UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Programa de Pós-Graduação em Química

CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA E ESPECTROMÉTRICA DE EXTRATOS DE *CINCHONA* DE USO FITOTERÁPICO E COSMÉTICO

Viviane do Nascimento

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo - SP

Data do Depósito do Trabalho na SPG: 08/12/2009

(oito de dezembro de 2009)

Viviane do Nascimento

CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA E ESPECTROMÉTRICA DE EXTRATOS DE *CINCHONA* DE USO FITOTERÁPICO E COSMÉTICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de ***Mestre*** *em Química (Química Analítica)*

Orientador: Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares

São Paulo – SP

2009

Viviane do Nascimento

CARACTERIZAÇÃO ELETROFORÉTICA E ESPECTROMÉTRICA DE EXTRATO DE *CINCHONA* DE USO FITOTERÁPICO E COSMÉTICO

Dissertação apresentada ao Instituto de Química da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de ***Mestre*** *em Química (Química Analítical)*

Aprovado em: _____

Banca examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico aos meus Pais, o maior presente que Deus me deu. Dizem que quando nascemos escolhemos nossos pais, se isso for verdade, de todas as escolhas que fiz na vida com certeza esta foi a mais acertada. Na escola ou universidade aprendemos muito, porém nosso caráter, nossos valores são formados principalmente em nossa família Muito obrigada por me ensinar todos os valores da vida.

Agradecimentos

À Deus que nos concede, a cada dia, uma nova página de vida, cabendo a nós escrever belas palavras.

Aos meus pais Alfeu Mendes do Nascimento e Terezinha José Francisco do Nascimento, pelo amor incondicional, por todo apoio, pelos ensinamentos, valores, enfim, tudo que sou devo a eles.

À minha orientadora Dra Marina Franco Maggi Tavares, pela orientação, amizade e confiança em mim depositada.

Ao meu querido co-orientador Fernando Gustavo Tonin por todos os ensinamentos, discussões, paciência, esclarecimentos e apoio durante todo o projeto, não tenho palavras para agradecer, mas muito obrigada.

À minha família, em especial ao meu irmão Elcio e minhas tias Neusa e Roseli que são como irmãs, por todo apoio em todos esses anos de convivência.

Ao meu namorado Marcos Xavier de Oliveira pela paciência, companheirismo e apoio durante todos esses anos juntos.

Às minhas afilhadas Fernanda e Myllena, que tanto me trazem alegrias e que tanto amo.

A todos pequenos da minha familia: Daniel, Karol, Lucas, Ju, Nathalia e Bia, amo muito vocês.

Aos grandes amigos André, Claudinei, Giovana, Kátia, Lya, Raquel, Simone, Tati e Virginia, por todos os momentos que dividimos e pelo prazer de conhecer as pessoas maravilhosas que vocês são.

Aos amigos de laboratório: Ana Carolina, Aline Klassen, Aline, Daniel, Edgar, Gisele, Graziela, José Luiz, Karina, Laís, Luíz Antonio, Meiriane e Valéria, pela direta ou indireta contribuição para realização deste trabalho.

Aos amigos do Instituto de Química, em especial aos amigos do bloco 12. Aos amigos da UFSCar, onde tudo começou.

Ao Prof. Farah por toda ajuda, apoio e paciência, muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Massuo Jorge Kato por toda ajuda e apoio.

À Profa. Dra Liliana Mazaroti por pela gentil ajuda.

A todos funcionários do IQ-USP que sempre me ajudaram muito.

À Formil Química e a todos amigos muito especiais e companheiros da Formil.

À FAPESP pelo apoio financeiro.

À CNPQ pela bolsa concedida e todo apoio financeiro.

Enfim a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para realização deste trabalho.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	acetonitrila
CD	ciclodextrina
CE	eletroforese capilar (capillary electrophoresis)
CE-MS	eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas
CMC	concentração micelar critica (critical micelle concentration)
CV	coeficiente de variação
CZE	eletroforese capilar de zona
DP	desvio padrão
EOF	fluxo eletrosmótico (eletroosmotic flow)
ESI	ionização por electrospray (electrospray ionization)
GC	cromatografia gasosa (gas chromatography)
HPLC	cromatografia liquida de alta eficiência (high performance liquid chromatography)
HPTL	cromatografia em camada delgada de alta eficiência (high performance thin layer chromatography)
LOD	limite de detecção (limit of detection)
LOQ	limite de quantificação (limit of quantification)
MEKC	cromatografia eletrocinética micelar (micellar electrokinetic)
MeOH	metanol
MS	espectrometria de massas (mass spectrometry)
NACE	eletroforese capilar em meio não-aquoso (non aqueous capillary electrophoresis)
PI	padrão interno

SDS	dodecilsulfato de sódio (dodecylsulfat sodium salt)
TBS	tetraborato de sódio
TEA	trietilamina
TLC	cromatografia em camada delgada (thin layer chromatography)
UV	ultravioleta

Sumário

Resumo i

Abstract ii

1. Introdução 1

1.1 A malária no mundo 1

1.2 Plantas 2

1.2.1 Alcalóides 6

2. Objetivos 13

3. Método CE-DAD para determinação dos alcalóides da *Cinchona* 14

3.1 Introdução 14

3.1.1 Eletroforese Capilar 14

3.1.2 Eletroforese Capilar em Solução livre (CZE) 16

3.2 Parte Experimental 16

3.2.1 Instrumentação 16

3.2.2 Reagentes e soluções 17

3.2.3 Preparo de amostra 18

3.3 Desenvolvimento do Método 19

3.3.1 Seleção de variáveis 19

3.4 Utilização de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para obtenção de ótimos de separação 28

3.4.1 Planejamento Fatorial 28

3.4.2 Validação do Método 37

3.5 Conclusão 51

4. Análise confirmatória de alcalóides por CE-MS 52

4.1 Introdução 52

4.1.1 Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas (CE-MS) 52

4.1.2 Técnica de preenchimento parcial (“partial filling”) 54

4.2 Instrumentação 55

4.3 Reagentes e Soluções 56

4.4 Desenvolvimento do método 56

4.5 Conclusões 67

5. Efeito do Solvente na Separação dos Alcalóides 68

5.1 Introdução 68

5.2 Parte Experimental 71

5.2.1 Instrumentação 71

5.2.2 Reagentes e soluções para MEKC 72

5.2.3 Reagentes e soluções para NACE 72

5.3 Estudos em meio micelar 73

5.4 Estudos em meio não aquoso 76

5.4.1 Figuras de Mérito para método em meio não-aquoso 83

5.5 Conclusões 89

6. Conclusão 90

7. Referências Bibliográficas 91

Resumo

A cada ano a malária mata cerca de um milhão de pessoas. Segundo a OMS, 3,3 bilhões de pessoas, metade da população mundial, estão expostas à doença, principalmente em países subdesenvolvidos. Os fármacos utilizados no tratamento da malária incluem: cloroquina, primaquina, quinina, mefloquina, doxiclina, clindamicina e artemisina. A extensa resistência do parasita *Plasmodium falciparum* ao medicamento sintético cloroquina re-estabeleceu a quinina, um alcalóide encontrado na planta do gênero *Cinchona*, como droga antimalarial. A quinidina, o diastereoisômero da quinina, é usada como droga antiarrítmica e no tratamento de fibrilação arterial. Os estereoisômeros, cinchonina e cinchonidina, não são usados como medicamentos, embora mostrem efeitos similares àqueles da quinina e da quinidina. Os efeitos cardíacos da quinidina impossibilita seu uso como antimalarial. Outro alcalóide presente na espécie *Cinchona* é a hidroquinidina, que assim como a quinidina também apresenta atividade antiarrítmica. Os extratos vegetais são base para a produção de fitoterápicos, porém sem padronização o produto perde qualidade e a indústria não pode garantir a eficácia apregoada já que desconhece a concentração do princípio ativo no produto à venda. A portaria RDC 48/04 de 16.03.04 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) estabeleceu uma legislação específica, que se baseia na "garantia da qualidade", exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos produzidos, que só pode ser garantida com a utilização de extratos padronizados. De acordo com essa tendência, o objetivo do presente trabalho é o desenvolvimento de métodos de análise para os principais alcalóides da *Cinchona* por eletroforese capilar, podendo ser usada em caracterização de drogas vegetais, no controle de qualidade de extratos, bem como em possíveis adulterações. As determinações dos cinco principais alcalóides da *Cinchona* foram realizadas por eletroforese capilar de zona (CZE), utilizando como eletrólito TEA (1,1% v/v) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico e 20 mmol L^{-1} de α-ciclodextrina, com tempo total de análise inferior a 12 minutos. A otimização das condições de análise foi realizada através da realização de experimentos de planejamento fatorial 3^{2+1}, sendo as variáveis do estudo a concentração de TEA e de α-ciclodextrina. Com o uso de seletores quirais também foi desenvolvido um método para análise confirmatória dos alcalóides através do acoplamento de eletroforese capilar à espectrometria de massas, utilizando a estratégia de "partial filling". Com objetivo de verificar o efeito do solvente na separação dos presentes alcalóides foi realizado um estudo do mecanismo de separação modulada por solvente em meio micelar (MEKC) e em meio não-aquoso (NACE).

Palavras-chave: eletroforese capilar, espectrometria de massas, alcalóides, Cinchona, cromatografia eletrocinética micelar, eletroforese capilar em meio não-aquoso, efeito do solvente.

Abstract

Every year, malaria kills about one million people. According to OMS, 3.3 billion people, half of the world population, are exposed to the disease, mostly in underdeveloped countries. The pharmaceuticals used in the treatment of malaria include: chloroquine, primaquine, quinine, mefloquine, doxyclyne, clindamicina and artemisin. The increased resistance of the parasite *Plasmodium falciparum* to the synthetic pharmaceutical chloroquine reestablished quinine, an alkaloid found in the genus *Cinchona,* as antimalarial drug. Quinidine, the diasteroisomer of quinine, is used as antiarrhythmic drug in the treatment of arterial fibrillation. The diastereoisomers cinchonine and cinchonidine are not employed as pharmaceuticals although present similar effects to quinine and quinidine. The cardiac effects of quinidine hinders its use as antimalarial. Another alkaloid found in *Cinchona* is hydroquinidine, which similarly to quinidine also presents antiarrhythmic activity. Herbal extracts are the basis of phytotherapic production, however, with no standardization, the product lacks quality and the industry cannot guarantee its alleged efficacy, since there is no knowledge of the active principle concentration in the product put to sale. The ANVISA protocol (RDC 48/04 published on March16, 2004) established a specific legislation based on the "guarantee of quality", which demands the reprodutibility of the produced phytotherapic, only achievable with standardized extracts. Following this tendency, the aim of this work was to develop methods of analysis for the main alkaloids of *Cinchona* using capillary electrophoresis, to apply in the characterization of herbal drugs, in the quality control of extracts as well as in the searching of possible adulterations. The determinations of five main alkaloids of *Cinchona* were carried out by capillary zone electrophoresis (CZE) using an electrolyte composed of 1.1% (v,v) TEA adjusted to pH 2.5 with phosphoric acid containing 20 mmol L^{-1} α-cyclodextrin, providing a less than 12 min total analysis time. The optimization of analytical conditions was conducted experimentally by a 3^{2+1} factorial design where the studied variables were TEA and α-cyclodextrin concentrations. With the use of chiral selectors a confirmatory analytical method for alkaloids was also developed with the coupling of capillary electrophoresis and mass spectrometry employing a strategy called "partial filling". With the purpose of verifying solvent effects on the separation of the alkaloids under investigation, studies of the separation mechanism as modulated by solvent in micelar medium (MEKC), and non aqueous medium (NACE) were conducted.

Keywords: capillary electrophoresis, mass spectrometry, alkaloids, Cinchona, micellar electrokinetic chromatography, non aqueous capillary electrophoresis, solvent effects.

1. Introdução

1.1 A malária no mundo

A malária é uma das doenças que mais mata no mundo; enquanto a dengue atinge cerca de 50 milhões de pessoas em mais de cem países, a malária a cada ano atinge cerca de 250 milhões e leva a cerca de um milhão de mortes. As pessoas que vivem nos países mais pobres são as mais vulneráveis (WHO, 2009)

Apesar de existirem mais de cem mil espécies de plasmódios, apenas quatro produzem a doença no homem, são eles o *falciparium*, o *vivax*, o *malarie* e o *ovale*. São transmitidos através da picada de mosquitos Anopheles. No Brasil, a malária é causada por duas espécies de plasmódios, o *vivax*, que causa uma forma mais branda da doença e o *falciparium*, causador da forma mais grave (Andrade-Neto *et al.*, 2003).

Atualmente, no Brasil, são utilizados como medicamentos para combate à malária a cloroquina, a primaquina, a quinina, a mefloquina, a doxiclina, a clindamicina ou a artemisina. Aos poucos o parasita vai desenvolvendo resistência aos medicamentos. Diversas são as ações para erradicar a malária, pois mais do que uma doença tropical, a malária é uma doença que atinge países subdesenvolvidos (WHO, 2009).

A quinina, isolada ou em associações farmacêuticas, tem se re-estabelecido como medicamento anti-malarial a partir da década de 60, com o surgimento de resistência do *P. falciparum* à cloroquina (Gatti *et al.*, 2004). A quinina foi o primeiro medicamento utilizado para o tratamento da malária; a principal fonte do composto é

a casca da espécie *Cinchona*. A utilização de plantas no tratamento de diversas doenças no mundo é realizada desde os primórdios da humanidade.

1.2 Plantas

O uso dos vegetais, minerais e animais como alimento, medicamento ou cosmético, perde-se com a história do ser humano, e hoje se pode dizer que o hábito de recorrer às virtudes curativas de certos vegetais foi uma das primeiras manifestações do esforço do ser humano para compreender e utilizar a natureza (Braquet e Hosford, 1991; Veiga *et al.*, 2005).

As plantas representaram durante séculos a única fonte de agentes terapêuticos para o homem. No inicio do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos (Hostettman *et al.*, 2003).

Documentos sumérios de 5000 a.C. referem-se à papoula (*P. somniferum*) e tábuas assírias descrevem suas propriedades. As primeiras descrições sobre plantas feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Este papiro foi encontrado próximo da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (Pinto *et al.*, 2002). Durante o período anterior à era cristã que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios. Na idade média, no período entre 450-1000, conhecida como a “Idade Tenebrosa” devido ao obscurismo religioso da ciência nesta época, a preocupação teológica invadiu os

espíritos e somente a partir do séc. VII a ciência readquiriu importância, entre os árabes principalmente (Viegas *et al.*, 2006).

A civilização árabe trouxe importantes contribuições à medicina natural. A ela deve-se o emprego dos purgativos vegetais e o conhecimento do sabor doce da urina dos diabéticos. No séc. X impõe-se o nome do médico islâmico Avicena, estudioso botânico, criador de um tratado sobre medicamentos cardíacos. Sua obra mais importante, Canon, foi durante muito tempo o texto médico mais popular da Europa. Outra figura importante e muito polêmica foi Paracelso (1493-1541), que criou a assinatura dos corpos, segundo a qual a atividade farmacológica de uma planta estaria relacionada com seu aspecto morfológico. Assim a serpentária, erva cuja aste lembra o corpo de uma serpente serviria para curar picadas de cobra (Alfonso-Goldfarb, 2001).

As grandes navegações trouxeram a descoberta de novos continentes, trazendo ao mundo moderno um grande arsenal terapêutico de origem vegetal até hoje indispensável à medicina (Alfonso-Goldfarb, 2005). O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal começa a acontecer no séc. XVIII. Em 1821, Pelentier e Caventou descreveu o isolamento da quinina, dez anos antes o médico português Bernardino Antonio Gomes isolou a cinchonina da quina proveniente do Brasil. O final dos anos vinte e toda a década de trinta pode ser caracterizada pelo grande número de trabalhos de isolamento e a identificação de substâncias de natureza esteroidal. Graças principalmente aos estudos de Wieland e Windaus e colaboradores o principal representante desta classe, o colesterol, teve sua estrutura determinada. Esta década e a seguinte são bastante marcadas pela síntese de diversos compostos, como por exemplo, da quinina em 1945 por Robinson e

Woodward (Pinto *et al.*, 2002).

A introdução dos métodos espectroscópicos e das diferentes modalidades de cromatografia na fitoquímica alterou gradualmente os objetivos e a filosofia dos trabalhos de isolamento e de determinação estrutural de Produtos Naturais. A utilização de métodos espectroscópicos em identificação estrutural permitiu a redução das quantidades de material necessário para a análise e possibilitou, ao mesmo tempo, a determinação em curto espaço de tempo de estruturas complexas com vários centros esterogênicos.

Nos dias atuais, os produtos naturais têm grande importância na economia mundial. O mercado mundial de fitoterápicos movimenta cerca de US$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. Nos EUA o setor faturou cerca de US$ 6 bilhões e US$ 8,5 na Europa, sendo a Alemanha, de longe, o maior mercado mundial de fitoterápicos (Pinto *et al.*, 2002).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas, sendo que cerca de 120 compostos de origem natural obtidos de aproximadamente 90 espécies vegetais compõem este cenário (Hostettman *et al.*, 2003). Atualmente, atenção especial é dada ao estudo científico dos fitoterápicos, buscando-se recursos disponíveis e renováveis que permitam uma atividade sustentável. Apenas cerca de 14% dos recursos vegetais disponíveis são conhecidos adequadamente. Considerando as plantas superiores temos atualmente cerca de 250.000 espécies no planeta, sendo que aproximadamente 55.000 localizam-se no Brasil, que conta com a maior biodiversidade do planeta, sendo apenas 2% conhecida (Baby *et al.*, 2005).

A síntese de compostos essenciais para a sobrevivência dos vegetais, tais como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e seus polímeros derivados, faz parte do metabolismo primário das plantas. Os metabólitos secundários por sua vez são produzidos a partir de um número relativamente pequeno de compostos intermediários chaves, oriundos de rotas metabólicas primárias, as quais são similares em todos os organismos, podendo ser chamadas de anabólicas e catabólicas (Simões *et al.*, 2007).

Analisando apenas os metabólitos secundários obtidos de espécies lenhosas que tiveram alguma atividade biológica determinada, encontramos inúmeros compostos naturais ativos, distribuídos em dezenas de classes distintas de substâncias químicas. A Figura 1.1 ilustra a distribuição dessas substâncias nas classes mais conhecidas e importantes de metabólitos secundários, sendo que são conhecidas cerca de 350 estruturas de alcalóides com atividade farmacológica, o que faz dessa classe de metabólitos secundários uma das mais importantes fontes de possíveis medicamentos para o homem (Di Stasi, 1995; Hostettman *et al.*, 2003).

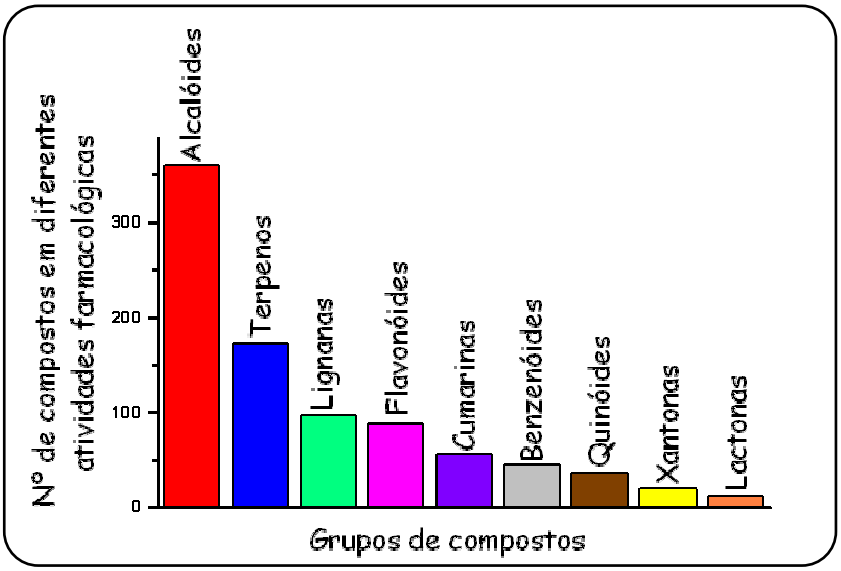


Figura 1.1. Distribuição de substâncias naturais ativas de espécies lenhosas, nas classes químicas de metabólitos secundários (Di Stasi, 1995).

1.2.1 Alcalóides

Os alcalóides são um grupo de substâncias naturais, que possuem um heteroátomo (-N-), responsável pela sua basicidade (Hostettman *et al.*, 2003; Simões *et al.*, 2007). Por ser um grupo tão vasto, e por apresentar diferentes esqueletos estruturais, convencionou-se dividir tal classe em subgrupos levando em consideração sua origem a partir do amino–ácido precursor (Figura 1.2) (Simões *et al.*, 2007).

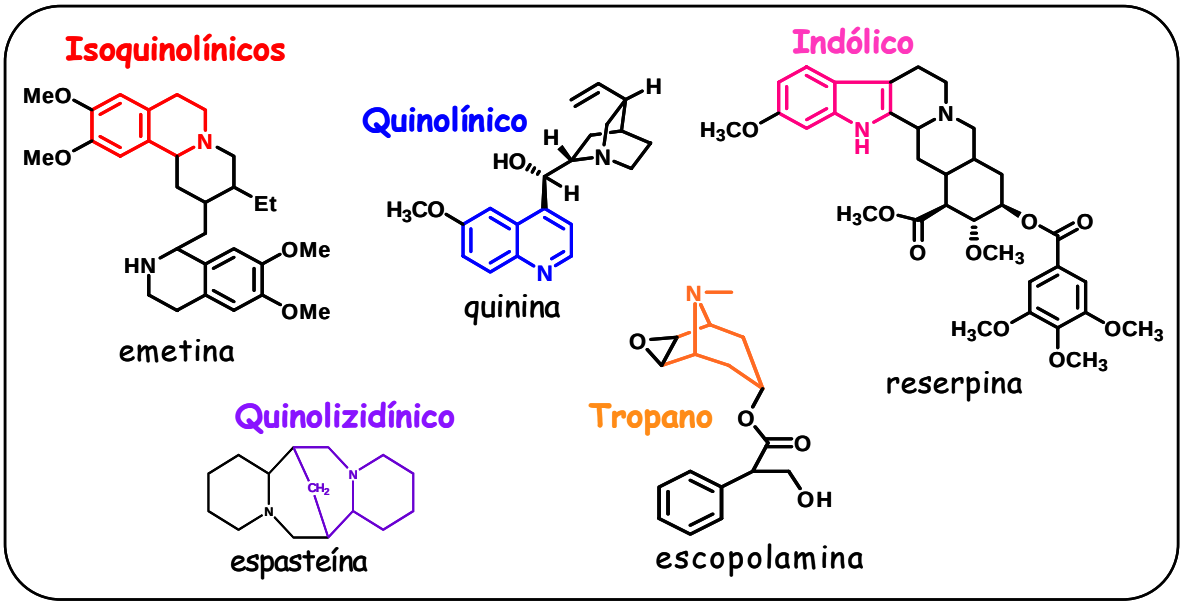


Figura 1.2. Algumas classes de alcalóides e exemplos

A toxicidade de alguns grupos de alcalóides para espécie humana está bem descrita na literatura, assim como sua importância na medicina moderna como agentes antimicrobianos, hipertensores, psicotrópicos, sedativos, analgésicos, dentre outros (Simões *et al.*, 2007) Um exemplo é a pilocarpina, encontrada no jaborandi (*Pilocarpus jaborandi* H.), arbusto endêmico nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, o qual é amplamente usado como agente colinérgico na medicina tradicional e estimulante do crescimento capilar na cosmetologia. Um outro exemplo consiste na papoula (*Papaver somniferum* L. - Papaveraceae), de onde é extraído o ópio, conhecido há séculos por suas propriedades soporíficas e analgésicas (Hostettman *et al.*, 2003). Substâncias como a quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina, reconhecidos como agentes antimaláricos, são exemplos de alcalóides da classe dos quinolínicos. Esses alcalóides podem ser obtidos de várias espécies de plantas do gênero *Cinchona* (Di Stasi, 1995).

1.2.1.1 Gênero Cinchona

O gênero *Cinchona* abrange cerca de 40 espécies pertencentes à família das Rubiaceae. Crescem na parte oriental da floresta amazônica, entre 1.500 e 3.000 m de altitude, cada árvore pode atingir até cerca de 20 m de altura (Andrade-Neto *et al.*, 2003; Hostettman *et al.*, 2003). Os alcalóides da *Cinchona* são um grupo de 35 bases, que ocorrem na casca das espécies *Cinchona* e *Remija*. A *Cinchona* é nativa da América do sul, sendo cultivada na Bolívia, Peru, Costa Rica, Equador, Colômbia, Indonésia, Tanzânia, Kenia e Sri Lanka. A utilidade da árvore foi aprendida pelos missionários jesuítas, que introduziram a casca na Europa (McCalley, 2002).

