mm/s)	<i>t</i> ₀	<i>V</i> _{eof} (mm/s)	<i>t</i> ₀	<i>V</i> _{eof} (mm/s)
média	3,36	1,24	3,67	1,14	3,85	1,08
SD ^b	0,03	0,01	0,03	0,01	0,03	0,01
CV ^c (%)	0,77	0,77	0,80	0,80	0,82	0,82

<i>"Repetibilidade"</i> ^{a,b,c}		
	<i>(n</i> = 26)	
	<i>t</i> ₀	<i>V</i> _{eof} (mm/s)
média	3,67	1,14
SD ^b	0,19	0,06
CV ^c (%)	5,07	5,24

^a Fase móvel: 50% de ACN em NaH₂PO₄ 50mM, pH 2,8, +25kV, 25°C, λ=337, injeção: 12bar/0,15min;

^b Desvio padrão

^c Coeficiente de variação

Pode-se observar que a repetibilidade da velocidade do EOF em SCX/C18 (**Tabela 51**) seguiu o mesmo padrão descrito para Spherisorb (**Tabela 50**), ou seja, a repetibilidade (CV < 0,8%) foi bem melhor que a repetibilidade (CV = 5,24%). Houve, entretanto, um aumento considerável do coeficiente de variação nos testes de repetibilidade com a coluna SCX/C18, em relação à Spherisorb ODS1, que apresentou um CV = 3,69% contra CV = 5,24 em SCX/C18. Tal fato pode ter explicação na presença dos grupamentos sulfônicos na fase estacionária e na ineficiência da metodologia de condicionamento do capilar no início do dia. Uma solução para este problema foi dada pelo próprio Prof. El Rassi⁴⁹, o qual sugeriu que fosse usado ACN/H₂O 8:2 durante cerca de uma hora, antes do início dos experimentos de condicionamento do capilar no início do dia. Segundo ele, esta prática seria suficiente

⁴⁹ Comunicação pessoal.

para regenerar os grupamentos sulfônicos sem afetar as cadeias carbônicas hidrofóbicas. Entretanto, esta sugestão só foi feita após o término dos experimentos.

Além da repetibilidade da velocidade do EOF, a coluna SCX/C18 também foi avaliada quanto a repetibilidade dos tempos de retenção, área e altura dos picos das substâncias fenólicas na condição otimizada (**Tabela 51**). Os dados foram coletados com dez corridas seqüenciais.

A repetibilidade dos tempos de retenção apresentou resultados semelhantes àqueles observados para o EOF, CV variou de 0,80 a 2,00 %.

O coeficiente de variação da área variou de 2,7% (umbeliferona (2)) a 10,3% (apigenina-7-O-glucosídeo (6)), enquanto que para a altura de pico, esta variação foi de 5,4% (ácido cafêico (3)) a 14,6 % (quercetina (9)).

Tabela 51: Dados de repetibilidade dos tempos de retenção (min), valores de área e altura de picos das substâncias fenólicas analisadas em SCX/C18. Eletrolito de corrida: NaH₂PO₄ 50mM pH 2,8/ACN 50:50, +25kV, 25°C. Injeção: 12bar/0,15min. λ = 337nm. Numeração das substâncias de acordo com a **Figura 3**.

	rutina (10)			luteolina-7-O-glicosídeo (8)			apigenina-7-O-glicosídeo (6)		
	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura
média ^a	3,88	8,90	5,04	3,95	10,8	5,10	4,04	4,30	1,42
SD ^b	0,04	0,74	0,32	0,04	1,03	0,24	0,04	0,41	0,15
CV ^c %	0,93	8,30	6,36	0,97	9,54	4,62	1,00	9,50	10,4

	ácido caféico (3)			ácido clorogênico (4)			umbeliferona (2)		
	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura
média ^a	4,40	19,9	22,3	4,61	36,0	7,92	5,28	19,4	14,7
SD ^b	0,04	2,63	1,85	0,09	1,97	0,69	0,05	1,60	0,49
CV ^c %	0,97	13,2	8,31	2,00	5,46	8,70	0,98	8,25	3,34

	quercetina (9)			luteolina (7)			apigenina (5)		
	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura
média ^a	5,78	49,81	5,72	5,87	57,5	13,2	6,33	3,89	0,92
SD ^b	0,06	7,30	0,26	0,07	7,30	0,62	0,08	0,26	0,07
CV ^c %	1,04	14,66	4,57	1,11	12,70	4,70	1,27	6,59	7,97

	naringenina (11)			herniarina (1)		
	tr (min)	área	altura	tr (min)	área	altura
média ^a	7,15	58,9	11,6	7,68	60,80	9,68
SD ^b	0,09	3,30	0,43	0,09	4,51	0,27
CV ^c %	1,29	5,59	3,75	1,20	7,41	2,75

^a n = 10;
^b desvio padrão;
^c coeficiente de variação.

Ao longo do trabalho foi observado que algumas práticas podem melhorar a reprodutibilidade da velocidade do EOF e conseqüentemente dos tempos de migração nos experimentos em CEC.

O primeiro e talvez o mais importante dos fatores foi, assim como em FSCE, fazer uso de uma boa metodologia de condicionamento do capilar entre as corridas. Outra prática não menos importante, foi usar recipientes diferentes para o condicionamento e para a corrida, ou seja, o condicionamento foi feito com um par de recipientes e a corrida com outro par, cada um contendo tampão recém preparado. Este procedimento foi adotado por dois motivos. Primeiro porque como o tempo de condicionamento era muito longo (35 a 40 min), o eletrólito acabava por perder a capacidade tamponante; isto foi observado porque ficou muito claro que o valor da corrente ia decaindo lentamente depois que a voltagem era mantida por mais de cerca de uma hora. Em segundo, devido à rápida evaporação do eletrólito de corrida, o qual é composto por altas concentrações de solvente orgânico.

Estes simples cuidados aumentaram consideravelmente a reprodutibilidade das análises.

4- Conclusões

Este trabalho demonstrou a aplicação da CEC na análise de substâncias fenólicas em extratos vegetais, onde foi possível separar as 11 substâncias fenólicas estudadas em menos de 8,5 minutos, usando modo isocrático.

O uso de uma fase estacionária contendo grupamentos sulfônicos aumentou consideravelmente a velocidade do EOF nas condições testadas, além de promover a separação do par crítico formado pela quercetina/luteolina, os quais não haviam sido separados em nenhuma das técnicas cromatográficas em coluna empacotada até então testadas. Não ficou esclarecido se esta separação ocorreu devido ao aumento do número de pratos nesta coluna ou se foi devido a alteração da seletividade.

A CEC mostrou ser uma técnica bastante promissora na análise de substâncias fenólicas em extratos vegetais, entretanto, diversos problemas inerentes aos aspectos instrumentais ainda dificultam a aplicação desta em análises de rotina.

Um dos maiores problemas ainda é a coluna empacotada, a qual além de ser muito frágil, ainda apresenta problemas de formação de falhas; acredita-se que as colunas do tipo monolíticas serão o futuro para estas análises. O segundo problema é o equipamento em si, uma vez que ainda não há exemplares comerciais que permitam, a aplicação de maiores valores de pressão, para lavagem e condicionamento da coluna.

Foi possível concluir que a CEC é uma ferramenta analítica extremamente potente, a qual possibilita o uso de dois princípios distintos de separação, permitindo combinar versatilidade com altos valores de eficiência.

Conclusões da 2ª Parte

A primeira publicação encontrada sobre a análise da fração fenólica de extratos de camomila data de 1969, quando Stahl⁴ fez uso da cromatografia em camada delgada com sílica gel, para a análise de cumarinas em extrato de flores de camomila. Desde então, o número de trabalhos publicados sobre este tema cresceu consideravelmente. A **Tabela 52** mostra o levantamento bibliográfico realizado para a análise desta fração, cobrindo o período de 1968 a Novembro de 2001.

Tabela 52: Levantamento bibliográfico das técnicas de análise usadas para extratos de camomila, cobrindo o período de 1968 a novembro de 2001. Fonte: *Chemical Abstracts* e *Analytical Abstracts*.

Substâncias	Técnica	Referências
Apigenina	HPLC (RP 18, gradiente)	1
Apigenina e Apigenina-7-O-glic.	HPLC (Zorbax SB-CN, gradiente)	2
a) Apigenina; luteolina; apigenina-7-O-β- glic, -monoacetil glic., e -diacetilglic.	HPTLC (Sílica gel)	3
b) Apigenina e apigenina-7-O-β- glic	HPLC (RP 18, isocrático)	
c) Apigenina; luteolina; apigenina-7-O-β- glic., -monoacetilglic, e -diacetilglic	TLC (Sílica gel)	
Cumarinas	TLC (Sílica gel) and UV-vis	4
Ácidos cafeoilquinico, dicafeoilquinico e seus derivados; ácido ferúlico e seus derivados; ácido quinico e seus derivados; Patuletina-7-O-glic; Apigenina e seus glicosídeos; Quercetina e seus glicosídeos; Luteolina e seus glicosídeos;	HPLC-MS HPLC-DAD (RP 18, gradiente)	5
Herniarina; umbeliferona; ácidos cafêico e clorogênico; apigenina; apigenina-7-O-glic; luteolina; luteolina-7-O-glic; quercetina; rutina; naringenina	FSCE MEKC	6

¹ R. Avallone, P. Zanolì, G. Puia, M. Kleinschnitz, P. Schreier, M. Baraldi, *Biochem. Pharmacol.* 59 (2000) 1387.

