SHEILA BARRETO GUTERRES

**Estudo dos extratos dos frutos de *Sapindus saponaria*
enriquecidos em saponinas e outros glicosídeos e sua
aplicação em eletroforese capilar**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Química de São Carlos, da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de Mestre em
Ciências (Química Analítica).*

Orientador: Emanuel Carrilho

São Carlos

2005

RESUMO

Os frutos de *S. saponaria*, espécie bastante abundante em São Carlos e outras regiões do Brasil são ricos em glicosídeos anfifílicos, ou seja, compostos por uma parte polar e outra apolar. Devido a esta peculiaridade tendem a formar espuma mostrando propriedades químicas semelhantes às dos tensoativos. Alguns destes glicosídeos pertencem à classe das saponinas e são constituídos por uma aglicona de estrutura carbônica a qual está ligada a uma ou duas cadeias de açúcar. O interesse pelas propriedades tensoativas deste glicosídeos motivou o estudo destas substâncias para uso em eletroforese capilar. Os frutos foram extraídos com metanol e fracionados em coluna cromatográfica preparativa utilizando sephadex LH-20 como fase estacionária. Após a eluição, as frações foram analisadas por espectrometria de massas e estudadas por eletroforese capilar. A eletroforese capilar de zona mostrou-se uma técnica viável para o estudo das frações obtidas. Embora um grau de pureza elevado não tenha sido alcançado, a fração B foi utilizada como aditivo para tampão em cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) e uma interação diferenciada foi observada do nitrobenzeno com o tampão aditivado em relação ao tampão com SDS puro.

ABSTRACT

Sapindus saponaria is a very abundant species in São Carlos and others regions of Brazil. Fruits of *S. saponaria* have a high content of glycosides which possess well-defined regions of hydrophobic and hydrophilic feature denominated amphiphilic molecule. Thus, this can form a foam showing chemical proprieties equals to surfactants. Some glycosides belong to class of saponins and are composed of carbonic structure designates aglycone, which is linked in one or two sugar chains. The purpose of the present study was the use of glycosides due to their surfactants properties in further applications of capillary electrophoresis. The extraction of crude fruits was carried out with methanol and this extract was fractionated in Sephadex LH-20. The fractions were analyzed for mass spectrometry and studied in capillary electrophoresis (CE). This is a feasible technique for the study of fractions obtained. Although a high degree of purity was not reached, the fraction B were used as additive for the electrolyte background in MEKC. The nitrobenzene showed different interaction with micellar system in the electrolyte background with fraction B.

Dedico este trabalho aos meus super pais

*JOÃO GONÇALVES GUTERRES e MARIA TEREZA BARRETO
GUTERRES...*

...pelo amor incondicional que têm por mim, pelos ensinamentos morais primordiais que cultivaram em meu coração desde a mais tenra idade. Valores como honestidade, amor ao próximo, perseverança e determinação. Isso é a maior contribuição que herdei. Muito obrigada.

AGRADECIMENTOS

- ♥ *A Deus, pela sua infinita bondade e amor incondicional que permite que tenhamos inúmeras chances de errar, aprender, se arrepender e, assim, evoluir.*
- ♥ *Às agências de fomento à pesquisa: CAPES pela bolsa concedida, CNPq e FAPESP, pela infraestrutura dos laboratórios.*
- ♥ *Aos meus pais João Gonçalves Guterres e Maria Tereza Barreto Guterres, com muito amor.*
- ♥ *Ao meu orientador Emanuel Carrilho pela paciência, compreensão, amizade e confiança.*
- ♥ *Aos meus irmãos e sobrinhos Carlos Alberto, Gilberto, Wagner, Jhoni, Jeniffer e Nicholas pelo amor e carinho que me concedem.*
- ♥ *Ao meu amado Gebson Eduardo Büscher pelo amor, força e incentivo no término do trabalho.*
- ♥ *Ao meu amigo Anderson Espírito Santos Bezerra pela amizade, carinho e valiosa ajuda.*
- ♥ *Aos meus amigos “São Carlenses” tri legais!!! Cristiane de Paula Moccio, Rosilene Prestes, Rodrigo Marques, Amilton Teixeira Matos, Priscila Maria Alves, Paula Rattis Teixeira, Claudete Alves, Álvaro José Neto, Maribel Funes Huacca, Nilson Assunção, Arlete Ferreira, Célia Caruso, Daniane Vicentine, Christian e Rafaela Fernandes, pela amizade, carinho, companhia e principalmente pela ajuda que me dispensaram.*
- ♥ *Ao Prof. Dr. Edson Rodrigues Filho (DQ-UFSCar) pela colaboração e co-orientação.*
- ♥ *Ao Pro. Dr. Fernando Mauro Lanças.*
- ♥ *Aos colegas, Profs. e funcionários dos laboratórios: Croma (USP), Produtos Naturais (UFSCar), Espectrometria de Massas (UFSCar), CLAE (UFSCar) e Síntese de Produtos Naturais (UFSCar) pelos ensinamentos teórico e prático, pelas ajudas na realização dos experimentos e pelas gargalhadas.*
- ♥ *Aos Profs. Drs. Hamilton Varela e Wagner Luiz Polito pela paciência ao me prestarem esclarecimentos em eletroquímica e equilíbrio químico, respectivamente.*
- ♥ *Às secretarias da pós-graduação Sílvia e Andréa pela disponibilidade em ajudar e servir e às funcionárias da biblioteca do IQSC..*
- ♥ *Aos todos os colegas do IQSC e do DQ-UFSCar pela parceria e troca de idéias pelos corredores.*

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estrutura de uma saponina isolada dos frutos de <i>Sapindus saponaria</i>	13
Figura 2: Ilustração de um sistema utilizado em eletroforese capilar.....	24
Figura 3: Variação do potencial elétrico com a distância da parede do capilar.....	27
Figura 4: Esquema que mostra o comportamento das espécies no capilar durante a eletroforese.....	28
Figura 5: Esquema que resume a relação entre os parâmetros que influenciam as separações em eletroforese capilar.....	28
Figura 6: Ilustração esquemática que mostra o comportamento de uma solução de SDS, tamponada, dentro do capilar utilizado em eletroforese.....	30
Figura 7: Esquema das partes de um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo, utilizado para experimentos de espectrometria de massa tandem.....	36
Figura 8: Ilustração mostrando o mecanismo de formação do spray.....	38
Figura 9: Ilustração dos componentes de um analisador do tipo quadrupolo.....	40
Figura 10: Ilustração esquemática dos procedimentos realizados no processo de extração e fracionamento em cromatografia líquida preparativa do extrato metanólico.....	44
Figura 11: Espectro de massas (A) extrato metanólico e (B) extrato hidrometanólico.....	53
Figura 12: Espectro do extrato aquoso (superior) e da espuma (inferior).....	54
Figura 13: Representação microscópica do gel. (A) Estrutura microscópica das esferas do gel polimérico empacotado, v_0 é o volume intersticial, v_i é o volume do poro e a porção preta é a matriz do gel. (B) Estrutura polimérica do gel de dextran hidroxipropilado com cadeias entrecruzadas.....	56
Figura 14: Gráfico mostrando o gradiente de eluição utilizado para as análises de HPLC.....	59
Figura 15: Cromatograma da fração 16 da coluna MeOH/H ₂ O (8:2).....	60
Figura 16: Cromatograma da fração 20 da coluna MeOH/H ₂ O (8:2).....	61
Figura 17: Espectro de massas das frações reunidas 16-19 (inferior) e das frações reunidas 20-26 (superior).....	62
Figura 18: Conjunto de espectro de massas das frações eluídas com MeOH/H ₂ O (1:1).	

Debaixo para cima: fração 12, 24, 49 e 62.....	64
Figura 19: Espectro de massas do resíduo evaporado do efluente da coluna de HPLC preparativo.....	66
Figura 20: Eletroferograma da fração (A) utilizando borato puro. Modo CZE.....	71
Figura 21: Eletroferograma da fração (A) utilizando borato/ SDS. Modo MEKC.....	72
Figura 22: Eletroferograma da fração (C) utilizando borato puro, modo CZE.....	73
Figura 23: Eletroferograma da fração (P) utilizando borato puro. Modo CZE.....	74
Figura 24: Eletroferograma da fração do extrato bruto eluída com ACN/H ₂ O (3/7) em um catucho de SPE com C18.....	76
Figura 25: Mistura β -naftol/ nitrobenzeno analisada no tampão com SDS 50 mmol L ⁻¹	78
Figura 26: Eletroferograma da mistura nitrobenzeno/ β -naftol utilizando tampão misto SDS/ Fração B.....	79
Figura 27: Linha de base do tampão misto SDS/ fração B.....	80
Figura 28: Eletroferogramas do nitrobenzeno e da mistura nitrobenzeno/ β -naftol obtidos utilizando tampão misto.....	82
Figura 29: Eletroferograma da mistura nitrobenzeno/ β -naftol utilizando tampão SDS em solução aquosa.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

*TÉCNICAS **

CE - Capillary Electrophoresis

CZE – Capillary Zone Electrophoresis

MEKC/MECC – Micellar Electrokinetic Chromatography/ Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography

CEG – Capillary Electrophoresis Gel

CIEF – Capillary

CITP -

HPLC - High Performance Liquid Chromatography

RP-HPLC – Reverse Phase - High Performance Liquid Chromatography

IEC – Ionic Exchange Chromatography

SEC – Size Exclusion Chromatography

SPE – Solid Phase Extraction

TLC – Thin Layer Chromatography

MS – Mass Spectrometry

LC/MS – Liquid Chromatography/Mass Spectrometry

ESI-MS/MS – Electrospray Ionization – Mass Spectrometry Tandem

MALDI- Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization

APCI - Atmospheric Pressure Chemical Ionization

FAB - Fast Atom Bombardment

NMR – Nuclear Magnetic Resonance

¹H-NMR – Proton Nuclear Magnetic Resonance

¹³C- NMR – Carbon Nuclear Magnetic Resonance

2D- NMR - Two Dimensional Nuclear Magnetic Resonance

SUBSTÂNCIAS

ODS - Octadecilsilano

MeOH - Metanol

ACN - acetonitrila

SDS* – Sodium Dodecyl Sulfate

OGSA – oligoglicosídeos sesquiterpênicos alicíclicos

OUTRAS

Da – Dalton

OHP* – Outer Helmholtz Plane

EOF* – Electroosmotic Flow

*Siglas mantidas em inglês

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	12
1.1. SAPONINAS E QUÍMICA ANALÍTICA.....	12
1.2. EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE SAPONINAS.....	14
1.2.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS À DETERMINAÇÃO DE SAPONINAS.....	16
1.2.2. TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS À DETERMINAÇÃO DE SAPONINAS.....	17
1.2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COMO TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS.....	19
JUSTIFICATIVA.....	21
OBJETIVOS.....	23
2. TEORIA DAS TÉCNICAS UTILIZADAS.....	24
2.1. ELETROFORESE CAPILAR.....	24
2.1.1. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA.....	24
2.1.2. CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR.....	30
2.2. ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	34
3. EXPERIMENTAL.....	41
3.1. COLETA DOS FRUTOS.....	41
3.2. OBTENÇÃO DOS EXTRATOS.....	41
3.3. FRACIONAMENTO EM COLUNA PREPARATIVA.....	43
3.4. ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	45
3.5. ANÁLISES DE ELETROFORESE CAPILAR.....	46
3.6. PREPARO DAS SOLUÇÕES.....	46

4. DISCUSSÃO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS.....	50
4.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO.....	50
4.1.1 ANÁLISES DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	50
4.1.2. ESCOLHA DO EXTRATO A SER FRACIONADO.....	51
4.1.3. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO.....	55
4.1.3.1. FRACIONAMENTO MEOH/H ₂ O (8:2)	57
4.1.3.2. FRACIONAMENTO MEOH/H ₂ O (1:1)	62
4.1.4. CONCLUSÕES DA PRIMEIRA ETAPA.....	66
4.2. ANÁLISES ELETROFORÉTICAS.....	67
4.2.1. ANÁLISES ELETROFORÉTICAS DAS FRAÇÕES	68
4.2.2. TESTE DA FRAÇÃO B COMO ADITIVO PARA MEKC.....	77
4.2.3. CONCLUSÕES DA SEGUNDA ETAPA.....	84
4.3 PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO.....	85
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

1. INTRODUÇÃO

1.1. SAPONINAS E QUÍMICA ANALÍTICA

As saponinas pertencem a uma classe de compostos de natureza glicosídica que ocorrem em plantas superiores e alguns organismos marinhos. A principal característica que classifica este grupo de substâncias é a presença de uma porção hidrofílica (cadeia de açúcar) e outra hidrofóbica (aglicona) na sua estrutura química que por isso é considerada anfifílica. Assim, a principal propriedade química das saponinas é a capacidade de diminuir a tensão superficial de uma solução aquosa, assemelhando-se a um detergente. Estruturalmente são constituídas por uma aglicona com esqueleto de triterpeno, esteróide ou alcalóide esteroideal, a qual está ligada uma ou duas cadeias de açúcar que podem ser lineares ou ramificadas. Elas são classificadas dentro de dois grupos de acordo com a estrutura da sua porção aglicona, também chamadas de sapogenina: grupo triterpenóide, no qual a aglicona é usualmente um oleano, ursano ou dammareno e o grupo esteróide que inclui os esteróides e os alcalóides esteroidais. Os açúcares podem ser ligados a aglicona em um ou dois sítios de glicosilação (através de uma ligação éter ou éster), originando as correspondentes saponinas monodesmosídicas ou bidesmosídicas, respectivamente. (SIMÕES et. al., 1999)