Diferentes espécies de *Cinchona* foram usadas como fontes comerciais, mas a grande variação no índice de alcalóides favoreceu o cultivo de três principais espécies. A espécie *C. succirubra* fornece o que é chamado de casca vermelha, C. *ledgeriana* fornece a chamada casca marrom, e C.*calisaya* dá origem à casca amarela. Os híbridos selecionados podem render até 17% de alcalóides totais.

Os principais alcalóides da *Cinchona* são quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina (Figura 1.3). Em média a casca da *Cinchona* contém 7-12% de alcalóides totais, sendo que a quinina conta com 70-90% desse total, cinchonidina 1-3% e quinidina perto de 1% (McCalley, 2002).

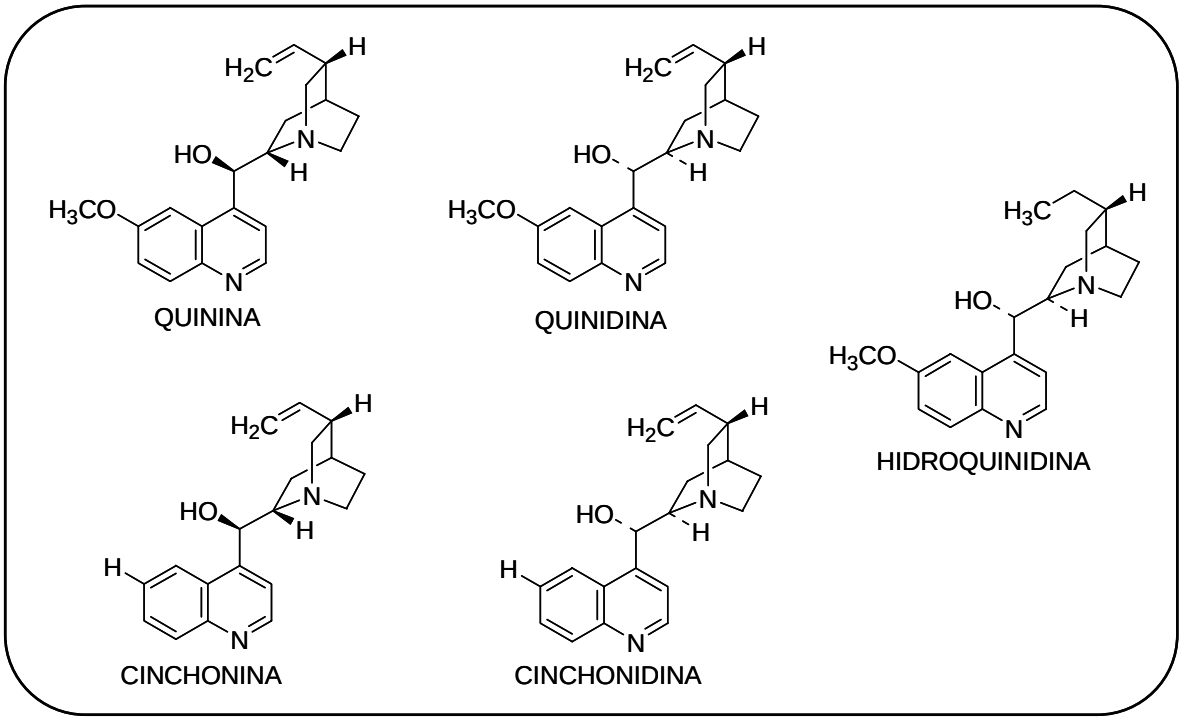


Figura 1.3. Estrutura dos principais alcalóides da espécie *Cinchona*.

Os alcalóides da *Cinchona*, que incluem os fármacos quinina e quinidina, continuam tendo ampla variedade de usos importantes. A extensa resistência do parasita *Plasmodium falciparum* ao medicamento sintético cloroquina re-estabeleceu a quinina como droga antimalarial. Outra vantagem da quinina com relação aos derivados sintéticos são seus preços relativamente baixos e a grande disponibilidade. A quinina também é usada como aromatizador amargo em bebidas e em muitos alimentos, antidiarréico, bem como em comprimidos de paracetamol, como um antipirético (McCalley, 2002; Tsimachidis *et al.*, 2008). A quinina tem também efeito relaxante muscular (Tsimachidis *et al.*, 2008), sendo utilizada para este fim em pessoas que sofrem de cãibra noturna, que corresponde a uma condição dolorosa que afeta principalmente idosos.

A quinidina, um diastereoisômero da quinina, é usada como droga

antiarrítmica e no tratamento de fibrilação arterial. Aproximadamente metade do mercado mundial da quinina é usada para a síntese da quinidina (McCalley, 2002). A quinidina é absorvida rapidamente pelo trato gastrointestinal e a overdose pode ser perigosa, conduzindo a parada diastólica.

Os estereoisômeros, cinchonina e cinchonidina, não são usados como medicamentos, embora mostrem efeitos similares àqueles da quinina e da quinidina (Gatti *et al.*, 2004). A quinidina, a cinchonina e a cinchonidina têm também propriedade antimalarial, mas estes alcalóides não são tão eficazes quanto a quinina. O efeito cardíaco da quinidina impossibilita seu uso como antimalarial (McCalley, 2002).

Devidos aos altos custos dos métodos sintéticos para obtenção da quinina, a casca da *Cinchona* continua sendo a fonte preliminar deste composto. Os procedimentos analíticos são necessários, por exemplo, para avaliar a qualidade da casca da *Cinchona*, que é colhida geralmente após 7 a 12 anos de crescimento (McCalley, 2002). Apesar de haverem valores médios dos alcalóides contidos na casca da Cinchona, esses valores estão sujeitos a variações ocasionais, o que pode levar a baixos teores e conseqüentemente a cascas com baixo valor comercial.

1.2.1.2 Determinação dos principais alcalóides presentes na *Cinchona*

Em termos de metodologia analítica, a literatura é vasta no que se refere à determinação dos principais alcalóides presentes na casca da *Cinchona*, principalmente com uso de detectores do tipo UV. Não há dúvidas de que no âmbito da detecção por UV pode ser melhorada consideravelmente pelo uso de instrumentos com fotodiodos (DAD), que são capazes de gerar espectros de cada

substância, assim como os picos cromatográficos convencionais. A detecção que tem se mostrado bastante promissora na determinação dos alcalóides da *Cinchona* é a espectrometria de massas, pois fornece informações estruturais dos compostos analisados. O acoplamento da espectrometria de massas com técnicas cromatográficas tem apresentado excelentes resultados, e tem sido bastante utilizado principalmente com cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) (Abdulrahman *et al.*, 1991; Giroud *et al.*, 1991). A fluorescência induziada por laser (LIF) tem sido pouco explorada como modo de detecção para análise dos presentes alcalóides. A detecção por fluorescência apresenta uma boa sensibilidade para quinina e quinidina, mas a baixa ou ausência de fluorescência para muitos outros alcalóides tem limitado o uso desta técnica. No entanto, vem sido utilizado como modo de detecção para HPLC em estudos biomédicos, que envolvem análises destes alcalóides em fluidos biológicos (Feas *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de alta eficiência é a técnica de separação mais utilizada na determinação dos alcalóides da *Cinchona* em diferentes matrizes, como extrato vegetal, bebidas, cosméticos e fitoterápicos *(Sarsunov.M e Hrivnak, 1974; Bauer e Untz, 1980; Johnston et al., 1980; Mccalley, 1983b, a; Smith, 1984; Verpoorte et al., 1984; Mccalley, 1986, 1990; Kabulov et al., 1991; Theodoridis et al., 1995; McCalley, 2002; Gatti et al., 2004; Horie et al., 2006; McCalley, 2008; Hoffmann et al., 2009).*

Outras técnicas cromatográficas que a literatura reporta para determinação dos alcalóides da Cinchona são cromatografia gasosa (GC) (Sarsunov.M e Hrivnak, 1974; Verzele, 1980), TLC e HPTLC (Coenegracht *et al.*, 1991; Mroczek e Glowniak, 2000).

A eletroforese capilar tem conquistado a atenção da comunidade científica internacional como uma poderosa técnica alternativa para separação e análise de compostos de interesse industrial, farmacêutico, clínico, e ambiental (Tavares, 1996).

Apesar do crescente desenvolvimento da técnica de eletroforese capilar nos últimos anos, foi encontrado em nossa compilação bibliográfica apenas quatro trabalhos referente à separação dos quatro alcalóides majoritários presentes na casca de espécies do gênero *Cinchona* (Ozaki *et al.*, 1995; Akada e Kurogi, 1997; Zimina *et al.*, 1997; Tsimachidis *et al.*, 2008).

2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo apresentar o desenvolvimento de método para determinação dos principais alcalóides da espécie *Cinchona* em extratos vegetais e fitoterápicos por CE-DAD e confirmação estrutural por CE-MS, bem como estabelecer o efeito do solvente na separação dos presentes alcalóides por estudos em meio micelar (MEKC) e meio não-aquoso (NACE).

3. Método CE-DAD para determinação dos alcalóides da *Cinchona*

3.1 Introdução

3.1.1 Eletroforese Capilar

A eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis, ou através da interação diferencial de compostos neutros com aditivos carregados (micelas, ciclodextrinas, etc), em um campo elétrico (Baker, 1995; Tavares, 1996; Landers, 2008). Com relação a outras técnicas de separação em meio líquido, como cromatografia líquida de alta eficiência, a técnica de eletroforese capilar tem como uma das grandes vantagens a facilidade com que se pode efetuar separações de compostos quirais (Vespalec e Bocek, 1999). Nesta técnica utiliza-se para tal apenas a adição de seletores quirais (ciclodextrinas, sais de bile, éteres coroa, entre outros) a um eletrólito de pH adequado, sem a necessidade de se ter colunas específicas, como no caso da HPLC, pois todos os possíveis modos de eletroforese podem ser operados no mesmo capilar de sílica fundida (Tavares, 1996).

Na eletroforese capilar a separação é conduzida em tubos com dimensões de 15 a 100 μm de diâmetro interno, e 30 a 100 cm de comprimento, preenchidos com um eletrólito condutor, e submetidos à ação de um campo elétrico (Figura 3.1). O uso do capilar oferece muitas vantagens sobre outros meios utilizados para eletroforese (placas de gel, papel, etc). Devido a fatores geométricos (a relação entre a área superficial interna e volume é apreciavelmente grande) um capilar possibilita a dissipação eficiente do calor gerado pela passagem da corrente elétrica.

Além disso, a alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 a 500 V/cm), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede a 10^5 pratos teóricos), resolução inigualável e tempos de análise apreciavelmente curtos. Outras vantagens de eletroforese capilar são: volumes de injeção tipicamente da ordem de 1 a 10 nL e a possibilidade de injeção e detecção em fluxo (Tavares, 1997).

Outra vantagem é a compatibilidade com uma variedade de sistemas de detecção disponíveis para cromatografia líquida, como absorção no UV-VIS, fluorescência, métodos eletroquímicos, condutividade, e espectrometria de massas (Tavares, 1996).

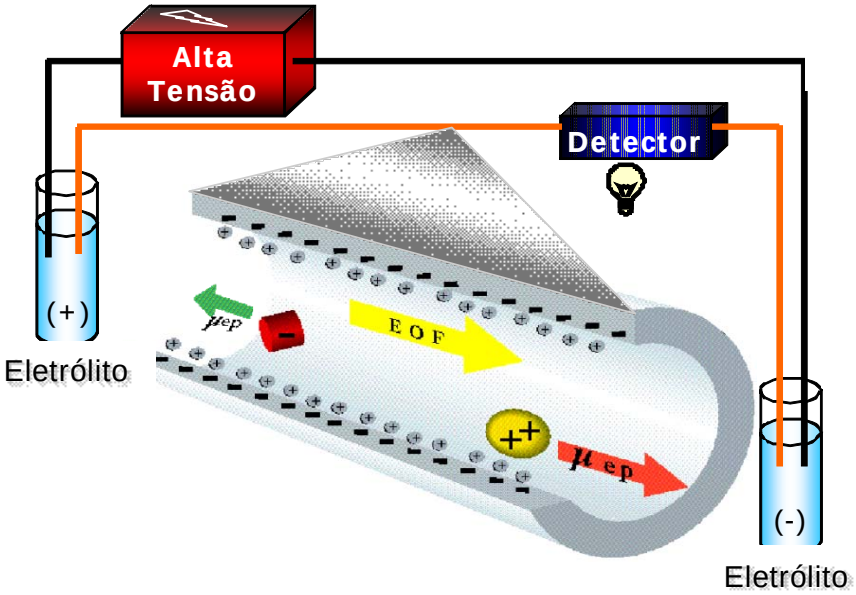


Figura 3.1. Montagem esquemática para eletroforese capilar (Moraes, 2008)

3.1.2 Eletroforese Capilar em Solução livre (CZE)

A eletroforese capilar em solução livre é um dos modos de separação eletroforética mais usados, provavelmente em razão da facilidade de sua implementação e otimização das condições experimentais (Tavares, 1997). A eletroforese capilar em solução é a técnica de separação efetuada em capilares e baseada somente nas diferenças entre as mobilidades de espécies carregadas (analitos), em eletrólitos. Estes podem conter aditivos, como ciclodextrinas, complexantes ou ligantes, que interagem com os analitos e alteram suas mobilidades eletroforéticas (Da Silva *et al.*, 2007). As diferentes mobilidades eletroforéticas resultam em diferentes velocidades de migração de espécies iônicas no eletrólito, contido dentro do capilar. O mecanismo de separação é baseado nas diferenças da razão carga/ massa dos solutos em um dado pH (Baker, 1995).

3.2 Parte Experimental

3.2.1 Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), com detector de arranjo de diodos, e com programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, ver A.06.01). O equipamento possui um sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar forçado que possibilita o controle da temperatura interna do capilar. As amostras e soluções padrão foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar durante 5 s) e o sistema de

eletroforese operado em polaridade normal com tensão constante de 30 kV. Foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestido externamente com polimida, com dimensões de 50 μm de diâmetro interno e 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector. O capilar foi submetido a condicionamentos iniciais sempre que utilizados, através de lavagens realizadas por pressão de aproximadamente 940 mbar, com hidróxido de sódio 1,0 mol L^{-1} durante 10 minutos, seguido de água deionizada durante 10 minutos e 5 minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens durante 5 minutos com o eletrólito de corrida. Ao término das análises o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 1,0 mol L^{-1} durante 10 minutos e por 10 minutos com água deionizada. O capilar permaneceu preenchido com água deionizada para armazenamento do mesmo.

3.2.2 Reagentes e soluções

Todos reagentes utilizados são de grau analítico e a água deionizada foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Os padrões de quinina, quinidina, cinchonidina e hidroquinidina foram obtidos da Sigma Aldrich (St Louis, MO, U.S.A.) e cinchonina da Avocado Research Chemical (Heisham, Lancs., U.K.). Foram preparadas soluções estoque dos padrões dos alcalóides quinina, quinidina, cinchonina, cinchonidina e hidroquinidina nas concentrações de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ em álcool etílico e armazenadas sob refrigeração de 4 ºC. Foram preparadas soluções estoque de trietilamina (TEA) 1% e 2% (v/v) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente

através da diluição da solução estoque e posterior diluição da α-ciclodextrina sob efeito do ultra-som durante 10 minutos. A composição do eletrólito de corrida consiste em trietilamina 1,1% (v/v) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico e 20 mmol L^{-1} de α-ciclodextrina.

3.2.3 Preparo de amostra

Os extratos das espécies *C. calisaya* (Quimer – ervas e especiarias) e *C.succirubra* (Quimer – ervas e especiarias) foram preparados sob efeito de ultra-som e extração em sistema soxhlet.

O extrato foi preparado com a utilização de 500 mg de casca de *C. calisaya* e *C. succirubra,* previamente seca à 50 ˚C durante doze horas e pulverizada, em 60 mL de líquido extrator água /etanol 1:1 e colocado sob efeito de ultra-som durante 20 minutos.

Para extração utilizando aparelho Soxhlet foram utilizadas 4 g da casca da planta previamente seca e pulverizada, utilizando 120 mL de etanol e 1,5 mL de hidróxido de sódio 1 mol L^{-1}. A extração em sistema Soxhlet foi realizada durante cinco horas.

Posteriormente os extratos foram filtrados e armazenados sob refrigeração de 4 ºC. Nas determinações dos alcalóides os extratos foram diluídos em dez vezes.

O extrato vegetal de origem comercial (Farma Service Bioextract) é uma preparação em água/glicerol, enquanto que o extrato vegetal comercializado na forma de fitoterápico, que tem Água Inglesa (Catarinense) como nome comercial é uma preparação em etanol. O fitoterápico é resultado do extrato vegetal da

Cinchona calisaya e associações com outros extratos vegetais. O extrato vegetal comercial foi armagenado sob refrigeração de 4 ºC, enquanto que o fitoterápico à temperatura ambiente (15 a 30 ˚C), como indicado pelo fabricante.

3.3 Desenvolvimento do Método

3.3.1 Seleção de variáveis

O método para determinação dos principais alcalóides presentes no gênero *Cinchona* foi desenvolvido em eletroforese capilar com detector de arranjo de diodos utilizando ciclodextrina na composição do eletrólito.

Devido ao caráter básico que possuem os alcalóides, os mesmos podem ser analisados por eletroforese capilar através de alterações no pH, onde sua carga e conseqüentemente sua mobilidade são alteradas. Os valores de pKas encontrados para os presentes alcalóides são: quinina – pKa_1 5,07 e pKa_2 9,7; quinidina – pKa_1 5,4 e pKa_2 10,0; cinchonina – pKa_1 5,85 e pKa_2 9,92; cinchonidina – pKa_1 5,80 e pKa_2 10,03.

De modo a se obter uma separação robusta e reprodutível, o meio deve estar tamponado. Em pH em torno de 2,5 as moléculas dos alcalóides encontram-se ionizadas positivamente devido a presença do grupo amina, que é protonado, o que permite sua migração até o detector, quando submetidas à ação do campo elétrico. Escolheu-se o fosfato como parte do eletrólito de corrida. Este foi escolhido por possuir alta capacidade tamponante na faixa de pH de interesse entre 1,2 e 3,2; além de 6,21 e 8,21; 11,32 e 13,32;. Com isso, o cátion (co-íon) para compor o eletrólito deverá apenas possuir mobilidade semelhante a dos analitos já que o ânion que constitui o eletrólito atuará como tampão.

A necessidade da utilização de um cátion com mobilidade semelhante a dos analitos para compor o eletrólito de corrida se dá devido à possibilidade de ocorrer eletrodispersão. A otimização da separação por eletroforese capilar não se baseia apenas na obtenção da separação dos analitos. Pode-se obter a separação dos analitos, porém com uma resposta insatisfatória no sentido de detectabilidade ou dificuldade de integração dos picos obtidos. Essas são conseqüências dos efeitos eletrodispersivos que podem ocorrer com os analitos.

O efeito eletrodispersivo se manifesta formando picos com cauda frontal ou cauda. O formato do pico ocorre como resultado da diferença de condutividade entre a zona do analito e o eletrólito de corrida. Diferenças na condutividade podem estar presentes como resultado de diferenças nas mobilidades do analito com respeito ao co-íon do eletrólito de corrida, ou como resultado de diferença na concentração entre a zona do analito e o eletrólito de corrida. (Weston e Brown, 1999). Quando o analito tem uma mobilidade maior do que o co-íon do eletrólito de corrida a extremidade inicial da zona do analito será difusa e a extremidade final será acentuada; este efeito no formato do pico ocorre, pois o campo elétrico na zona do eletrólito de corrida é maior que no centro da zona do analito, com isso os íons que se encontram distantes do centro da zona do analito são acelerados levando a formação de picos com cauda frontal (Baker, 1995). Por outro lado, quando o soluto tem mobilidade menor do que o co-íon no eletrólito de corrida, a extremidade inicial será acentuada e a extremidade posterior será difusa, isso porque o campo elétrico no centro da zona do analito será maior que na zona do eletrólito de corrida, com isso os íons que se encontram na extremidade posterior serão acelerados, levando à formação de picos com cauda (Weston e Brown, 1999).

Quando as condutividades são equivalentes não ocorre dispersão do pico, como mostrado na Figura 3.2.

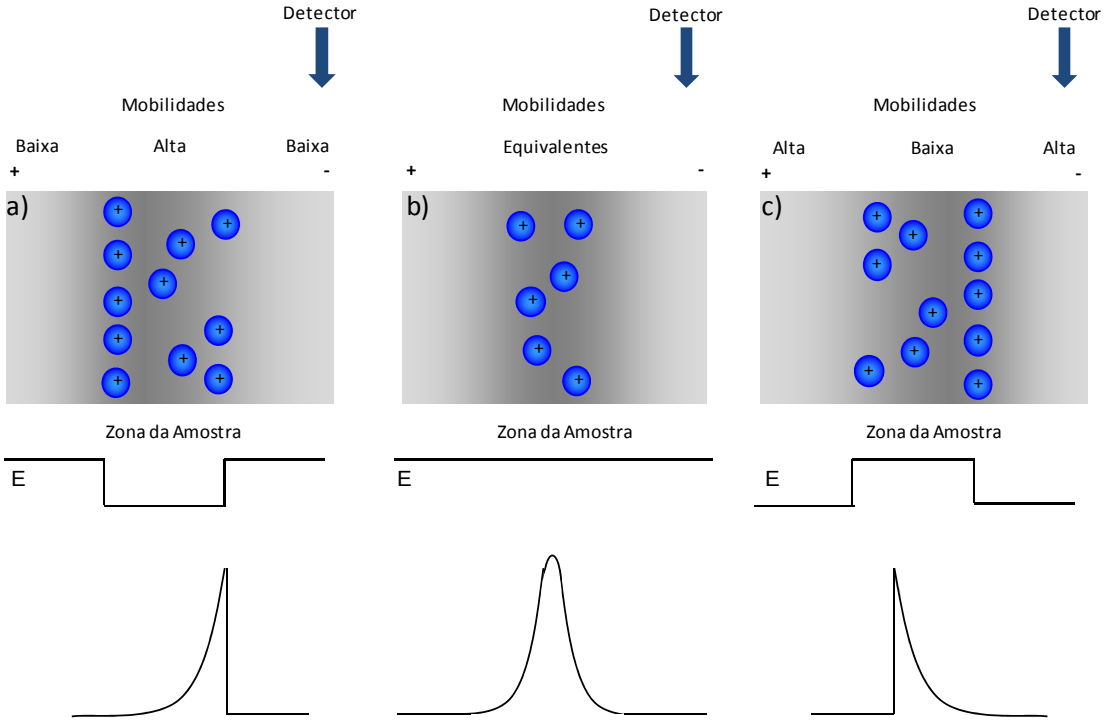


Figura 3.2: Efeito eletrodispersivo. a) zona do analito com condutividade maior que da zona do eletrólito de corrida; b) zona do eletrólito e do analito com condutividades equivalentes; c) zona do analito com condutividade menor que do eletrólito de corrida.

O eletrólito de corrida deve ter uma condutividade semelhante à da zona da amostra; ainda, a mobilidade eletroforética do co-íon deve ser semelhante à do analito de interesse, para que o efeito eletrodispersivo seja minimizado. Quando em uma mesma corrida temos diversos analitos, portanto diferentes mobilidades, devemos ajustar a mobilidade do eletrólito mais próxima possível da média das mobilidades dos analitos. Desta forma os picos sofrerão uma eletrodispersão baixa,

levando a grande detectabilidade, minimização de erros de integração do pico e melhor reprodutibilidade do método.

Para compor o eletrólito de corrida, a TEA (trietilamina) foi escolhida como co-íon. Por possuir mobilidade próxima da média das mobilidades dos analitos, minimizando assim os efeitos eletrodispersivos. Além disso analitos que possuem grupamentos amina podem ser adsorvidos na parede do capilar; uma forma de minimizar esse tipo de interação é a adição de certas aminas ao eletrólito, a quais interagem preferencialmente com os grupos silanóis da parede do capilar, competindo com a adsorção do próprio analito. Um composto comumente utilizado com essa finalidade é a trietilamina (TEA), que não absorve na região do UV/Vis e no pH utilizado encontra-se carregada positivamente.