² S. Scalia, L. Giuffreda, P. Pallado, J. Pharmaceut. Biomed. Anal. 21 (1999) 549.

³ Z. Zekovic, B. Pekic, Z. Lepojevic, L. Petrovic, *Chromatographia*, 39 (1994) 587.

⁴ E. Stahl, *Arzneimittel-Forschung*, 19 (1969) 1892.

⁵ M. Mulinacci, A. Romani, P. Pinelli, F. F. Vincieri, D. Pruncher, *Chromatographia* 51 (2000) 301.

⁶ F. N. Fonseca, M. J. Kato, L. O. Junior, N. P. Neto, M. F. M. Tavares, *J. Microcol. Sep.* 13 (2001) 227.

2ª PARTE - CONCLUSÕES

Glicosídeos flavonoídicos	HPLC (RP 18, gradiente)	7
Flavonóides	Espectroscopia de UV-vis	8
Apigenina e Apigenina-7-O-glic	HPLC (RP 18, gradiente)	9
Apigenina e Apigenina-7-O-glic	HPLC (RP 18, gradiente)	10
Apigenina e seus -7-O-glic e -7-O-acetilglic.	HPLC (RP 18, gradiente)	11
Fração fenólica	HPLC (RP 18, gradiente) HPTLC (Silica gel)	12
Flavonóides	HPLC (RPC18, gradiente)	13
Flavonóides	Espectroscopia de UV-vis	14
Apigenina e herniarina	HPLC (RP 18, gradiente)	15
Herniarina	GC	16
Apigenina	HPLC	17
Herniarina e apigenina	HPLC HPLC (RP 18, gradiente)	18
Apigenina e apigetrina	HPLC (RP 18, gradiente)	19
Apigenina	HPLC (RP 18, gradiente)	20
Umbeliferona e herniarina	HPLC (RP 18, gradiente)	21

⁷ H. Miething; W. Holz, Pharmazie 44 (1989) 784.

⁸ G. Stanic, B. Katusin-Razem, J. Petricic, Farm. Glas. 44 (1988) 179.

⁹ R. Maier, W. Kreis, R. Carle, E. Reinhard, Planta Med. 57 (1991), 297.

¹⁰ A. Schreiber, R. Carle, E. Reinhard, Planta Med. 56 (1990) 179.

¹¹ B. Carle, B. Doelle, E. Reinhard, Planta Med. 55 (1989) 540.

¹² E. Menziani, D. Mazzotta, V. Brandolini, G. Lodi, Cosmet. Toiletries, Ed. Ital. 11(1990) 34.

¹³ F. Dondi, Y. D. Kahie, G. Lodi, P. Reschiglian, C. Pietrogrande, C. Bighi, G. P. Cartoni, Chromatographia 23 (1987) 844.

¹⁴ D. Grgesina, M. Mandic, L. Karuza, T. Klapac, D. Bockinac, Prehrambeno-Technol. Biotechnol. Rev. 33 (1995) 111.

¹⁵ M. Repcak, A. Eliasova, A. Ruscancinova, Pharmazie 53 (1998) 278.

¹⁶ A. Ahmad, L. N. Misra, Int. J. Pharmacogn. 35 (1997) 121.

¹⁷ V. Svehlikova, M. Repcak, Plant Biol. 2 (2000) 403.

¹⁸ M. Repcak, A. Eliasova, A. Ruscancinova, Pharmazie 53 (1998) 278.

¹⁹ W. Letchamo, J. Plant Physiol. 148 (1996) 645.

²⁰ A. Perez, J. S. Molli, D. A. Cardell, J. A. Retamar, Essenze, Deriv. Agrum. 64 (1994) 463.

²¹ B. Tosi, C. Romagnoli, E. M. Andreoli, A. Bruni, Int. J. Pharmacogn. 33 (1995) 144.

2ª PARTE - CONCLUSÕES

Apigenina, apigenina-7-O-glic, -7-O-(6"-acetil- β -O-glic), -7-O-(2"-acetil- β -O-glic)	HPLC (RP 18, gradiente)	22
Apigenina-7-O-glic e seus derivados mono e diacetilados	HPLC (RP C18, gradiente)	23
Ácidos cis- e trans-2- β -D-glicopiranosiloxi-4-metoxi cinâmico, cosmosina	HPLC (RP 18, gradiente)	24
Apigenina-7-O-glic e derivados acetilados	TLC (Sílica gel) and HPLC (RP 18, gradiente)	25
Apigenina-7-O- β -glic e outros glicosídeos acetilados	HPLC-MS (RP 18, gradiente)	26
Flavonóides	HPLC (RP 18, gradiente)	27
Herniarina e umbeliferona	HPLC	28
Apigenina e apigenina-7-O-glic	TLC (Sílica gel)	29
Apigenina, apigenina-7-O-glic, ácidos cafeico e ferúlico; umbeliferona, herniarina	HPTLC (Sílica gel)	30
Apigenina e herniarina	HPLC (RP 18, isocrático)	31
Apigenina- 7-O-glic, apigenina- 7-O-acetil glic, umbeliferona, e herniarina	HPLC (RP 18, isocrático)	32
Apigenina, apigenina-7-O-glic e herniarina	HPLC (RP18, gradiente)	33
Umbeliferona e herniarina	HPLC (RP 18)	34
Apigenina, apigenina-7-O-glic, apigenina-7-O-acetilglic	HPLC (RP 18)	35

Glic = glicosídeo

- ²² A. Perez, J. S. Molli, D. A. Cardell, *Essenze, Deriv. Agrum.* 64 (1994) 224.
- ²³ B. Pekic, Z. Zekovic, Z. Lepojevic, *Zb. Matice Srp. Prir. Nauke* 86 (1994) 37.
- ²⁴ H. Kanamori, M. Terauchi, J. Fuse, I. Sakamoto, *Shoyakugaku Zasshi* 47 (1993) 34.
- ²⁵ K. Tschiersch, J. Hoelzl, *Pharm. Ztg. Wiss.* 5 (1992) 208.
- ²⁶ R. Carle, B. Doelle, W. Mueller, U. Baumeister, *Pharmazie* 48 (1993) 304.
- ²⁷ R. M. Smith, M. D. Burford, *Chemom. Intell. Lab. Syst.* 18 (1993) 285.
- ²⁸ O. Ceska, S. K. Chaudhary, P. J. Warrington, M. J. A. Smith, *Fitoterapia* 63 (1992) 387.
- ²⁹ B. Pekić, Z. Lepojević, B. Slavica, *Arch. Farm.* 39 (1989) 163.
- ³⁰ E. Menziani, B. Tosi, A. Bonora, P. Reschiglian, G. Lodi, *J. Chromatogr. A* 511 (1990) 396.
- ³¹ P. G. Pietta, P. L. Mauri, E. Manera, P. L. Ceva, A. Rava, *Chromatographia* 27 (1989) 509.
- ³² P. G. Pietta, E. Manera, P. Ceva, *J. Chromatogr.* 404 (1987) 279-81.
- ³³ M. F. Briancon, J. Roter, *Parfums, Cosmet., Aromes* 54 (1983) 61.
- ³⁴ C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, *Planta Med.* 43 (1981) 412.
- ³⁵ C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, *Planta Med.* 42 (1981) 288.

A **Tabela 52**, mostra que cerca de 70% dos trabalhos descritos foram realizados em HPLC com colunas ODS e modo gradiente. Além da HPLC, as outras técnicas cromatográficas usadas foram a cromatografia em camada delgada (TLC) e a cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC), ambas com suporte de sílica gel.

Apesar do grande número de publicações lidando com a análise destas amostras, pouco trabalho tem sido feito no sentido de padronizar uma técnica para o controle de qualidade da fração fenólica dos extratos de camomila.

O presente trabalho veio complementar este quadro, introduzindo o uso de quatro técnicas analíticas capilares - FSCE, MEKC, μ HPLC e CEC - na análise da fração fenólica de extratos de camomila.

A **Figura 92** mostra os cromatogramas, eletroferogramas e eletrocromatogramas otimizados, obtidos com as quatro técnicas mencionadas, além da HPLC, introduzida como técnica de referência.