Sapindus saponaria é uma árvore da família sapindaceae encontrada nos trópicos onde seus frutos são utilizados como sabão devido ao alto teor de saponinas. Pode ser considerada como uma importante fonte para obtenção destas substâncias, já que esta árvore se encontra em grande parte do país e produz quantidade abundante de frutos com alto teor de saponinas. A Figura 1 mostra a estrutura de uma saponina

isolada da planta *Sapindus saponaria*. As saponinas possuem atividades biológicas diversas como: ação moluscicida, atividade piscicida, e tóxica para vários animais, principalmente os de sangue frio, antiinflamatória, analgésica, expectorante, antioxidante, espermicida, redutora de colesterol, antiviral, antibacteriana e antifúngica. Uma das teorias mais aceita para explicar a alta concentração de saponinas em muitas espécies de plantas de muitas famílias diferentes é que estas funcionariam como proteção ao ataque de patógenos, sejam estes fungos, bactérias ou vírus. (SPARG et. al., 2004; MURGU, 2002; MAHATO et. al., 1988)

Figura 1: Estrutura de uma saponina isolada dos frutos de *Sapindus saponaria*. (MURGU, 2002)

O principal interesse químico analítico nas saponinas está relacionado com as propriedades tensoativas destas. Quando substâncias anfifílicas são solubilizadas em um meio aquoso, por exemplo, a energia do sistema é aumentada devido a pouca afinidade de interação entre o meio polar e a porção apolar da molécula. Assim, a cada molécula adicionada, ocorre um aumento na energia total do sistema de modo que, em uma dada

concentração denominada concentração crítica micelar, as porções apolares das espécies presentes se organizam pela interação mútua e formam aglomerados moleculares dinâmicos denominados micelas. (WEINBERGER, 2000) A equação 1 mostra que, embora a formação destes aglomerados seja desfavorável entropicamente, a energia liberada no processo é grande o suficiente para que a energia livre seja negativa e a micelização se torne espontânea quando a concentração de tensoativo atinge a concentração crítica micelar.

$$\underline{\underline{\Delta G = \Delta H - T \cdot \Delta S}} \quad (1)$$

Em soluções aquosas as micelas comportam-se como gotas de fase hidrofóbica presentes dentro de um meio hidrofílico. Esta propriedade juntamente com a capacidade que têm de interagir seletivamente com uma grande variedade de moléculas possibilita o uso destas em separações analíticas. Os sistemas nos quais as micelas movimentam-se com velocidade global diferente do meio aquoso constituem meios de separação para compostos com diferentes graus de hidrofobicidade. A fase hidrofóbica micelar pode ser considerada como uma “pseudo-fase estacionária” visto que ocorre uma defasagem entre as velocidades das duas fases e, considerando que a micela mova-se numa velocidade menor que o meio aquoso, ela ficará retardada com relação a este.

1.2. EXTRAÇÃO, ISOLAMENTO E PURIFICAÇÃO DE SAPONINAS

Como explicado anteriormente, a estrutura química peculiar classifica estes compostos. Pequenas modificações na aglicona ou nas cadeias de açúcares, ou ainda, na seqüência em que as unidades glicosídicas estão ligadas, geram uma nova substância. Assim, a diversidade destas em uma mesma espécie de planta é muito grande, o que

resulta em extratos com misturas altamente complexas devido à similaridade dos seus componentes. Aliado a isto as saponinas são muito polares e possuem alta massa molecular o que aumenta a dificuldade de isolamento e purificação.

O procedimento de extração deve ser o mais brando possível, pois algumas saponinas podem sofrer algumas transformações durante o processo, tais como: hidrólise enzimática durante a extração aquosa; esterificação de saponinas ácidas com o tratamento com álcool; hidrólise de grupos ésteres lábeis; transacilação. Os procedimentos para a obtenção do extrato bruto em geral utilizam metanol, etanol, água ou soluções hidrometanólicas como solventes extratores, no entanto, as extrações mais eficientes são realizadas com metanol e soluções hidro-metanólicas. (HOSTETTMANN, 1995a)

As primeiras tentativas de determinação de saponinas em plantas estavam baseadas em métodos gravimétricos ou em métodos que levavam em conta algumas das características químicas e biológicas destas. Atualmente diversos métodos são empregados para a determinação qualitativa e quantitativa de saponinas. Estes vão desde os cromatográficos (LIU et. al., 2005; KIM E PARK, 2001) e eletroforéticos (EMARA et. al., 2001) para a separação até os espectrométricos (WANG et. al., 2005; LI et. al., 2004; WANG et. al., 1999) e espectroscópicos (KRIEF et. al., 2005; ELIAS et. al., 2004) para a detecção e a elucidação estrutural. Entre os métodos cromatográficos destacam-se a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), cromatografia por exclusão de tamanho (SEC) e cromatografia de troca iônica (IEC). Alguns relatos mostram as vantagens do uso de sistemas de separação *on-line*, como cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC/MS) e a extração em fase sólida acoplada a ressonância nuclear magnética (SPE/NMR), no isolamento, separação e detecção de saponinas em extratos brutos de ervas utilizadas em medicina popular. (NYBERG et. al., 2003; LIU et. al., 2002)

1.2.1. TÉCNICAS CROMATOGRÁFICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS À DETERMINAÇÃO DE SAPONINAS

A cromatografia gasosa é uma técnica eficiente de separação, porém está limitada pela estrutura e as propriedades físicas dos analitos de interesse. Os compostos que podem ser analisados por esta são, em geral, moléculas de baixa massa molecular e com pontos de ebulição baixos. As saponinas são polares e possuem alta massa molecular, por isso a cromatografia gasosa não é uma técnica corriqueiramente utilizada para análise destes compostos. A cromatografia líquida de alta eficiência geralmente é indicada quando compostos não são adequados para análise por cromatografia gasosa.

A dificuldade da determinação de saponinas em HPLC utilizando um detector de ultravioleta é a ausência de grupos cromóforos capazes de resultar em absorção adequada na estrutura da grande maioria das saponinas. Em baixos comprimentos de onda (200-210 nm) uma sensibilidade satisfatória para a detecção é alcançada. No entanto, esta limitação impõe restrições na escolha do solvente e dos gradientes que podem ser utilizados. Os solventes que absorvem menos nesta região do ultravioleta são respectivamente: a água, a acetonitrila e o metanol. Este último por absorver na faixa utilizada é usado com menos frequência enquanto que gradientes de acetonitrila-água mostram melhores resultados e por isso são mais utilizados. O uso do gradiente, no entanto, exclui a detecção por índice de refração e por isso este tipo de detecção raramente é utilizado. Os trabalhos mais recentes utilizam a detecção por espectrometria de massas. Este detector além de ser muito sensível, fornece a massa molecular dos compostos eluídos e permite experimentos de fragmentação controlada do analito o que possibilita a obtenção de detalhes estruturais destes. Posteriormente a análise de saponinas por espectrometria de massas será detalhada.

1.2.2. TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS DE SEPARAÇÃO APLICADAS À SEPARAÇÃO DE SAPONINAS

A eletroforese capilar é uma técnica com características bastante interessantes principalmente quando a natureza da mistura a ser separada é complexa, como é o caso de misturas oriundas de produtos naturais. Esta fornece alta eficiência, tempo de análise reduzido, baixo custo, simplicidade de operação e, ainda, a coluna de separação é preenchida unicamente com o tampão de corrida. Isto evita a impregnação de impurezas que possam prejudicar a separação e a própria vida útil da coluna, como acontece nas colunas cromatográficas empacotadas. Uma limitação surge quando o sistema de detecção ultravioleta é utilizado, pois o caminho óptico é o diâmetro do capilar quando a detecção é *on column*. Algumas maneiras de contornar essa limitação são: a utilização de capilares com caminho óptico estendido que têm o seu diâmetro ampliado na janela de detecção; o uso de células de detecção em “Z”; desenvolver o método de análise usando detecção indireta, quando o composto não absorve, e dependendo do caso, a derivatização do analito. Outros detectores muito sensíveis, tais como o de fluorescência induzida por laser e os eletroquímicos, também podem ser utilizados, embora sejam seletivos apenas para compostos fluorescentes e eletroquimicamente ativos, respectivamente. O acoplamento *on line* da eletroforese capilar com a espectrometria de massas tem contornado o problema da detecção, visto que este tipo de detector tem baixos limites de detecção, permite a determinação da massa molecular do analito separado e, com o uso da espectrometria tandem, possibilita o detalhamento estrutural dos analitos alvos. A eletroforese capilar não permite a separação e escala preparativa, porém tem se destacado na separação e quantificação de uma grande variedade de produtos naturais, incluindo as saponinas. (SHEU e CHEN, 1995; EMARA et al. 2001)

A CZE separa analitos carregados, assim, é necessário induzir uma carga nas saponinas a serem separadas. Isto pode ser feito pela complexação do ânion borato com os carboidratos da molécula. Dessa forma as saponinas são analisadas como ânions e um fluxo eletrosmótico alto é conveniente para uma redução no tempo de análise. Este método foi utilizado com sucesso para separar 3 saikosaponinas (a, c, d) presentes em ervas medicinais popularmente consumidas na China. Além do uso de borato, a mono-3-fenicarbamoil- β -ciclodextrina foi utilizada como agente de separação. A concentração de ciclodextrina, bem como o pH e a concentração de borato foram avaliados com o objetivo de chegar a uma boa condição de separação, que se deu em pH 10, 8 mM de mono-3- fenicarbamoil - β -ciclodextrina e 40 mM de borato. Utilizando um capilar de 50 μ m de diâmetro interno (D.I.), o meio tamponante mencionado acima, obtiveram uma boa resolução na análise destas saponinas em extratos etanólico, mostrando que: o método proposto pode ser aplicado para uma determinação rápida destas saponinas e que a CE é uma técnica capaz de fornecer bons resultados para a separação de misturas complexas, como no caso apresentado. (LIN et al., 2005)

Para a determinação de saikosaponinas em *Bupleuri Radix*, MEKC foi o modo de eletroforese escolhido, pois fornece separações altamente eficientes para compostos neutros e hidrofóbicos. Neste estudo as cinco saponinas majoritária foram analisadas utilizando colato de sódio, SDS e ciclodextrinas como aditivos. Porém, devido a complexidade das amostras, BRIJ 35 foi adicionado ao tampão de corrida. Apesar disto, os resultados obtidos demonstraram que o método proposto pode ser usado para a determinação de saponinas. (HSIEH e HUANG, 1997)

A eletroforese capilar com detecção ultravioleta, apesar de fornecer bons resultados em termos de separação, está limitada a análise de substâncias previamente

identificadas e com a estrutura molecular conhecida. A aplicação da eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas, constituiria uma ferramenta ideal para este tipo de trabalho, porém este trás algumas limitações na composição do tampão de corrida. Existem trabalhos tentando contornar essas limitações, que atingem principalmente a MEKC. (LEE e YANG, 1997)

1.2.3. ESPECTROMETRIA DE MASSAS COMO TÉCNICA DE IDENTIFICAÇÃO DE SAPONINAS

A identificação completa de uma saponina inclui: a determinação da estrutura da aglicona; a composição e a sequência dos componentes monossacarídeos na porção carboidrato; como as unidades de monossacarídeos estão ligadas umas nas outras; a configuração anomérica de cada unidade de monossacarídeo glicosidicamente ligado; a localização da porção carboidrato na aglicona. Devido a esta complexidade, a identificação de saponinas é uma tarefa bastante árdua e é pouco provável que possa ser realizada apenas utilizando a espectrometria de massas. As técnicas que consolidam e complementam os dados obtidos por espectrometria de massas são as relacionadas à ressonância nuclear magnética, ^1H -NMR, ^{13}C - NMR, 2D- NMR, espectroscopia de correlação e técnicas relacionadas.

A identificação de moléculas grandes é um processo bastante trabalhoso, principalmente quando estas não estão puras o suficiente ou não apresentam massa necessária para análises de NMR. A espectrometria de massas é uma técnica que pode dar uma importante contribuição nesses casos, pois é muito sensível, possui alta resolução e permite que as moléculas sejam analisadas sem que ocorra degradação. A ligação éter entre o grupo hidroxil hemiacetal dos açúcares e a porção triterpenóide é

chamada ligação glicosídica enquanto que as ligações éter entre as unidades de monossacarídeos são denominadas interglicosídicas. São justamente estas ligações que serão os pontos de fragmentação nas saponinas e através de experimentos MS/MS, que possibilitam uma fragmentação controlada, a porção sapogenina (aglicona) é separada dos açúcares e estes, por sua vez, separados em suas unidades básicas.

A espectrometria de massas tandem deu uma grande contribuição para facilitar este tipo de análise, pois antes eram realizadas reações para quebrar a molécula em partes menores. As reações mais comumente utilizadas eram: a hidrólise ácida, hidrólise básica, hidrotermólise, hidrólise enzimática e hidrólise microbiológica. Além dos passos serem demorados, existia a possibilidade de formação de artefatos dificultando a análise dos resultados.

A espectrometria de massas é uma técnica muito importante na análise de carboidratos porque fornece resultados precisos, alta sensibilidade e boa versatilidade analítica. Os modos de ionização mais utilizados atualmente para a ionização de oligosacarídeos são a ionização por *electrospray* (ESI) e a ionização/dessorção auxiliada por laser (MALDI), mas os modos de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e bombardeamento por átomos rápidos (FAB), entre outros, já foram relatados. (ZAIA, 2004; MURGU, 2002; HOSTETTMANN, 1995c).

A volatilização destas substâncias é dificultada por causa da grande polaridade e da massa molecular elevada. Assim, a escolha do procedimento de ionização é crucial para obter-se bons resultados. O modo ESI aparece na literatura atual (LIU et. al., 2005; LIU et. al., 2002; CHAI et. al., 2001) com elevada frequência sendo o método de escolha para a ionização de saponinas, ainda que alguns trabalhos relatem o sucesso do uso do nanoESI (KARAS et al., 2000). A ionização utilizando MALDI é mais usual para a análise de oligossacarídeos neutros e com maiores massas moleculares visto que a eficiência da

ionização observada é constante com o aumento da massa molecular o que não ocorre para ESI (HARVEY et. al., 1993). As saponinas de *Sapindus saponaria* já foram previamente estudadas e parcialmente caracterizadas (MURGU, 2002), assim, a faixa de massa molecular observada das saponinas isoladas está entre 700 – 1000 Da. Neste caso a ionização por ESI é mais conveniente, principalmente porque fornece um espectro mais limpo em regiões de baixas massas moleculares. Essa vantagem é muito relevante, pois experimentos de fragmentação são necessários para a obtenção de detalhes estruturais de determinadas saponinas. Além disso, algumas destas possuem grupos ácidos na aglicona o que possibilita aprimorar algumas condições experimentais para melhorar a eficiência de ionização e assim obter um sinal espectral de melhor qualidade.