Portanto para separação dos presentes alcalóides foram testados eletrólitos contendo diferentes proporções de TEA, com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico.

Uma vez que os alcalóides a serem analisados constituem dois pares de diastereoisômeros não é possível obter-se nem pela diferença nas massas, nem pela mobilidade eletroforética uma separação satisfatória. Dessa forma faz-se necessária a adição ao eletrólito de uma espécie capaz de promover uma migração diferencial dos diastereoisômeros, sendo que sem a qual não é possível a sua discriminação. Tais aditivos podem ser tensoativos carregados ou neutros, éteres coroa, ciclodextrinas, etc (Tavares, 1997).

As ciclodextrinas (CD's) são oligossacarídeos cíclicos formados por moléculas de D-glicose unidas através de ligações glicosídicas α(1-4), obtidas a partir da degradação enzimática do amido (Figura 3.2). As CD's mais conhecidas são as α, β

e γ - ciclodextrinas, constituídas por 6, 7 e 8 unidades de glicose, respectivamente, que adotam conformação de cadeia (Gübitz e Schmid, 2001). A molécula de ciclodextrina tem uma cavidade hidrofóbica e uma superfície externa (anel) hidrofílica. O anel contém de doze a dezoito grupos hidroxila secundários (dependendo do número de unidades de glicose na estrutura) (Schneiderman e Stalcup, 2000). Uma variedade de compostos solúveis e insolúveis em água pode se encaixar na cavidade quiral hidrofóbica da molécula da ciclodextrina, formando complexos com diferentes estabilidades (Luong e Nguyen, 1997; Lurie, 1997).

Estes complexos formados levam a separações de moléculas quirais devido à interação do grupo hidrofóbico do analito com o interior da cavidade hidrofóbica da CD, formando complexos de inclusão e, também, pelas interações externas com os grupos hidroxila que estão dispostos na estruturas das CDs, interações do tipo dipolo-dipolo. As ciclodextrinas possuem diferentes graus de afinidade pelo analito, com isso, o analito terá seu tempo de migração alterado, levando assim a diferenciação de um possível par critico.

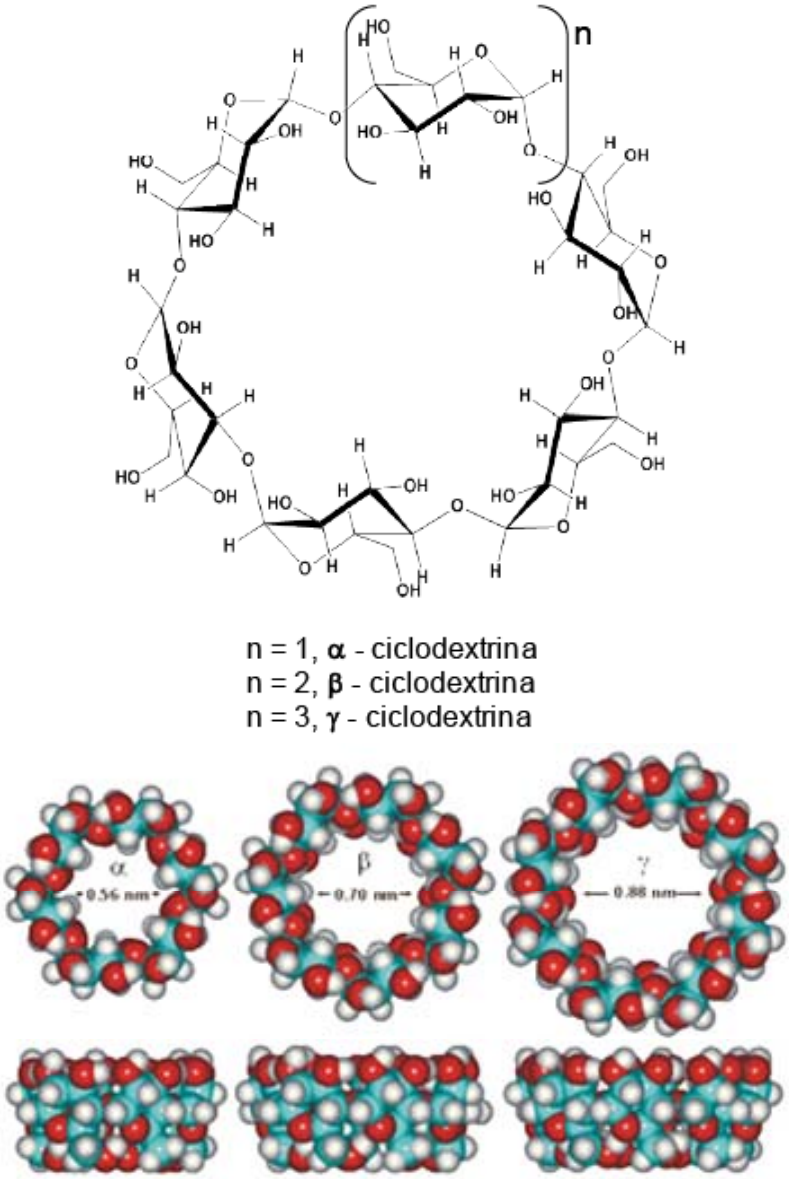


Figura 3.3. Estrutura química e modelo das ciclodextrinas α-CD, β-CD, γ-CD (Silva, 2008).

Como o eletrólito de corrida utilizado está em pH 2,5 as ciclodextrinas neste meio (fluxo eletrosmótico reduzido), tendem a ficarem estáticas no interior do capilar, quando se aplica um determinado campo elétrico. Com a passagem dos alcalóides carregados positivamente, estes formam complexos transitórios com as ciclodextrinas, sendo que cada diasteroisômero sofre interações diferentes com as

ciclodextrinas, o que leva a uma modificação de sua mobilidade, culminando com uma possível resolução dos pares de isômeros. A molécula do analito quando complexada à ciclodextrina migra na mesma velocidade do fluxo eletrosmótico, pois estas são neutras. Com isso, a velocidade do analito tem um componente do vetor da velocidade do fluxo eletrosmótico, além da própria velocidade eletroforética analito, já que o complexo formado é lábil, sendo governado por um equilíbrio.

Foram testados os desempenhos das α, β e γ – ciclodextrinas. Foram realizados experimentos utilizando a mesma porcentagem de TEA (0,8% v/v) para composição do eletrólito e a mesma concentração de ciclodextrina (10 mmol L^{-1}), variando o tipo da ciclodextrina para verificar o efeito de cada uma delas sobre a separação dos alcalóides da *Cinchona*. As Figuras 3.4, 3.5 e 3.6, apresentam os eletroferogramas obtidos, com o uso das α, β e γ-ciclodextrinas, respectivamente.

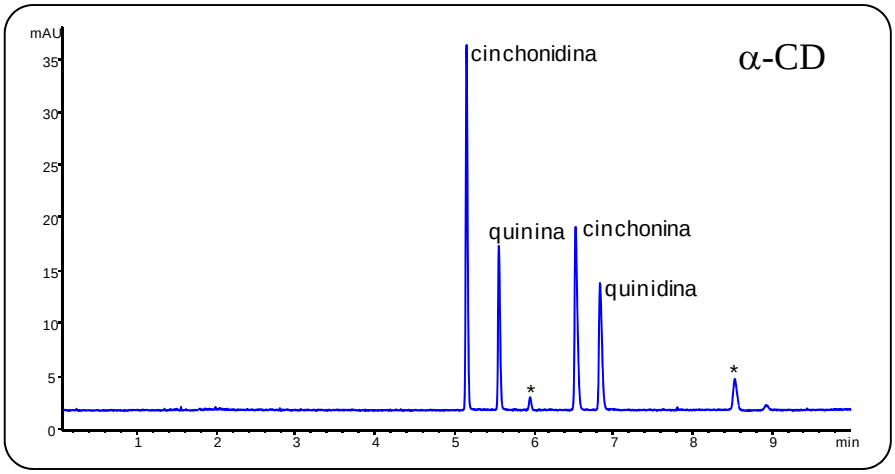


Figura 3.4. Eletroferograma da mistura de padrões dos alcalóides da *Cinchona* (40 μg mL^{-1}). Eletrólito de corrida: 0,8% (v/v) TEA com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, 10 mmol L^{-1} α-ciclodextrina.

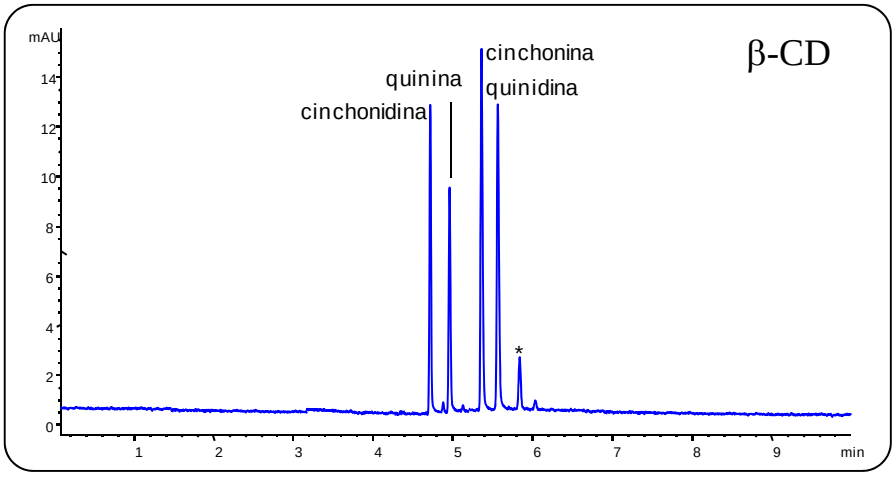


Figura 3.5. Eletroferograma da mistura de padrões dos alcalóides da *Cinchona* (40 mg mL^{-1}). Eletrólito de corrida: 0,8% (v/v) TEA com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, 10 mmol L^{-1} β-ciclodextrina.

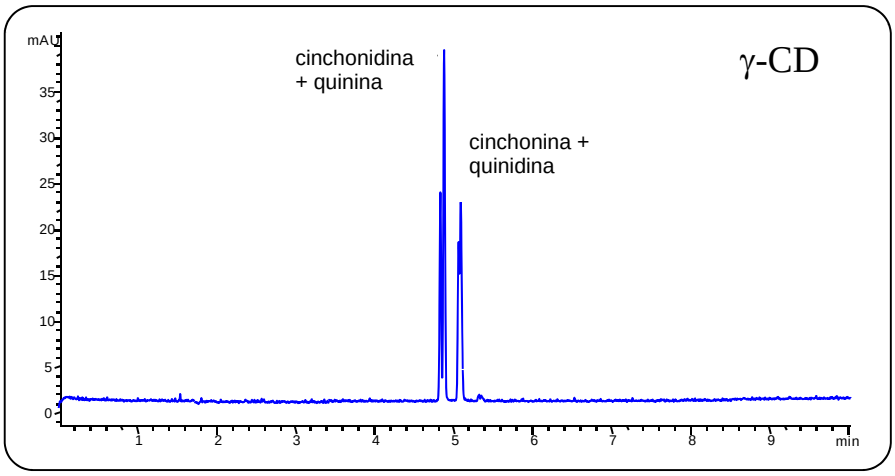


Figura 3.6. Eletroferograma da mistura de padrões dos alcalóides da *Cinchona* (40 mg mL^{-1}). Eletrólito de corrida: 0,8% (v/v) TEA com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, 10 mmol L^{-1} γ-ciclodextrina.

Pode-se observar nos eletroferogramas que para a solução padrão dos alcalóides, as diferentes CDs influenciam o tempo de migração dos analitos, pois verificamos que em uma mesma concentração das α, β e γ-ciclodextrinas, diferentes

tempos de migração dos analitos, bem como diferentes resoluções, foram obtidos. O uso da α e β - ciclodextrinas levaram a resolução em linha de base de todos os analitos na concentração testada, enquanto que nesta concentração o uso da γ-ciclodextrinas não levou à separação dos analitos. Porém a α–CD apresentou melhores resultados quanto à resolução dos analitos, mesmo despendendo maior tempo de análise em relação à β-CD; a α-CD foi então selecionada para ser utilizada como seletor na separação dos alcalóides da *Cinchona.* No extrato da casca da planta estão presentes outros compostos, que possivelmente possuem estruturas semelhantes à dos alcalóides aqui estudados, e podem co-migrar com os analitos que estão sendo determinados e prejudicar a análise quantitativa. Outra vantagem no uso da α-ciclodextrina como seletor é a maior solubilidade em água em relação à β-ciclodextrina. Enquanto levamos cerca de 30 minutos para dissolver a β-ciclodextrina, levamos cerca de 10 minutos para dissolver a α-ciclodextrina.

Depois de selecionada a α-ciclodextrina como aditivo, foram realizados experimentos de modo a otimizar a composição do eletrólito, visando diminuir o tempo de análise sem comprometer a resolução. Para tanto se utilizou o planejamento fatorial como ferramenta.

3.4 Utilização de planejamento fatorial e metodologia de superfície de resposta para obtenção de ótimos de separação

3.4.1 Planejamento Fatorial

Primeiramente em um planejamento fatorial é necessário definir quais são os fatores e as respostas de interesse. Os fatores são as variáveis que o experimentador tem condições de controlar. Em relação aos fatores é necessário determinar as variáveis de interesse e em seguida em quais níveis estas variáveis serão estudadas, normalmente estas variáveis são utilizadas em dois níveis, o nível mais baixo (-1) e o nível mais alto (+1). Utilizando as variáveis e os níveis escolhidos são realizados experimentos gerados a partir das combinações destas variáveis. Esse tipo de fatorial é conhecido como fatorial completo. Portanto para um planejamento fatorial com n variáveis e 2 níveis são executados 2^n experimentos. Desta forma é possível avaliar o efeito de cada variável individualmente, bem como o efeito da interação entre elas. Outro tipo de planejamento é o planejamento com ponto central, onde são realizados experimentos no nível 0 da variável, esse nível é médio entre as variáveis de nível (+1) e (-1). A adição do ponto central tem por objetivo determinar erros do modelo aplicado (Klein e Rivera, 2000; Rodrigues e Iemma, 2005; Ferreira *et al.*, 2007).

Após selecionada a α-CD como seletor quiral, foram estudados os efeitos das concentrações da ciclodextrina e do eletrólito sobre a separação dos alcalóides da *Cinchona*, através de um estudo de planejamento fatorial 3^2 (Neto e Bruns, 2007; (Fukuji *et al.*, 2010).

Inicialmente foi realizado um planejamento fatorial, onde a porcentagem de TEA foi variada entre 0,1 e 0,3% (v/v) e a concentração de α-CD entre 2 e 6 mmol L^{-1}. Para tais condições foi realizada uma análise qualitativa dos resultados, uma vez que verificamos que ao realizar as injeções com 0,1% de TEA em todas as concentrações de α-CD e 0,2% TEA com 2 e 4 mmol L^{-1} de α-CD não obtivemos separação entre os analitos. As demais condições testadas levaram a separação dos quatro alcalóides da *Cinchona*, contudo em nenhuma destas condições foi possível obter boa resolução entre os analitos de interesse e outros componentes do extrato; ao injetar o extrato em tais condições, verificamos que alguns componentes co-migraram com os analitos de interesse, além da obtenção de picos alargados.

Com o propósito de determinar outra região de estudo da concentração de α-CD e das porcentagens de TEA, foram realizados experimentos univariados, para posteriormente realizarmos um segundo planejamento fatorial.

Para verificarmos a influência da concentração de α-CD na separação dos alcalóides foram realizados experimentos com maiores concentrações de α-CD em uma concentração fixa de TEA. Experimentos variando a concentração de α-CD entre 10 e 40 mmol L^{-1} mantendo-se fixa a concentração de TEA em 0,1% (v/v), levaram a separação dos alcalóides, porém a partir da concentração de 20 mmol L^{-1} não verificamos efeitos significativos relacionados à resolução entre os diasteroisômeros.

Uma estratégia para melhorar o formato do pico, é o aumento da força iônica do eletrólito, pois o alargamento do pico pode ser proveniente da adsorção dos analitos no capilar. Para verificarmos tal efeito fixamos a concentração de ciclodextrina em 20 mmol L^{-1} e variamos a porcentagem de TEA entre 0,5 a 1,5%

(v/v). O aumento da porcentagem de TEA melhorou o formato do pico principalmente na região entre 0,8 e 1,7 % TEA (v/v).

Após realizarmos esses experimentos preliminares foi possível escolher uma nova região onde possivelmente estaria a melhor condição para separação dos alcalóides da *Cinchona*. Com tais informações foi realizado um novo planejamento fatorial.

Um modelo fatorial 3^2 foi aplicado, onde foram utilizadas como variáveis independentes a porcentagem (v/v) de TEA e a concentração de α-CD em três níveis de variação (+1, 0 e -1). Desta forma foram gerados nove experimentos com repetições em triplicata do ponto central (Tabela 3.1)

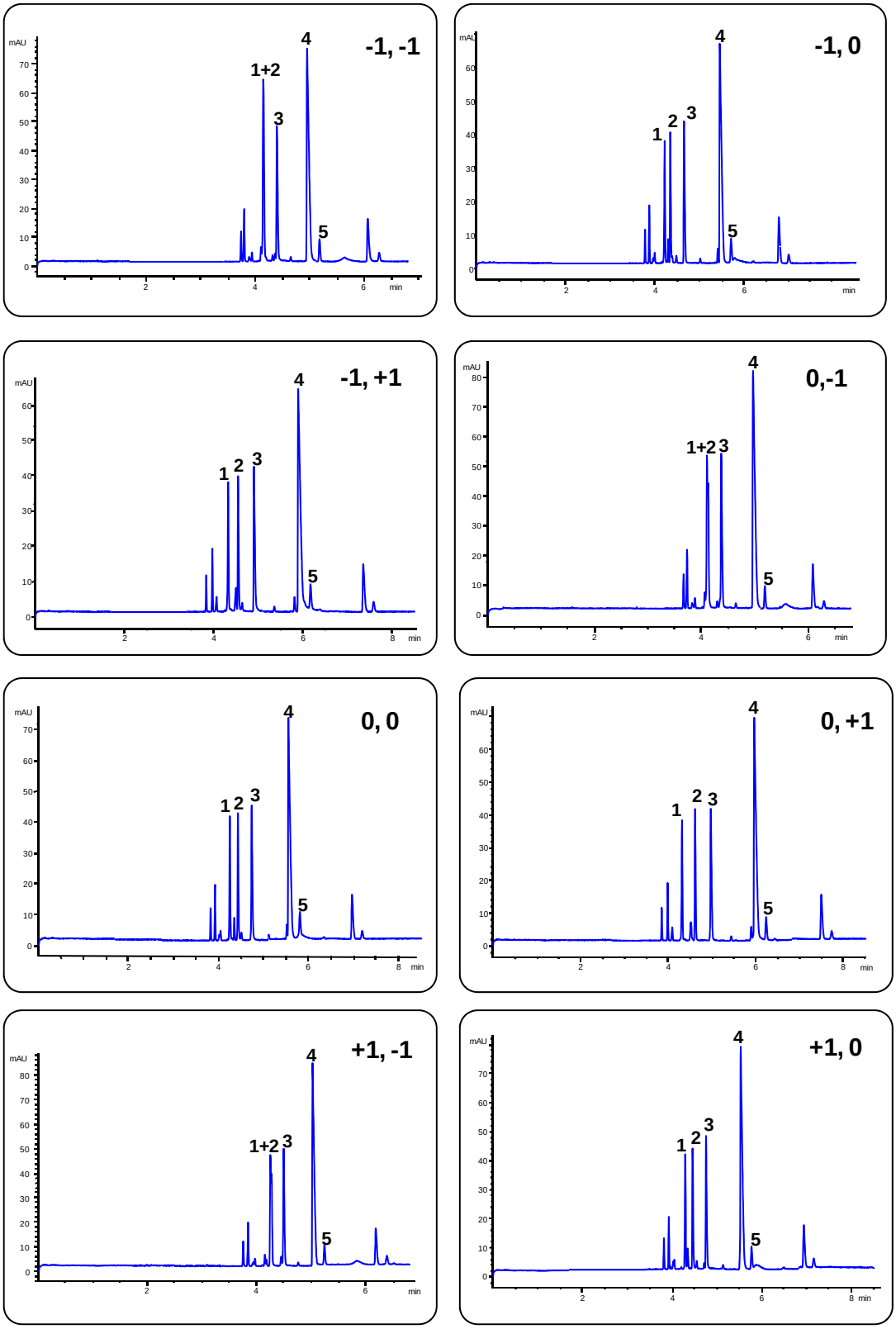
Tabela 3.1 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial

experimento	***[TEA]****	***[α-ciclodextrina]*****
1	-1	-1
2	-1	0
3	-1	+1
4	0	-1
5	0	0
6	0	+1
7	+1	-1
8	+1	0
9	+1	+1
10	0	0
11	0	0
12	0	0

* TEA (+): 1,2% (v,v); TEA (-): 0,8% (v,v)
**[α-CD] (+) mmol L^{-1}: 20; [α-CD] (-) mmol L^{-1}: 10

Foram realizados experimentos variando a concentração de α-CD entre 10 (-1) e 20 (+1) mmol L^{-1} e a porcentagem (v/v) de TEA entre 0,8 (-1) e 1,2% (+1), inicialmente. As condições utilizadas na realização dos experimentos do planejamento foram: injeção hidrodinâmica durante 5s (50 mbar), temperatura do capilar de 25 ºC e tensão de 30 kV.

Extratos vegetais podem apresentar-se como matrizes complexas, onde não se conhece exatamente a composição do extrato, sendo, portanto amostras de difícil desenvolvimento de metodologias analíticas. Desta forma compostos presentes no extrato poderiam co-migrar com os analitos de interesse. Uma alternativa interessante para desenvolvimento de metodologias para este tipo de matriz é a avaliação das diversas condições eletroforéticas aplicadas a amostras reais, não apenas a mistura de padrões dos analitos de interesse. Em todas as condições foram injetadas mistura de padrões dos alcalóides, assim como o extrato da *Cinchona calisaya* preparado no laboratório. Desta forma podemos obter um método livre de interferências, ou seja, o mais seletivo possível. As misturas de padrões foram injetadas na concentração de 40 μg L^{-1} e o extrato diluído em dez vezes.


-1, -1
1+2
3
4
5
-1, 0
1
2
3
4
5
-1, +1
1
2
3
4
5
0,-1
1+2
3
4
5
0, 0
1
2
3
4
5
0, +1
1
2
3
4
5
+1, -1
1+2
3
4
5
+1, 0
1
2
3
4
5
mAU
min

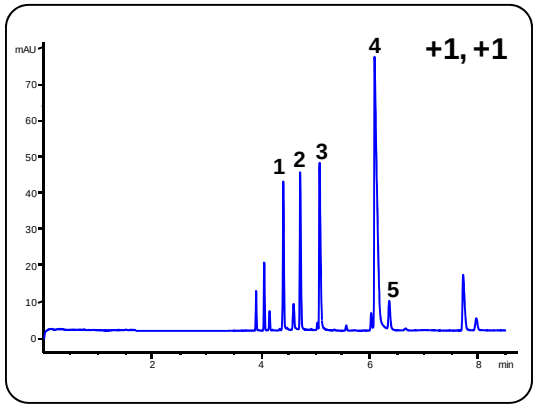


Figura 3.7. Eletroferogramas do extrato de *Cinchona calisaya* nas condições testadas no planejamento fatorial. Composição do eletrólito: TEA em porcentagens (v/v) de 0,8 % (-1); 1,0% (0) e 1,2% (+1) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico; 10 mmol L^{-1} (0); 15 mmol L^{-1} (0) e 20 mmol L^{-1} (+1) e adição de 10% (v,v) de metanol. Identificação: (1) Composto desconhecido, (2) Cinchonidina, (3) Quinina, (4) Cinchonina, (5) quinidina.

A identificação de cada um dos alcalóides foi realizada através da comparação do espectro de UV-vis obtido pela injeção de cada padrão dos alcalóides em corridas individuais. Ao serem realizadas as injeções do extrato nas condições do planejamento fatorial verificamos que um composto presente no extrato co-migrava com um dos analitos de interesse. Com isso tornou-se necessário utilizar os dados referentes às injeções realizadas com o extrato para obter-se uma função resposta.