Todas as metodologias apresentadas possibilitaram a análise simultânea de flavonóides, cumarinas e fenilpropanóides, apresentando porém prós e contras, que devem ser levados em consideração, dependendo da finalidade da análise.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi propor uma metodologia útil no controle de qualidade de extratos de camomila, as técnicas estudadas serão avaliadas levando em consideração:

- o tempo total de análise (o qual foi dividido em tempo de corrida e tempo de condicionamento);
- as características da coluna (fragilidade, tempo de vida útil e preço);
- gasto de solvente;
- instrumentação;
- a necessidade do preparo de amostras;
- o limite de detecção apresentado pelo método;
- o custo total da análise.

Antes que as comparações sejam feitas, é necessário esclarecer que a resolução completa para todos os solutos ($R_s=1,5$), não foi alcançada em nenhuma das técnicas. Entretanto, por motivos que ficarão claros no capítulo seguinte, será

levado em consideração a resolução total apenas para a apigenina (5) e dos compostos adjacentes a ela.

Com relação ao tempo de corrida, a técnica que apresentou o menor tempo na separação das 11 substâncias foi a CEC (SCX/C18), separando estas substâncias em 8,5 minutos com condição isocrática. Em contrapartida, a técnica mais lenta foi a HPLC convencional, onde foram gastos cerca de 45 minutos. Entretanto, se levarmos em consideração que em CEC, o condicionamento das colunas leva cerca de 50 minutos, teremos um tempo total de análise de quase 1 hora, contra os 57 minutos total gastos na HPLC, uma vez que esta foi feita no modo gradiente.

Dentre as técnicas estudadas, aquelas que apresentaram os melhores resultados para tempo total de análise foram a FSCE, a MEKC e a μ HPLC.

Do ponto de vista das características das colunas, os capilares abertos usados na FSCE e na MEKC foram, sem dúvida, os mais baratos e os que apresentaram maior vida útil. O único problema com estes capilares foi a fragilidade conferida pela retirada da cobertura da camada de polimida na janela de detecção.

Apesar do alto valor das colunas de HPLC, estas se mostraram bastante robustas, uma vez que se faça o pré-tratamento dos extratos. Já as colunas para CEC e μ HPLC foram dentre todas, as mais frágeis, caras e com menor tempo útil de vida.

Figura 92: Cromatogramas, eletroferogramas e eletrocromatogramas otimizados, mostrando a separação das substâncias fenólicas nas 5 técnicas estudadas. Numeração conforme descrito na **Figura 3**. Condições de análise: vide **Figuras 14, 26, 53, 65B, 83** para as letras A, B, C, D e E respectivamente. 3* e 4* são isômeros *cis* dos ácidos caféico e clorogênico

O consumo de solvente foi significativamente alto apenas na HPLC. Na μ HPLC, este foi relativamente alto se comparado com as demais técnicas capilares, uma vez que o equipamento usado era um cromatógrafo convencional, adaptado para o uso de colunas capilares.

Com exceção do equipamento para CEC, todos os demais estavam bem adaptados para as necessidades apresentadas pela técnica. O principal motivo do longo tempo de condicionamento das colunas em CEC foi a impossibilidade do equipamento usado (o qual é um dos mais modernos disponíveis) em aplicar valores de pressão suficientemente altos para a lavagem da coluna capilar empacotada, em um curto espaço de tempo. Caso estes equipamentos permitissem a aplicação de valores de pressão da ordem de 100bar, o condicionamento da coluna seria muito mais rápido e consequentemente o tempo total de análise muito menor.

A necessidade da pré-purificação foi outro ponto importante considerado. De uma maneira geral, não é recomendado a análise de matrizes vegetais em colunas a base de ODS, sem que estas estejam previamente livres de interferentes os quais podem danificar permanentemente a coluna. Uma das maiores vantagens da MEKC e da FSCE foi dispensar este passo, diminuindo consideravelmente o tempo gasto na obtenção do resultado final.

Um dos maiores inconvenientes observados para as técnicas capilares foi a baixa sensibilidade do detector de UV, devido ao pequeno caminho óptico conferido pelo diâmetro interno dos capilares usados. O uso de colunas com janela de detecção do tipo “bolha” ou em “Z” minimiza consideravelmente este problema, aumentando por outro lado tanto a fragilidade quanto o preço das colunas.

Das 5 técnicas testadas, aquelas com menor custo total de análise foram a FSCE e a MEKC. Uma vez que o preço do equipamento usado gira em torno do mesmo valor que um cromatógrafo líquido, o custo da análise foi definido pelo baixo gasto com a compra de solventes e baixo custo das colunas capilares. Na CEC porém, o custo foi relacionado mais ao preço da coluna, a qual além de extremamente frágil, apresentou tempo de vida útil bastante limitado.

A **Tabela 53** sumariza os aspectos discutidos acima.

	HPLC	μ HPLC	CEC	FSCE	MEKC
Tempo de análise:	Lento	Rápido	Lento	Rápido	Rápido
-corrida	Lento	Rápido	Rápido	Rápido	Rápido
-condicionamento	Relativamente rápido	Rápido	Lento	Rápido	Rápido
Colunas:					
-custo	Alto	Alto	Alto	Baixo	Baixo
-fragilidade	Baixa	Alta	Alta	Alta	Alta
-tempo de vida útil	Alto	Baixo	Baixo	Alto	Alto
Limpeza da amostra	Necessário	Necessário	Necessário	Desnecessário	Desnecessário
Gasto com solvente	Alto	Relativamente baixo	Baixo	Baixo	Baixo
Sensibilidade do detector de UV	Alta	Baixa	Baixa	Baixa	Baixa
Instrumentação	Boa	Boa	Em desenvolvimento	Boa	Boa
Custo total da análise	Alto	Alto	Alto	Baixo	Baixo

Tabela 53: Tabela comparativa, resumindo os parâmetros usados para a comparação das cinco técnicas estudadas.

Com base nos dados descritos acima, optou-se por escolher a metodologia FSCE para ser usada nos experimentos de quantificação, que serão tratados na 3ª Parte desta tese. Esta escolha foi feita levando em consideração os seguintes fatores:

- A boa resolução obtida no eletroferograma mostrado na **Figura 92A**, principalmente no que se refere aos picos adjacentes à apigenina;
- A boa reprodutibilidade dos valores de área e tempo de retenção para o pico da apigenina na condição otimizada (descrita no Capítulo 1 da 2ª Parte);
- O baixo custo das análises;
- A possibilidade de injeção direta dos extratos, sem a necessidade de limpeza prévia, o que acaba facilitando os experimentos quantitativos;
- O curto tempo total de análise: cerca de 20 minutos, contando com o condicionamento entre-corridas.

Desta forma, uma vez que foi escolhida uma metodologia dentre as estudadas, partiu-se então para os estudos quantitativos, os quais estão descritos na 3ª Parte deste trabalho.

3ª PARTE

***Proposta Metodológica para o
Controle de Qualidade de
Extratos de Matricaria recutita L.
Baseada na Determinação de seus
Teores de Apigenina Livre e Total***

1- Introdução

1.1. A Apigenina e sua Ocorrência em Flores de *Matricaria recutita* L.

Dentre as substâncias fenólicas presentes na camomila, uma das que vem recebendo maior atenção é a apigenina (5, 7, 4'-triidroxiflavona), uma flavona de distribuição ampla no reino vegetal, ocorrendo inclusive em frutas e verduras¹.

A apigenina apresenta diferentes tipos de atividade farmacológica e quando comparada a outros flavonóides, tais como a quercetina, luteolina e rutina, é considerada relativamente atóxica e não mutagênica^{1,2}.

Ela é capaz de inibir o câncer de pele, induzido tanto por luz UV quanto por substâncias químicas³; possui também ação inibitória das ciclogeneses 1 e 2, o que lhe confere ação anti-inflamatória comparável ao ibuprofeno, naproxeno e ácido acetil-salicílico⁴. Sua capacidade de capturar radicais livres lhe confere potente atividade anti-oxidante^{4,5} e, recentemente Lee e Pezzuto⁶ demonstraram sua ação sedativa.

O conjunto destas atividades pode explicar o fato da apigenina vir a ser a principal substância enfocada nas análises da fração fenólica de extratos de *M. recutita*^{7,8}.

As substâncias flavonoídicas, assim como todos os metabólitos secundários, podem estar presentes nos extratos vegetais tanto como uma aglicona, quanto sob a forma de glicosídeos. A glicosilação é um artifício da natureza para aumentar a

¹ J. P. Brown, P. S. Dietrich, Mutat. Res. 66 (1979) 223.

² H. Czeczot, B. Tudek, J. Kusztelak, T. Szymczyk, B. Dobrowolska, G. Glinkowska, J. Malinowski, H. Strzelecka, Mutat. Res. 240 (1990) 209.