JUSTIFICATIVA

Alguns estudos investigando a utilização das saponinas em MEKC foram relatados. Em um deles, a digitonina, uma saponina oriunda da *Digitalis purpurea* que pode ser obtida comercialmente (PUBCHEM, 2005), foi usada para separar derivados de aminoácidos feniltiohidantonados. Por ser não-iônica, foi combinada com SDS para formar micelas mistas carregadas negativamente. Nas condições de separação, o tempo necessário para a resolução foi muito longo o que não é desejável pois utilizando métodos cromatográficos essa separação é facilmente alcançada com menores tempo e dificuldade. (OTSUKA e TERABE, 1990) O ácido glicirízico e a β -escina também foram utilizados para separação enantiomérica de derivados aminoácidos dansilados. As micelas compostas por ácido glicirízico, octil- β -D-glucosídeo e SDS realizaram a separação enatiomérica de alguns aminoácidos, porém o tempo necessário para a

obtenção de uma resolução satisfatória foi grande. Micelas compostas de β -escina e SDS separaram alguns derivados de DL-aminoácidos feniltiohidantoinados, sob condições ácidas, em tempos menores quando comparados com os obtidos com o ácido glicirízico, porém estes ainda não podem ser considerados curtos. Verificaram, também, que condições ácidas eram mais favoráveis à separação enquanto que condições neutras não produziram boas separações. (ISHIHAMA e TERABE, 1993) Essa informação foi a base para a formulação da proposta do estudo das saponinas de *Sapindus saponaria* como meio de separação em MEKC.

É importante salientar que o objetivo do trabalho não requer uma focalização intensiva no processo de isolamento, purificação e identificação destas substâncias, visto que os extratos obtidos são de grande complexidade, pois além de serem compostos por diversas saponinas, contêm oligoglicosídeos sesquiterpênicos alicíclicos. Estes são estruturalmente compostos por uma cadeia sesquiterpenóide alicíclica em cujas extremidades estão ligadas cadeias de açúcares. Embora sejam mais polares que as saponinas contribuem para aumentar a complexidade dos extratos, principalmente quando o interesse se volta para as saponinas mais polares que estão presentes no extrato aquoso e hidrometanólico.

Neste trabalho técnicas cromatográficas (HPLC, SEC, SPE) e eletroforéticas (CZE e MEKC) foram empregadas, assim como a espectrometria de massas com modo de ionização *electrospray* (ESI-MS), para a separação do extrato bruto e a análise da composição das frações obtidas.

OBJETIVOS

O objetivo inicial do trabalho era isolar uma determinada saponina dos frutos da *S. saponaria*, medir a concentração crítica micelar e utilizá-la como fase micelar em MEKC, induzindo uma carga negativa na molécula pela complexação com borato para que a micela fosse aniônica. Porém, como o processo de isolamento dessa saponina revelou-se bastante complexo, o foco do trabalho desviou-se para o estudo da obtenção e caracterização das frações enriquecidas em saponinas e outros glicosídeos presentes nos frutos de *S. Saponaria* utilizando métodos cromatográficos e eletroforéticos de análise.

A partir da obtenção das frações enriquecidas, os objetivos buscados foram:

- ✓ verificar o comportamento das frações enriquecidas obtidas em sephadex e das frações eluídas em SPE frente às análises de CZE e MEKC.
- ✓ verificar o comportamento do uso das frações como aditivo em tampão utilizando SDS em separação de compostos simples.

2. TEORIA DAS TÉCNICAS UTILIZADAS

2.1. ELETROFORESE CAPILAR

Eletroforese capilar é o nome genérico dado a um conjunto de técnicas que utilizam o fenômeno da migração de partículas carregadas sob a ação de um campo elétrico elevado em um capilar de sílica fundida. O objetivo é promover a separação de misturas de compostos que podem ser iônicos, ionizáveis ou neutros, dependendo do modo de eletroforese utilizado. Os modos de operação mais comuns são cinco: eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), eletroforese capilar em gel (CEG), focalização isoeletrica (CIEF) e isotacoforese (CITP).

2.1.1. ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA

A eletroforese capilar de zona é o modo mais utilizado devido a sua versatilidade e simplicidade de operação. A Figura 2 ilustra a esquematização de um sistema utilizado em eletroforese capilar.

Figura 2: Ilustração de um sistema utilizado em eletroforese capilar.

Quando uma amostra contendo espécies carregadas é introduzida no capilar o qual está sob a ação de um dado campo elétrico E , a velocidade de migração v das espécies, através do capilar, dependerá da mobilidade μ destas segundo a equação (2):

$$\underline{v = \mu \cdot \vec{E}} \quad (2)$$

A mobilidade μ , por sua vez, é proporcional à razão entre as forças elétrica e friccional como mostra a equação (3):

$$\underline{\mu \propto \frac{\text{Força Elétrica } (F_E)}{\text{Força Friccional } (F_F)}} \quad (3)$$

A força elétrica F_E é dada pela equação (4) enquanto que a força friccional F_F é dada pela equação (5):

$$\underline{F_E = qE} \quad (6)$$

$$\underline{F_F = -6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r \cdot v} \quad (5)$$

Onde q é a carga do íon, η é a viscosidade da solução, r é o raio do íon solvatado e v é a velocidade do íon. Durante a eletroforese o estado estacionário é alcançado quando o balanço entre estas forças é estabelecido, ou seja, quando $F_E = F_F$ (6). Substituindo a equação (4) e (5) na (6) obtemos a equação (7), que mostra como a mobilidade eletroforética μ_e das espécies depende da razão $\frac{q}{r}$ destas já que $6 \cdot \pi \cdot \eta$ é constante para uma dada análise.

$$\underline{\mu_e = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot \eta \cdot r}} \quad (7)$$

Porém, o movimento de migração das espécies através do capilar não está sujeito apenas ao movimento eletroforético destas, mas também é influenciado por um fluxo de solução que se dirige para o cátodo denominado fluxo eletroosmótico (EOF). A origem

deste está relacionada à formação da dupla camada elétrica na interface entre a parede do capilar e o meio tamponante. A superfície interna do capilar de sílica fundida apresenta grupos Si-OH, ácidos, que são ionizados gradualmente em pH acima de 3. Esta ionização deixa a superfície interna do capilar carregada negativamente que atrai os cátions do tampão para manter a eletroneutralidade do sistema. Quando a diferença de potencial é estabelecida nas extremidades do capilar a camada de cátions que está fixa à parede movimenta-se ordenadamente em direção ao cátodo e arrasta consigo a solução.

Quando a superfície eletricamente carregada (parede interna do capilar) é colocada em contato a solução (meio tamponante) ocorre uma perturbação eletrostática na solução nas imediações muito próximas à superfície do capilar. O sistema reage contra essa perturbação e, na tentativa de minimizá-la e retornar ao equilíbrio eletrostático, ocorre a formação da dupla camada elétrica. Esta é composta por três regiões distintas: a camada adsorvida (que é fixa à superfície), a camada compacta e a camada difusa. O plano externo de Helmholtz (OHP), que é definido como o plano que passa pelo centro de massa das espécies diretamente adsorvidas na superfície, limita a camada adsorvida. A variação de potencial elétrico nesta camada é linear enquanto nas camadas compacta e difusa é exponencial. A Figura 3 mostra a representação gráfica da variação de potencial elétrico entre a superfície do capilar e o interior da solução tamponante.

Figura 3: Variação do potencial elétrico com a distância da parede do capilar. (HAMANN et. al., 1998)

Onde χ é o comprimento da camada compacta, $\xi=1/\kappa$ é o valor onde a camada difusa começa, ϕ_{OHP} é o potencial no OHP, $\Delta\phi_H$ é a diferença de potencial no OHP, ϕ_{cap} é o potencial na parede do capilar, $\Delta\phi$ é a diferença de potencial total e $\Delta\phi_{diff}=\zeta$ é o potencial zeta. A diferença de potencial elétrico estabelecido entre o OHP e o interior da solução é denominado potencial zeta ζ . Outra definição bastante usual é que o potencial ζ é o potencial elétrico no plano de cisalhamento, ou seja, o plano que separa a camada fixa (adsorvida) da camada móvel (compacta).

A velocidade total de cada espécie no capilar dependerá do balanço entre os movimentos de migração eletroforética e de eletroosmose. Assim, durante a eletroforese as espécies catiônicas migrarão com a maior velocidade, seguidas pelas espécies neutras e, por fim, as aniônicas. A ilustração da Figura 4 esquematiza o movimento de migração dentro do capilar.

Figura 4: Esquema que mostra o comportamento das espécies no capilar durante a eletroforese.

A otimização da separação é realizada pela alteração dos parâmetros que influenciam nas velocidades eletroforética e eletroosmótica de modo a maximizar as diferenças na velocidade efetiva dos analitos que compõem a mistura. Os fatores que afetam a velocidade das espécies no capilar são inerentes aos componentes do sistema, que são: a instrumentação, o tampão e o íon (a espécie) a ser analisado. A Figura 5 mostra a relação entre os parâmetros experimentais que modificam a velocidade dos íons em solução. Como vemos, o controle do potencial zeta ζ da parede do capilar e dos íons é imprescindível para uma separação seletiva e reprodutível.

Figura 5: Esquema que resume a relação entre os parâmetros que influenciam as separações em eletroforese capilar. (VINDEVOGEL E SANDRA, 1992)

Parâmetros importantes como: tempo de migração, eficiência, seletividade e resolução podem ser otimizadas para se obter o sucesso da separação. As equações que regem estas variáveis são expressas a seguir:

$$t_m = \frac{lL}{(\mu_{ep} + \mu_{EOF})V} \quad (8),$$

Onde: t_m é o tempo médio de migração, l é o comprimento efetivo do capilar (da injeção à detecção), μ_{ep} é a mobilidade eletroforética, μ_{EOF} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico e V é a diferença de potencial aplicada.

$$N = \frac{(\mu_{ep} + \mu_{EOF})V}{2D} \quad (9)$$

Onde: N é o número de pratos teóricos e D é o coeficiente de difusão do soluto.

$$\alpha = \frac{\mu_1}{\mu_2} \cdot b \quad (10)$$

Onde: α é a seletividade, μ_1 e μ_2 é, respectivamente, as mobilidades dos analitos 1 e 2 e b uma constante.

$$R = 0,177 \Delta\mu_{ep} \sqrt{\frac{EL}{(\mu_{ep} + \mu_{eof})D}} \quad (11)$$

Onde: R é a resolução e $\Delta\mu_{ep}$ é a mobilidade média dos analitos 1 e 2.

2.1.2. CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR

A cromatografia eletrocinética micelar foi introduzida no início da década de 80 (TERABE et al., 1984) e consiste de um modo de operação de eletroforese capilar que permite a separação eletrocinética de substâncias neutras e carregadas simultaneamente.

Um agente tensoativo (que pode ser aniônico, catiônico, neutro ou zwitteriônico), geralmente dodecil sulfato de sódio (SDS), aniônico, é utilizado para originar micelas carregadas em solução. Um capilar de sílica fundida é preenchido com a solução micelar tamponada e uma diferença de potencial aplicada nas suas extremidades. Geralmente, o tensoativo não iônico pode ser utilizado juntamente com um tensoativo iônico a fim de otimizar a seletividade da separação. A Figura 6 esquematiza a situação acima descrita.

Figura 6: Ilustração esquemática que mostra o comportamento de uma solução de SDS, tamponada, dentro do capilar utilizado em eletroforese. (VINDEVOGEL e SANDRA, 1992)

Definindo: μ_{EOF} é a mobilidade do fluxo eletrosmótico; $\mu_{\text{ep,MC}}$ é a mobilidade eletroforética da micela; μ_{MCeff} é a mobilidade efetiva da micela; t_0 é o tempo necessário para que um soluto, que não tenha nenhuma interação com a micela, percorra o capilar da entrada ao detector, t_s é o tempo de migração dos analitos; t_{mic} é o tempo necessário para que uma substância, que interaja somente com o interior da micela, percorra o capilar. O tempo decorrido entre t_0 e t_{mic} é denominado janela de migração. Quanto maior este intervalo, maior a capacidade de pico, ou seja, um número maior de compostos poderão ser separados com resolução 1, em uma mesma análise.

As micelas carregadas negativamente têm uma mobilidade eletroforética no sentido do ânodo enquanto que o sentido do fluxo eletrosmótico é para o cátodo. Supondo que a magnitude do fluxo eletrosmótico seja maior que a magnitude da mobilidade eletroforética da micela, estas serão arrastadas para o cátodo, com uma mobilidade resultante menor que a do fluxo eletrosmótico. Teremos duas fases movimentando-se com velocidades diferentes, a fase aquosa mais rápida e a fase micelar mais lenta. O princípio de separação baseia-se na partição diferenciada dos analitos com o interior das micelas e o meio aquoso. Quanto mais hidrofóbico maior a afinidade com o núcleo micelar, mais tempo o analito permanece interagindo com a micela e, portanto, mais lentamente ele se movimenta em relação ao analito que permanece na solução. Devido ao fato da micela movimentar-se na solução ela é considerada uma pseudo-fase estacionária, esta consideração tem implicações diretas na dedução das equações que regem o processo de separação.