A função resposta empregada foi a resolução do pico do composto presente no extrato (1) e o pico da cinchonidina (2) (Figura 3.7). A resolução entre dois picos adjacentes é dada segundo a equação 3.1.

$$R_s = \frac{2 \cdot (t_{r2} - t_{r1})}{w_1 + w_2} \quad (3.1)$$

Onde:
t_{r1} = tempo de migração do primeiro pico dado em unidade de tempo
t_{r2} = tempo de migração do segundo pico dado em unidade de tempo
w_i = largura da base do pico dado em unidade de tempo

Como podemos observar nos eletroferogramas da Figura 3.7 algumas condições levaram a co-migração de um dos analitos de interesse com o composto presente na amostra. Em todas as condições em que utilizamos 10 mmol L^{-1} de α-CD para compor o eletrólito observamos este comportamento.

Tabela 3.2 – Resoluções obtidas para picos 1 e 2 do planejamento fatorial

experimento	**Variáveis dependentes**		**Variáveis Independentes**
	[TEA]*	***[α-CD]*****	**$Rs_{1,2}$**
1	0,8 (-1)	10 (-1)	0
2	0,8 (-1)	15 (0)	1,8
3	0,8 (-1)	20 (+1)	3,0
4	1,0 (0)	10 (-1)	0
5	1,0 (0)	15 (0)	2,8
6	1,0 (0)	20 (+1)	4,1
7	1,2 (+1)	10 (-1)	0
8	1,2 (+1)	15 (0)	2,6
9	1,2 (+1)	20 (+1)	4,2
10	1,0 (0)	15 (0)	2,3
11	1,0 (0)	15 (0)	2,3
12	1,0 (0)	15 (0)	2,9
13	1,0 (0)	15 (0)	3,18

* [TEA] % v,v
**[α-CD] mmol L^{-1}

Os resultados foram aplicados num modelo quadrático para dois fatores (x_1 para % TEA e x_2 para [α-CD] para gerar a superfície de resposta de acordo com a seguinte equação:

$$\hat{y} = b_0 + b_1 x_1 + b_2 x_2 + b_{22} x_2^2 \quad (3.2)$$

Onde, $\hat{y}$ são os valores de resolução entre os picos 1 e 2 e o coeficiente de segunda ordem para estimar a curvatura é $b_{22.}$ A equação 3.3 descreve a superfície de resposta. O modelo foi validado por ANOVA, não apresentando falta de ajuste do modelo. Para ajuste do modelo os coeficientes com p>0,05 foram desconsiderados do modelo. Os valores de F e p encontrados para o modelo foram de 46,48 e 0,0001, respectivamente.

$$\hat{y} = 2{,}55(\pm 0{,}15) + 0{,}32(\pm 0{,}17)x_1 + 1{,}88(\pm 0{,}17)x_2 - 0{,}67(\pm 0{,}23)x_2^2 \quad (3.3)$$

Observando os valores de resolução obtidos em cada uma das condições (Tabela 3.2) e os eletroferogramas da Figura 3.7, exceto as condições em que ocorre co-migração dos picos, todas levam a resultados de resoluções satisfatórias. Contudo com o objetivo de encontrar uma condição mais apropriada utilizamos a superfície de resposta como ferramenta para busca de melhor condição.

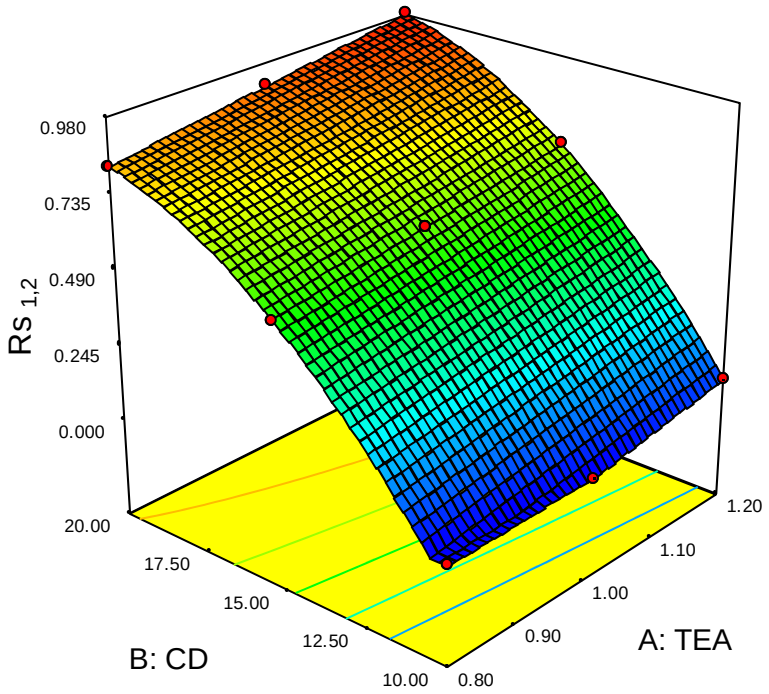


Figura 3.8. Gráfico de otimização segundo planejamento fatorial em função da concentração de TEA e de α-ciclodextrina

Podemos verificar no gráfico da superfície de resposta (Figura 3.7) e na Tabela 3.2, que dentro desta região estudada as resoluções obtidas para as condições de 1,0 e 1,2% (v,v) de TEA e 20 mmol L^{1} α-CD são bastante satisfatórias. Além disso, se observarmos na Figura 3.6, que apresenta os eletroferogramas obtidos em cada condição do planejamento fatorial, os picos 1 e 2, referentes ao par critico, e 3 encontram-se em posições mais simétricas em relação as outras condições. Como sabemos que em concentrações abaixo de 1,0% (v,v) de TEA a resolução começa a ficar comprometida e não observamos grandes variações entre 1,0 e 1,2% (v,v) de TEA com uso de 20 mmol L^{-1} de α-CD, escolhemos então trabalhar com uma condição intermediária entre as concentração estudadas no

fatorial que apresentam melhores resultados, para compor o eletrólito de corrida. Portanto para composição do eletrólito utilizamos TEA 1,1% (v/v) (78,9 mmol L^{-1}) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico e 20 mmol L^{-1} de α-CD. Com isso conhecemos os efeitos das variações na concentração do TEA do eletrólito de corrida, o que nos possibilita a obtenção de um método mais robusto.

3.4.2 Validação do Método

O método otimizado para determinação dos principais alcalóides presentes na *Cinchona* por eletroforese capilar com detecção por UV-DAD foi validado para quantificar tais compostos em extratos vegetais e fitoterápicos seguindo o protocolo de validação da USP XXXII (USP, 2009), onde foram estudados os parâmetros de seletividade, linearidade, exatidão, precisão e robustez (Ribani *et al.*, 2004).

3.4.2.1 Seletividade

O parâmetro de seletividade de um método é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias de interesse na presença de compostos que podem interferir na sua determinação em uma amostra complexa (Ribani *et al.*, 2004).

O método apresenta uma boa seletividade para os alcalóides estudados, como podemos verificar na Figura 3.9, que apresenta o eletroferograma dos padrões dos alcalóides e os mesmos no extrato da planta.

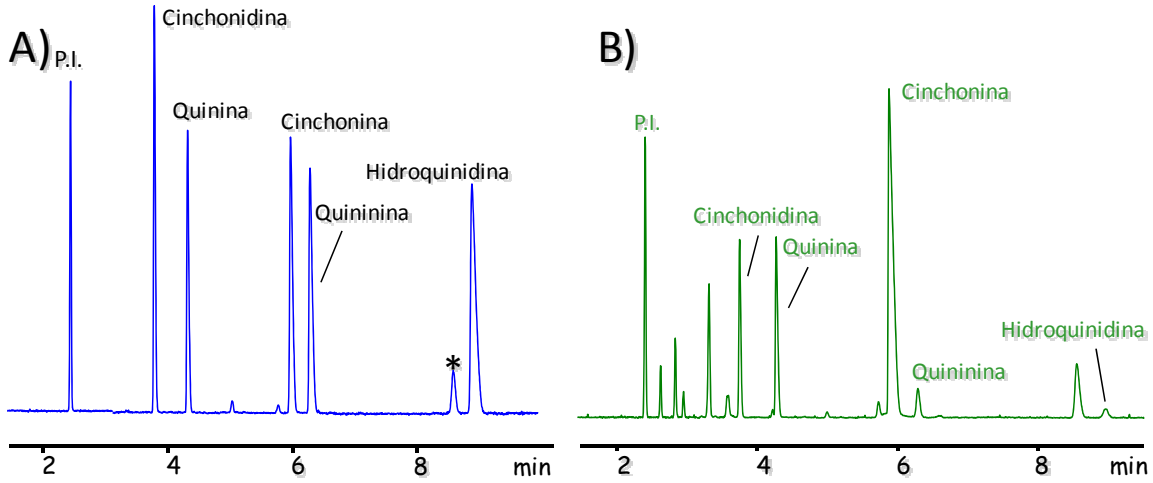


Figura 3.9. Eletroferogramas: A) padrões dos alcalóides (40 mmol L^{-1}); B) Extrato de *Cinchona calisaya*. Eletrólito: TEA 1,1% v/v com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, 20 mmol L^{-1} α-CD. Tensão 30 kV, temperatura 25 ˚C. Injeção 5 mbar/5s e detecção 204 nm.

3.4.2.2 Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ)

Para construção da curva analítica de calibração foram injetados os padrões dos analitos nas faixas de concentração: cinchonidina 5,0 – 40 μg.mL^{-1}, quinina 70 – 110 μg.mL^{-1}, cinchonina 80 – 120 μg.mL^{-1}, quinidina 2,0 – 10 μg.mL^{-1}, hidroquinidina 5,0 – 40 μg.mL^{-1}. Em todas cinco curvas foram utilizadas 40 μg.mL^{-1} de benzoimidazol como padrão interno. As curvas analíticas foram construídas com as razões de áreas dos analitos pela área do padrão interno (benzoimidazol) versus a concentração. As Tabelas 3.3 a 3.7 apresentam os dados referentes às regressões lineares de cinco curvas. Podemos observar pelos dados estatísticos que o método apresentou boa linearidade, uma vez que foram obtidos coeficientes de determinação maiores que 0,99 nas faixas de concentração estudadas, valores altos de F e erros pequenos. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram obtidos a partir dos dados da regressão linear.

Tabela 3.3 – Dados estatísticos para cinchonidina.

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	5,0 - 40
Intercepto	0,013 ± 0,007
Inclinação da reta	0,0141 ± 0,0002
Coeficiente de determinação	0,9987
Erro padrão	0,009
F	2155
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	2,1
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	6,2

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

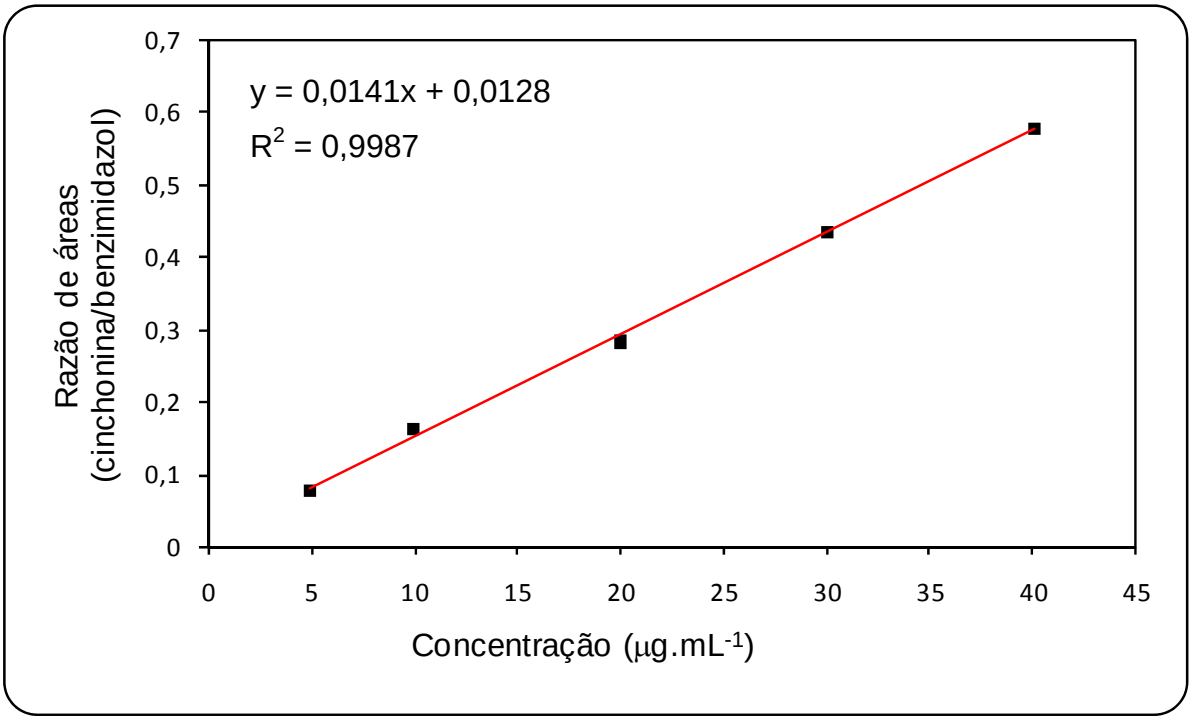


Figura 3.10. Curva analítica para cinchonidina

Tabela 3.4. – Dados estatísticos para quinina.

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	70 - 110
Intercepto	0,064 ± 0,028
Inclinação da reta	0,012 ± 0,0003
Coeficiente de determinação	0,9982
Erro padrão	0,009
F	1706
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	2,5
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	7,6

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

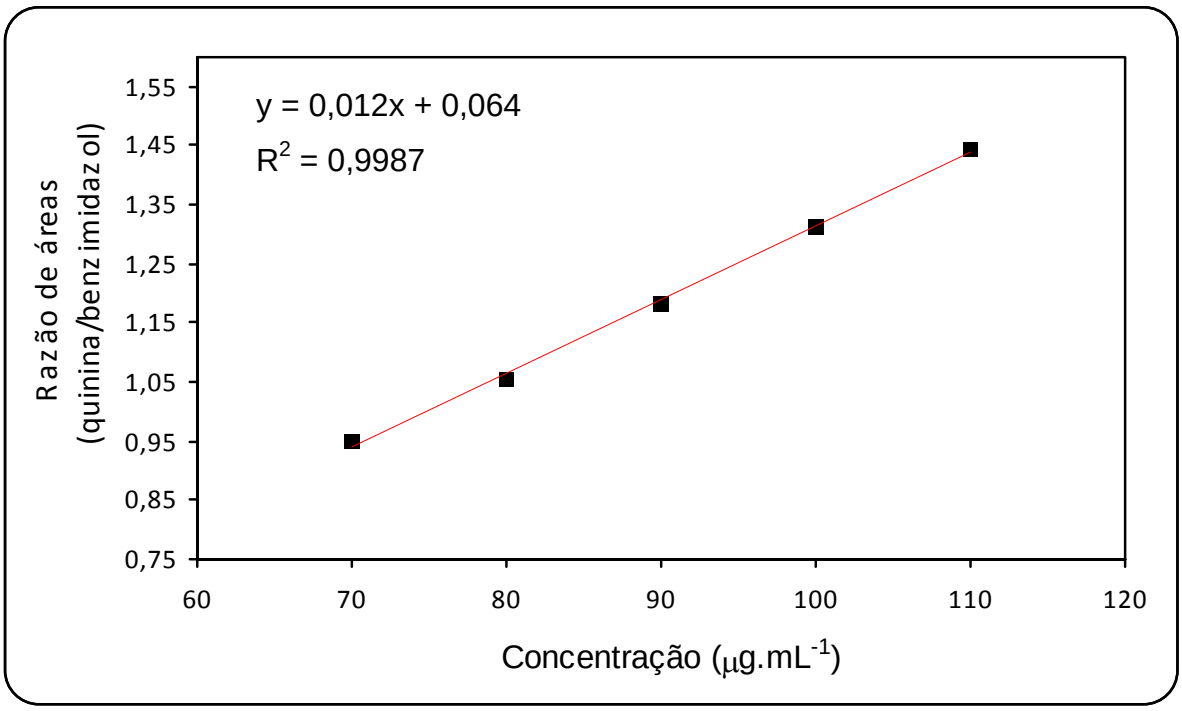


Figura 3.11. Curva analítica para quinina

Tabela 3.5. – Dados estatísticos para cinchonina

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	80 - 120
Intercepto	-0,0098 ± 0,018
Inclinação da reta	0,013 ± 0,0002
Coeficiente de determinação	0,9988
Erro padrão	0,013
F	4597
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	3,3
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	10

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

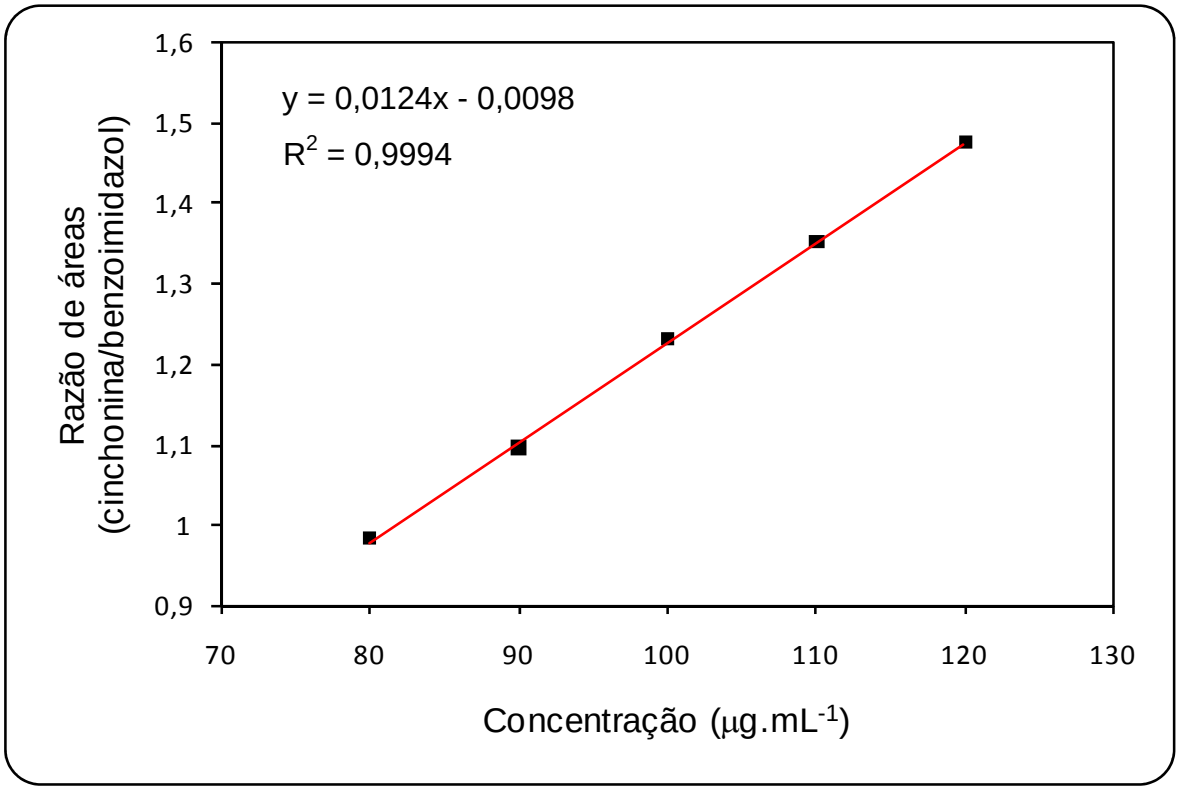


Figura 3.12. Curva analítica para cinchonina.

Tabela 3.6. – Dados estatísticos para quinidina.

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	2,0 - 10
Intercepto	0,0175 ± 0,002
Inclinação da reta	0,016 ± 0,0003
Coeficiente de determinação	0,9992
Erro padrão	0,002
F	3642
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	0,41
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	1,0

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

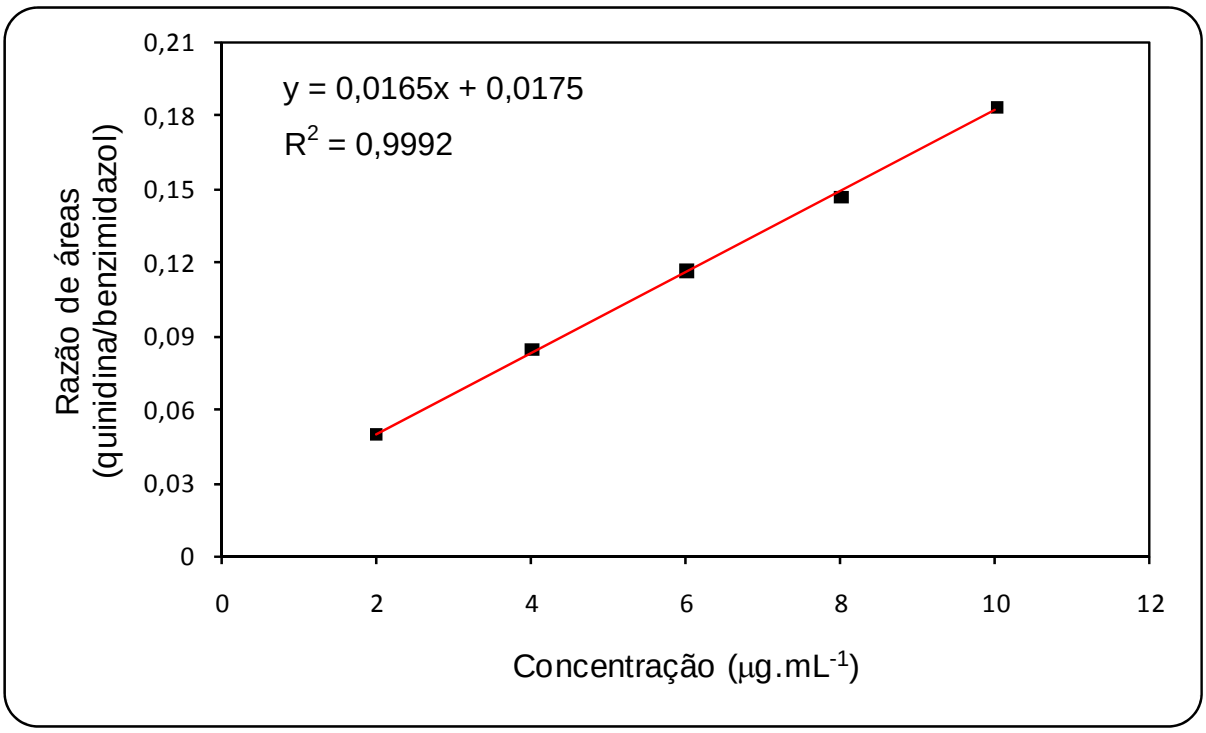


Figura 3.13. Curva analítica para quinidina

Tabela 3.7. – Dados estatísticos para hidroquinidina.

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	5,0 - 40
Intercepto	- 0,0019 ± 0,004
Inclinação da reta	0,017 ± 0,0002
Coeficiente de determinação	0,9997
Erro padrão	0,005
F	11782
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	0,97
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	2,6

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

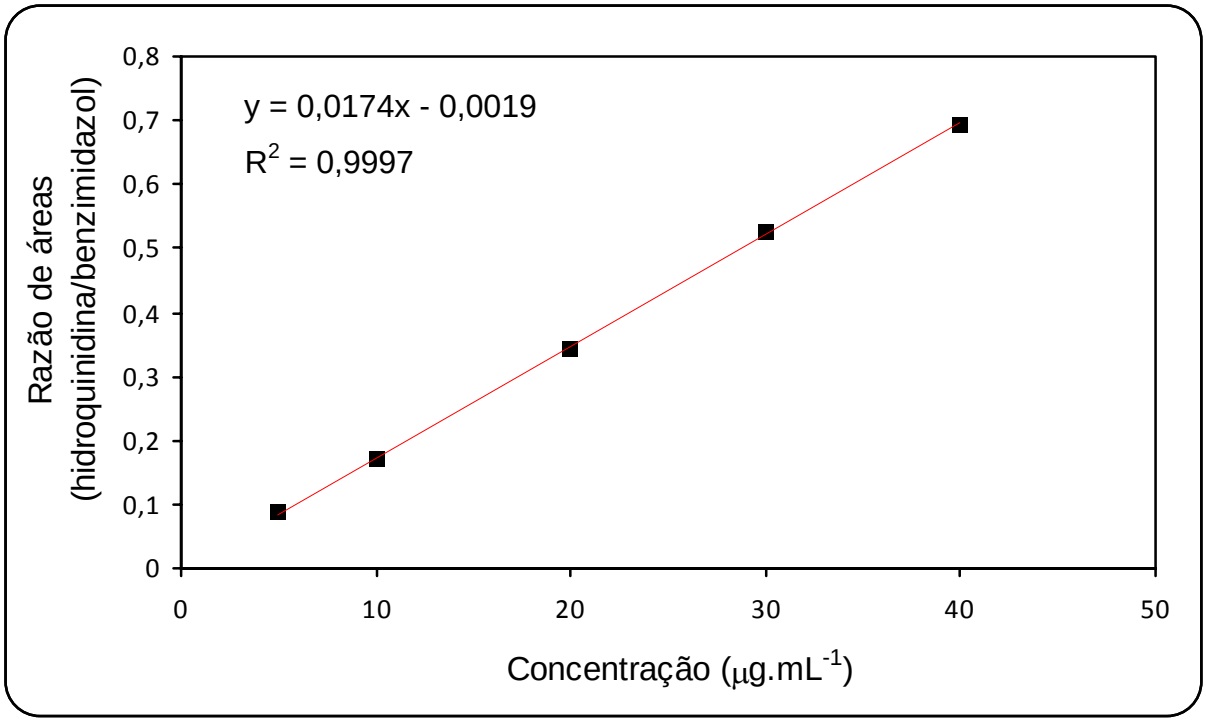


Figura 3.14. Curva analítica para hidroquinidina.