³ D. F. Birt, D. Mitchell, B. Gold, P. Pour, H. Pinch, Anticancer Res. 17 (1997) 85. H. Wei, L. Tye, E. Bresnick, D. F. Birt, Cancer Res. 50 (1990) 499. D. M. Lepley, J. C. Pelling, Mol. Carcinogen. 19 (1997), 74. J. K. Lin, Y. C. Chen, Y. T. Huang, S. Y. L. Shiau, J. Cel. Biochem. 28-29 (1997) 39. A. Saija, A. Tomaino, D. Trombetta, M. Giacchi, A. De Pasquale, F. Bonina, Int. J. Pharm. 175 (1998) 85.

⁴ J. Fuchs, R. Milbradt, Arzneimittelforsch. 43 (1993) 370. H. K. Kim, B. S. Cheon, Y. H. Kim, S. Y. Kim, H. P. Kim, Biochem. Pharmacol. Res. 58 (1999) 759. I. Merfort, J. Heilmann, U. Hagedornleweke, B. C. Lippold, Pharmazie 49 (1994) 509. M. A. Kelm, M. G. Nair, G. M. Strasburg, D. L. Dewett, Phytomedicine 7(2000) 7.

⁵ J. V. Formica, W. Regelson, Food Chem. Toxic. 33 (1995) 1061.

⁶ S. K. Lee, J. M. Pezzuto, Arch. Pharmacol. Res. 22 (1999) 559.

⁷ J. Y. Vernin, I. Katz, B. Rochette, in M. C. Martini, M. Seiller (Eds.), Actifs & Additifs en Cosmétologie, Technique & Documentation, Lavousseier, Paris, 1992, p. 34.

⁸ Extratos de *M. recutita* comercializados pela Indena (Itália). M. F. Briançon, J. Rotger, Parf. Cosmet. Arom. 45 (1983) 61.

solubilidade de moléculas hidrofóbicas, para que assim possam ser transportadas do sítio de síntese ao local de acúmulo.

Muitas vezes durante o processo extrativo, estes glicosídeos podem ser quebrados, liberando a aglicona. Como porém este processo nem sempre é total, os extratos apresentam então agliconas e glicosídeos misturados. Uma vez que ambas as formas são farmacologicamente ativas, a determinação apenas da aglicona seria subestimar a potência medicamentosa do extrato em questão.

Além disso, como esta glicosilação pode ocorrer em vários sítios na molécula e como o tipo e o número de unidades de açúcares ainda podem variar, é bastante trabalhoso determinar todas as possíveis formas glicosiladas de uma molécula e conseguir padrões analíticos, tanto para análises quantitativas quanto qualitativas.

Uma maneira simples de resolver esta questão é submeter os extratos a um processo hidrolítico visando a quebra da ligação glicosídica, liberando a aglicona.

O tema da ocorrência da apigenina livre em flores de camomila ainda gera controvérsias no meio acadêmico⁹. Todavia, a abundância dos glicosídeos (de 3 a 9% do peso seco) parece ser consideravelmente maior que a da aglicona (0 a 0,5%)¹⁰. Recentemente, Mulinacci e colaboradores¹¹ fizeram uma revisão das formas glicosiladas da apigenina até então descritas em extratos de *M. recutita*, as quais são mostradas na **Figura 93**.

A hidrólise de glicosídeos flavonoídicos é uma prática corriqueira e simples, muito usada em estudos de elucidação estrutural. O processo hidrolítico pode ser de três tipos: ácido, enzimático e alcalino^{12,13}. Dos três o mais utilizado para a hidrólise dos glicosídeos da apigenina é a hidrólise ácida, entretanto, esta deve ser branda para não degradar outras substâncias de interesse, tais como a herniarina⁷.

⁹ Ver o 4º parágrafo no item "Colheita" da 1ª Parte

¹⁰ Z. Zekovic, B. Pekic, Z. Lepojevic, L. Petrovic, Chromatographia 39 (1994) 587. C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, Phytochemistry 19 (1980) 985. C. Redaelli, L. Formentini, E. Santaniello, Planta Med. 42 (1981) 288. B. Pekic, Z. Lepojevic, B. Slavica, Arch. Pharm. (Belgrade) 39 (1989) 163.

¹¹ Mulinacci N., Romani A., Pinelli P., Vincieri F. F. and Prucher D. Chromatographia 51 (2000) 301.

¹² K. R. Markham, Techniques of Flavonoids Identification, Academic Press, New York, 1982 p. 52.

¹³ T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas (ed), The Systematic Identification of Flavonoids, Springer Verlag, New York, 1979, Cap. 3.

(5) Apigenina	R = OH
(6) Apigenina-7-O-β-glicosídeo	R = O-glu
(12) Apigenina-7-O-apiosil-glicosídeo	R = O-glu-apio
(13) Apigenina-7-O-6"-acetato	R = O-glu-6"ac
(14) Apigenina-7-O-2"-acetato	R = O-glu-2"ac
(15) Apigenina-7-O-2",3"-diacetato	R = O-glu-2", 3"-diac

Figura 93: Apigenina e seus glicosídeos isolados de *Matricaria recutita* L¹¹. A numeração destas substâncias continua a partir da numeração adotada na **Figura 3**.

1.2. Quantificação da Apigenina por Eletroforese Capilar

Os elementos mais importantes no desenvolvimento de uma boa metodologia de quantificação são a precisão e a exatidão do método. Os termos, “*precisão*” e “*exatidão*” na linguagem analítica são as medidas dos erros indeterminados e sistemáticos, respectivamente. Na eletroforese capilar os erros indeterminados são oriundos da imprecisão dos sistemas de injeção, da regulação da temperatura e ainda do ruído do detector. Já os erros sistemáticos são conseqüências de problemas nos sistemas de calibração e ou integração¹⁴. Além disso, para que a CE possa ser uma técnica quantitativa útil, é necessário que se obtenha a repetição do

¹⁴ P. D. Grossman, J. C. Colburn, Capillary Electrophoresis - Theory and Practice, Academic Press INC, San Diego, 1992, p. 87.

tempo de migração ou da mobilidade eletroforética do analito desejado¹⁵. A repetibilidade do tempo de migração pode ser determinada através da medida do desvio padrão (σ), de dez ou mais corridas consecutivas do analito, onde o valor do tempo de migração deve cair dentro de um intervalo de $\pm 3\sigma$ ¹⁵. Na CE, o principal fator que afeta a variação do tempo de migração é o fluxo eletroosmótico (EOF) e este, por sua vez, é influenciado por uma série de fatores. Mudanças no pH de 4,5 a 6,0 podem afetar o EOF drasticamente, dessa forma, o uso de tampões nesta faixa pode diminuir a precisão qualitativa. No geral, quanto maior a força iônica do tampão, maior é a sua capacidade tamponante. Além disso, a carga efetiva da parede do capilar diminui com o aumento da força iônica, diminuindo conseqüentemente o fluxo eletroosmótico¹⁶. O uso de um tampão com concentração iônica moderadamente alta (30mM) influencia positivamente na repetibilidade do tempo de migração. Todavia, o uso de concentrações muito altas tais como 150mM, ou mais, apresentam o inconveniente de provocar o alargamento e distorções dos picos, devido ao calor Joule dentro do capilar¹⁴.

Em análises quantitativas, o sistema eletroforético deve estar suficientemente equilibrado ou estabilizado, de modo a permitir análises repetíveis. Primeiramente, isso exige que a superfície interna do capilar, a concentração iônica do tampão e o pH estejam em equilíbrio a fim de se obter um EOF consistente. Quando a corrente elétrica fica constante é uma boa indicação de que este equilíbrio ocorreu^{14,17}.

A maneira pela qual a amostra é introduzida no capilar tem importante implicação nas metodologias quantitativas em CE, pois afeta diretamente a repetibilidade da área (altura), a qual, por sua vez afeta a precisão do método. De um modo geral, a injeção hidrodinâmica apresenta maior precisão do que a eletrodinâmica, ficando esta última relegada apenas aos casos em que se usa capilares recheados com géis, nos quais a injeção hidrodinâmica é impossível¹⁴.

Da mesma maneira que as técnicas cromatográficas, a informação quantitativa de um eletroferograma é dada através da área ou da altura de um pico.

¹⁵ L. R. Snyder, J. J. Kirkland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, 2nd ed. John Wiley & Sons, New York, 1997, p. 127.

¹⁶ K. D. Altria, C. F. Simpson, Anal. Proc. 23 (1986) 453.

¹⁷ D. R. Baker, Capillary Electrophoresis, John Wiley & Sons Inc., 1995.

Uma das formas mais simples de medir a resposta do detetor é através da determinação da altura do pico. Entretanto, é a área do pico a grandeza mais usada como resposta do detetor, para experimentos de quantificação. A área de um pico bem resolvido é definida como a integral da resposta do detector, de um dado tempo no começo até o final do pico, sendo que em vários detectores tais como UV, a área do pico é diretamente proporcional à concentração da amostra¹⁵.