Esta técnica pode ser definida como um técnica híbrida onde a instrumentação utilizada é de eletroforese enquanto que o princípio de separação é cromatográfico. Assim, as equações que regem o processo de separação derivam da cromatografia com a

consideração adicional do tempo de migração do marcador da micela. O fator de retenção κ é definido na equação (12)

$$\kappa = \frac{n_{mc}}{n_{aq}} \quad (12)$$

Onde n_{mic} e n_{aq} são o número de mol do analito na micela e na fase aquosa, respectivamente. O valor do κ em termos do tempo de migração das espécies pode ser obtido pela equação (13):

$$\kappa = \frac{t_s - t_0}{t_0 \left(1 - \frac{t_s}{t_{mic}} \right)} \quad (13)$$

Onde t_s , t_{mic} e t_0 são, respectivamente, os tempos de migração do analito, do marcador da micela e do marcador do fluxo eletroosmótico. A diferença entre a equação (13) e a usada em cromatografia restringe-se ao tempo de migração da micela que limita a janela de migração em MEKC.

A equação da resolução é em MEKC é dada pela equação (14):

$$R_s = \left(\frac{N^{1/2}}{4} \right) \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_2}{k_2 + 1} \right) \left(\frac{1 - \frac{t_0}{t_{mic}}}{1 + \frac{t_0}{t_{mic}} k_1} \right) \quad (14)$$

Onde N é o número de pratos, α é a seletividade, κ é o fator de retenção, t_0 e t_{mic} são, respectivamente, os tempos de migração do marcador de fluxo eletroosmótico e do marcador da micela.

A equação (14) é semelhante a utilizada em cromatografia exceto pelo último termo do lado direito. Este vem da migração da micela dentro do capilar, ou seja, a

migração da micela causa uma redução no comprimento do capilar. Se a migração da micela é completamente suprimida com t_{mic} tendendo ao infinito, a equação iguala-se a da cromatografia convencional.

A maneira mais fácil para se otimizar a separação é aumentar a seletividade. Em RP-HPLC, a seletividade da separação é alterada pela variação da composição da fase móvel enquanto que a fase estacionária quase sempre utilizada é C18. Já em MEKC, a pseudo-fase estacionária são as micelas e vários tensoativos podem ser utilizados para formá-las, mudando a seletividade da separação. O uso micelas mistas, ou seja, combinações de tensoativos iônicos e não iônicos ou iônicos e zwitteriônicos é uma outra forma de alterar a seletividade das separações.

O valor ótimo de κ para maximizar a resolução é obtido pela equação (15):

$$\kappa_{ot} = \sqrt{\frac{t_{mic}}{t_0}} \quad (15)$$

Para ajustar o κ em MEKC é necessário variar a concentração do tensoativo pois o κ é linearmente proporcional à concentração de tensoativo como mostra a equação (16):

$$\kappa = K \frac{V_{mic}}{V_{aq}} \equiv K \bar{v} (C_{ten} - cmc) \quad (16)$$

Onde K é o coeficiente de distribuição do analito entre a micela e a fase aquosa, V_{mic} e V_{aq} são, respectivamente, os volumes da fase micelar e da fase aquosa, $\bar{v}$ é o volume específico parcial da micela e C_{ten} é a concentração do tensoativo.

Os analitos extremamente hidrofóbicos com altos valores de κ ainda são um grande desafio para MEKC pois são muito difíceis de separar. A adição de solventes orgânicos no tampão de corrida reduz significativamente o κ e proporciona uma melhor resolução para a separação destes analitos. No entanto, os solventes orgânicos aumentam a

viscosidade do tampão de corrida tornando o tempo de migração maior. Adicionalmente, o solvente orgânico pode destruir a estrutura micelar e/ou diminuir a janela de migração, por que ocasiona a redução da mobilidade eletroforética da micela.

Assim como em CZE, MEKC possui limitações de sensibilidade quando a detecção espectrofotométrica é utilizada. Os métodos de pré-concentração de amostra *on-line* são uma escolha bastante interessante para aumentar a sensibilidade. Estes se baseiam na injeção de uma zona de amostra maior do que o normal e através da focalização dentro do capilar esta zona é contraída aumentando a concentração do analito. Tanto a injeção hidrodinâmica quanto a eletrocinética podem ser utilizadas. As duas técnicas mais utilizadas para a concentração de analitos neutros são: *electric field-enhanced sample stacking* e *sweeping*.

2.2 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica analítica instrumental utilizada para a análise, em fase gasosa, de átomos ou moléculas de uma amostra que são ionizados e separados de acordo com a razão massa/carga quando submetidos a condições específicas de um campo elétrico e/ou magnético. Esta técnica possibilita: a determinação da massa molecular; a caracterização estrutural; o estudo da reatividade em fase gasosa; a análise qualitativa e quantitativa dos componentes de uma mistura. (LABORATÓRIO, 2005) A idéia da técnica é determinar a estrutura de uma molécula desconhecida a partir do conhecimento dos fragmentos que esta produz em determinadas condições. A molécula inteira pode ter infinitas combinações de átomos e grupos funcionais orgânicos arranjados de infinitas maneiras. Assim, dificilmente conseguiremos propor uma estrutura por causa

do grande número de possibilidades. No entanto, conhecendo as propriedades das ligações entre os diferentes átomos e em diferentes combinações podemos ter uma noção de como as ligações serão quebradas e/ou como serão formadas. Assim, conhecendo o padrão de fragmentação de certas classes de compostos podemos fazer com que a molécula inteira seja fragmentada, os fragmentos identificados e a partir destes, como em um quebra-cabeça, propor uma estrutura química que dependendo da sua complexidade pode exigir ou não outras análises para a sua confirmação. A ionização por elétrons permite essa fragmentação que é executada pela incidência de um feixe de elétrons de alta energia nas moléculas em condições de pressão baixa. Porém, este modo de ionização é tão drástico a ponto de estraçalhar todas as moléculas e fazer com que a informação importante da massa molecular do composto seja perdida. Para contornar este problema um método de ionização mais brando foi implementado. A ionização química, como foi chamado, produz a ionização branda das espécies a serem analisadas pelo mecanismo de protonação/desprotonação permitido que a informação da massa molecular seja preservada. A necessidade de se obter, simultaneamente, a informação da massa molecular e o detalhamento estrutural foi o impulso necessário para o desenvolvimento da espectrometria de massas tandem que permite a ionização branda e, com um arranjo de analisadores de massa intermediados por uma câmara de colisão, a fragmentação controlada dos compostos a serem analisados. Apesar de todas essas melhorias a espectrometria de massas era restrita a gases, substâncias voláteis e termicamente estáveis porque a ionização destas era conduzida sob condições de baixa pressão. Isto porque para que as leis físicas que regem o equacionamento da trajetória dos íons quando estes passam pelo analisador de massas são deduzidas considerando o sistema evacuado e porque se existissem moléculas gasosas quaisquer no sistema os íons a serem analisados poderiam colidir com estas, o que poderia

resultar em novas fragmentações, rearranjos e perdas quaisquer. Estes tipos de eventos contribuiriam para aumentar a complexidade dos espectros obtidos dificultando, assim, a sua interpretação. A dificuldade existente era compatibilizar o sistema de alto vácuo do analisador de massas com maiores pressões na fonte de ionização para que moléculas mais pesadas e menos voláteis pudessem ser analisadas. O desenvolvimento das técnicas de ionização a pressão atmosférica foi o grande avanço que contornou esse problema e permitiu o acoplamento com HPLC e, com isso, o aumento do número de compostos analisáveis por espectrometria de massas. As pesquisas objetivando melhorar as fontes de ionização continuam avançando e aumentando a gama de compostos analisáveis por espectrometria de massas. A Figura 7 esquematiza um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo especificando as funções de cada parte do equipamento.

Figura 7: Esquema das partes de um espectrômetro de massas com triplo quadrupolo, utilizado para experimentos de espectrometria de massa tandem (ANALYTICAL CHEMISTRY, 1984)

A tabela 1 mostra os modos de operação que podem ser executados neste equipamento. Vemos a variedade de experimentos que podem ser realizados para se obter informações estruturais de substâncias com estrutura desconhecida.

Tabela 1: Modos de operação que podem ser executados no equipamento acima mencionado.(ANALYTICAL CHEMISTRY, 1984)

Modo de operação	Quad Q1	Quad Q2	Quad Q3	Resultado
MS	Separação por massa	Todas as massas passam (sem gás de colisão)	Todas as massas passam	Espectro de massas normal.
Filhos	Massa específica fixada	Todas as massas passam (Com gás de colisão)	Separação por massa	Espectro de todo íons filhos do íon pai selecionado.
Pais	Separação por massa	Todas as massas passam (Com gás de colisão)	Massa específica fixada	Espectro dos íons pais cujo fragmento da origem a um íon filho específico.
Perda de massa neutra	Separação por massa	Todas as massas passam (Com gás de colisão)	Separação por massa	As diferenças de massa entre duas varreduras fornece perdas de massas neutras específicas.
Monitoramento de íons selecionados	Massa específica fixada	Todas as massas passam (Com gás de colisão)	Massa específica fixada	Monitoramento de uma ou mais reações.

A Técnica de Ionização Utilizada

Existem várias técnicas de ionização que podem ser utilizadas em espectrometria de massas. Dentre estas podemos citar, as principais: a ionização por impacto eletrônico, a ionização química, o bombardeamento com átomos rápidos (FAB), a ionização química à pressão atmosférica (APCI), a ionização por *electrospray* e a ionização/desorção auxiliada por laser (MALDI). A escolha da técnica depende de uma série de fatores, mas principalmente das características físico-químicas do analito a ser ionizado pois dependendo do modo escolhido a eficiência da ionização é aumentada, produzindo sinais espectrais melhores. O modo de ionização utilizado neste trabalho foi a ionização por *electrospray*, que será mais bem detalhada.

A ionização por *electrospray* é um modo de promover a transferência de íons em solução para a fase gasosa à pressão atmosférica. A energia necessária para levar um íon

do estado solvatado para o estado gasoso é muito alta, maior que a energia necessária para romper uma ligação entre dois carbonos. Se essa energia fosse fornecida ao sistema, de uma vez só, mesmo que por um curto tempo, poderia causar a fragmentação não controlada das espécies. Com o *electrospray* a dessolvatação é conseguida gradualmente por energia térmica em temperaturas relativamente baixas, o que impede a fragmentação das espécies. Por esta característica essa técnica é tida como uma das mais suaves e a que possibilita um melhor controle na fragmentação.

Existem três etapas majoritárias na passagem de íons em solução para íons em fase gasosa por *electrospray*, são elas: (1) a produção de gotas carregadas no capilar; (2) O encolhimento das gotas carregadas pela evaporação do solvente e a desintegração das gotas originando gotas muito pequenas e altamente carregadas capazes de produzir íons em fase gasosa; (3) mecanismo no qual os íons em fase gasosa são produzidos a partir de gotas muito pequenas e altamente carregadas. Essas etapas ficam melhores visualizadas na Figura 8, que segue:

Figura 8: Ilustração mostrando o mecanismo de formação do *spray*. (TITATO, 2004)

Uma diferença de potencial é aplicada entre o capilar e o eletrodo planar que fica em frente a este. Quando esta diferença de potencial é aplicada uma dupla camada elétrica forma-se no interior do capilar, fazendo com que os íons negativos fiquem próximos a parede e os positivos sejam repelidos para a superfície do líquido. Esse enriquecimento de íons positivos na superfície do líquido ocasiona a desestabilização do menisco e um cone (cone de Taylor) forma-se e, posteriormente, gotas com excesso de íons positivos são emitidas para fora do cone. As gotas carregadas começam a diminuir por causa da evaporação do solvente e gotas cada vez menores são formadas. A diminuição do tamanho faz com que aumente a densidade de carga e íons passam a ser ejetados da gota. Assim, íons positivos em fase gasosa são formados e atraídos para o anteparo negativo que os conduz para o interior da região de alto vácuo.

Analizador de massas utilizado

O analisador de massas é o local onde os íons formados serão separados e selecionados de acordo com a sua razão massa/carga. O analisador do tipo quadrupolo foi o analisador utilizado nestes experimentos. Este consiste de dois pares de barras cilíndricas paralelas que estão localizadas entre a fonte de íons e o detector, conforme ilustra a Figura 9. Uma diferença de potencial formada por duas componentes é aplicada entre os dois pares de barras. A primeira componente é o potencial de corrente contínua e a segunda é uma rádio-frequência (RF) alternada. As barras opostas são conectadas eletricamente e a RF faz com que a polaridade das barras se alterne de modo que os íons selecionados dentro de uma faixa de m/z sejam repelidos e atraídos de tal maneira que percorram a trajetória

entre as barras e cheguem até o detector. Aqueles íons que estão fora da faixa de m/z selecionada simplesmente colapsam ao colidirem com as barras.

Figura 9: Ilustração dos componentes de um analisador do tipo quadrupolo. (TITATO, 2004)

3. EXPERIMENTAL

3.1 COLETA DOS FRUTOS

Os frutos foram coletados em árvores da espécie *S. saponaria* localizadas no estacionamento da Prefeitura Universitária da UFSCar. Parte das folhas e frutos coletados nestas árvores foram depositados no herbário do Departamento de Botânica da UFSCar (HUFSCar) sob o número 003651.

3.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os frutos foram lavados com água, escorridos e secos a temperatura ambiente. Após, uma massa de 720 g de frutos tiveram as suas sementes removidas, sendo o restante triturado a seco em liquidificador. O metanol utilizado nas extrações foi destilado no DQ-UFSCar e a água destilada no laboratório de cromatografia do DQ-UFSCar.

Extrato aquoso

Os frutos triturados foram extraídos com água, pela simples imersão destes em um becker contendo água, sob a agitação de um bastão de vidro e deixado em descanso por 1 dia. Após o período de descanso, a solução foi filtrada e colocada em frascos com aberturas largas e curtas para evaporar em temperatura ambiente com ventilação aquecida.

Extrato da espuma

A espuma formada na etapa de extração com água foi recolhida colocada em um becker e solubizada em metanol.

Extrato hidro-metanólico

Outra porção de frutos triturados foi posta em contato com uma solução hidro-metanólica MeOH/H₂O, (1:1, v/v), agitada com bastão de vidro e deixada em repouso por 3 dias. Após o repouso, ela foi filtrada e o excesso de metanol foi evaporado no evaporador rotatório. A solução resultante foi colocada em frascos com aberturas largas e curtas e deixada evaporar em temperatura ambiente com ventilação aquecida.