3.4.2.3 Precisão do método

3.4.2.3.1 Intra-ensaio

Para determinar a precisão do método foram realizadas análises dos padrões dos alcalóides em três níveis de concentração (30, 45 e 60 $\mu g.mL^{-1}$), com três replicatas para cada nível sendo, portanto, realizados nove determinações. Através dos coeficientes de variação (CV) foram determinadas a repetibilidades do método para cada analito. As repetibilidades para o tempo de migração e para razão de áreas apresentaram-se menores que 0,81 e 2,16, respectivamente, conforme Tabela 3.8. Os dados apresentados indicaram boa precisão do método.

Tabela 3.8. Avaliação da precisão – intra-ensaio do método.

ALCALÓIDES	CV TEMPO DE MIGRAÇÃO*	CV RAZÃO DE ÁREAS*		
		30 $\mu g.mL^{-1}$	45 $\mu g.mL^{-1}$	60 $\mu g.mL^{-1}$
Cinchonidina	0,49	0,49	0,92	0,12
Quinina	0,48	0,47	2,2	0,67
Cinchonina	0,65	0,54	0,82	1,9
Quinidina	0,66	0,56	0,30	0,97
Hidroquinidina	0,81	0,52	0,30	1,6

*n = 3

3.4.2.3.2 Inter-ensaio

Para determinar a precisão intermediária foram realizadas análises dos padrões dos alcalóides em três níveis de concentração (30, 45 e 60 $\mu g.mL^{-1}$), com três replicatas para cada nível, em três diferentes dias. Através dos coeficientes de variação (CV) foi determinada a precisão intermediária do método para cada analito. Os resultados para tempo de migração apresentaram-se menores que 0,98%,

enquanto que para áreas relativas variaram entre 1,7 e 9,1%. Os dados apresentados na Tabela 3.9 indicaram boa precisão intermediária do método.

Tabela 3.9. Avaliação da precisão – Inter-ensaio do método

ALCALÓIDES	CV TEMPO DE MIGRAÇÃO*	CV RAZÃO DE ÁREAS*		
		30 $\mu g.mL^{-1}$	45 $\mu g.mL^{-1}$	60 $\mu g.mL^{-1}$
Cinchonidina	0,73	3,90	4,43	2,08
Quinina	0,66	3,61	1,72	7,12
Cinchonina	0,81	2,70	4,85	5,36
Quinidina	0,76	2,84	5,83	2,90
Hidroquinidina	0,98	6,61	9,14	3,67

* n = 9, 3 dias

3.4.2.4 Exatidão

Para realização do teste de recuperação é necessária a determinação dos padrões do analito na matriz isenta do mesmo (placebo) (Anvisa, 2003); uma vez que não é possível obter-se a matriz isenta do analito, no caso de extratos vegetais, foi realizada a adição de quantidades conhecidas dos analitos à amostra de extrato vegetal preparado no laboratório da espécie de *C. calisaya*, em três níveis de concentração, bem como a determinação do branco (matriz sem adição dos analitos). Os dados referentes ao teste de recuperação estão apresentados na Tabela 3.10. Foram obtidos resultados de recuperação na faixa de 89,3 a 101,4%. Tais valores são aceitáveis tendo em vista que a presente matriz é uma matriz complexa.

Tabela 3.10. Avaliação da Exatidão do método (teste de recuperação)

ALCALÓIDES	RECUPERAÇÃO (%)		
	30 μg.mL^{-1}	45 μg.mL^{-1}	60 μg.mL^{-1}
Cinchonidina	90,5 ± 2,2	101,4 ± 2,6	94,8 ± 1,1
Quinina	95,3 ± 2,2	92,9 ± 1,9	98,1 ± 1,6
Cinchonina	95,3 ± 2,5	91,3 ± 3,2	93,6 ± 1,2
Quinidina	89,3 ± 3,1	96,4 ± 0,75	98,9 ± 2,9
Hidroquinidina	92,1 ± 1,1	95,0 ± 1,1	97,5 ± 3,2

3.4.2.5 Robustez

A robustez do método foi avaliada através da comparação dos resultados, da razão de áreas, obtidos com os parâmetros do método proposto e pequenas variações na tensão aplicada (28 e 29 kV) e na temperatura (24 e 26 ºC). Aplicou-se o teste F para verificar a significância entre os resultados. De acordo com os valores apresentados na Tabela 3.11 podemos verificar que não há diferença significativa entre os resultados, aplicando-se pequenas variações na tensão e na temperatura, a um nível de confiança de P = 95%.

Tabela 3.11. Avaliação da Robustez do método

ALCALÓIDES	Tensão		Temperatura	
	28(kV)	29 (kV)	24 ˚C	26 ˚C
	F_c	F_c	F_c	F_c
Cinchonina	0,39	0,57	0,18	0,19
Quinina	0,35	0,81	0,90	0,75
Cinchonidina	0,78	0,34	0,64	0,37
Quinidina	0,58	0,82	0,72	0,42
Hidroquinidina	0,34	0,87	0,17	0,81

Valor Tabelado de F, P = 95%, $F_{2,2}$ = 19,00 (Barros Neto *et al.*, 2007)

3.4.2.6 Determinação dos alcalóides em Extratos de *Cinchona calisaya e succirubra,* formulações comercializadas

Foram realizadas as determinações dos alcalóides em extratos preparados no laboratório das espécies de *C. calisaya e succirubra*, além da determinação dos alcalóides presentes em um extrato comercial e em um fitoterápico.

Foram preparados extratos da espécie de *C. calisaya* utilizando ambas as técnicas de extração, com o objetivo de verificar o efeito do ultra-som na extração dos presentes alcalóides. A literatura já tem reportado a extração por efeito do ultra-som, porém com a utilização de solventes tóxicos como metanol (Gatti *et al.*, 2004). Utilizamos água e etanol para compor o líquido extrator por não serem solventes tóxicos.

O extrato foi preparado por extração sob efeito de ultra-som e extração por Soxhlet. A literatura relata que a eficiência da extração é muito melhorada pelo tratamento com ultra-som. A capacidade de recuperação pelo tratamento com ultra-som é principalmente atribuída pela facilidade de transferência de massas entre a fase imiscível por meio da agitação, especialmente pela faixa de freqüência. Os mais importantes efeitos mecânicos do tratamento com ultra-som são microjato e microfluxo (Tsochatzidis *et al.*, 2001; Velickovic *et al.*, 2006). O primeiro é uma conseqüência da cavitação ou por causa da grande aproximação da superfície sólida, resultando em um colapso de bolhas de maneira assimétrica. O último é principalmente uma conseqüência da cavitação em presença de força suspensa. O primeiro beneficio da extração por ultra-som é a melhoria na hidratação e fragmentação do material da planta (Yang *et al.*, 2008).

Para preparação do extrato por ultra-som foi utilizada uma mistura de solventes composta por água/etanol (1:1) e a mistura foi colocada sob efeito de ultra-som durante vinte minutos. A água é, sem dúvida, um dos líquidos extrator mais importantes e muito utilizada na extração de diversos produtos naturais; a mesma foi utilizada para compor a mistura de solvente para extração devido ao intumescimento da célula (Simões *et al*, 2007), o que facilita a extração.

A extração por Soxhlet é bastante descrita na literatura para extração de alcalóides (McCalley, 2002; Gatti *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2009). A extração em aparelho de Soxhlet consiste em uma extração a quente em sistema fechado. É utilizada, sobretudo, para extrair sólidos com solventes voláteis. Em cada ciclo de operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado, assim, o processamento possibilita a extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos (Simões *et al*., 2007).

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.12.

Tabela 3.12. Determinação dos alcalóides em casca de *Cinchona*

ALCALÓIDES	AMOSTRAS (% casca de Cinchona seca)		
	Extrato preparado[a]	Extrato preparado[c]	Extrato preparado[b]
Cinchonidina	0,94 ± 0,10	1,7 ± 4,3	< LOD
Quinina	5,5 ± 4,0	3,2 ± 2,2	< LOD
Cinchonina	5,9 ± 1,7	8,1 ± 2,9	< LOD
Quinidina	0,35 ± 4,7	0,39 ± 2,0	< LOD
Hidroquinidina	0,76 ± 1,9	0,18 ± 0,54	< LOD

a Extrato preparado sob efeito ultra-som para espécie de *C. calisaya*
c Extrato preparado em aparato Soxhlet para espécie de *C. calisaya*
b Extrato preparado sob efeito ultra-som para espécie de *C. succrirubra*

Como podemos verificar com os resultados obtidos, a extração dos alcalóides da *C. calisaya* sob efeito de ultra-som apresentou-se bastante eficiente, principalmente considerando o tempo de extração e a alta quantidade extraída do alcalóide quinina, que tem alto valor comercial.

Já para espécie *C. succirubra* a presente extração não se mostrou tão eficiente, com isso realizamos outros experimentos aumentando o tempo de exposição ao efeito do ultra-som para 60 minutos. Contudo, não foi possível a verificação dos alcalóides no extrato em estudo dentro dos presentes limites de detecção. A literatura apresenta que a espécie de *C. succirubra* possui maiores concentrações de alcalóides em relação a outras espécies, e trabalhos com a extração da espécie *C. succirubra* sob efeito de ultra-som apresentaram resultados satisfatórios (Head *et al.*, 1956; Gatti *et al.*, 2004). Esses fatos nos levam a supor que a casca de *C.succirubra* que analisamos pode não ser da espécie descrita, ou que devido à sazonalidade não houve a produção dos presentes alcalóides pela planta, já que não encontramos nenhum dos alcalóides estudados dentro do limite de detecção do método.

Para determinação dos alcalóides em extrato vegetal comercial e no fitoterápico foi realizada a diluição dos mesmos em 10 vezes.

Os resultados obtidos estão apresentados na Tabela 3.13.

Tabela 3.13. Determinação dos alcalóides em formulações comerciais

ALCALÓIDES	AMOSTRAS ($\mu g\ mL^{-1}$)		
	Extrato comercial	Fitoterápico[a]	Fitoterápico[b]
Cinchonidina	149,18 ± 0,11	-	-
Quinina	257,21 ± 4,1	387,68 ± 0,98	400
Cinchonina	633,89 ± 0,92	-	-
Quinidina	40,29 ± 8,2	-	-
Hidroquinidina	76,18 ± 5,9	-	-

a Concentração encontrada
b Concetração declarada

Com o objetivo de investigar a aplicação do método na identificação de amostras adulteradas, adquirimos uma amostra de casca de *Cinchona*, vendida com o nome popular de quina, em comércio, onde não há certificação.

Realizamos o processo de extração, seguindo o mesmo procedimento que para amostra de *C. calisaya*.

A Figura 3.15 apresenta os eletroferogramas da amostra obtida no comércio sem certificação e a amostra de *C.calisaya*. Como podemos observar o perfil eletroforético dos extratos é bastante diferente, bem como os espectros de UV obtidos para os principais picos, o que nos leva a concluir que possivelmente esse a planta vendida como quina (*Cinchona*) não apresenta os principais alcalóides da *Cinchona*.

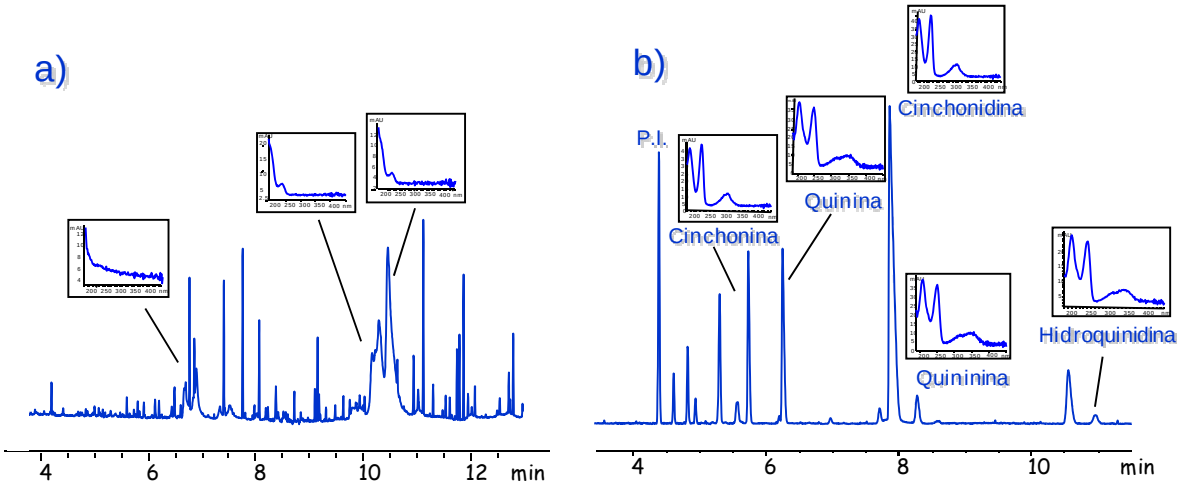


Figura 3.15. Eletroferogramas: a) extrato de quina de comércio sem certificado; b) extrato de *Cinchona calisaya*. Eletrolito: Eletrólito: TEA 1,1% (v/v) com pH ajustado para 2,5 com ácido fosfórico, 20 mmol L^{-1} α-CD. Tensão 30 kV, temperatura 25 ˚C. Injeção 5mbar/5s e detecção 204 nm.

3.5 Conclusão

Neste capítulo foi desenvolvido e validado um método simples e preciso por CZE, para determinação dos principais alcalóides presentes no gênero *Cinchona*, com tempo de análise inferior a 10 minutos e os demais parâmetros de validação adequados, que pode vir a ser facilmente implementado em rotinas de laboratório de controle de qualidade de extratos vegetais.

4. Análise confirmatória de alcalóides por CE-MS

4.1 Introdução

4.1.1 Eletroforese Capilar acoplada à Espectrometria de Massas (CE-MS)

A espectrometria de massas é uma poderosa técnica analítica utilizada como ferramenta para elucidação estrutural, identificação e quantificação de compostos. Um espectrômetro de massas é composto por uma fonte de íons, analisador e detector. Para obtenção de resultados mais sensíveis e seletivos o espectrômetro de massas tem sido combinado com técnicas cromatográficas (GC e HPLC) e eletroforese capilar (CE).

A eletroforese capilar (CE) acoplada ao espectrômetro de massas com ionização por electrospray (ESI-MS) é uma importante ferramenta bioanalítica para análise de solutos quirais e aquirais, devido à sensibilidade e seletividade do detector. Enquanto novas aplicações de CE em separações quirais continuam aparecendo, as vantagens em acoplar equipamentos de CE com espectrômetros de massas tornam-se evidentes (Shamsi e Miller, 2004).

A cromatografia líquida e a eletroforese capilar têm apresentado importante papel como técnicas de separação em meio liquido para análise quiral de diversos compostos. A eletroforese capilar apresenta maior eficiência, muitas vezes, análises mais rápidas do que a cromatografia líquida e necessidade de volumes de amostras menores. O volume de preenchimento do capilar também é baixo o que torna acessível para utilização de seletores quirais de elevado custo. Alem disso, já que o seletor quiral é misturado ao eletrólito de corrida é possível testar diversos seletores quirais em diferentes concentrações. A principal desvantagem da eletroforese capilar

em relação a cromatografia liquida é seu limite de detecção relativamente pobre em relação à cromatografia liquida (Giuffrida *et al.*, 2009).

Considerando as grandes vantagens derivadas da utilização da eletroforese capilar quiral, o acoplamento com espectrômetro de massas (MS) deu origem a uma poderosa ferramenta analítica. Deste modo, a CE-MS quiral permite combinar a velocidade de separação, poder de resolução elevado, mínimo de amostra e reagentes são consumidos na CE e com as informações fornecidas pelo MS (Giuffrida *et al.*, 2009).

Diversos métodos de ionização foram propostos para CE-MS, mas a interface com ionização por electrospray (ESI), estudada primeiramente por Fenn e outros, foi reconhecido como um poderoso método na maioria dos estudos de CE-MS.

O método mais popular para conexão de CE-ESI-MS é o sistema de fluxo com tubo triplo utilizando um líquido auxiliar (sheath liquid), relatado por Smith e outros (Shamsi *et al.*, 2004). Neste tipo de interface um tubo de aço inox concêntrico ao capilar é responsável por guiar o líquido auxiliar até a extremidade do capilar, fechando o contato elétrico do sistema de eletroforese capilar. Além do estabelecimento do contato elétrico, o líquido auxiliar também faz com que o fluxo seja aumentado promovendo uma maior estabilidade do spray. A relação sinal/ruído fornecida por este tipo de montagem é fortemente dependente da composição qualitativa e quantitativa do eletrólito utilizado para separação, assim como do líquido auxiliar. Outros fatores como a pressão do gás nebulizador, o fluxo do líquido auxiliar bem como a temperatura da interface também são fatores que influenciam de forma decisiva os resultados no que se refere a relação sinal/ruído (Moraes e Lago, 2003; Shamsi *et al.*, 2004; Simionato *et al.*, 2008; Giuffrida *et al.*, 2009).

Na eletroforese capilar acoplada com o espectrômetro de massas (CE-MS) é pouco recomendada a utilização eletrólitos não voláteis, assim como a presença contínua de seletores quirais tais como a ciclodextrina, pois estes podem resultar na contaminação da fonte de íons do espectrômetro de massas, em baixa eficiência de ionização e na perda da sensibilidade do detector (Shamsi *et al.*, 2004; Assuncao *et al.*, 2008; Quirino e Haddad, 2009; Xia *et al.*, 2009).

Uma possível resolução para presença continua da utilização seletores quirais é a utilização da técnica de preenchimento parcial (“partial filling”) .

4.1.2 Técnica de preenchimento parcial (“partial filling”)

A técnica de preenchimento parcial foi primeiramente introduzida por Valtcheva (Valtcheva *et al.*, 1993), e modificada por Terabe (Tanaka e Terabe, 1995). A técnica foi originalmente desenvolvida para melhorar a detectabilidade em sistemas de separação quiral com detecção por UV, a qual envolvia seletores quirais, que levavam a respostas no detector, como proteínas e antibióticos macrocíclicos.

Esta técnica requer o preenchimento do capilar com eletrólito de corrida sem a presença do seletor quiral, em seguida é introduzido parcialmente no capilar o eletrólito de corrida contendo o seletor quiral e, finalmente a amostra é injetada. (Harino *et al.*, 1995; Tanaka e Terabe, 1997; Tanaka *et al.*, 2000; Rudaz *et al.*, 2001).

A técnica de “partial filling” foi aplicada em separação quiral para CE-MS pela primeira vez em 1998 por Jäverfalk, *et. al*. (Jäverfalk *et al.*, 1998). Neste estudo, os enantiômeros da bupicaíva e ropivacaína foram separados usando capilar revestido

com gel de poliacrilamida, a β-metil ciclodextrina foi utilizada como seletor quiral e como eletrólito de corrida 50 mmol L^{-1} de ácido acético em pH 3,0. Os autores relatam que o uso de capilares revestidos não apenas minimizam o fluxo eletrosmótico, mas também inibem a entrada do seletor quiral na fonte de íons. Outra estratégia para impedir a entrada de seletor quiral na fonte de íons é o monitoramento da zona de seletor quiral a partir do tamanho da zona de eletrólito de corrida, que contém o seletor quiral, e a velocidade do fluxo eletrosmótico, para seletores quirais neutros.

4.2 Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (P/ACE MDQ, Beckman Coulter) acoplado a um espectrômetro de massas (LCQ Deca XP Max, Finningan) e com programa de aquisição e tratamento de dados (X-Calibur). O equipamento de eletroforese capilar possui um sistema de refrigeração do capilar por circulação de liquido refrigerador, que possibilita o controle da temperatura interna do capilar. As amostras e soluções padrão foram injetadas hidrodinamicamente (1 psi durante 5 s) e o sistema de eletroforese operado com tensão constante de 25 kV. Foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestido externamente com polimida, com dimensões de 50 μm de diâmetro interno e 74 cm de comprimento total. O capilar foi submetido a condicionamentos iniciais sempre que utilizados, através de lavagens realizadas por pressão de 20 psi, com hidróxido de amônio 3 mol L^{-1} durante 6 minutos, seguido metanol e de água deionizada durante 6 minutos cada um e 3

minutos de eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens durante 3 minutos com o eletrólito de corrida. Ao término das análises o capilar foi lavado com hidróxido de amônio 3 mol L^{-1} durante 6 minutos e por 6 minutos com água deionizada. Para armazenamento do capilar o mesmo permaneceu sem nenhum liquido.

4.3 Reagentes e Soluções

Todos reagentes utilizados são de grau analítico e a água deionizada foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Foram preparadas soluções estoques dos padrões e extrato da *Cinchona calisaya* como descrito anteriormente no desenvolvimento da metodologia por CE-DAD. Foram preparadas soluções estoque de ácido fórmico 1 mol L^{-1}. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente através da diluição da solução estoque. Para o plug de ciclodextrina, a α-ciclodextrina foi diluída no eletrólito de corrida sob efeito do ultra-som durante 10 minutos.

4.4 Desenvolvimento do método

Para o desenvolvido do método para análise confirmatória dos principais alcalóides presentes no gênero *Cinchona* um equipamento de eletroforese capilar acoplado a um espectrômetro de massas (CE-MS) foi utilizado, uma vez que esta técnica fornece uma combinação de elevada eficiência de separação com riqueza de informação estrutural e grande seletividade.

A informação sobre o melhor seletor quiral (tipo de ciclodextrina) foi aproveitada da etapa de desenvolvimento de metodologia por CE-DAD.

Como a utilização eletrólitos não voláteis, assim como a presença contínua de seletores quirais, tais como a ciclodextrina, não é recomendada no acoplamento da eletroforese capilar com espectrômetro de massas (CE-MS), pois estes podem resultar na contaminação da fonte de íons do espectrômetro de massas, em baixa eficiência de ionização e na perda da sensibilidade do detector (Shamsi e Miller, 2004), foi desenvolvido um eletrólito de corrida com objetivo de minimizar tais problemas.

O problema de baixa volatilidade do eletrólito foi resolvido com a utilização de ácido fórmico como eletrólito, e o problema da presença contínua de ciclodextrina no eletrólito de corrida, contaminando a fonte do espectrômetro, pela utilização da técnica de preenchimento parcial (“partial filling”).

Na técnica de preenchimento parcial do capilar somente uma parte do capilar é preenchido com eletrólito contendo ciclodextrina (neutra) e, uma vez que em baixos valores de pH tem-se um fluxo eletrosmótico bastante reduzido a ciclodextrina não atinge o detector de massas (Figura 4.1). A separação quiral ocorre então dentro do plug de ciclodextrina injetado antes da amostra, sendo que os analitos, diasteroisômeros no caso dos alcalóides da *Cinchona*, uma vez separados dentro deste plug migram normalmente quando deixam a região contendo ciclodextrinas, atingindo o detector de massas em tempos diferentes.