A altura ou a área do pico promove a resposta em termos de sinal do detetor e esta resposta deve estar relacionada com a concentração ou a massa do composto de interesse. Para esta determinação é necessário o uso de algum tipo de calibração, tal como o uso de padrão interno, externo ou método de adição de padrão¹⁵.

Uma necessidade crítica em metodologias para quantificação é a habilidade do método em medir uma grande faixa de concentração da amostra, com uma resposta linear para o analito em questão. Os detectores de UV tem sido os mais usados para análises exatas e precisas em HPLC e em CE¹⁵.

Para o desenvolvimento de uma boa metodologia de quantificação é necessário conhecer algumas propriedades do detetor para o dado tipo de soluto a ser quantificado, tais como o limite de detecção (LOD) e o limite de quantificação (LOQ).

O LOD é a menor quantidade de analito detectável nas condições de análise estabelecida. Ele está relacionado ao sinal e ao ruído do sistema e geralmente é definido como o pico em que a relação sinal/ruído (S/N) seja pelo menos 3:1.

O LOQ é a menor concentração de analito quantificável, com exatidão e precisão nas condições de análise estabelecida¹⁸. Ele é similar ao LOD, requerendo, entretanto, S/N de 10:1. Paino e Moore¹⁷ verificaram a performance dos vários métodos de determinação de LOD e LOQ em detectores de UV e não encontraram nenhuma diferença significativa dentre eles, concluindo que tais métodos são essencialmente equivalentes.

O método mais comum para a determinação da concentração de um analito é através da construção de uma curva de calibração usando padrão externo. Neste

¹⁸ T. C. Paino, A. D. Moore, Pharm. Tech. 23 (1999) 86.

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

caso soluções padrão com concentrações conhecidas são preparadas. Um volume fixo de cada padrão é injetado e analisado e a resposta do pico é correlacionada com a concentração em um gráfico, a fim de obter uma reta. Neste caso as concentrações dos padrões devem ser similares à concentração esperada na amostra. Este tipo de calibração é conhecido como método de padrão externo. Amostras com concentração desconhecida são então preparadas, injetadas e analisadas da mesma maneira e a concentração é determinada graficamente, a partir da reta obtida ou numericamente, através de fatores de respostas¹⁴.

Para uma boa quantificação usando padrão externo, as condições de separação devem permanecer constantes durante a separação de todos os padrões e amostras (mesmas condições eletroforéticas, volume de injeção, etc.)¹⁴.

O objetivo deste 1º Capítulo da 3ª Parte foi determinar a concentração de apigenina livre e apigenina total em extratos metanólico, glicólico e etanólico de *Matricaria recutita* L., usando a condição otimizada em FSCE, descrita no 1º Capítulo da 2ª Parte. Para isso, os três extratos em questão foram submetidos à hidrólise ácida e os teores de apigenina quantificados pelo método de padrão externo.

2- Parte Experimental

Materiais, Reagentes e Instrumentos Utilizados

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para os experimentos de hidrólise foram usados solventes e reagentes de grau P.A. da Merck e/ou Carlo Erba. O pH dos eletrólitos com tetraborato de sódio (Riedel de Haen) foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 1M (Carlo Erba). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema de membrana filtrante Milli-Q com membrana de 0,45µm. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente e filtrados com membrana filtrante 0,45µm (Millipore), antes do uso.

Todos os experimentos em FSCE foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies), equipado com detector do tipo arranjo de diodos, fixado em 337nm, controle de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

Eletrólito de Corrida e Condições de Análise

O eletrólito de corrida usado nos experimentos de quantificação foi o tetraborato de sódio 20mM, pH 10. O sistema foi operado a +25kV e a temperatura mantida a 25°C. Foi usado um capilar de sílica fundida com 63cm de comprimento total e 54,5cm de comprimento efetivo, com 75µm e 325µm de diâmetros interno e externo, respectivamente. As amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente com 3,0s/50mbar.

Padrões

A apigenina (**Figura 93**) foi adquirida da Sigma e a apigenina-7-O-glucosídeo da Extrasynthèse. As soluções estoque das duas substâncias descritas acima, foram preparadas semanalmente na concentração de 1mg/mL usando MeOH/DMSO 1:9. Maiores detalhes sobre diluições estão descritos nas legendas de cada eletroferograma.

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

Hidrólise

Para a quantificação de apigenina total presente em extratos de camomila, optou-se por utilizar a hidrólise ácida, adaptando a metodologia descrita por Martini e Seiller⁷ da seguinte maneira:

Para a hidrólise dos extratos metanólico, foi utilizado 5mL da solução estoque descrita na 1ª Parte. Já para os extratos glicólico e etanólico foram utilizados 5mL de uma solução 2,5g/10mL e 5,0g/10mL respectivamente. Cerca de 1mL de ácido clorídrico concentrado foi adicionado aos 5mL de solução referidos acima. Tal mistura foi mantida a 100⁰C sob agitação constante, em refluxo, durante 1 hora.

Uma vez resfriada a temperatura ambiente, a fração flavonoídica foi extraída com cinco porções de 6mL de éter etílico. As frações foram reagrupadas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas à secura. O resíduo obtido foi solubilizado em 1mL de MeOH e transferido para um balão volumétrico de 5 mL, o qual foi completado com MeOH/H₂O 1:1. Cerca 1,5mL das soluções oriundas dos extratos metanólico e etanólico e 1,0mL da solução do extrato glicólico foram pipetados e diluídos para 5 mL, filtrados, sonicados e injetados.

Para o monitoramento da repetibilidade do processo hidrolítico, a hidrólise no extrato metanólico foi feita em triplicata.

Em todos os casos, tanto nos experimentos qualitativos quanto nos quantitativos, os extratos glicólico e etanólico foram utilizados conforme enviados pela indústria.

Avaliação da Faixa de Concentração e Determinação da Linearidade e da Curva de Calibração

A partir de uma solução estoque de apigenina 1000µg/mL, alíquotas apropriadas foram transferidas separadamente para balões volumétricos de 5mL e o volume completado com metanol. As soluções foram filtradas em membrana filtrante de 0,45µm e sonicadas durante 10 min.

A linearidade foi observada dentro da faixa de análise testada, a qual foi de 5µg/mL a 300µg/mL. Todas as soluções foram analisadas em triplicata.

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

A curva de calibração foi obtida através da correlação dos valores das áreas dos picos de soluções padrão das apigenina com as concentrações 5µg/mL a 75µg/mL, os quais se mostraram linear dentro da faixa de concentração avaliada.

Cálculo dos Limite de Detecção (LOD) e Quantificação (LOQ)

O critério usado para a determinação do LOD e LOQ foi baseado no desvio padrão (SD) da resposta e na inclinação da curva de calibração (S) de acordo com as expressões $LOD = 3,3(SD/S)$ e $LOQ = 10(SD/S)$. O desvio padrão da resposta foi calculado a partir do desvio padrão da intercepção da curva de regressão.¹⁸

Determinação de Apigenina Livre

Nos experimentos de quantificação de apigenina livre, 5,0g (5,24mL, d= 0,954g/mL) da solução estoque do extrato metanólico (obtida conforme descrito na Parte 1) foram pesados e diluídos em uma mistura de MeOH/H₂O 1:1. Depois de filtrada com membrana filtrante 0,45µm, esta solução foi usada diretamente nos experimentos em CE.

Cerca de 2,5g (2,49mL, d= 1,004mg/mL) do extrato glicólico e 5,0g (4,99mL, d= 1,002mg/mL) do extrato etanólico foram pesados e diluídos para 10mL em MeOH/H₂O 1:1. As soluções obtidas foram usadas para as análises depois de filtradas em membrana filtrante 0,45µm.

As amostras e o padrão de apigenina (50µg/mL) foram injetados em triplicata.

Determinação de Apigenina Total

O preparo das amostras para doseamento da apigenina total está descrito no ítem “Hidrólise”. As amostras de extratos analisados bem como o padrão de apigenina (50µg/mL) foram injetadas em triplicata.

¹⁸ M. L. Swartz, I. R. Krull, Pharm.Tech. 2 (1998) 12.

3- Resultados e Discussões

Hidrólise

Os eletroferogramas das amostras resultantes da hidrólise ácida dos extratos de camomila são mostradas nas **Figuras 94 a 98**.

A **Figura 94A** mostra o eletroferograma de um extrato metanólico antes da hidrólise, enquanto que a **94B** mostra o mesmo extrato hidrolisado. A hidrólise alterou consideravelmente o perfil eletroforético dos extratos metanólicos; enquanto o extrato bruto apresenta vários picos com intensidade relativamente alta, o extrato hidrolisado apresentou apenas 4 componentes principais: uma substância não identificada, a qual parece não ter sido afetada pelo tratamento ácido (ver espectro e tm do pico assinalado com #), a umbeliferona (2), a apigenina (5) e o ácido cafêico (3). A pureza destes picos foram checadas, e todos apresentaram índice superiores ou iguais a 99%.