Extrato metanólico

Os frutos utilizados na extração hidro-metanólica foram batidos no liquidificador com metanol puro, filtrados e deixado em repouso por 1 dia. A solução resultante foi evaporada em evaporador rotatório e como ficou muito viscosa, devido a composição glicosídica alta, foi colocada em frascos com aberturas largas e curtos e deixado evaporar em temperatura ambiente e com ventilação aquecida.

3.3 FRACIONAMENTO EM COLUNA PREPARATIVA

O fracionamento em coluna preparativa foi realizado utilizando uma coluna de vidro com 4 cm de diâmetro preenchida com sephadex LH-20 (especificações) onde o comprimento da fase estacionária foi 120 cm. O metanol utilizado como eluente foi destilado no DQ-UFSCar e a água destilada no laboratório de cromatografia do DQ-UFSCar.

Fracionamento utilizando como eluente MeOH/H₂O (8:2)

A coluna inicialmente foi limpa com metanol puro e posteriormente foi condicionada com 500 mL de MeOH/H₂O (8:2). O extrato metanólico (≈ 8 g) foi dissolvido em 50 mL de eluente, ultra sonicado por 10 minutos para melhorar a solubilização e filtrado em papel filtro comum. Em seguida foi aplicado na coluna e eluído por 3 dias, resultando em 50 frações de 25 mL.

Fracionamento utilizando como eluente MeOH/H₂O (1:1)

Procedeu-se do mesmo modo que o fracionamento anterior, porém a quantidade de extrato dissolvida na fase móvel foi ≈ 10 g. Foi aplicado na coluna e eluído por 5 dias, resultando em 65 frações de 25 mL.

Fracionamento das frações reunidas 41-63 eluída com MeOH/H₂O (1:1)

A coluna inicialmente foi limpa com metanol puro e posteriormente foi condicionada com 200 mL de MeOH/H₂O (1:1) Em seguida foi aplicado na coluna e eluído por 6 horas, resultando em 15 frações de 25 mL.

A Figura 10 mostra uma ilustração esquematizando os procedimentos realizados em cada etapa do fracionamento em cromatografia líquida preparativa.

Figura 10: Ilustração esquemática dos procedimentos realizados no processo de extração e fracionamento em cromatografia líquida preparativa do extrato metanólico.

Fracionamento e enriquecimento em SPE

Um grama de extrato metanólico bruto foi dissolvido em 3 mL acetonitrila/água (ACN/H₂O) (2:8, v/v) e aplicado em um cartucho contendo 2000 mg de octadecilsilano (ODS) como fase estacionária (Macherey Nagel, Chromabond C18). A acetonitrila utilizada foi de grau analítico da marca Baker e a água ultrapurificada Milli-Pore. A eluição das frações foi conduzida sob pressão reduzida em um sistema de vácuo Supelco em um fluxo de 1 mL/min, com a aplicação de 5 mL de eluente com diferentes proporções de ACN/H₂O. O cartucho foi condicionado com 5 mL de ACN/H₂O (2:8, v/v) com um fluxo de 1,5 mL/min. Inicialmente a amostra foi aplicada sob ação da gravidade, porém como a consistência desta era muito viscosa e o tempo de aplicação estendeu-se muito a pressão do sistema foi reduzida para que aplicação fosse concluída. Após a aplicação da amostra esta foi eluída com água pura, ACN/H₂O (2:8) e por fim ACN pura. A fração eluída com acetonitrila foi utilizada para um fracionamento posterior. Um volume correspondente a 5 mL da fração eluída com ACN pura foi aplicada em um cartucho de 2000 mg de ODS e eluída com o seguinte sistema de eluição: gradiente de ACN/H₂O nas seguintes proporções: 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3 e 8:2, v/v. Todas estas frações foram submetidas a análise de CZE.

3.4 ANÁLISES DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS

As análises de ESI-MS foram realizadas por inserção direta em um espectrômetro de massas Micromass Quattro LC, com analisador triplo quadrupolo. As amostras foram diluídas em metanol (Baker) e injetadas em um *loop* de 10 µL e

carregadas para o interior da fonte de ionização com o auxílio da fase móvel ACN/H₂O (1:1, v/v). O gás de nebulização e dessolvatação utilizado foi nitrogênio (White Martins). Os parâmetros do *tuning* foram otimizados para cada análise e são descritos nas legendas dos espectros. A temperatura do bloco da fonte: 135 °C; temperatura de dessolvatação: 420 °C. O programa para operação do equipamento e tratamento dos dados foi o Masslynx 3.3 (Micromass).

3.5 ANÁLISES DE ELETROFORESE CAPILAR

As análises de eletroforese capilar foram realizadas em um aparelho de eletroforese capilar, HPCE 3D HEWLETT PACKARD. As dimensões dos capilares utilizados bem como os parâmetros do tampão, voltagem e comprimento de onda analisados estão especificados na legenda de cada eletroferograma. Um pré-condicionamento do capilar foi realizado antes de cada injeção. Este foi realizado pelo bombeamento de NaOH 0,1 mol L⁻¹ por 1 minuto, água por 1 minuto de água e o tampão da análise por 3 minutos.

3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES

As soluções tampão estoques foram preparadas em concentrações mais elevadas e estas diluídas no máximo até um volume duas vezes maior, para garantir que a capacidade tamponante destas não fosse esgotada. A água utilizada no preparo de todas as soluções foi ultrapurificada em sistema Milli-Q. Estas soluções foram filtradas

em filtro de membrana com 22 μ m de poro, eram levadas à temperatura ambiente e degaseificadas sempre antes da diluição.

Solução estoque de dodecilsulfato de sódio 500 mmol L⁻¹

A solução estoque de SDS na concentração de 500 mmol . L⁻¹ (2,8838 g em 0,20 L) foi preparada pela adição de 3,0356 g de SDS 95% (J. T. Baker) em 20 mL de água. Antes do volume final ser completado algumas gotas de diclorometano foram adicionadas com o objetivo de diminuir a espuma e preservar a solução. Todas as outras soluções contendo SDS foram preparadas a partir da diluição desta.

Solução tampão estoque fosfato de sódio 20 mmol L⁻¹

O tampão fosfato de sódio foi preparado pela neutralização de uma solução 20 mmol L⁻¹ de Na₂HPO₄ 7 H₂O (1,3404 g em 0,25 L de água) (Mallinckrodt) com uma solução 20 mmol L⁻¹ de H₃PO₄ (137 μ L de H₃PO₄ p.a em 0,1 L) até pH 8. Após a solução foi transferida para um balão volumétrico de 200 mL. Essa solução foi utilizada para preparar os tampões na concentração de 20 e 10 mmol L⁻¹, pH 8.

Solução tampão estoque borato de sódio 150 mmol L⁻¹

A solução foi preparada pela neutralização de uma solução 150 mmol L⁻¹ de ácido bórico (0,9275 g em 0,1 L) (Vetec) com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (Mallinckrodt) até pH 9,0.

Solução tampão estoque borato de sódio 20 mmol L⁻¹

A solução foi preparada pela neutralização de uma solução de ácido bórico (0,3092 g em 0,25 L) (Vetec) com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de NaOH (Mallinckrodt) até pH 9,1.

Soluções dos tampões de corrida

Em um balão de 25 mL, foram adicionado 20 mL de solução estoque de tampão fosfato ou borato quando a concentração era 20 mmol L⁻¹ e 10 mL quando a concentração era 10 mmol L⁻¹. Um volume de solução estoque 500 mmol L⁻¹ de SDS era adicionado para se obter a concentração de SDS desejada. Em seguida o volume era completado com água até 25 mL.

Solução da Fração B

A massa de 2,0778 g da fração B foi dissolvida em 25 mL de água.

Solução mista 100 mmol L⁻¹ de SDS/fração B

Esta solução foi preparada pela adição de 2 mL de SDS 500 mmol L⁻¹ em 8 mL da solução da fração B.

Solução tampão borato pH 9,1 10 mmol L⁻¹ 50 mmol L⁻¹ SDS/Fração B

Esta solução foi preparada pela adição de 2,5 mL de solução tampão estoque borato 20 mmol L⁻¹ em 2,5 mL de solução mista 100 mmol L⁻¹ SDS/fração B

4. DISCUSSÃO E APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

O presente trabalho foi desenvolvido em duas etapas distintas: uma envolvendo conhecimentos de química orgânica e outra, conhecimentos de química analítica. A primeira etapa consistiu na tentativa de isolamento e caracterização das saponinas de *S. Saponaria*. Nesta os conhecimentos desenvolvidos foram de técnicas de separação em escala preparativa, analítica, conhecimento de espectrometria de massas como técnica de caracterização. A segunda etapa envolveu o conhecimento de técnicas eletroforéticas de separação, porém sem identificação dos compostos pela ausência de um padrão para auxiliar as análises e também ausência de um detector de massas acoplado ao equipamento de eletroforese. Dois modos de eletroforese capilar foram utilizados para a separação dos extratos, CZE e MEKC, e os resultados foram comparados qualitativamente.

4.1. EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO

4.1.1. ANÁLISES DAS FRAÇÕES POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O monitoramento das frações por espectrometria de massas foi realizado utilizando o modo de ionização *electrospray* negativo e os íons analisados por um sistema quadrupolar. O modo negativo envolve espécies desprotonadas, então quanto mais grupos com facilidade para doar prótons forem encontrado na espécie analisada, melhor será a eficiência de ionização. Algumas das saponinas de *Sapindus saponaria* possuem grupos ácidos na aglicona o que facilita o processo de desprotonação/ionização

tornando o modo eficiente e sensível para a análise destes compostos. As principais informações adquiridas por espectrometria de massas são: a massa molecular obtida a partir do íon molecular desprotonado e, por experimentos de fragmentação, a identificação de grupos funcionais com padrões de fragmentação conhecidos.

Os principais tipos de fragmentações envolvidos na análise as saponinas são a quebra da ligação glicosídica, as perdas de unidades monossacarídeas e as perdas de grupos acetatos. Os acetatos podem sair na forma de ácido acético e $\text{H}_2\text{C}=\text{C}=\text{O}$, que possuem massas 60 e 42 Da, respectivamente. Os picos na faixa de 800-1000 Da que diferem por estas massas indicam saponinas com diferentes graus de acetilação. A partir da saponina desacetilada, com massa 882 Da (MURGU, 2002), podemos chegar aos fragmentos gerados pela perda parcial e total das unidades monossacarídeas. Um fragmento importante é o m/z 472 que corresponde à massa da aglicona não protonada. Essa informação é importante, pois quando um espectro de massas normal (definido na tabela 1) é gerado, a presença deste íon pode indicar que uma fragmentação precoce está ocorrendo na fonte. Enquanto que em experimentos de MS/MS a presença deste fornece meios de se obter a confirmação da presença das saponinas no extrato. Com base nestas informações a espectrometria de massas foi utilizada para acompanhar a composição das frações eluídas nas colunas preparativas com sephadex.

4.1.2. ESCOLHA DO EXTRATO A SER FRACIONADO

Os extratos dos frutos de *Sapindus saponaria* compõem-se basicamente de oligoglicosídeos sesquiterpênicos alicíclicos (OGSA) e saponinas, sendo estas menos polares que os primeiros. Inicialmente o interesse estava voltado para as saponinas, mas

com o decorrer do trabalho os OGSA se mostraram interessantes, pois eles também possuem propriedades tensoativas, embora produzam espuma em menor quantidade e menos estável do que as saponinas.

Quando os frutos foram extraídos com água, uma espuma abundante formou-se na superfície da solução de extração. Essa espuma foi coletada e solubilizada em metanol e analisada juntamente com os demais extratos obtidos. O perfil de massas destes extratos (aquoso, hidrometanólico, metanólico e da espuma) foi investigado por espectrometria de massas antes da realização do fracionamento, pois seria interessante fracionar um extrato cuja composição fosse enriquecida em saponinas. No espectro apresentado na Figura 11 os sinais foram adquiridos até a m/z 1200 e os sinais 882, 924, 966 correspondem aos íons de algumas saponinas desprotonadas que diferem por 42 Da, o que equivale a perda de um acetato. Os sinais 1002, 1116, 1146 e 1188, correspondem aos íons de OGSA desprotonados, os quais foram isolados anteriormente. (MURGU, 2002).

Na Figura 11 (A) o sinal em m/z 1188 tem intensidade pouco superior a dos picos 966 e 924, indicando que, nesta amostra, a quantidade de moléculas com estas massas é aproximadamente igual enquanto que em (B) as intensidades mostram uma diferença maior.

Figura 11: Espectro de massas (A) extrato metanólico e (B) extrato hidrometanólico. Condições de análise: *electrospray* no modo negativo, os parâmetros do tuning foram otimizados para cada amostra.

O sinal em m/z 966, correspondente a uma saponina, tem um ligeiro aumento na sua intensidade, quando o comparamos com o sinal em m/z 1188 no (A) e no (B). Isto sugere um enriquecimento da saponina com massa 967 no extrato metanólico. Porém, a diferença mais significativa mostra-se na relação entre os picos 686 e 710. Estas massas estão fora da faixa de massa das saponinas e a sua discussão não é necessária.

A Figura 12 mostra os espectros dos extratos: aquoso (superior) e da espuma (inferior). Podemos observar que a composição predominante é de OGSA, principalmente os de maiores massas moleculares, que são mais polares. O espectro da espuma mostra-se enriquecidos em substâncias mais apolares do que as presentes no extrato aquoso. Os OGSA's de menores massas aparecem em intensidade maior do que os de maiores massas moleculares.

Figura 12: Espectro do extrato aquoso (superior) e da espuma (inferior). Condições de análise: *electrospray* no modo negativo, os parâmetros do tuning foram otimizados para cada amostra.