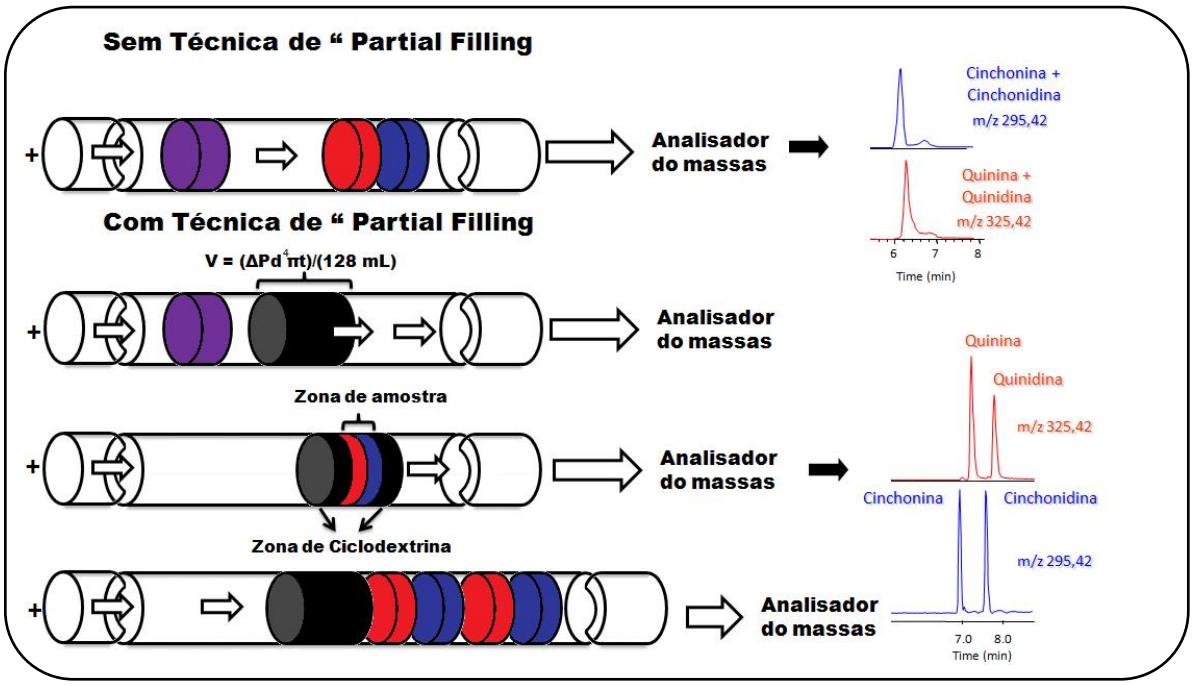


Figura 4.1. Técnica de preenchimento parcial do capilar ¨partial filling¨

Para o desenvolvimento da metodologia em CE-MS foi realizado um estudo de planejamento fatorial 2^3 (Barros Neto *et al.*, 2007), tendo como fatores o tamanho do plug de ciclodextrina a ser injetado e a concentração da solução de ciclodextrina deste plug.

Para obtenção da separação satisfatória entre os alcalóides e sem deformação dos picos, foi ajustada a força iônica do eletrólito, ajustando-se a concentração do ácido fórmico; a concentração utilizada foi de 200 $mmol.L^{-1}$. Além das condições de separação também foram otimizadas as condições de melhor ionização dos compostos de interesse pelo próprio software do equipamento, e da composição do líquido auxiliar. Os parâmetros referentes que são otimizados pelo software LCQ Tune Plus 1.4 regulam todos parâmetros internos do espectrômetro de massas, com objetivo de obter-se a máxima sensibilidade do equipamento. A tensão do spray utilizada foi de 5 kV (ionização positiva), temperatura do capilar de

entrada no MS de 200 ºC, fluxo de gás auxiliar 5 u.a. A vazão do líquido auxiliar também foi uma variável considerada na obtenção da maior sensibilidade do espectrômetro, sendo a melhor vazão obtida a de 5 μL min^{-1}. O líquido auxiliar utilizado foi água/metanol (1:1) e 50 mmol L^{-1} de ácido fórmico.

Os tamanhos dos plugs de α-CDs foram determinados calculando-se a porcentagem em volume do preenchimento do plug em relação ao volume total do capilar. A equação 4.1 foi utilizada para o cálculo dos volumes.

$$Vc = \frac{\Delta P \, \pi \, d^4 \, t}{128 \, \eta \, L_T} \qquad (4.1)$$

onde d é o diâmetro do capilar, η, a viscosidade da solução L_T o comprimento total do capilar, ΔP é a variação da pressão aplicada para injeção, t o tempo de injeção, sendo os dois últimos parâmetros variados para obtenção de diferentes tamanhos do plug de injeção. O valor utilizado da viscosidade foi a viscosidade da água, uma vez que os valores das viscosidades das soluções deveriam ser determinados experimentalmente. Considerando a mesma viscosidade para todas as soluções, temos cálculos aproximados das porcentagens do preenchimento do capilar e os erros são iguais para todas as soluções, desta forma podemos obter um valor aproximado que indicaria uma tendência para o ótimo da separação.

Utilizando como eletrólito de corrida o ácido fórmico temos a velocidade do fluxo eletrosmótico bastante reduzida, e as espécies neutras, como as CDs, são carregadas lentamente até o detector. Portanto, é necessário o conhecimento do tempo em que o plug de CD atinge o detector de massas, pois a CD pode

contaminar a fonte do espectrômetro de massas; esse tempo deve ser o tempo limite máximo da corrida.

Para determinarmos o tempo máximo da corrida temos que antes determinar a velocidade do fluxo eletrosmótico. Para isso realizamos uma corrida sem o plug de α-CD e a partir do tempo do fluxo, calculamos sua velocidade. Em seguida realizamos o cálculo do tempo em que o fluxo atinge o detector de massas, considerando que parte do capilar já foi preenchida pelo plug, por exemplo, se 30% do capilar foi preenchido com o plug, faltam apenas 70% do comprimento do capilar para o plug percorrer e atingir o detector de massas; essa é a distância utilizada para o cálculo do tempo máximo de corrida.

Inicialmente foram realizados alguns testes utilizando ácido fórmico 200 mmol L^{-1} como eletrólito de corrida e preenchendo-se 50% do capilar e variando-se a concentração de α-CD entre 10 e 30 mmol L^{-1}. Nessas condições foi possível observar a separação entre os pares de diasteroisômeros, sendo o melhor resultado obtido com 30 mmol L^{-1} de α-CD.

Foram realizados experimentos com ácido fórmico 200 mmol L^{-1} como eletrólito e variando a concentração de α-CD entre 30 e 50 mmol L^{-1} e o plug de α-CD entre 30 e 50% do preenchimento do capilar, montando-se assim um planejamento fatorial 2^3 com ponto central, obtendo-se, portanto um total de nove experimentos. As condições utilizadas na realização dos experimentos do planejamento foram: injeção hidrodinâmica durante 5s (1 psi), temperatura do capilar de 25 ºC e tensão de 25 kV. As variáveis e níveis utilizados durante o planejamento fatorial estão descritos na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Variáveis utilizadas no planejamento fatorial

experimento	[ciclodextrina]*	Preenchimento do capilar**	Níveis de Variação
1	30	30	-1,-1
2	30	40	-1,0
3	30	50	-1,1
4	40	30	0,-1
5	40	40	0, 0
6	40	50	0,1
7	50	30	1,-1
8	50	40	1, 0
9	50	50	1, 1

* concentração de α–ciclodextrina em mmol L^{-1}
** preenchimento do capilar em % do comprimento

A melhor condição de separação obtida no planejamento fatorial foi utilizando 30 mmol L^{-1} de α–CD e 30% do preenchimento do capilar, como podemos verificar na Figura 4.6, que apresenta o eletroferograma do íon extraído na condição de ótimo. Como podemos verificar na Figura 4.3, onde são apresentados os eletroferogramas dos íons extraídos, obtidos em cada condição do planejamento, quando utilizamos 30 mmol L^{-1} de α–CD e 30% do preenchimento do capilar obtivemos a melhor relação sinal ruído, sendo que nos outros eletroferogramas dos íons extraídos verificamos um alto backgraund.

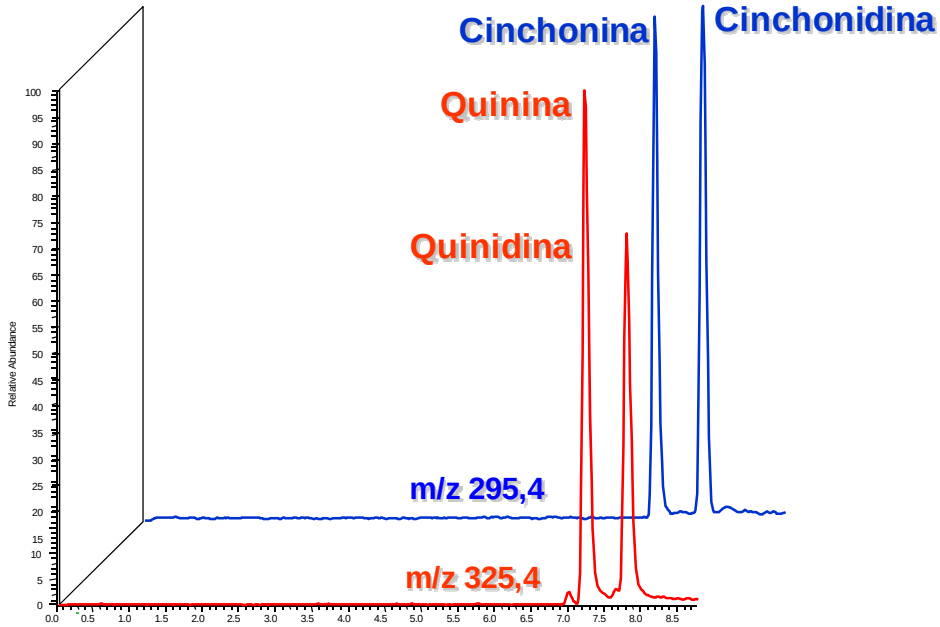


Figura 4.2. Eletroferograma do Íon Extraído. Eletrólito - Ácido fórmico (200 mmol L^{-1}); "Sheath liquid": 50 mmol L^{-1} de ácido fórmico em uma mistura 1:1 metanol/água; 30% de preenchimento do capilar; 30 mmol L^{-1} α – ciclodextrina.

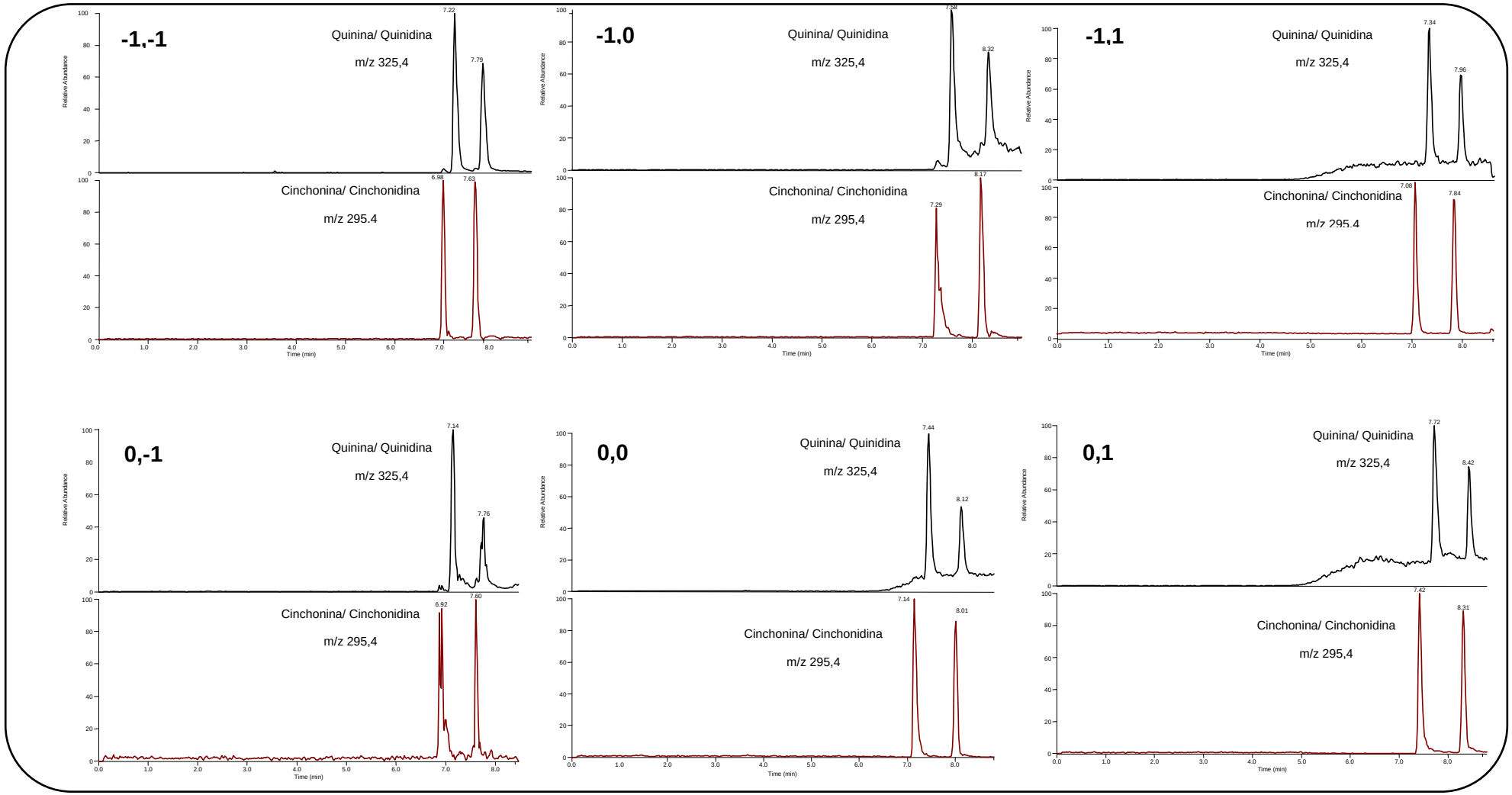
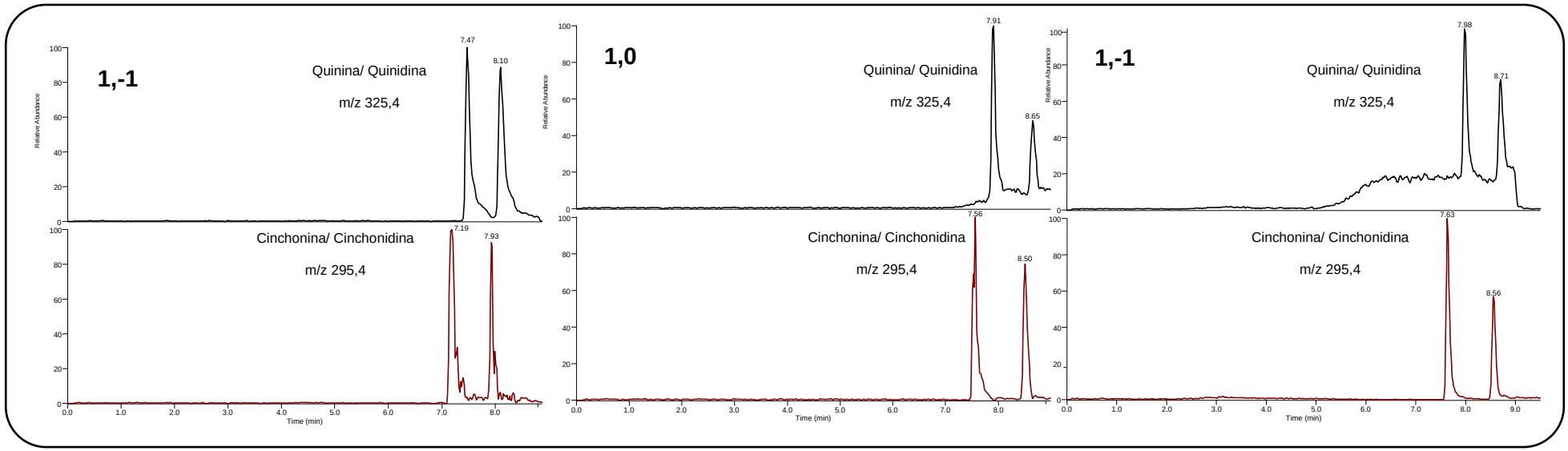


Figura 4.3. Eletroferograma do Íon Extraído nas condições do planejamento fatorial.



Continuação: **Figura 4.3.** Eletroferograma do Íon Extraído nas condições do planejamento fatorial.

Depois de desenvolvida a melhor condição para determinação dos alcalóides da *Cinchona* por CE-MS, foram realizados experimentos de MS/MS com objetivo de montar uma biblioteca de espectros, já que a literatura apresenta uma vasta biblioteca para compostos com ionização por impacto eletrônico, mas por outro lado não apresenta muitos dados de compostos com ionização por electrospray. Os espectros de massas são reprodutíveis quando utilizadas as mesmas energias de colisão, portanto a obtenção de espectros para compor uma biblioteca é viável. A Figura 4.4 apresenta os espectros MS/MS dos principais alcalóides da *Cinchona*, após ser utilizada uma energia de colizão normalizada de 35%.

Como os analitos são dois pares de diasteroisômeros os espectros de massas obtidos mostram se bastante semelhantes, porém como podemos verificar na Figura 4.4 as intensidades dos sinais são diferentes nos espectros obtidos.

As propostas de íons moleculares para os principais alcalóides da *Cinchona* (Figura 4.4) apresentam perda de água em sua fragmentação.

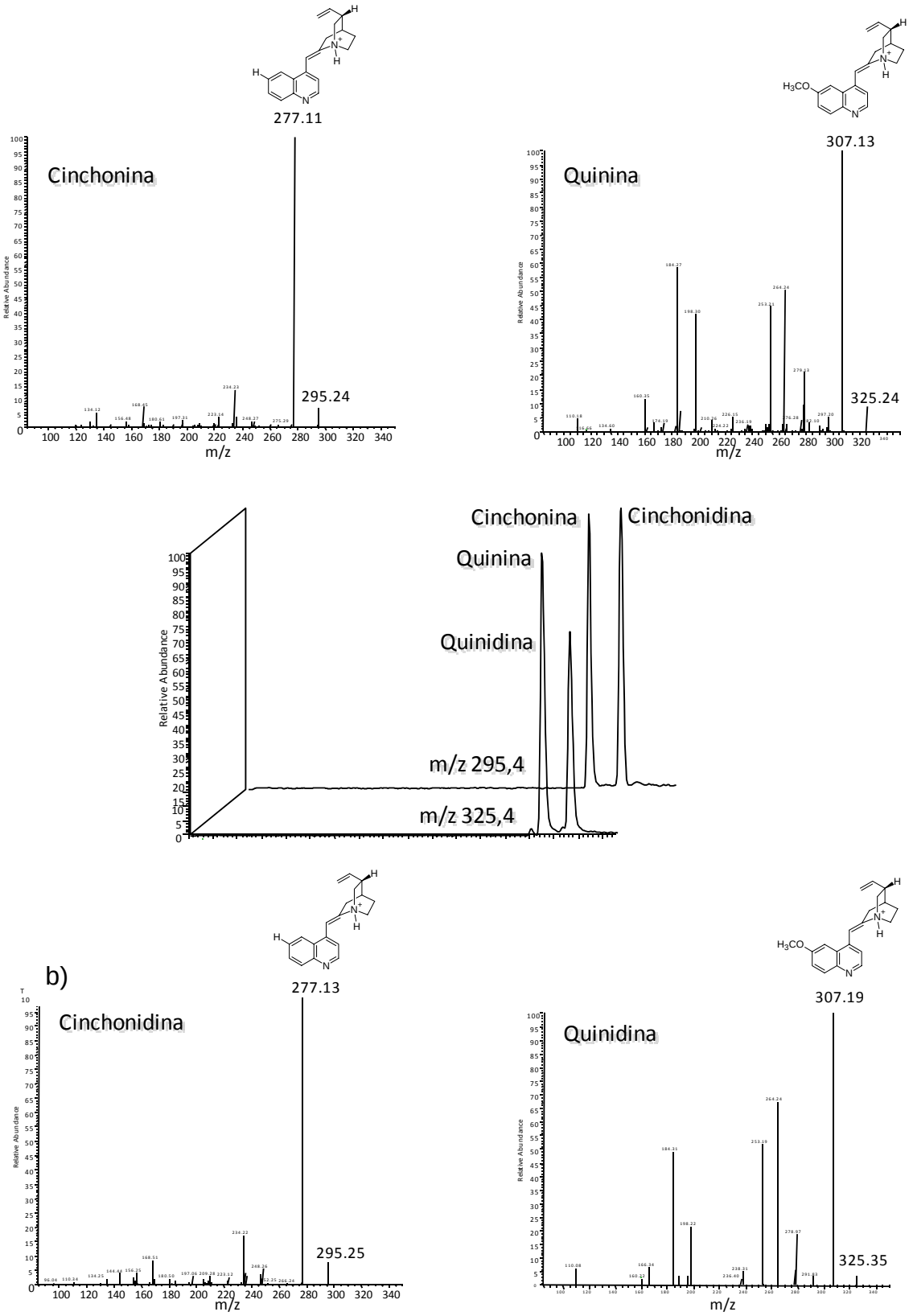


Figura 4.4. Espectros de massas (MS/MS) dos principais alcalóides da *Cinchona* e propostas de íons moleculares.

Outro experimento que realizamos com eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas foi um em uma ampla faixa de razão m/z, utilizando ácido fórmico 200 mmol L^{-1} como eletrólito, com objetivo de verificar se apenas um dos nitrogênios dos alcalóides é protonado.

O espectro de massas apresentado a seguir demonstra que possivelmente, apenas um hidrogênio é adicionado à molécula dos alcalóides, sendo que ocorre a protonação do nitrogênio mais básico de cada molécula, já que na faixa de m/z estuda não verificamos nenhum outro sinal (Figura 4.5).

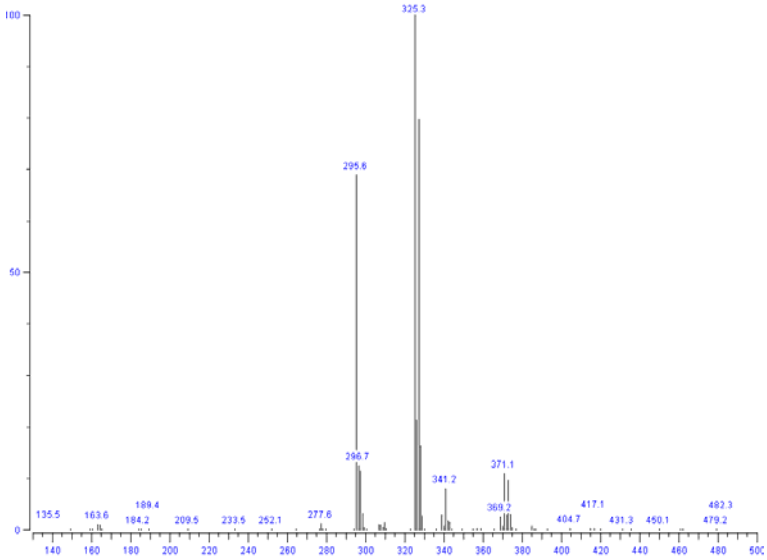


Figura 4.5. Espectro de massas quinina/quinidina e cinchonina/cinhonidina em ampla faixa de m/z.

4.5 Conclusões

Neste capítulo foi desenvolvido um método para análise confirmatória dos principais alcalóides da *Cinchona*, através do preenchimento parcial do capilar com ciclodextrina como seletor quiral.

5. Efeito do Solvente na Separação dos Alcalóides

5.1 Introdução

A separação de moléculas com estruturas similares ou muito similares pode apresentar-se como um desafio em eletroforese capilar. Tais separações são na maioria das vezes realizadas pela adição de diferentes reagentes. A separação de diasteroisômeros requer um ambiente quiral e muitas vezes também uma pseudo-fase estacionária micelar é incorporada ao tampão de corrida a fim de aumentar a seletividade. Diasteroisômeros possuem a mesma razão massa carga, entretanto possuem diferentes características físico-químicas e podem ser separados usando MEKC ou outra pseudo-fase estacionária ou pela adição de ciclodextrina ao eletrólito de corrida.

O desenvolvimento da cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), realizada por S. Terabe e colaboradores em 1984, apresentou-se como um marco para as técnicas de separação (Terabe *et al.*, 2002), sem a qual a eletroforese capilar seria uma técnica essencialmente restrita a compostos ionizáveis (Baker, 1995). A cromatografia eletrocinética é uma técnica de separação baseada na combinação de eletroforese e interações dos analitos com aditivos (por ex., tensoativos), de modo a formar uma fase dispersa que se mova com velocidade diferente do analito. De maneira a promover a separação, os analitos ou a fase dispersa devem possuir carga. A cromatografia eletrocinética micelar é um caso especial da cromatografia eletrocinética, em que a fase dispersa no capilar é micelar (Da Silva *et al.*, 2007). Neste modo de eletroforese é possibilitada a separação de compostos neutros, pela interação com micelas carregadas (Landers, 2008).