Conforme esperado, houve um aumento significativo do pico da apigenina (5) e o desaparecimento do pico referente a apigenina-7-O-glicosídeo/luteolina-7-O-glucosídeo (6+8).

A hidrólise do extrato metanólico foi feita em triplicata para que fosse possível avaliar a repetibilidade do processo. A **Tabela 54** mostra os valores de área dos picos da apigenina, obtidas em cada replicata, a qual foi usada para monitorar o processo.

Tabela 54: Tabela relacionando a média dos valores de área do pico da apigenina, obtidos dos eletroferogramas das replicatas do processo hidrolítico do extrato metanólico. O processo foi conduzido em triplicata, e cada amostra foi injetada três vezes. Eletrólito de corrida: tampão tetraborato de sódio 20mM, pH 10. Outras condições: +25kV, injeção hidrodinâmica 3,0s (50mbar), 337nm.

Replicatas do extrato	Área do pico
I	61,7 ^a
II	61,5 ^a
III	61,7 ^a
^b SD = 1,2 CV = 2,1%	

^a área média obtida em três injeções consecutivas;

^b n = 9.

Figura 94: Eletroferograma do extrato metanólico A) antes da hidrólise, B) hidrolisado. Eletrólito de corrida: tampão tetraborato 20mM pH 10. Outras condições: +25kV, injeção hidrodinâmica 3,0s (50mbar), 337nm. Numeração de acordo com a **Figura 3**. # corresponde a substância não identificada.

De acordo com a Tabela 55 foi possível observar que a hidrólise ácida descrita é reprodutível apresentando 2,3% de coeficiente de variação, o que foi bastante satisfatório.

As **Figuras 95A e B** mostram os eletroferogramas de um extrato glicólico antes e depois da hidrólise respectivamente. Assim como no extrato metanólico, a intensidade do pico da apigenina e, neste caso da luteolina (7) também, aumentaram consideravelmente às custas do pico de seus glicosídeos (6+8).

Novamente foi possível observar a ocorrência da mesma substância assinalada com # , à qual outra vez parece não ser afetada pela hidrólise. No eletroferograma **B** ainda é possível observar o aparecimento de outros 2 picos com intensidade relativamente alta, assinalados com asteriscos (*), os quais foram atribuídos aos conservantes presentes nos extratos comerciais.

Os extratos etanólico brutos e hidrolisados são mostrados nas **Figuras 96A e B**, respectivamente. Estes também apresentaram o pico dos conservantes assinalados com um asterisco (*), e a mesma substância #, presente então nos 3 extratos analisados.

Nos três extratos hidrolisados ficou claro o aumento da intensidade dos picos da apigenina (5) e da luteolina (7), bem como da umbeliferona (2) e do ácido cafêico (3).

Uma vez que o processo de hidrólise proposto mostrou-se reprodutivo e satisfatório (**Tabela 54**), fez-se a quantificação da apigenina livre e total nos três extratos estudados.

Figura 95: Eletroferograma do extrato glicólico A) antes da hidrólise, B) hidrolisado. Eletrólito de corrida: tampão tetraborato 20mM pH 10. Outras condições: +25kV, injeção hidrodinâmica 3,0s (50mbar), 337nm. Numeração de acordo com a **Figura 3**. # corresponde a substância não identificada.

Figura 96: Eletroferograma do extrato etanólico A) antes da hidrólise, B) hidrolisado. Eletrólito de corrida: tampão tetraborato 20mM pH 10. Outras condições: +25kV, injeção hidrodinâmica 3,0s (50mbar), 337nm. Numeração de acordo com a **Figura 3**. # corresponde a substância não identificada.

Curva de calibração, LOD e LOQ

A curva de calibração (**Figura 96** e **Tabelas 55** e **56**) foi construída a partir das concentrações de apigenina na faixa de 5,0 a 75,0 µg/mL, e suas áreas do pico correspondentes.

A equação da curva foi $\text{área} = 1,0078 \times \text{concentração} + 1,048$, com coeficiente de correlação de 0,9998, indicando boa linearidade entre o sinal do detector (área do pico) e a concentração do analito. O limite de detecção e quantificação foram de 3,8 µg/mL e 11,5 µg/mL, respectivamente. Boyong e colaboradores¹⁹, ao validar uma metodologia em HPLC para a análise de apigenina em tecidos epiteliais de camundongos, obtiveram LOD de 43 ng/mL para a apigenina.

Tabela 55: Dados relacionando os valores de área do pico da apigenina nas concentrações analisadas, para o cálculo da curva de calibração. Eletrólito de corrida: tetraborato de sódio 20 mM, pH 10. Outras condições: +25 kV, injeção hidrodinâmica 3,0 s (50 mbar), 337 nm.

Corrida	Concentração de apigenina				
	5 µg/mL	10 µg/mL	25 µg/mL	50 µg/mL	75 µg/mL
corrida 1	4,25	12,32	26,29	52,25	77,00
corrida 2	4,96	12,05	26,48	52,80	77,38
corrida 3	4,87	12,52	26,21	51,29	73,90
média ^a	4,70	12,30	26,33	52,11	76,09
SD	0,39	0,23	0,13	0,77	1,91
CV%	8,28	1,90	0,51	1,47	2,51

^a n = 3

¹⁹ L. Boyong, D. H. Robison, D. F. Birt, J. Pharm. Sci. 86 (1997) 721.

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

Figura 97: Curva de calibração para apigenina. Condições de análise, conforme descrito na **Tabela 55**.

Tabela 56: Dados de linearidade, limites de detecção e quantificação para apigenina. Condições de análises conforme descrito na **Tabela 55**.

Parâmetros	Dados estatísticos
Faixa de concentração analisada (µg/mL)	5,0 - 300,00
Faixa de concentração linear (µg/mL)	5,0 - 75,00
Intercepção	1,0468
Inclinação	1,0078
Coeficiente de correlação, r^2	0,9988
Desvio padrão da intercepção	1,16
Limite de detecção (µg/mL)	3,8
Limite de quantificação (µg/mL)	11,5

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

Quantificação da Apigenina Livre e Total nos Extratos de Camomila

Os teores de apigenina livre e total nos extratos de camomila foram quantificados utilizando a curva de calibração mostrada anteriormente. As **Tabelas 57 e 58** mostram os resultados para apigenina livre e total, respectivamente, para os três extratos analisados, onde também pode ser observado os limites de confiança para cada extrato analisado. Devido aos diversos passos de diluições, os quais o extrato metanólico foi submetido, são mostrados dois quadros (**Figuras 98 e 99**), contendo exemplos do cálculo para a determinação da apigenina.

Tabela 57: Concentração de apigenina livre em extratos metanólico, glicólico e etanólico de camomila. Condições de análise: vide **Figura 94**.

Amostra	Área	Concentração da amostra injetada (µg/mL)	Concentração em 1g de flores secas (µg/g)
Ex MeOH	13,5044	12,36	106,17
	13,4824	12,34	105,98
	13,5268	12,38	106,36
média	13.50	12,36	106,17
SD	0.02	0,02	0,19

Amostra	Área	Concentração da amostra injetada (µg/mL)	Concentração em 1g do extrato bruto (µg/g)
Ex Glicólico	19.6276	18,44	74,04
	19.3631	18,17	72,99
	22.2704	21,06	84,57
média	20.42	19,22	77,20
SD	1.61	1,60	6,41
Ex hidroalcoólico	6.3427	5,25	10,51
	6.8431	5,75	11,50
	6.5343	5,45	10,89
média	6.57	5,48	10,97
SD	0.25	0.25	0,50

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

Tabela 58: Concentração de apigenina total nas três replicatas do extrato metanólico e nos extratos glicólico e etanólico de camomila. Condições de análise: vide **Figura 92**.

Amostra	Área	Concentração da amostra injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração em 1g de flores secas ($\mu\text{g/mL}$)
Ex MeOH I	63.7279	62,20	932,94
	62.0627	60,54	908,15
	59.5198	58,02	870,31
média	61.77	60,25	903,80
SD	2.12	2,10	31,54
Ex MeOH II	59.6621	58,16	872,42
	63.2953	61,77	926,50
	61.6994	60,18	902,75
média	61.55	60,04	900,56
SD	1.82	1,81	27,10
Ex MeOH III	60.9924	59,48	892,22
	60.505	59,00	884,97
	63.6143	62,08	931,25
média	61.70	60,19	902,81
SD	1.67	1,66	24,89

Amostra	Área	Concentração da amostra injetada ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração em 1g do extrato bruto ($\mu\text{g/g}$)
Ex Glicólico	42.1875	40,82	816,45
	42.6471	41,28	825,57
	41.8287	40,47	809,33
média	42.22	40,86	817,11
SD	0.41	0,41	8,14
Ex Etanólico	41.2848	39,93	266,18
	36.6465	35,32	235,49
	37.1433	35,82	238,78
média	38.36	37,02	246,82
SD	2.55	2,53	16,85

3ª PARTE - CAPÍTULO 1 - Determinação da Concentração de Apigenina

Figura 98: Exemplo do cálculo da concentração de apigenina livre para o extrato metanólico. Para melhor visualização da sequência de diluição, vide item referente a obtenção do extrato na 1ª Parte.