A saponina majoritária da mistura é a que possui a massa 967, portanto, aquele extrato que a contém em quantidade maior comparativamente às outras substâncias presentes na mistura, é o mais desejável para o fracionamento. Analisando o conjunto de espectros mostrados vemos que diferenças pouco significativas foram encontradas. Mesmo assim essas pequenas diferenças foram consideradas. O extrato aquoso e o da espuma mostram a região de massa das saponinas muito limpas e por isso o extrato metanólico foi escolhido para o fracionamento.

4.1.3. FRACIONAMENTO POR CROMATOGRÁFIA DE EXCLUSÃO POR TAMANHO

A primeira etapa de fracionamento escolhida foi a cromatografia de exclusão por tamanho utilizando como fase estacionária a resina Sephadex LH-20, pois os componentes do extrato são bastante polares e isso poderia acarretar dificuldades, como por exemplo, adsorção irreversível, se a sílica fosse utilizada. Outro fator motivante é que esta resina possui uma característica dual. Na sua estrutura existem grupos polares e apolares que, dependendo da polaridade do solvente de eluição, se conformam de tal maneira que provocam uma expansão ou contração tridimensional da esfera polimérica, alterando o tamanho dos poros de cada uma delas. Em solventes polares os canais expandirão de modo a se estreitarem. Em solventes apolares ocorre contração tridimensional e, assim, o alargamento dos canais. Pela variação da polaridade da fase móvel podemos “ajustar” o tamanho dos poros para se obter uma melhor seletividade na separação dos compostos desejados, visto que estes possuem massas moleculares bastante próximas.

A Figura 13 ilustra: (A) a representação microscópica do gel empacotado e (B) a estrutura química do gel. As ligações entrecruzadas promovem uma maior resistência ao gel e possibilitam o uso de solventes com polaridades diversas. A hidróxi-propilação confere ao gel a característica apolar enquanto que as unidades sacarídeas a polar.

Figura 13: Representação microscópica do gel. (A) Estrutura microscópica das esferas do gel polimérico empacotado, v_0 é o volume intersticial, v_i é o volume do poro e a porção preta é a matriz do gel. (B) Estrutura polimérica do gel de dextran hidroxipropilado com cadeias entrecruzadas.

O limite de exclusão da sephadex LH-20 é 4000 Da, ou seja, substâncias com massas moleculares acima deste valor não podem ser separadas, eluirão todas juntas e primeiro que qualquer outro composto. Os compostos orgânicos com massas moleculares abaixo de 1000 Da, podem se adsorver na fase e, por isso, necessitar de um eluente com força adequada para que eles saiam da coluna. Quando em meio polar os grupos polares presentes na estrutura da Sephadex LH-20 tendem a se expor de modo que tenham um contato maior com o solvente de eluição. Assim, esta fase funciona como fase normal permitindo que compostos polares sejam adsorvidos. Como a faixa de massa das saponinas está próxima desse limite (entre 800 e 1000 Da) o efeito de exclusão por tamanho poderia não atuar sozinho. O uso de metanol puro não seria uma boa opção para o começo do fracionamento, pois existia a possibilidade dos glicosídeos com massa abaixo de 1000 Da interagir com a fase por adsorção. Um solvente mais polar evitaria que, se ocorresse interação, os glicosídeos ficassem retidos e prejudicasse

a separação. A eluição isocrática com a fase móvel metanol/água (8:2 v/v), foi a primeira tentativa de investigação da separação de saponinas em sephadex LH-20, tendo em vista essa incerteza quanto ao mecanismo de separação.

4.3.1.1. FRACIONAMENTO MEOH/H₂O (8:2)

O extrato metanólico, dissolvido em uma pequena quantidade de fase móvel, foi aplicado na coluna e eluído por 3 dias resultando em 50 frações. O perfil de cada uma destas foi monitorado por cromatografia de camada delgada (TLC). Apesar de não ter-se obtido uma boa resolução, a partir do perfil de TLC essas frações foram reunidas. Algumas frações foram analisadas por espectrometria de massas antes da reunião. Além da espectrometria de massas, as frações obtidas com eluição MeOH/H₂O (8:2) foram analisadas por HPLC analítico.

A HPLC é uma técnica eficiente para a separação de misturas e possibilita a observação da complexidade da mistura a ser analisada. Já como método de identificação dos compostos numa mistura é mais restrita e requer alguns cuidados quando esse é o objetivo desejado. A análise quantitativa em HPLC requer o uso de um padrão para que o tempo de retenção deste seja comparado com os componentes da mistura separada. Ainda que o tempo de retenção de um analito qualquer seja exatamente o mesmo que o do padrão, não podemos afirmar que ambos os picos correspondem à mesma substância. O que podemos dizer é que se os tempos de retenção não coincidem, os compostos correspondentes não são os mesmos. A HPLC, por si só, permite excluir possibilidades, mas não confirmar a identificação de substâncias. A identificação do(s) composto(s) presentes no pico requer uma avaliação,

primeiro da pureza do pico, ou seja, se neste existe apenas uma substância ou não e, posteriormente, o uso de algum método espectroscópico ou espectrométrico para a identificação da substância. Uma maneira de investigar a pureza de um pico é o uso de detectores com sistema de varredura onde cada ponto do cromatograma é analisado. A utilização de um cromatógrafo com detecção por ultravioleta, com um detector com arranjos de diodos, permite essa varredura. Com esse tipo de detecção em cada ponto do cromatograma é feito uma análise espectral em uma faixa de comprimentos de onda de interesse. Assim, se o espectro de ultravioleta em cada ponto do pico for idêntico podemos afirmar que este é composto por uma única substância. Outro tipo de detector que permite essa análise é o detector de massas, que pode ser programado para fazer um espectro de massas em cada ponto do cromatograma. Além de fornecer a pureza do pico, este fornece dados de massa molecular e possibilita a fragmentação da molécula de modo a permitir um detalhamento estrutural do composto. Outras técnicas de identificação como espectroscopia no infra-vermelho, NMR e técnicas relacionadas, podem complementar os resultados obtidos em HPLC.

No caso das saponinas de *Sapindus saponaria* para conseguir o padrão seria necessário isolar uma saponina parecida com estas para utilizá-la. Porém, como foi anteriormente explanado, não temos certeza do tempo de retenção nem quando o padrão é idêntico que dirá de um composto semelhante. Além disso, esse tipo de trabalho nos desviaria do objetivo inicial. Desta maneira os cromatogramas das frações serviram para nos dar uma noção do grau de complexidade das frações obtidas. Todos os cromatogramas foram obtidos utilizando uma coluna de C18 (15 cm x 4.6 mm) e eluído com um gradiente de ACN/H₂O, mostrado na Figura 14.

Figura 14: Gráfico mostrando o gradiente de eluição utilizado para as análises de HPLC.

A Figura 15 mostra o cromatograma da fração 16. A partir dessa fração até a fração 19 observamos o mesmo perfil de compostos. Alguns destes são bastante polares, pois eluem antes de 5 minutos quando temos apenas 10% de ACN. Porém, a maioria possui polaridade intermediária (16-22 min). Vemos, também, outros dois picos, um pouco antes de 25 e outro pouco depois de 35 min que apareceram em todas as frações desde a 15 até a 26. Observando a região de 16-22 min no detalhe podemos ver a complexidade desta fração.

Figura 15: Cromatograma da fração 16 da coluna MeOH/H₂O (8:2).

O cromatograma da fração 20, na Figura 16, mostra uma diminuição no número de compostos que eluem entre 16 e 22 min. O par de picos mencionado anteriormente continua eluindo antes de 25 min e depois de 35 min. O perfil das frações seguintes seguiu mais ou menos como este, porém, apresentou um novo pico eluído em 54 min a partir da fração 21 até a 26.

O resultado foi o agrupamento das frações 20-26, originando a fração (A), contendo maior quantidade de saponinas, enquanto que as frações iniciais 16-19, que originaram a fração (B), estavam enriquecidas em OGSA.

Figura 16: Cromatograma da fração 20 da coluna MeOH/H₂O (8:2).

A Figura 17 mostra o espectro de massas da fração reunida 16-19 (Fração B) (inferior) e da fração reunida 20-26 (Fração A) (superior). Comparando os dois espectros vemos claramente a diferença entre as composições das frações, a primeira enriquecida com OGSA's de maiores massas moleculares, e a segunda enriquecida em saponinas. Aparentemente, o processo de separação ocorreu por exclusão por tamanho visto que as moléculas maiores eluíram primeiro enquanto que as menores eluíram depois.

Figura 17: Espectro de massas das frações reunidas 16-19 fração B(inferior) e das frações reunidas 20-26 fração A (superior). Condições de análise: *electrospray* no modo negativo, os parâmetros do tuning foram otimizados para cada amostra.

Comparando os dois espectros vemos um nítido enriquecimento das saponinas nas frações mais retidas, porém percebemos que as frações menos retidas, apesar de ter um enriquecimento em OGSA's apresentam picos de pequena intensidade das saponinas mostrando que a composição do eluente pode ainda ser otimizada de modo a alcançar uma resolução melhor na separação. Vemos, também, que a pequena diferença de massa entre os compostos majoritários do extrato requer condições de inchamento do gel mais acentuadas de modo a tornar os poros menores e aumentar o volume de eluição das saponinas. Essas condições podem ser alcançadas aumentando a polaridade do eluente. Assim, um novo fracionamento utilizando um eluente com maior proporção de água foi efetuado.

4.1.3.2. FRACIONAMENTO MEOH/H₂O (1:1)

Como uma boa resolução utilizando MeOH/H₂O (8:2 v/v) não foi totalmente alcançada, optou-se por realizar um novo fracionamento para obter frações mais purificadas e também para estudar o comportamento da separação diante de um aumento na polaridade do eluente e, assim, verificar se o processo é dominado unicamente por exclusão por tamanho ou se existe alguma força adsortiva agindo na

separação. O conhecimento mais aprofundado do processo de interação dos componentes do extrato com a sephadex LH-20 permite que as separações posteriores possam ser melhores conduzidas e frações obtidas mais puras.

A eluição com MeOH/H₂O (1:1) foi ainda mais demorada que a etapa anterior pois as condições de inchamento foram mais acentuada, indicando uma separação, se dominada apenas por exclusão, melhorada. As análises das frações 12, 24, 49 e 62 mostram o perfil da composição ao longo da separação com o eluente MeOH/H₂O (1:1). A escolha das frações a serem monitoradas foi baseada em análises de cromatografia de camada delgada combinada com a observação do aspecto visual dos compostos obtidos em cada fração. A Figura 18 mostra um conjunto de espectros que mostra o enriquecimento das frações mais retidas com as saponinas enquanto que as menos retidas são enriquecidas em OGSA's.

Figura 18: Conjunto de espectro de massas das frações eluídas com MeOH/H₂O (1:1). Debaixo para cima: fração 12, 24, 49 e 62.

Comparando os espectros das frações 49 e 62, por exemplo, os picos 882, 924, 966 Da correspondem a saponinas com diferentes graus de acetilação: a de massa 882 Da é a menos acetilada e mais polar, enquanto que a de massa 966 Da é a mais acetilada e menos polar. A fração 49 é mais enriquecida com a 924 Da (mais polar) enquanto que a fração 62 mais enriquecida com a 966 Da (menos polar) enquanto que a mais polar de todas começa a sair já na fração 24 e assim vai até a fração 62, o que pode indicar que algum fenômeno adsorptivo ocorreu, embora o maior efeito observado foi a exclusão por tamanho.

A partir destes dados de espectrometria de massas as frações 49-62 foram reunidas originando a fração (C). Esta fração ainda apresentava uma coloração mais acentuada e com o objetivo de livrá-la destes possíveis pigmentos ela foi submetida a outro fracionamento.

A fração (C) foi fracionada, mais uma vez com sephadex LH-20, utilizando MEOH/H₂O (1:1), as frações 7-10 desta coluna foram reunidas e deram origem a fração livre da coloração, que foi denominada fração (P).

Após a obtenção destas frações enriquecidas a técnica de HPLC preparativa foi utilizada para tentar o isolamento. Transpondo o sistema analítico para o preparativo, utilizando coluna de ODS e ACN/H₂O como eluente algumas tentativas foram realizadas. Porém, o sistema utilizado não permitia fazer eluição gradiente como no analítico e, devido a baixa detectabilidade dos compostos ocorreu que em várias situações os picos não eram observados e as frações coletadas dos picos que eram observados, quando analisadas por massas não indicavam a presença de saponinas. O efluente da coluna foi evaporado e o resíduo analisado por massas. O espectro da Figura 19 mostra a composição do resíduo. Podemos observar os íons 882, 924, 966, correspondem às saponinas não acetiladas e acetiladas. Além dos íons correspondentes outros íons foram detectados mostrando que a amostra não estava pura. O pico 472 confirma a presença de saponinas no resíduo.

Figura 19: Espectro de massas do resíduo evaporado do efluente da coluna de HPLC analítico.

4.1.4 CONCLUSÕES DA PRIMEIRA ETAPA

A partir dos resultados obtidos nestes processos de separação constatamos que apesar das tentativas de purificação, os extratos obtidos estavam enriquecidos em saponinas, porém, continuavam altamente complexos e com vários componentes. Isto porque os compostos presentes nos frutos possuem muitos isômeros por causa da mudança na posição dos acetatos nos açúcares, tanto de saponinas quanto dos OGSA's.

A Sephadex LH-20 é uma fase adequada para fazer uma separação entre as duas classes de compostos presentes majoritariamente no extrato, porém outras técnicas devem ser utilizadas para o isolamento completo. Aparentemente, o mecanismo de exclusão predominou frente ao de adsorção.

A massa restante das frações foram 390 mg (fração C), 253 mg (fração A) e 2,0778 g (fração B). Assim, devido à complexidade e pouca massa das frações enriquecidas em saponinas alguns ensaios eletroforéticos foram propostos a fim de averiguar como seria o comportamento dos analitos frente às técnicas eletroforéticas de separação. Além disso, a fração com maior massa obtida, embora enriquecida em OGSA's, foi utilizada para os testes como aditivo no tampão de corrida para a observação do comportamento da separação de β -naftol e nitrobenzeno frente ao tampão aditivado.