Este modo de eletroforese capilar é baseado no particionamento dos solutos entre as micelas e o tampão de corrida. As micelas são agregados de moléculas de tensoativos. Quando os tensoativos estão presentes em solução a uma concentração alta, que é a concentração micelar critica (CMC), formam micelas. Tensoativos são moléculas que possuem uma parte hidrofílica, ou seja, uma extremidade da molécula solúvel em água e a outra extremidade hidrofóbica, insolúvel em água. Alguns tensoativos possuem grupos iônicos na extremidade hidrofílica, por exemplo, o dodecilsulfato de sódio (SDS) [CH_3-$(CH_2)_{11}$-O-SO_3], que é um tensoativo aniônico. É também comum o uso de solventes orgânicos em MEKC para obtenção da seletividade desejada. Outro modo de eletroforese capilar que o uso de solventes leva a seletividade desejada é a eletroforese capilar em meio não aquoso.

Recentemente avanços em eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) para separação de moléculas com estruturas similares e com mesma relação massa carga têm sido demonstradas (HANSEN, 2007).

Uma das vantagens mais importantes da eletroforese capilar em meio não aquoso é a possibilidade de investigação de substâncias insolúveis ou pouco solúveis em água. O uso de eletroforese capilar em meio não aquoso amplia a gama de aplicações de CE, como possibilidade de aplicar maior intensidade de campo elétrico ou uma maior força iônica, que conduzem a maior eficiência, sem obtenção de altos valores de correntes (Wang e Khaledi, 1996).

Em geral para compor os eletrólitos de corrida em meio não aquoso utiliza-se sistemas com acetato de amônio, formiato de amônio em solventes como metanol e acetonitrila ou misturas destes. Para obtenção de eletrólitos em valores de pH baixo

são utilizados ácido acético glacial ou ácido fórmico, preparados no solvente selecionado. Ainda, são utilizados sistemas que apresentam pequenas quantidades de água.

Para obtenção de baixos limites de detecção, para possibilidade de detecção de impurezas, por exemplo, são utilizados solventes com alta transparência na região do UV. A mistura de metanol e acetonitrila são bastante usadas para obtenção da seletividade desejada.(Riekkola *et al.*, 2000; Geiser e Veuthey, 2009).

A literatura reporta que o uso de metanol e acetonitrila leva a alta seletividade para compostos com mesma massa em eletroforese capilar em meio não aquoso.

A eletroforese capilar em meio não aquoso (NACE) foi pela primeira vez apresentado por Waldbroehl e Jorgenson em 1984 (Walbroehl e Jorgenson, 1984). O uso deste modo de eletroforese capilar não foi estabelecido até meados dos anos 90. A primeira publicação de NACE quiral aparece na literatura em 1996 (Bjornsdottir *et al.*, 1996).

Uma vez que as propriedades físico-químicas dos solventes orgânicos são diferentes da água, sistemas não aquosos podem ser utilizados para melhorar seletividade de compostos de difícil análise em meio aquoso (WEN CHIU, 2007).

Outra importante característica da NACE é a possibilidade da sua utilização como eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas, uma vez que os eletrólitos são compostos por substâncias voláteis, e a presença de solvente no eletrólito de corrida facilita a formação do spray.

A separação em meio não aquoso depende das diferenças dos volumes das conformações da molécula, o qual é resultado de interações intermoleculares e solvatação. Assim como os solutos são protonados boa separação (seletividade)

pode ser obtida. A separação é muito dependente do tipo e concentração do eletrólito usado. A técnica tem sido usada para teste de pureza de sustâncias medicamentosas. (HANSEN, 1997).

5.2 Parte Experimental

5.2.1 Instrumentação

Os experimentos foram conduzidos em um sistema de eletroforese capilar (modelo $HP^{3D}CE$, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), equipado com fonte de alta tensão (0-30 kV), com detector de arranjo de diodos, e com programa de aquisição e tratamento de dados (HP ChemStation, ver A.06.01). O equipamento possui um sistema de refrigeração do capilar por circulação de ar forçado, que possibilita o controle da temperatura do capilar. As amostras e soluções padrão foram injetadas hidrodinamicamente (50 mbar durante 5 s) e o sistema de eletroforese operado em polaridade normal com tensão constante de 30 kV. Foi utilizado um capilar de sílica fundida (Polymicro Technologies, Phoenix, AZ, EUA), revestido externamente com polimida, com dimensões de 50 μm de diâmetro interno, 38,5 cm de comprimento total e 30 cm até o detector para MEKC, e 48,5 cm de comprimento total e 40 cm até o detector para NACE. O capilar foi submetido a condicionamentos iniciais sempre que utilizados, através de lavagens realizadas por pressão de aproximadamente 940 mbar, com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} durante 10 minutos, seguido de água deionizada durante 10 minutos, 5 minutos com metanol e 5 minutos com eletrólito de corrida. No intervalo entre as corridas o capilar foi recondicionado com lavagens durante 5 minutos com o eletrólito de corrida. Ao término das análises o capilar foi lavado com hidróxido de sódio 1 mol L^{-1} durante 10

minutos e por 10 minutos com água deionizada. O capilar permaneceu preenchido com água deionizada para armazenamento do mesmo.

5.2.2 Reagentes e soluções para MEKC

Todos reagentes utilizados são de grau analítico e a água deionizada foi purificada através de um sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA). Foram preparadas soluções estoques dos padrões dos alcalóides quinina, quinidina, cinchonina e cinchonidina nas concentrações de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ em álcool etílico e armazenadas sob refrigeração de 4 ºC. O extrato da espécie *Cinchona calisaya* foi preparado através da adição de água/etanol (1:1) à casca da planta pulverizada sob efeito de ultra-som durante 20 minutos e posterior filtração; o extrato foi armazenado sob refrigeração de 4 ºC. Foram preparadas soluções estoque de dodecilsulfato de sódio (SDS) 100 mmol L^{-1}, tampão fosfato 100 mmol L^{-1} e tampão borato 100 mmol L^{-1}. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente através das diluições das soluções estoque.

5.2.3 Reagentes e soluções para NACE

Todos reagentes utilizados são de grau analítico. Foram preparadas soluções estoques dos padrões dos alcalóides quinina, quinidina, cinchonina, cinchonidina, hidroquinidina e cinchonidina O-benzil-N-antracenil nas concentrações de 1000 $\mu g.mL^{-1}$ em álcool etílico e armazenadas sob refrigeração de 4 ºC. O extrato da espécie *Cinchona calisaya* foi preparado através da adição de água/etanol (1:1) a casca da planta pulverizada sob efeito de ultra-som durante 20 minutos e posterior

filtração, o extrato foi armazenado sob refrigeração de 4 ºC. Adicionalmente, foram preparadas soluções estoque de acetato de amônio 100 mmol L^{-1} e formiato de amônio 100 mmol L^{-1} em metanol e armazenados sob refrigeração de 4 ºC. Os eletrólitos de corrida foram preparados diariamente através das diluições das soluções estoque.

5.3 Estudos em meio micelar

A possibilidade de separação dos principais alcalóides da *Cinchona* por meio da cromatografia micelar eletrocinética apresentou-se a princípio interessante, uma vez que desenvolvido um método com uso de seletores quirais por CE-DAD poderíamos desenvolver um método alternativo ao uso de seletores quirais. Para tal é necessário uma modificação no pH do eletrólito de corrida, para uma faixa onde os compostos permaneçam neutros.

Devido ao caráter básico que possuem os alcalóides, os mesmos podem ser analisados por eletroforese capilar através de alterações no pH, onde sua carga e conseqüentemente sua mobilidade são alteradas. Em pH em torno de 2,5 as moléculas dos alcalóides encontram-se protonadas, o que permite sua migração até o detector, quando submetidas à ação do campo elétrico. Assim uma modificação do pH para aproximadamente 9, faz com que os alcalóides tornem-se moléculas parcialmente neutras o que possibilita a separação utilizando a técnica de MEKC no modo normal (micelas migrando em contra-fluxo).

Em meio micelar foram realizados experimentos utilizando dodecilsulfato de sódio como surfactante (SDS) em diferentes concentrações (20 – 40 mmol L^{-1}) e diferentes porcentagens de metanol (5 – 15 % v/v) em 20 mmol L^{-1} de tampão TBS.

Foi possível observar que o aumento da porcentagem de metanol em cada uma das concentrações de SDS promoveu um aumento na resolução (Figura 5.1). Ao analisar o aumento da concentração de SDS numa mesma porcentagem de metanol não observamos um efeito significativo na resolução dos analitos. Assim, foi possível realizar a separação dos quatro alcalóides em 15 % de metanol, independente do teor de SDS.

Outras condições foram testadas, como tampão fosfato 30 mmol L^{-1}. A condição utilizando-se um eletrólito de composição: TBS 10 mmol L^{-1}, SDS 20 mmol L^{-1} e metanol 20% v,v (Figura 5.2), poderia constituir um método para os alcalóides da Cinchona em substituição ao método proposto anteriormente com ciclodextrina.

Como podemos observar nos eletroferogramas na Figura 5.1 existe um efeito bastante importante do solvente, pois nas mesmas concentrações de SDS ao aumentar a porcentagem de MeOH existe uma melhora na resolução dos analitos que mostrou ser mais significativo que o teor de tensoativo para separação dos alcalóides. Com isso resolvemos realizar um estudo que buscasse esclarecer o efeito do solvente na separação dos alcalóides. Para tanto realizamos um estudo de separação dos alcalóides em meio não-aquoso.

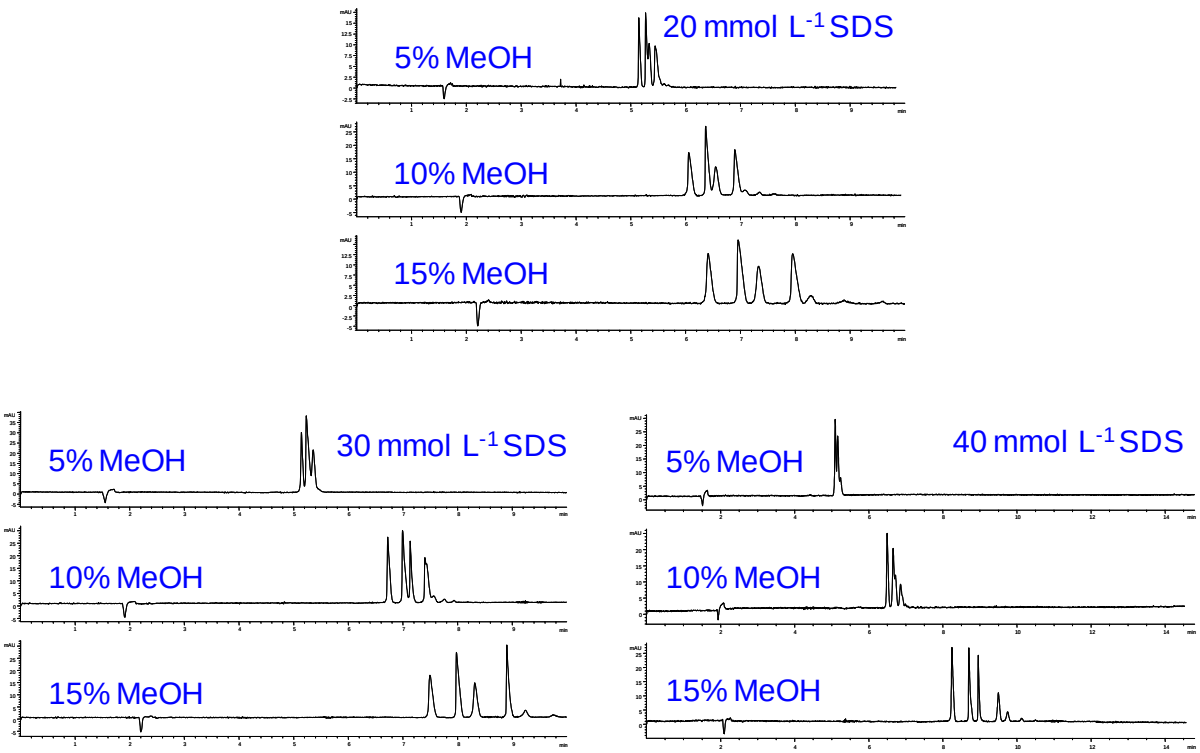


Figura 5.1. Eletroferograma da mistura dos quatro padrões dos alcalóides da *Cinchona* (cinchonina, cinchonidina, quinina e quinidina a 40 μg mL^{-1} cada). Eletrólito de corrida: tampão borato (TBS) 20 mmol L^{-1}, variando a concentração de SDS e a porcentagem de metanol adicionada ao eletrólito.

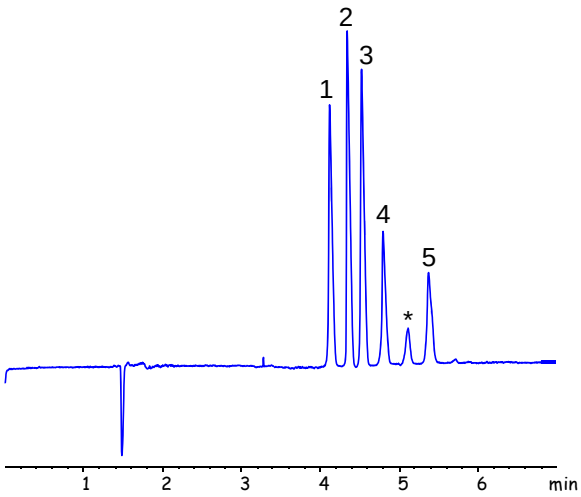
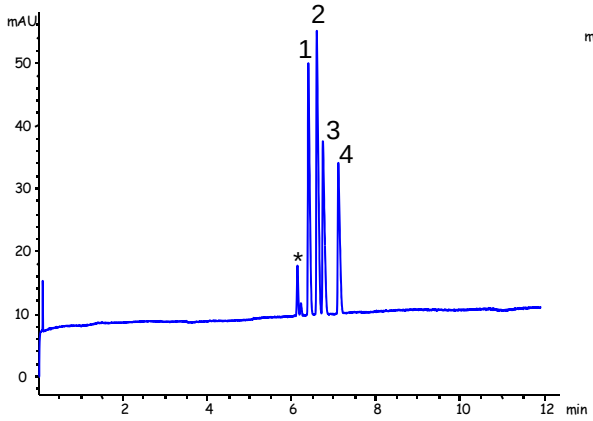


Figura 5.2. Eletroferograma da mistura de padrões dos alcalóides da *Cinchona* (40 μg mL^{-1}). Eletrólito de corrida: tampão borato (TBS) 20 mmol L^{-1}, SDS 20 mmol L^{-1} e metanol 20% (v,v). Picos: 1-cinchonina; 2-cinchonidina; 3-quinina; 4-quinidina; 5-hidroquinidina.

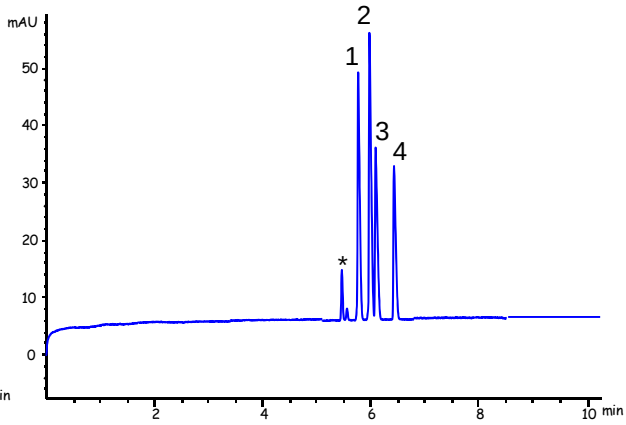
5.4 Estudos em meio não aquoso

A utilização da eletroforese em meio não aquoso para determinação dos principais alcalóides da *Cinchona* apresentou-se interessante a princípio pela possibilidade de obtenção da separação sem a utilização de algum tipo de seletor quiral ou meio micelar. Além disso, apresenta a possibilidade da implementação da metodologia em eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massas, que tem como vantagem o fato de que o eletrólito é composto apenas por solventes orgânicos, e, portanto, volátil.

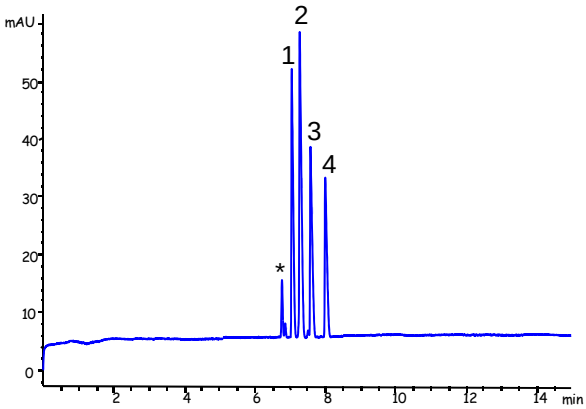
Para estudar a separação dos principais alcalóides da *Cinchona* em meio não aquoso foram testados como eletrólitos acetato de amônio 50 mmol L^{-1} e formiato de amônio 50 mmol L^{-1}, em algumas condições exploratórias para busca de uma região de estudo para otimizar a separação dos alcalóides. As primeiras condições testadas foram acetato de amônio 50 mmol L^{-1} em metanol com a adição de 10% de acetonitrila e 0,5 ou 5% de ácido acético. Em seguida foi testada a utilização de formiato de amônio 50 mmol L^{-1} em metanol para composição do eletrólito de corrida. Em todas condições obteve-se a separação dos quatro principais alcalóides da *Cinchona,* e não verificamos nenhuma melhora significativa na resolução nestas condições testadas. (Figura 5.3).



Eletrólito CH_3COONH_4 50 mmol L^{-1}; 5% CH_3COOH; 10% ACN em MeOH, 30 KV



Eletrólito CH_3COONH_4 50 mmol L^{-1}; 0,5% CH_3COOH; 10% ACN em MeOH, 30 KV



Eletrólito $CHOONH_4$ 50 mmol L^{-1}; 5% CH_3COOH; 10% ACN em MeOH, 30 KV

Figura 5.3. Eletroferogramas NACE, em condições exploratórias. Picos: 1-cinchonidina; 2-cinchonina; 3-quinidina, 4-quinina, * pico não identificado

Realizamos um estudo para verificar o efeito da acetonitrila na separação dos alcalóides da *Cinchona* em meio não aquoso. Como podemos verificar nos eletroferogramas da Figura 5.4, a adição de acetonitrila não apresentou efeito significativo na separação dos presentes analitos. As composições dos eletrólitos testados foram acetato de amônio 50 mmol L^{-1} em metanol contendo 5% de ácido acético e porcentagens entre 5 e 20% de acetonitrila.

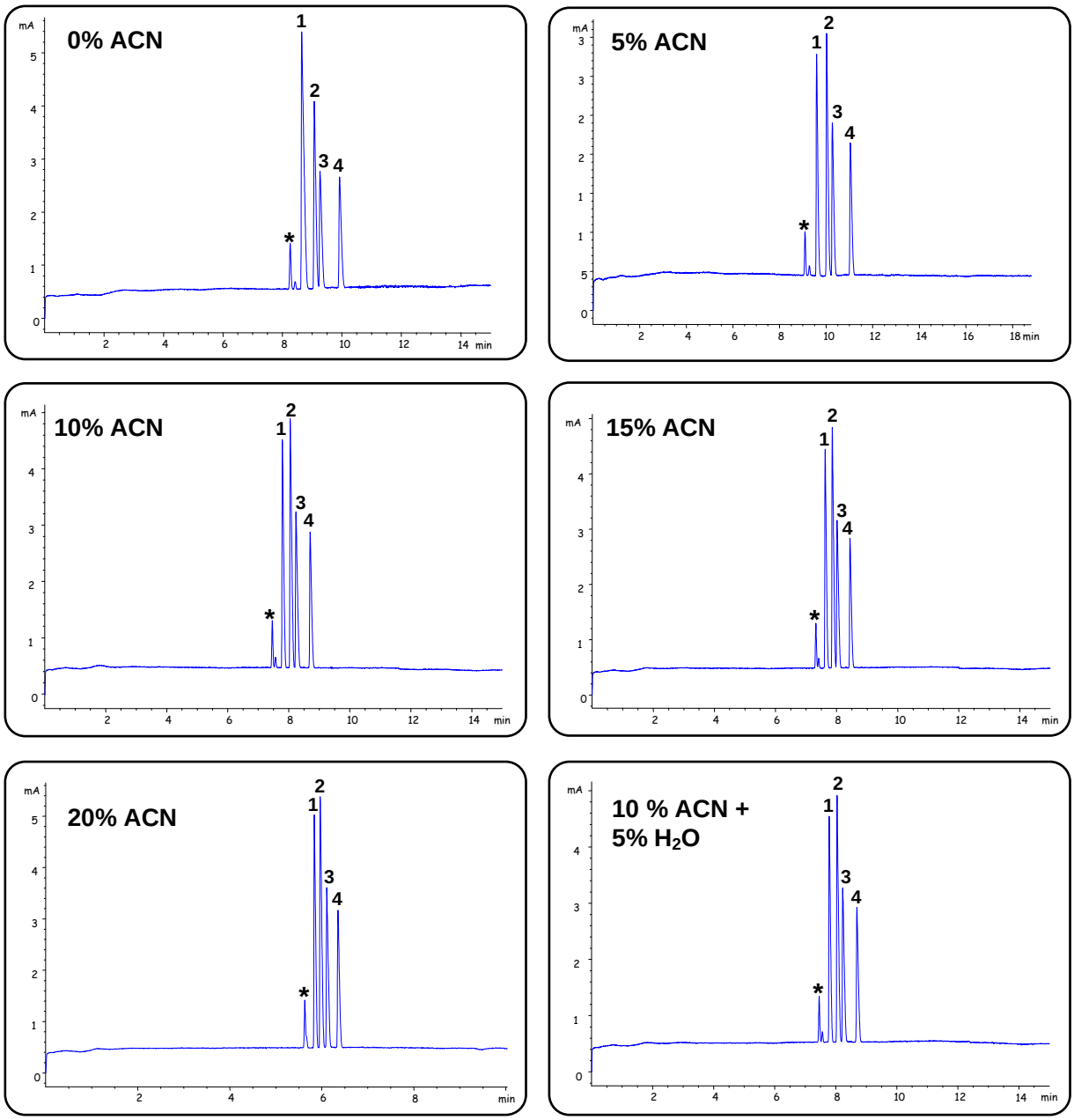


Figura 5.4. Eletroferogramas NACE, estudo do efeito da acetonitrila e da água na composição do eletrólito de corrida. Picos: 1-cinchonidina; 2-cinchonina; 3-quinidina, 4-quinina, * pico não identificado. Eletrólito: Acetato de Amônio 50 mmol L^{-1}, Ácido Acético 5% (v,v), porcentagens variadas de acetonitrila, eletrólito preparado em metanol

O fato de não encontrarmos efeito significativo com o uso de acetonitrila e água na composição do eletrólito de corrida (Figura 5.4), nos leva a supor que a formação do par iônico não explica a separação, pois o aumento da acetonitrila força o aparecimento do par iônico (Figura 5.6), enquanto que a água força o desaparecimento do par iônico.

Para tal estudo buscamos uma molécula que fosse parecida com os alcalóides da *Cinchona,* mas que possuísse substituições com grupos mais volumosos, para cerificarmos o efeito das substituições na separação dos compostos e com isso verificar qual efeito do solvente na separação dos alcalóides da *Cinchona*. A cinchonidina O-benzil-N-antracenil foi utilizada para realização de tal estudo.

Foram injetados padrões dos principais alcalóides presentes na *Cinchona* juntamente com a cinchonidina O-benzil-N-antracenil para verificar a ordem de migração dos compostos. A condição escolhida para realização do presente experimento foi o eletrólito composto por acetato de amônio 50 mmol L^{-1} em metanol contendo 5% de ácido acético. Como verificamos que o efeito da acetonitrila não era significativo, optamos em não utilizá-la na composição do eletrólito de corrida. O eletroferograma a seguir apresenta a ordem de migração obtida.

Para entendermos a ordem de migração dos compostos na Figura 5.5 devemos levar em conta os grupamentos presentes nas moléculas e suas interações intramoleculares, que são conseqüências das conformações de cada molécula. A Figura 5.6 apresenta as conformações mais estáveis para a quinina e quinidina, calculado pelo software Spartan.