Figura 99: Exemplo do cálculo da concentração de apigenina livre para o extrato metanólico. Para melhor visualização da sequência de diluição, vide item referente à obtenção do extrato na 1ª Parte e a Parte experimental deste capítulo.

Nos três extratos testados, como já era esperado, a concentração de apigenina total foi maior que a concentração de apigenina livre. A concentração de apigenina nos extratos metanólicos foi expressa em termos de μg de apigenina por g de flores secas, enquanto que nos extratos glicólico e etanólico μg de apigenina por g de extrato bruto, uma vez que não foi fornecido a quantidade exata de flores usadas no preparo destes extratos.

A concentração de apigenina livre e total no extrato metanólico foi de $106,17\mu\text{g/g}$ e $902\mu\text{g/g}$ de flores secas, respectivamente. Os resultados obtidos estão relativamente próximos àqueles obtidos por Tubaro e colaboradores²⁰: 0,4% de apigenina total; entretanto, Zekovic⁷ e colaboradores relataram que este valor deveria girar em torno de 0 a 0,5% para apigenina livre e 7 a 9% para apigenina total. O baixo índice de apigenina encontrada nestes extratos pode ser atribuído tanto a falhas no processo de beneficiamento (colheita e secagem), como também ao fato de que estes valores foram obtidos para plantas cultivadas em condições climáticas distintas.

4-Conclusões

A metodologia proposta mostrou-se bastante versátil, possibilitando a quantificação de apigenina nos 3 extratos analisados. Além de versatilidade, a técnica apresentou ainda vantagens no que diz respeito à praticidade no preparo da amostra (não são necessários longos protocolos de pré-purificação) e condicionamento da coluna, favorecendo todo o processo de quantificação e levando a análises rápidas e relativamente baratas em equipamentos de simples operação.

²⁰ A. Tubaro, C. Zilli, C. Redaelli, R. Della Loggia, *Planta Med.* 51 (1984) 359.

1- Introdução

Os testes para determinação dos níveis da qualidade de produtos farmacêuticos estão sujeitos a vários requerimentos.

Estes requerimentos podem ser encontrados nas Farmacopéia e/ou Formulários Nacionais reconhecidos pelo Governo de um País, apresentando monografias oficiais que descrevem as especificações e os ensaios que um medicamento deve apresentar, para que sua qualidade seja garantida.

O Brasil possui sua própria Farmacopéia¹, todavia a Secretaria de Vigilância Sanitária também aceita as monografias das Farmacopéias Internacionais descritas na PORTARIA N.116 - DE 22 DE NOVEMBRO DE 1995². Dentre estas Farmacopéias podemos citar a "*United States Pharmacopoeia (USP)*"³, a "*British Pharmacopoeia*"⁴ e a "*European Pharmacopoeia*"⁵.

As regras atuais de "Boas Práticas de Manufatura" de medicamentos³ preconiza que os métodos usados no controle da qualidade destes produtos devam apresentar especificações padronizadas, as quais estão descritas nos Compêndios oficiais que são as Farmacopéias.

Ao submeter uma nova metodologia analítica para um compêndio, como as Farmacopéias Brasileira e dos Estados Unidos, esta deve conter informações suficientes para que os membros do comitê de revisão possam avaliá-la. Tais dados podem ser obtidos submetendo a metodologia analítica em questão a um processo de validação.

A validação de uma metodologia analítica é o processo pelo que se estabelece, através de estudos laboratoriais, que as características de desempenho do método proposto está de acordo com os requerimentos analíticos necessários para a confiança no resultado obtido³.

¹ Farmacopéia Brasileira 1 (1927) a 3 (1971), Organização Andrei Editora S.A, São Paulo.

² PORTARIA N. 116 - DE 22 DE NOVEMBRO DE 1995. D. O. (1995) 224, 23.11.1995, 18.841.

³ United States Pharmacopoeia 24, United States Pharmaceutical Convention Inc., Rockville, MD, 2000.

⁴ British Pharmacopoeia, Vols I – II, (1993). Pharmaceutical Press, London, UK.

⁵ European Pharmacopoeia, 2nd ed. Part I, (1980); Part II, 1st Fascicule (1980) to 15th (1991). Moissonneuve S A. Saint-Ruffine, France.

Segundo a *USP 24*³, as características típicas da performance analítica que devem ser avaliadas são:

- Exatidão;
- Precisão;
- Especificidade;
- Limite de detecção;
- Limite de quantificação;
- Linearidade;
- Intervalo de análise.

Como o Governo Brasileiro reconhece os extratos vegetais como medicamentos, optamos por validar a metodologia apresentada segundo o protocolo descrito pela *USP 24*³. Esta Farmacopéia preconiza que métodos analíticos para a quantificação de componentes majoritários ou o princípio ativo presentes em um conjunto de substâncias, sejam validados segundo sua exatidão, precisão, especificidade, linearidade e o intervalo de análise.

Uma vez que a definição destes parâmetros varia significativamente, de acordo com a entidade que os definiu, as definições dadas a seguir foram retiradas da *USP 24*³.

Linearidade

A linearidade de um método analítico é sua capacidade de fornecer resultados bem definidos através de transformações matemáticas, ou que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, numa dada faixa de análise.

A linearidade deve ser estabelecida dentro da faixa do procedimento analítico. É recomendado para o estabelecimento da linearidade, que um mínimo de 5 concentrações utilizadas sejam testados. Ela também recomenda que a faixa de concentração de 80% a 120% da concentração a ser quantificada também seja testada.

Precisão

A precisão de uma metodologia analítica é o grau de conformidade entre os resultados de testes individuais, quando a metodologia em questão é aplicada repetidamente em várias análises de uma mesma amostra. Geralmente a precisão de uma metodologia analítica é expressa como o desvio padrão ou o desvio padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medidas. Ela também pode ser medida como o grau de reprodutibilidade ou repetibilidade de uma metodologia analítica sob condições normais de operação. Neste contexto, a reprodutibilidade pode ser avaliada através de testes com a metodologia em questão, em laboratórios ou dias diferentes. A repetibilidade refere-se ao uso de um procedimento analítico dentro de um mesmo laboratório, dentro de um período de tempo pequeno, usando o mesmo analista e o mesmo equipamento. Para a maioria dos propósitos a repetibilidade é o critério de escolha da USP 24, embora a reprodutibilidade também possa ser considerada durante a padronização de metodologia antes desta ser submetida ao comitê farmacopêico.

A repetibilidade deve ser verificada usando um mínimo de nove determinações, cobrindo a faixa de concentração a ser usada no doseamento (três concentrações e três replicatas de cada concentração ou usando um mínimo de seis determinações com 100% da concentração a ser testada).

Especificidade

A especificidade é definida como a habilidade inequívoca da metodologia de verificar a concentração do analito em questão, mesmo na presença de outros componentes, sem que estes interfiram no resultado da análise. Quando procedimentos eletroforéticos são usados, os testes de pureza dos picos, obtidos com detectores do tipo arranjo de diodos ou espectrômetro de massas, podem ser úteis para mostrar que o pico do analito no eletroferograma possui somente um componente.

Exatidão

A exatidão de uma metodologia analítica pode ser definida como o valor mais próximo que um resultado de um teste pode chegar do valor verdadeiro contido na amostra. Nos casos de amostras complexas, onde não seja possível obter uma amostra com todos os componentes com concentração conhecida, a exatidão do método pode ser avaliada através de um teste de recuperação, ou ainda através da comparação do valor obtido com o valor fornecido por uma outra técnica oficial.

Neste caso, é recomendado que a exatidão seja calculada como a porcentagem de recuperação de uma quantia conhecida do analito na amostra, ou como a diferença entre a média e o valor verdadeiro, juntos com intervalos de confiança. É recomendado que se façam nove determinações num mínimo de três níveis de concentrações, as quais cubram a faixa de análise, ou seja, três concentrações com três replicatas de cada concentração.

Os itens referentes ao limite de detecção, quantificação, linearidade e intervalo de análise, necessários para a validação completa de um método, já foram discutidos anteriormente, no Capítulo 1 da 3ª Parte.