4.2. ANÁLISES ELETROFORÉTICAS

Como mencionado anteriormente, as massas finais das frações obtidas foram: 390 mg (fração C), 253 mg (fração A) e 2,0778 g (fração B). Estes resultados foram determinantes para a condução dos experimentos na próxima etapa do trabalho, que consistia em utilizar estas frações como aditivos para tampão de corrida em MEKC. Como um grau de purificação elevado não foi obtido e as massas finais das frações enriquecidas em saponinas foram pequenas esta etapa foi subdividida em duas partes: a análise eletroforética das frações enriquecidas em saponinas e o uso da fração B como aditivo de tampão de corrida em MEKC.

Alguns fatos que dificultaram a execução desta etapa foram: a ausência de um padrão de saponinas, a baixa detectabilidade destas com detector de ultravioleta aliada ao pequeno caminho óptico do capilar de eletroforese (50 μ m).

A análise de eletroforese capilar é rápida e a instrumentação simples de ser utilizada. As soluções tampões devem ser preparadas adequadamente para que a

reprodutibilidade e repetibilidade das análises sejam alcançadas. Estas devem ser preparadas o mais próximo possível do início das análises e conservadas sob refrigeração por poucos dias após o preparo. Para manter certa reprodutibilidade na força iônica do sistema as soluções tampão são preparadas em grande quantidade e diluídas adequadamente na hora do uso.

4.2.1. ANÁLISES ELETROFORÉTICAS DAS FRAÇÕES

A aplicação da eletroforese capilar para a análise de metabólitos secundários de plantas tem se destacado bastante desde o início da década de 90. Análises de uma grande variedade de classes de produtos naturais têm sido relatadas, como por exemplo, alcalóides, flavonóides, ácidos fenólicos, etc. Apesar desta grande variedade de classes, relatos sobre análise de saponinas não carregadas e não ionizáveis são escassos na literatura. ([TOMAS-BARBERAN, 1995](#)) Os poucos relatos sobre análises eletroforéticas de saponinas são muito recentes. Sendo esta uma importante classe de produtos naturais, com extensa atividade biológica e presente em muitas ervas da medicina tradicional chinesa, entre outras, estudar o comportamento eletroforéticos de extratos contendo saponinas revela-se bastante interessante, principalmente, pelos poucos estudos a respeito das saponinas de *Sapindus saponaria*.

Inicialmente, o interesse era utilizar as frações obtidas como aditivo para o preparo de tampão em eletroforese, porém com a pequena massa final das frações enriquecidas em saponinas conseguida, tornou-se mais coerente estudar o comportamento eletroforético destas frações e utilizar a fração com maior massa para os testes eletroforéticos.

Os dois modos de eletroforese que podem ser utilizados para a análise das saponinas estudadas são a CZE e a MEKC. Existem relatos na literatura utilizando ambos os modos para a análise de glicosídeos desta classe. (GLÖCKL, VEIT e BLASCHKE, 2002; EMARA, 2001) A eletroforese capilar é uma técnica de separação que, como HPLC, não permite a identificação dos compostos sem a ajuda de um padrão, portanto, os estudos eletroforéticos das frações serão comparativos, sem que seja possível a identificação de cada pico. A ausência de um padrão específico para as saponinas de *S. saponaria* impossibilita a quantificação ou qualificação cada pico dos eletroferogramas, porém podemos investigar como é o comportamento dos extratos frente à eletroforese.

O tampão de corrida mais comumente utilizado em CZE para a separação de carboidratos é o borato. Para promover a separação de extratos ricos em saponinas é necessário induzir uma carga nestes compostos, nas condições da eletroforese, para que possam migrar através do capilar. Tornou-se necessário a complexação da porção monossacarídeas das saponinas com borato para que uma carga negativa fosse induzida. A magnitude desta carga é determinada pela posição do equilíbrio e da estabilidade dos complexos.

As frações solubilizadas em MeOH consistiram de amostras com matrizes pouco condutiva e, nas primeiras tentativas de injeção, mesmo uma pequena zona de amostra ocasionava a interrupção do contato elétrico fazendo a corrente cair a zero. Matrizes pouco condutivas, quando não chegam a esse extremo, são interessantes quando o analito se encontra em baixa concentração, pois o fenômeno observado nessas condições, denominado *stacking*, muitas vezes é utilizado para fazer a pré-concentração do analito em zonas estreitas, possibilitando um aumento da sensibilidade. O *stacking* da zona da amostra pode se entendido levando-se em conta a Lei de Ohm expressa na

equação (17), onde E é o campo elétrico, IR_1 é o produto da corrente e da resistência na zona 1, IR_2 é o produto da corrente e da resistência na zona 2 e L_1 é o comprimento da zona 1 e L_2 o comprimento da zona 2.

$$E = \frac{IR_1}{L_1} + \frac{IR_2}{L_2} \quad (17)$$

A zona da amostra e a zona do tampão são análogas a dois resistores em série. Se a zona da amostra tem baixa condutividade, a magnitude do campo elétrico nela é alta, portanto, as espécies terão uma velocidade maior nesta zona do que na zona do tampão. Quando estas espécies chegarem rapidamente na interface, entre a zona da amostra e a zona do tampão, serão freadas, pois passarão para uma zona com menor campo elétrico e menor velocidade. A consequência da frenada é a compressão da zona. Assim, grandes volumes de amostra podem ser injetados aumentando a sensibilidade sem que ocorra prejuízo na resolução da separação. O problema inicial foi a matriz com condutividade muito baixa e, por isso, a análise não se completava devido à interrupção do contato elétrico. A solução desse problema foi a adição de uma ou duas gotas do tampão na amostra. Após, as injeções procederam normalmente sem acarretar prejuízo na resolução dos picos obtidos. A Figura 20 mostra o eletroferograma da fração (A).

Primeiramente, a fração A, solubilizada em MeOH, foi analisada em sistema contendo borato puro (Figura 20) e com borato/SDS (Figura 21), afim de se verificar o comportamento desta frente aos dois tipos de eletroforese.

Figura 20: Eletroferograma da fração (A) utilizando borato puro. Modo CZE.

O próprio metanol da amostra serviu como marcador de fluxo que aparece no eletroferograma da Figura 20 em 2 min. Podemos observar que uma boa separação da fração (A) foi alcançada. As espécies presentes na fração migraram como ânions com baixa mobilidade eletroforética em um curto tempo de análise e com resolução satisfatória. Apesar da alta concentração de borato (150 mmol L^{-1}), a corrente se estabilizou e não superaqueceu o capilar.

Já na Figura 21, a mesma amostra foi analisada utilizando tampão borato e SDS, no modo MEKC. A concentração de borato utilizada foi de 20 mmol L^{-1} um tanto baixa para que o efeito da complexação pudesse ser mais efetivo que a partição com a micela. Assim, o mecanismo de separação preponderante é o particionamento das espécies neutras com as micelas. As análises utilizando MEKC para essa fração, utilizando tampões com diferentes concentrações de borato e SDS, não foram

satisfatórias, pois uma boa separação não foi alcançada. O melhor eletroferograma obtido está apresentado na Figura 21.

Figura 21: Eletroferograma da fração (A) utilizando borato/SDS. Modo MEKC.

As análises em MEKC resultaram em separações com pobre resolução como as da Figura 21. A partir destes primeiros testes, a CZE foi o modo que garantiu melhor separação das frações e como o objetivo era comparar qualitativamente as frações, as demais foram analisadas por CZE. A Figura 22 mostra o eletroferograma da fração (C). O perfil eletroforético deste foi bastante semelhante ao da Figura 20, porém os dois picos entre 2,5 e 3 minutos tiveram menor resolução.

Figura 22: Eletroferograma da fração (C) utilizando borato puro. Modo CZE.

O fluxo eletrosmótico foi reproduzido indicando que o pré-condicionamento foi efetivo antes de cada análise e garantiu que nada ficasse adsorvido no capilar. A Figura 23 mostra o eletroferograma da fração (P). Neste podemos observar uma boa separação e poucos picos o que confirma a maior purificação desta fração.

Figura 23: Eletroferograma da fração (P) utilizando borato puro. Modo CZE.

Os picos que aparecem entre 2,5 e 3 min estão presentes nas três amostras enquanto que somente a fração A mostra alguns compostos mais retidos. As espécies complexadas adquirem carga negativa migrando com velocidade menor do que a do EOF. Assim, aquelas que formam um complexo mais estável ficam mais tempo no capilar.

Além das frações obtidas pelo fracionamento em Sephadex LH-20, o extrato metanólico bruto também foi fracionado utilizando a SPE. Esta técnica é aplicada, muitas vezes, como um passo importante no preparo de amostras, principalmente quando estas são constituídas por matrizes complexas, como é o caso de extratos de plantas.

O pré-tratamento da amostra objetiva melhorar a seletividade, a detectabilidade, a confiabilidade, a exatidão e a repetibilidade das análises. Estes objetivos podem ser alcançados pela remoção seletiva de componentes da matriz da

amostra que possam ocasionar interferência na análise. A SPE pode ser utilizada em vários modos de operação: concentração ou enriquecimento do analito, isolamento do analito (*clean-up*) e isolamento da matriz. É uma etapa rápida, econômica e versátil para o preparo da amostra antes da análise. Por isso esta técnica foi escolhida para fracionar o extrato bruto e suas frações foram analisadas por CZE e comparadas com as frações obtidas no fracionamento com Sephadex LH-20.

O extrato metanólico dissolvido em ACN/H₂O (2:8) foi aplicado em um cartucho de SPE contendo 2000 mg de ODS. Após a aplicação da amostra esta foi eluída com água pura, ACN/H₂O (2:8) e por fim ACN pura. A fração eluída com acetonitrila foi utilizada para um fracionamento posterior. Esta foi aplicada novamente em outro cartucho e eluída com diferentes composições de ACN/H₂O 2:8, 3:7, 4:6, 5:5, 6:4, 7:3, 8:2. O estudo eletroforético destas frações foi realizado por CZE.

O perfil da separação destas frações foi semelhante ao das frações obtidas em Sephadex LH-20, mas do mesmo modo, outras técnicas de separação devem ser utilizadas para se obter as saponinas purificadas. Esta observação indica que a SPE pode ser utilizada como técnica de preparo de amostra para estudos posteriores de enriquecimento das frações. A Figura 24 mostra o eletroferograma da fração do extrato eluída com ACN/H₂O (3/7).

Figura 24: Eletroferograma da fração do extrato bruto eluída com ACN/H₂O (3/7) em um catucho de SPE com C18.

Esta fração foi a que se apresentou menos complexa e a que apresentou menor quantidade de picos quando comparada às frações obtidas em sephadex. Desta forma, um enriquecimento foi obtido especificamente para os picos que saem entre 2 e 2,5 minutos.

4.2.2. *TESTE DA FRAÇÃO B COMO ADITIVO PARA MEKC*

A Fração B é constituída pelas frações 16-19 da coluna eluída com MeOH/H₂O (8:2 v/v). Conforme o espectro da Figura 18, podemos ver que a composição majoritária desta fração é de OGSA's, vemos também, que alguns picos correspondentes às saponinas estão presentes nessa fração. A solubilização desta fração em água produziu espuma em abundância o que orientou a possibilidade de utilizá-la como aditivo.

Pelo fato de não termos substâncias puras na fração e termos impurezas desconhecidas, a solução da fração B foi utilizada em associação com SDS na concentração de 50 mmol L⁻¹ para garantir a formação das micelas. As análises utilizando este tampão misto foram realizadas com o objetivo de observar o comportamento de uma mistura de compostos, nitro-benzeno e β -naftol, frente a ele e também a um tampão com mesmas condições de pH, concentração de borato e SDS, porém sem o acréscimo da fração B. Os compostos nitrobenzeno e β -naftol foram escolhidos por apresentarem núcleos aromáticos apolares e grupos polares na mesma molécula. A mistura foi analisada utilizando o tampão misto nas seguintes condições: borato 10 mmol L⁻¹ pH 9,1, SDS 50 mmol L⁻¹ preparado com solução aquosa da fração B. As Figuras 25 e 26 mostram a separação da mesma mistura nas mesmas condições, porém a solução de SDS 50 mmol L⁻¹ foi preparada em água (Figura 25) enquanto que a Figura 26 mostra o eletroferograma obtido com o tampão aditivado com a fração B.

Figura 25: Mistura β -naftol/nitrobenzeno analisada no tampão com SDS 50 mmol L⁻¹.

A mistura foi solubilizada em acetonitrila, que é um bom marcador para o fluxo eletrosmótico, a qual aparece em 4 min. O pico em 5 min corresponde ao nitrobenzeno e a dupla de picos que saem entre 7 e 8 minutos correspondem a solução de β -naftol enquanto que a pequena banda que sai entre 9 e 10 min estava presente quando o padrão isolado de nitrobenzeno em SDS puro foi analisado.

Na Figura 26 os compostos que migram com a velocidade do fluxo eletrosmótico (neutros) aparecem no pico ao redor de 5 minutos. O pico correspondente ao nitrobenzeno está em 7,3 minutos, a dupla de picos correspondente ao β -naftol entre 8 e 9 minutos.

Figura 26: Eletroferograma da mistura nitrobenzeno/β-naftol utilizando tampão misto SDS/fração B.

Comparando os eletroferogramas das Figuras 25 e 26 vemos, primeiramente, que os compostos que migram com a velocidade do fluxo eletrosmótico aparecem em 5 minutos e com uma intensidade de absorção muito maior do que no tampão com SDS puro. Como a única diferença nas análises se deve à adição da fração, este aumento na absorção pode ser atribuído a alguma impureza neutra da fração.

Observamos, também, um deslocamento de 1 min no tempo correspondente à eletrosmose. A velocidade do fluxo eletrosmótico pode ser alterada pela variação da viscosidade do meio ou pela alteração do potencial zeta da parede do capilar. A parede do capilar nas condições de pH da análise está carregada negativamente e os grupos silanóis altamente ionizados. Quanto maior a quantidade de carga na parede do capilar maior será a magnitude do fluxo eletrosmótico. A diminuição da velocidade eletrosmótico pode ter sido ocasionada pelo aumento da viscosidade do meio, pois a

fração adicionada é composta por moléculas relativamente grandes e bastante polares. Não podemos descartar a hipótese de adsorção de algum composto presente na fração ou até mesmo dos próprios glicosídeos. A adsorção modifica a parede do capilar ocasionando a alteração do fluxo.