2- Parte Experimental

Materiais, Reagentes e Instrumentos Utilizados

O grau de pureza dos solventes variou de acordo com a finalidade. Para os experimentos de hidrólise foram usados solventes e reagentes de grau P.A. da Merck e/ou Carlo Erba. O pH dos eletrólitos com tetraborato de sódio (Riedel de Haen) foi ajustado com solução de hidróxido de sódio 1M (Carlo Erba). A água utilizada em todos os experimentos foi deionizada e filtrada em sistema de membrana filtrante Milli-Q com membrana de 0,45 μ m. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente e filtrados com membrana filtrante 0,45 μ m (Millipore), antes do uso.

Todos os experimentos em FSCE foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo HP^{3D}CE, Agilent Technologies) equipado com detector do tipo arranjo de diodos, fixado em 337nm, controle de temperatura e programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, rev A.06.01).

Eletrólito de Corrida e Condições de Análise

O eletrólito de corrida usado nos experimentos de validação foi o tetraborato de sódio 20mM, pH 10. O sistema foi operado a +25kV e a temperatura mantida a 25⁰C. Foi usado um capilar de sílica fundida com 63cm de comprimento total e 54,5cm de comprimento efetivo com 75 μ m e 325 μ m de diâmetros interno e externo respectivamente. As amostras e padrões foram injetados hidrodinamicamente com 3,0s/50mbar.

Padrões

A apigenina (**Figura 92**) foi adquirida da Sigma e a apigenina-7-O-glicosídeo da Extrasynthèse. As soluções estoques das duas substâncias descritas a cima, foram preparadas semanalmente na concentração de 1mg/mL, usando MeOH/DMSO 1:9. Maiores detalhes sobre diluições estão descritos nas legendas de cada eletroferograma.

Amostras

Para a hidrólise do extrato metanólico, foi utilizado 5mL da solução estoque descrita na 1ª Parte. Já para os extratos glicólico e etanólico foram utilizados 5mL de uma solução 2,5g/10mL e 5,0g/10mL respectivamente.

Cerca de 1mL de ácido clorídrico concentrado foi adicionado aos 5mL de solução referidos acima. Tal mistura foi mantida a 100°C sob agitação constante, em refluxo, durante 1 hora.

Uma vez resfriada à temperatura ambiente, a fração flavonoídica foi extraída com cinco porções de 6mL de éter etílico. As frações foram reagrupadas, secas com sulfato de sódio anidro, filtradas e evaporadas à secura. O resíduo obtido foi solubilizado em 1mL de MeOH e transferido para um balão volumétrico de 5 mL, o qual foi completado com MeOH/H₂O 1:1. Exatamente 1,5mL das soluções oriundas dos extratos metanólico e etanólico e 1,0mL da solução do extrato glicólico foram pipetados e diluídos para 5 mL, filtrados, sonicados e injetados.

Teste de Exatidão

A exatidão foi avaliada através de um teste de recuperação⁶. Amostras de extratos metanólico hidrolisado foram fortificadas com determinadas concentrações de apigenina: 25µg/mL, 50µg/mL e 75µg/mL (**Tabela 59**). A recuperação foi avaliada através da diferença entre a quantidade determinada nas três faixas analisadas e o “branco” (extrato sem adição de padrão).

⁶ L. R. Snyder, J. J. Kirkiland, J. L. Glajch, Practical HPLC Method Development, John Wiley & Sons Inc., 1997, p. 660.

Tabela 59: Esquema de diluição para o preparo das amostras para o teste de exatidão.

<i>Volume (μL) de uma solução padrão de apigenina ($1000\mu\text{g/mL}$)</i>	<i>MeOH (μL)</i>	<i>Volume(μL) de extrato metanólico hidrolizado</i>
0,0	100,0	900,0
25,0	75,0	900,0
50,0	50,0	900,0
75,0	25,0	900,0

Determinação da Precisão

Neste trabalho, a precisão foi avaliada através de testes de repetibilidade e reprodutibilidade da concentração de apigenina, para o extrato metanólico hidrolisado

A repetibilidade foi avaliada através de 10 análises consecutivas da amostra, em um único dia (também chamada de “precisão entre-corridas”). A reprodutibilidade foi avaliada através de 3 análises consecutivas, da mesma amostra, em 3 dias diferentes (também chamada de “precisão entre-dias”).

Especificidade

A confirmação da atribuição correta do pico da apigenina nos eletroferogramas foi feita através da obtenção dos espectros obtidos dos picos e da determinação da porcentagem de pureza dos mesmos, em dez amostras diferentes de extrato metanólico.

3- Resultados e Discussões

Intervalo de análise, linearidade, limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ)

A linearidade encontrada para o método estudado foi de 5,0 a 75,0 µg/mL, e a equação da reta obtida foi $\text{área} = 1,0078 \times \text{concentração} + 1,048$, $r^2 = 0,9988$ (desvio padrão da interceptação = 1,16). Maiores detalhes são mostrados nas **Tabelas 55 e 56** do Capítulo 1 desta 3ª Parte, onde também estão calculados os LOD e LOQ, os quais foram 3,8 e 11,5 µg/mL respectivamente.

Especificidade

Os eletroferogramas mostrados nas **Figuras 14 e 92** mostram os espectros obtidos para o pico da apigenina. Todos os picos quantificados tiveram sua pureza checada através do índice de pureza fornecido pelo software do equipamento usado, e em todos os casos este foi maior que 998, o que mostrou a especificidade do método.

Exatidão

Conforme é mostrado na **Tabela 60**, o método mostrou-se exato, apresentando uma porcentagem de recuperação de $102,00 \pm 0,75\%$.

Tabela 60: Teste de recuperação para a verificação da exatidão do método proposto.

	Amostra 1	Amostra 2	Amostra 3	Amostra 4
Concentração de apigenina adicionada (µg/mL)	0,00	25,00	50,00	75,00
Concentração de apigenina encontrada (µg/mL)	49,89±1,48	75,37±0,65	100,54±0,59	126,99±0,40
Coeficiente de variação* (%)	0,95	0,86	0,59	0,32
Porcentagem de recuperação	x	101,9	101,3	102,8

* média de 3 determinações.

Precisão

A precisão, expressa em termos do coeficiente de variação, foi avaliada através da repetibilidade e reprodutibilidade do método.

Enquanto a repetibilidade foi avaliada através da análise consecutiva de 10 amostras de extrato metanólico hidrolizado num único dia, a reprodutibilidade foi avaliada através a análise desta mesma amostra em 3 dias diferentes, sendo que em cada dia ela foi analisada 3 vezes ($n=9$).

Os dados mostrados na **Tabela 61**, apresentam boa concordância entre si, indicando que o método apresenta precisão.

Tabela 61: Parâmetros estatísticos para a determinação da precisão do método.

	Repetibilidade ($n = 10$) (entre-corridas)	Reprodutibilidade ($n = 9$) (entre-dias)
Concentração média de apigenina ($\mu\text{g/mL}$)	57,14	57,06
SD	0,75	0,97
CV (%)	1,3	1,7
Intervalo de confiança ($\mu\text{g/mL}$)	$57,14 \pm 1,5$	$57,06 \pm 1,94$

4- Conclusões

A metodologia apresentada para a quantificação de apigenina em extratos de camomila, mostrou ser específica, ter boa linearidade, boa sensibilidade e ainda ser exata ($102,0 \pm 0,75\%$) e precisa ($\text{CV} < 2\%$), podendo ser aplicada na quantificação da apigenina presente nestes extratos.

Considerações Finais

Este trabalho propõe cinco metodologias, para a análise da fração fenólica de extratos de camomila. Dentre estas cinco técnicas, quatro fazem uso de colunas capilares (FSCE, MEKC, μ HPLC e CEC). A quinta, a HPLC, foi usada para fins comparativos, uma vez que foi encontrado um grande número de publicações sobre este tema.

Além das técnicas de separação mencionadas, foram usadas também a SPE para a pré-purificação da fração fenólica e a RMN, para o monitoramento de ácidos graxos durante estes experimentos.

As análises foram feitas em extratos etanólico, glicólico e metanólico. Este último foi feito a partir de flores de camomila cujo plantio, cultivo, colheita e beneficiamento foram controlados.

Todas as técnicas estudadas mostraram grande potencial para estas análises, entretanto, estas apresentaram prós e contras.

Uma vez que o objetivo deste trabalho foi a proposta de uma técnica para o controle de qualidade de extratos de camomila, a FSCE foi escolhida por apresentar resultados compatíveis com a demanda de uma rotina laboratorial: precisão, exatidão, especificidade, rapidez e baixo custo.

O método proposto possibilitou identificar 9 das 11 substâncias estudadas e ainda quantificar a principal delas, a apigenina, em menos de 17 minutos totais de análise. Uma outra grande vantagem deste método, foi a possibilidade da injeção direta do extrato bruto, o que acaba por diminuir consideravelmente o tempo gasto no preparo de amostras.

De uma forma geral, pode-se concluir que todas as técnicas testadas forneceram resultados bastantes interessantes, os quais foram bastante elucidativos na difícil tarefa que é a análise de extratos vegetais.