A linha de base do tampão misto (Figura 27) foi monitorada por 30 minutos e nesse período permaneceu relativamente estável, indicando que todos os picos obtidos no eletroferograma pertencem às amostras analisadas.

Figura 27: linha de base do tampão misto SDS/fração B.

Com o deslocamento de 1 min, correspondente ao fluxo eletrosmótico os picos correspondentes devem se deslocar pelo mesmo intervalo de tempo. O par de picos correspondentes à amostra de β -naftol passaram de 7 no tampão com SDS para 8 no tampão misto. No caso do nitrobenzeno, no tampão com SDS ele saiu em 5 minutos

enquanto que no tampão misto saiu em 7,3 minutos. A maior permanência do nitrobenzeno no capilar sugere uma interação maior deste com a micela.

O equilíbrio de partição entre o analito e a micela envolve algumas variáveis além da interação hidrofóbica. As interações dos grupos polares presentes na superfície da micela com os analitos podem resultar em uma modificação da retenção destes. Além das interações hidrofóbicas, podem ocorrer interações por ligações de hidrogênio e também interações eletrostáticas no caso de analitos carregados. Neste caso, o nitrobenzeno é mais polar que o β -naftol, tanto que esse último fica mais retido nas duas análises com os diferentes tampões. A micela de SDS aditivada com os glicosídeos possui na sua superfície os açúcares presentes nos glicosídeos entremeando a carga negativa. Esses açúcares com as hidroxilas expostas fazem com que compostos que interajam por ligações de hidrogênio fiquem mais retidos à micela. Neste caso a hidrofobicidade atua junto com as interações por ligações de hidrogênio alterando, assim, a partição do nitrobenzeno com a micela mista formada. Esse comportamento diferenciado do nitrobenzeno no tampão misto pode servir como indicador da formação da micela mista de SDS e os glicosídeos, visto que não sabemos nem a concentração crítica micelar nem a concentração molar destes, portanto, não podemos garantir que a quantidade de glicosídeo adicionada foi suficiente para uma mudança na seletividade da micela de SDS.

As Figuras 28 e 29 mostram os eletroferogramas dos padrões obtidos, utilizando o tampão misto, nas mesmas condições de análise em que a mistura foi submetida.

Figura 28: Eletroferogramas do nitrobenzeno e da mistura nitrobenzeno/ β -naftol obtidos utilizando tampão misto.

Vemos que os dois picos que saem em 9,5 e 10,5 minutos na Figura 26 são inerentes à amostra de nitrobenzeno, pois quando o padrão é analisado eles aparecem novamente. O EOF foi ligeiramente deslocado ocasionando um retardo nos picos. Isto exemplifica a importância da reprodutibilidade das condições da parede do capilar. O processo de pré-condicionamento do capilar também é importante, pois se alguma substância se adsorve na parede do capilar esse processo, se efetivo, remove tal interferência.

Na Figura 29 vemos a comparação dos eletroferogramas da solução de β -naftol e da mistura nitrobenzeno/ β -naftol. Como já verificado na separação utilizando tampão com SDS puro, o β -naftol está acompanhado de um pico desconhecido, onde foram separados com boa resolução. No tampão misto, na Figura 29, vemos o par de picos (8 e

9 min), onde o aumento da concentração da solução de β -naftol com relação à concentração desta na mistura, promove o aumento destes picos.

Figura 29: Eletroferograma da mistura nitrobenzeno/ β -naftol utilizando tampão SDS em solução aquosa.

A separação utilizando SDS puro apresentou eficiência e seletividade maiores resultando numa resolução melhor dos componentes da mistura, porém o efeito que mostrou-se interessante foi a interação diferenciada do nitrobenzeno com a solução tampão mista. Esses resultados indicam que podemos encontrar meios de separação bastante interessantes nos glicosídeos de *S. saponaria* e por isso investigações posteriores desses extratos e frações devem ser levadas adiante.

4.2.3. CONCLUSÕES DESTA ETAPA

A CZE utilizando complexação com borato pode ser aperfeiçoada para a análise de frações enriquecidas em saponinas. Uma maneira de se obter essas frações enriquecidas de modo fácil e rápido é através da SPE, pois esta se mostrou eficiente para um pré-fracionamento do extrato.

As frações contendo glicosídeos, mesmo quando não purificadas, mostram uma modificação nas micelas de SDS alterando a retenção de certos compostos.

A interação do nitrobenzeno com o sistema micelar SDS/fração B foi diferenciada em relação ao sistema SDS puro. Isto sugere que o sistema micelar formado mostrou certa preferência pelo composto mais polar da mistura indicando que, a fração B, mesmo não purificada, adicionada no tampão de corrida modificou o sistema micelar.

O teste da fração B não objetiva demonstrar uma seletividade maior do tampão misto. Esta etapa do trabalho serviu para investigar o comportamento do tampão misto com relação à migração dos compostos da mistura.

O estudo das saponinas presentes no extrato dos frutos de *S. saponaria* é muito importante, pois essas substâncias têm uma ampla aplicação e a disponibilidade dos frutos é bastante abundante no Brasil.

4.3. PERSPECTIVAS DE CONTINUIDADE DO TRABALHO

Os tensoativos glicosídicos têm sido utilizados como aditivos em eletroforese capilar para separação enantiomérica como: aditivos quirais neutros no tampão de corrida para enantioseparação de analitos carregados por CZE, tensoativo quiral aniônico em MEKC pela complexação da porção açúcar com grupos negativamente carregados e como tensoativo neutro quiral para formar micelas mistas com tensoativos aquirais. (RASSI, 2000) Este conjunto de possibilidades de usos de tensoativos glicosídicos em eletroforese capilar estimula a continuação dos estudos da aplicação destas substâncias em MEKC. Muitos relatos evidenciam as propriedades seletoras quirais de tensoativos glicosídicos utilizados em combinação com SDS. Posteriormente, será muito interessante verificar se estes compostos mostram essa propriedade.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Analytical Chemistry, v. 56, n. 12, p. 1322A, 1984.

CHAI, W.; PISKAREV, V.; LAWSON, A. M. Negative-ion electrospray mass spectrometry of neutral underivatized oligosaccharides. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 651-657, 2001.

ELIAS, R.; MSHVILDADZE, V.; FAURE, R.; RONDEAU, D.; DEBRAUWER, L.; DEKANOSIDZE, G.; KEMERTELIDZE, E.; BALANSARDB, G. Triterpenoid Saponins from Leaves of *Hedera pastuchowii*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 52, n. 12. p. 1411-1415, 2004.

EMARA, S.; MOHAMED, K. M.; MASUJIMA, T.; YAMASAKI, K. Separation of naturally occurring triterpenoidal saponins by capillary zone electrophoresis. **Biomedical chromatography**, v. 15, p. 252-256, 2001.

GLÖCKL, I.; VEIT, M.; BLASCHKE, G. Determination of ginsenosides from *Panax ginseng* using micellar electrokinetic chromatography. **Planta Medica**, v. 68, p. 158-161, 2002.

HAMANN, C. H.; HAMNETT, A.; VIELSTICH, W. **Electrochemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 1998. p. 108-109.

HARVEY, D. J. Quantitative aspects of the matrix-assisted laser-desorption mass spectrometry of complex oligosaccharides. **Rapid Communication Mass Spectrometry**, v. 7, p. 614-619, 1993.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry & pharmacology of natural products: saponins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995a. p. 144.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry & pharmacology of natural products: saponins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995b. p. 145.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. **Chemistry & pharmacology of natural products: saponins**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995c. p.198-207.

HSIEH, Y. A.; HUANG, H. Y. Determination of saikosaponins by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 759, p. 193-201, 1997.

ISHIHAMA, Y.; TERABE, S. Enantiomeric separation by micellar electrokinetic chromatography using saponins. **Journal of Liquid Chromatography**, v. 16, n. 4, p. 933-944, 1993.

KARAS, M.; BAHR, U.; DÜLCKS, T. Nano-electrospray ionization mass spectrometry: addressing analytical problems beyond routine. **Fresenius Journal Analytical Chemistry**, v. 366, p. 669-676, 2000.

KIM, N.; PARK, I. Purification of saponin compounds in *Bupleurum falcatum* by solvent partitioning and preparative LC. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 65, n. 7, p. 1648-1651, 2001.

KRIEF, S.; THOISON, O.; SE´VENET, T.; WRANGHAM, R. W.; LAVAUD, C. Triterpenoid saponin anthranilates from *Albizia grandibracteata* leaves ingested by primates in uganda. **Journal of Natural. Products**, v. 68, p. 897-903, 2005

LABORATÓRIO de espectrometria de massas do Instituto de química da UNICAMP, Campinas, 2005. Disponível em: <<http://www.em.iqm.unicamp.br/>>. Acesso em: 05 set. 2005.

LEE, C. S.; YANG, L. Micellar electrokinetic chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 780, p. 207-218, 1997.

LI, C.; BAO, Y.; SHEN, H.; NAN, F. Determination of Saikosaponin Derivatives in *Radix bupleuri* and in Pharmaceuticals of the Chinese Multiherb Remedy Xiaochaihu-tang Using Liquid Chromatographic Tandem Mass Spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 76, p. 4208-4216, 2004.

LIN, X.; XUE, L.; ZHANG, H.; ZHU, C. Determination of saikosaponins a, c, and d in *Bupleurum* Chinese DC from different areas by capillary zone electrophoresis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 382, p. 1610-1615, 2005.

LIU, S.; LIU, Z.; GUO, M.; SONG, F.; BAI, Y. Rapid analysis of a triterpenoid saponin mixture from extracts by electrospray ionization multi-stage tandem mass spectrometry (ESI-MSⁿ). **Analitycal Science**, v. 18, 481-484, 2002.

LIU, S.; LIU, Z.; SONG, F.; DOU, J.; TSAO, R.; LI, L. Detection of saponins in extract of *Panax notoginseng* by liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, V. 536, p. 21–28, 2005.

MAHATO, S. B.; SARKAR, S. K.; PODDAR, G. Triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 27, n. 10, p. 3037-3067, 1988.

McINTIRE, G. L. Micelles in Analytical Chemistry. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 21, n. 4, p. 257-278, 1990.

MURGU, Michael. **Saponinas e glicosídeos de *Sapindus saponaria*: metodologias de análise por espectrometria de massas e relação com fungos endofíticos**. 2002. 133 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica) – Departamento de Química da UFSCar, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2002.

TITATO, G. M. **Desenvolvimento de metodologia para determinação de pesticidas selecionados em um sistema de cromatografia em fase líquida acoplado à espectrometria de massas(HPLC-MS): Comparação entre ESI e APCI**. 2004.166 f. Tese (Doutorado em Ciências (Química Analítica)) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, 2004.

NYBERG, N. T.; BAUMANN, H.; KENNE, L. Solid-phase extraction NMR studies of chromatographic fractions of saponins from *Quillaja saponaria*. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 268-274, 2003.

OHSHIMA, H.; FURUSAWA, K. **Electrical phenomena at interfaces: fundamentals, measurements**. 2 ed., revised and expanded. New York: Marcel Dekker, 1998. 628p.

OLESZEK, W. A. Chromatographic determination of plant saponins. **Journal of Chromatography**, v.967, p. 147-162, 2002.

OTSUKA, K.; TERABE, S. Enantiomeric resolution by micellar electrokinetic chromatography with chiral surfactants. **Journal of Chromatography**, v. 515, p. 221-226, 1990.

SHEU, S. J.; CHEN, H. R. Simultaneous determination of twelve constituents of I-tzu-tang, a Chinese herbal preparation, by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 141-148, 1995.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 1999. p. 711-740.

SPARG, S.G.; LIGHT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, p. 219–243, 2004.

PUBCHEM, NCBI. Disponível em <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?sid=4027>>. Acesso em: 09 set. 2005.

QUIRINO, J. P.; TERABE, S. Sweeping of neutral analytes via complexation with borate in capillary zone electrophoresis. **Chromatographia**, v. 53, 285-289, 2001.

RASSI, Z. E. Chiral glycosidic surfactants for enantiomeric separation in capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 875, p. 207-233, 2000.

TERABE, S. Micelar electrokinetic chromatography: MEKC belongs to a mode of CE but also to micro-LC. **Analytical Chemistry**, v.76, p. 242A, 2004.

TERABE, S.; OTSUKA, K.; ICHIKAWA, K.; TSUCHIYA, A.; ANDO, T. Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. **Analytical Chemistry**, v. 56, p. 111-113, 1984.

[TOMAS-BARBERAN, F. A.](#) Capillary electrophoresis - a new technique in the analysis of plant secondary metabolites. **Phytochemical Analysis**, v. 6, n. 4, p. 177-192, 1995.

VINDEVOGEL, J.; SANDRA, P. **Introduction to Micellar Electrokinetic Chromatography**. Heidelberg: Hüthig, 1992. p. 52.

WANG, G.; SUN, J.; HAITANG, X.; HAO, L.; GUOYU, P.; TUCKER, I. Simultaneous rapid quantification of ginsenoside Rg1 and its secondary glycoside Rh1 and aglycone protopanaxatriol in rat plasma by liquid chromatography–mass spectrometry after solid-phase extraction. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 38, p. 126–132, 2005.

WANG, X.; SAKUMA, T.; ASAFU-ADJAYE, E.; SHIU, G. K. Determination of ginsenosides in Plant Extracts from *Panax ginseng* and *Panax quinquefolius* L. by

LC/MS/MS. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 1579-1584, 1999.

WEINBERGER, R. **Practical capillary electrophoresis**. 2 ed. New York: Academic Press, 2000. 462p.

ZAIA, J. Mass spectrometry of oligosaccharides. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 23, p. 161-227, 2004.