Uma possível explicação para separação entre os pares de diasteroisômeros

em meio não-aquoso se dá a partir das interações intramoleculares existentes entre a dupla ligação com anel aromático (quinolínico), estas interações estão indicadas na Figura 5.6 pela seta de duplo sentido na molécula de quinidina, que levam a regiões onde o solvente não tem acesso. Essas interações se dão devido a proximidade da dupla com o anel quinolínico, que ocorrem na quinidina e cinchonidina. As moléculas que não possuem essa interação têm um tempo de permanência maior no capilar. É possível que a separação neste caso não esteja ocorrendo por formação de par iônico, uma vez que existe uma interação intramolecular, por ponte de hidrogênio. Estes fatos explicam a ordem de migração (Figura 5.5) para os diasteroisômeros em meio não aquoso.

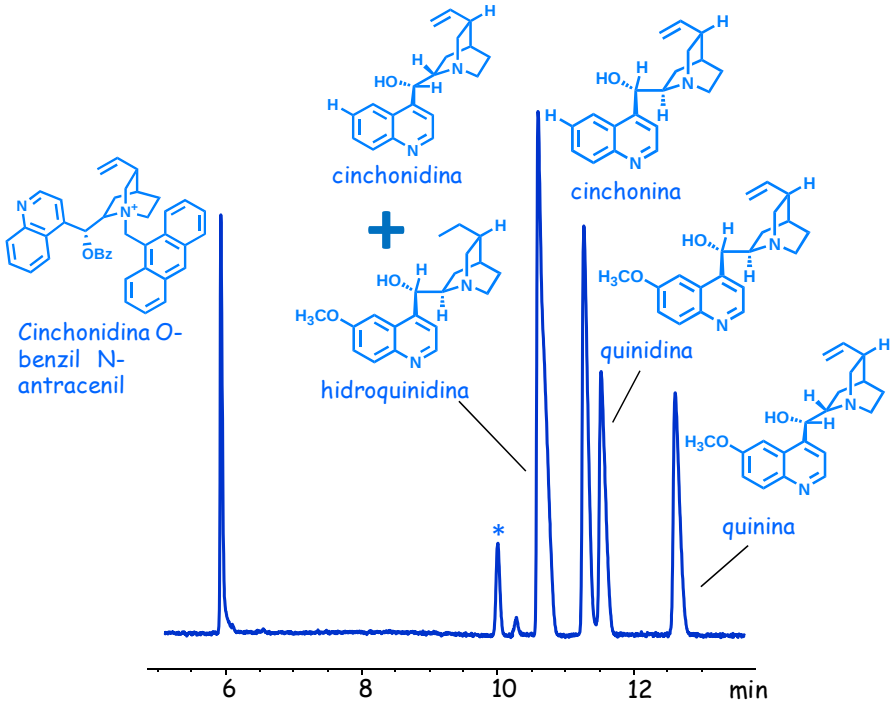


Figura 5.5. Eletroferograma em meio não-aquoso (NACE). Eletrólito: Acetato de Amônio 50 mmol L^{-1}, Ácido Acético 5% (v,v), porcentagens variadas de acetonitrila, eletrólito preparado em metanol. * pico não identificado.

A literatura reporta que a separação de moléculas em eletroforese capilar em meio não aquoso se dá pela possibilidade em diferenças na geometria, em conseqüência de solvatação. Outra possível explicação que a literatura apresenta para separação pode ser formação de par iônico. Uma possível explicação é devido às interações com solvente e interações intramoleculares.

A cinchonidina O-benzil-N-antracenil é o composto que apresenta maior mobilidade no sistema não aquoso estudado, como pode ser observado no eletroferograma da Figura 5.5, isso ocorre, pois este composto possui substituições com grupos muito volumosos o que impossibilita interações intramoleculares, além disso, o mesmo não possui grupos que interaja o suficiente com solvente para retê-lo mais no capilar.

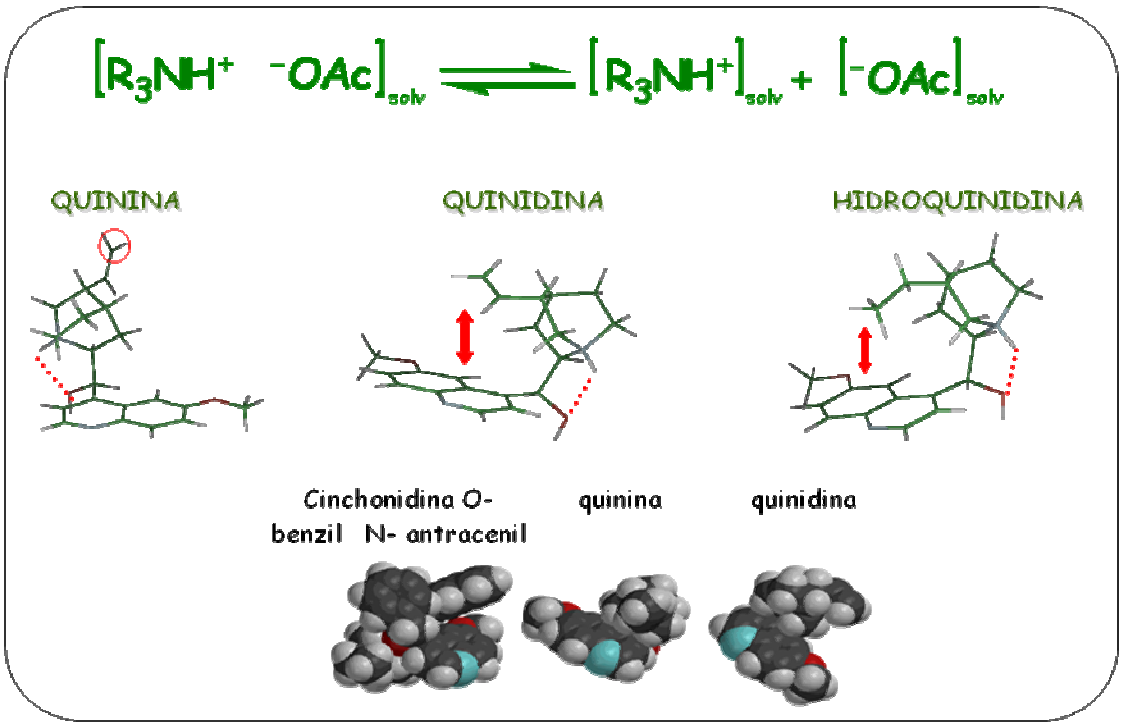


Figura 5.6. Interações intramoleculares e regiões de acesso do solvente

O grupamento metoxila da quinina e da quinidina interagem com o metanol, o que diminui a mobilidade desses compostos em relação à cinchonina e cinchonidina. A hidroquinidina, apesar de possuir uma metoxila, não possui a dupla ligação, e com isso não existe outra interação intramolecular entre essa dupla e o anel aromático, como indicado na Figura 5.6 com pela seta de duplo sentido na molécula de hidroquinidina, o que aumenta a mobilidade da hidroquinidina em relação à quinidina.

Como podemos observar na Figura 5.6, as pontes de hidrogênio indicadas com as linhas pontilhadas, indicam que estas conformações são as mais estáveis para as moléculas. Desta forma a quinina que não possui as interações intramoleculares é a que possui maior tempo de permanência no capilar, já a

quinidina que devido a ponte de hidrogênio formada tem uma conformação que favorece a interação entre a dupla ligação e o anel aromático (anel quinolínico), com isso é menos retido no interior do capilar em relação à quinina. O mesmo ocorre para explicarmos a ordem de migração da cinchonina em relação à cinchonidina.

Essas são possíveis explicações que buscam entender como ocorre o modo de separação em meio não-aquoso e como que o solvente interfere na separação dos presentes alcalóides. Por outro lado, estudos teóricos com experimentos de dinâmica molecular ou cálculo estático devem ser realizados, bem como estudo de vários solventes de diferentes relaxações dielétricas, devem ser realizadas para comprovar a possível explicação para a separação dos principais alcalóides presentes na *Cinchona* em meio não aquoso.

5.4.1 Figuras de Mérito para método em meio não-aquoso

Além de avaliarmos a influência do solvente na separação, avaliamos se o método proposto possui características adequadas para ser implementado em rotinas de laboratório. Foram avaliados alguns parâmetros referentes a validação do método. Os parâmetros avaliados foram a seletividade, linearidade, limite de detecção e limite de quantificação (Ribani *et al.*, 2004).

5.4.1.1 Seletividade

O método apresenta uma boa seletividade para os alcalóides estudados, como podemos verificar na Figura 5.7 que apresenta o eletroferograma dos padrões dos alcalóides e os mesmos no extrato da planta.

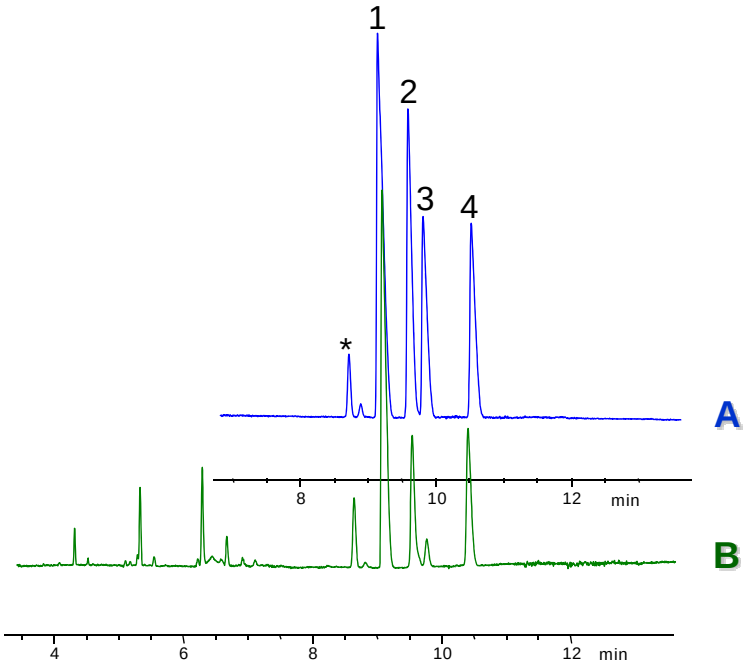


Figura 5.7. Eletroferogramas: A) padrões dos alcalóides (40 mmol L^{-1}); B) Extrato Cinchona calisaya. Eletrólito: Acetato de amônia 50 mmol L^{-1}, 5% (v/v) ácido acético em metanol. Tensão 30 kV, temperatura 25 ˚C. Injeção 5mbar/5seg e detecção 204 nm. Picos: 1 – cinchonidina, 2 – cinchonina, 3 – quinidina, 4 – quinina.

5.4.1.2 Linearidade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ)

Para construção da curva analítica de calibração foram injetados os padrões dos analitos nas faixas de concentração: cinchonidina 5,0 – 40 $\mu g.mL^{-1}$; quinina 70 – 110 $\mu g.mL^{-1}$; cinchonina 80 – 120 $\mu g.mL^{-1}$; quinidina 5,0 – 10 $\mu g.mL^{-1}$. Em todas cinco curvas foram utilizadas 40 $\mu g.mL^{-1}$ de cinchonidina O-benzil-N-antracenil como padrão interno. As curvas de calibração foram construídas com as razões de áreas dos analitos pela área do padrão interno (cinchonidina O-benzil-N-antracenil) versus a concentração. As Tabelas 5.1 a 5.4 apresentam os dados referentes às regressões lineares de quatro curvas. Podemos observar pelos dados estatísticos compilados nas tabelas que o método apresentou boa linearidade uma vez que

foram obtidos coeficientes de correlação maiores que 0,99 nas faixas de concentração estudadas além de F alto e baixo erro. Os limites de detecção (LOD) e os limites de quantificação (LOQ) foram obtidos a partir dos dados da regressão linear.

Tabela 5.1. – Dados estatísticos para Cinchonidina

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	5,0 - 40
Intercepto	0,11 ± 0,007
Inclinação da reta	0,014 ± 0,0002
Coeficiente de determinação	0,9987
Erro padrão	0,008
F	2186
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	1,9
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	5,7

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

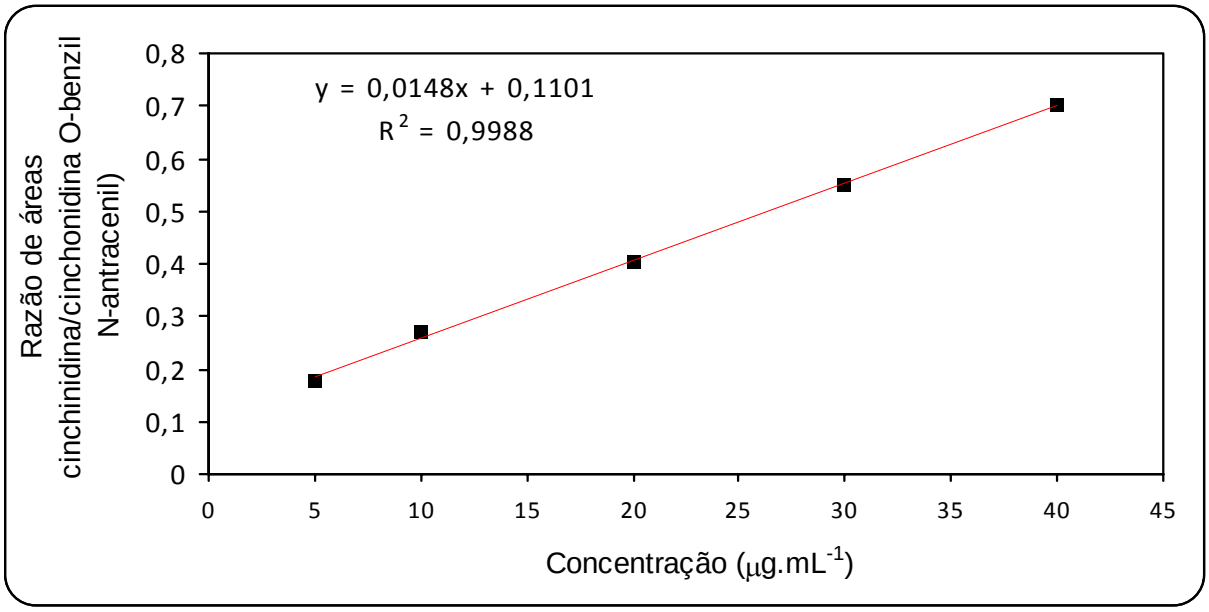


Figura 5.8. Curva analítica para cinchonidina

Tabela 5.2. – Dados estatísticos para Cinchonina

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	80 - 120
Intercepto	0,57 ± 0,036
Inclinação da reta	0,06 ± 0,0004
Coeficiente de determinação	0,9999
Erro padrão	0,011
F	3036
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	0,60
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	1,8

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

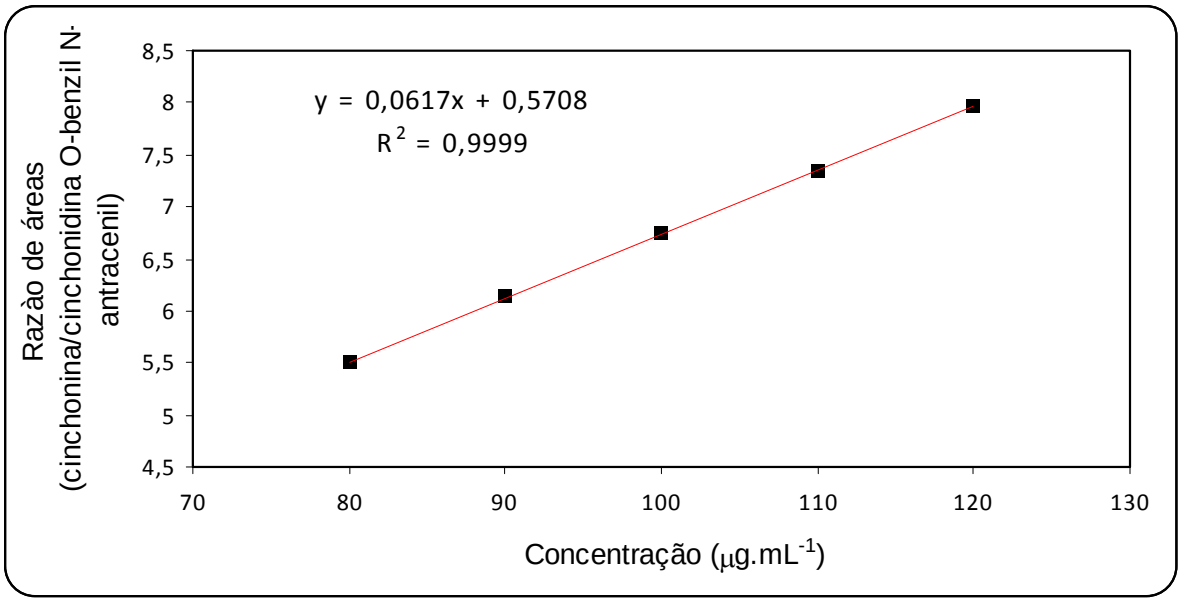


Figura 5.9. Curva analítica para cinchonina

Tabela 5.3. – Dados estatísticos para Quinidina

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	2,0 - 10
Intercepto	0,10 ± 0,012
Inclinação da reta	0,14 ± 0,002
Coefiente de determinação	0,9993
Erro padrão	0,011
F	6261
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	0,26
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	0,80

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

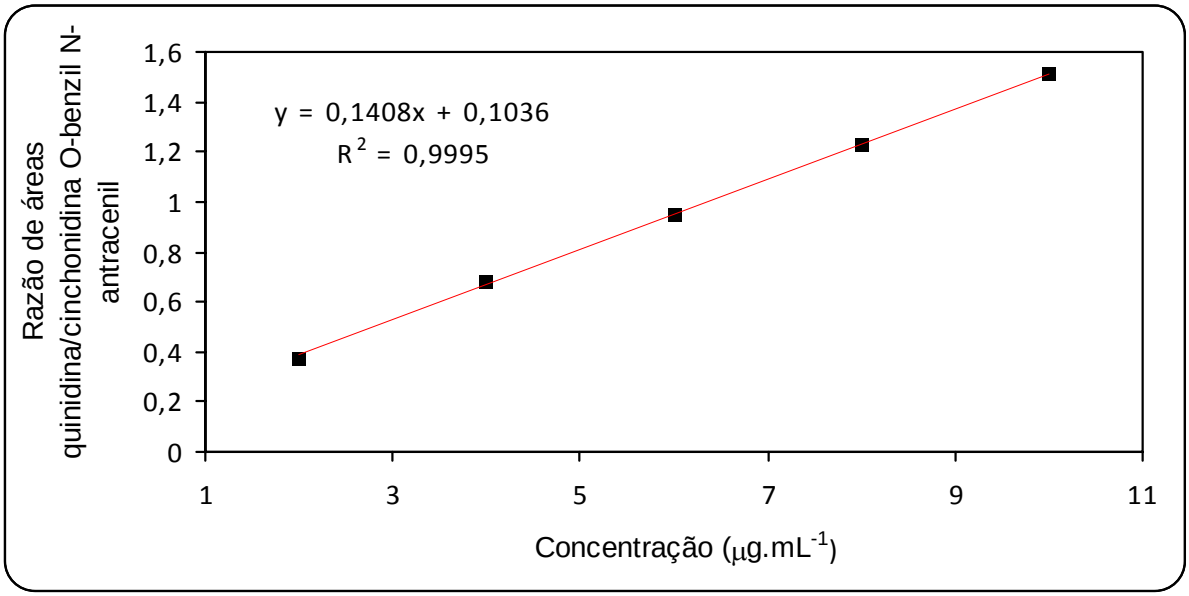


Figura 5.10. Curva analítica para quinidina

Tabela 5.4. – Dados estatísticos para Quinina

Parâmetros	Dados Estatisticos
Faixa de trabalho* ($\mu g.mL^{-1}$)	70 - 110
Intercepto	0,82 ± 0,0,052
Inclinação da reta	0,045 ± 0,0005
Coefiente de determinação	0,9995
Erro padrão	0,018
F	6182
Limite de detecção** ($\mu g.mL^{-1}$)	1,3
Limite de quantificação*** ($\mu g.mL^{-1}$)	4,0

* cinco níveis de concentração, injeção em triplicata de cada nível
** LOD = 3,3(erro padrão/inclinação da reta)
*** LOQ = 10(erro padrão/inclinação da reta)

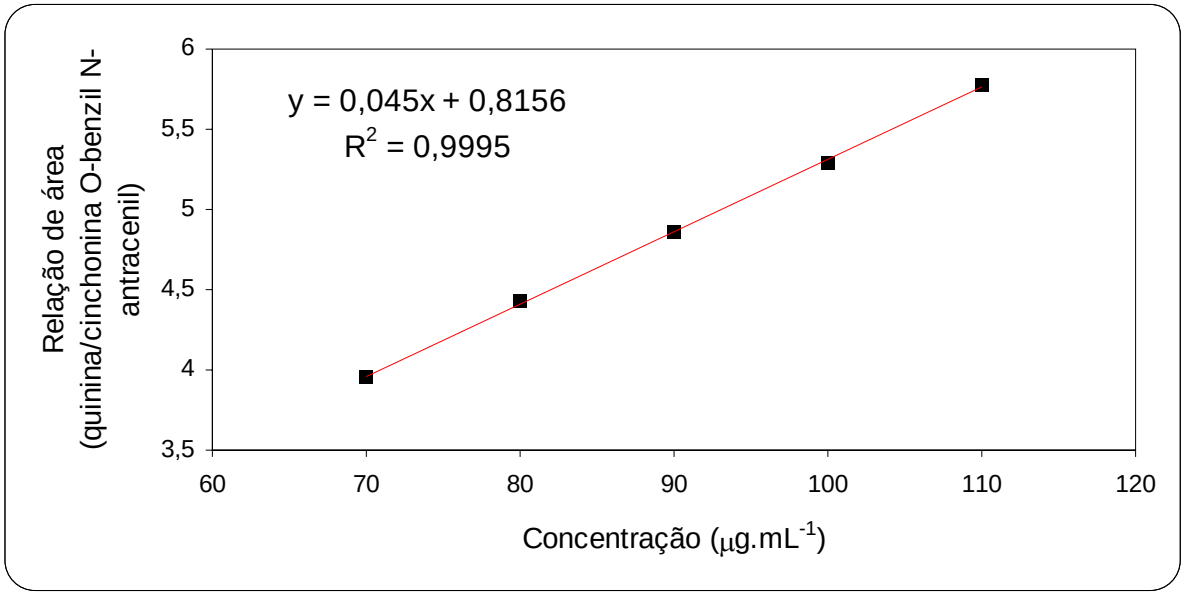


Figura 5.11. Curva analítica para quinina

5.5 Conclusões

O estudo do efeito do solvente apresentou um importante efeito do metanol na separação dos alcalóides da *Cinchona* em meio micelar e não aquoso. O método em meio não aquoso também apresentou características de desempenho que possibilitam sua implementação como método de análise de rotina.

6. Conclusões

O método proposto para determinação dos alcalóides em extratos vegetais por CE-DAD com uso de ciclodextrina como seletores quirais, apresentaram boa linearidade, precisão, exatidão e tempos de análises relativamente pequenos. O método proposto pode ser utilizado em rotina de laboratórios de controle de qualidade de extratos vegetais, bem como em busca de adulteração de extratos, uma vez que existe a facilidade na aplicação do método e apresenta boas características de desempenho.

O desenvolvimento do método de análise confirmatória por CE-MS, mostrou que com a implementação do preenchimento parcial ("partial filling") do capilar com eletrólito contendo α-ciclodextrina como seletor quiral é possível a análise confirmatória por CE-MS dos principais alcalóides da *Cinchona*, que constituem dois pares de diasteroisômeros.

O estudo do efeito do solvente mostrou que existe um importante efeito do metanol na separação dos alcalóides da *Cinchona*, uma vez que este efeito foi observado tanto na separação destes alcalóides em meio micelar quanto em meio não aquoso.

7. Referências Bibliográficas

Basic theory of mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta* **241-242**, 15-71.

ABDULRAHMAN, S., HARRISON, M. E., WELHAM, K. J., BALDWIN, M. A., PHILLIPSON, J. D., ROBERTS, M. F. (1991). High-Performance Liquid-Chromatographic Mass-Spectrometric Assay of High-Value Compounds for Pharmaceutical Use from Plant-Cell Tissue-Culture - Cinchona Alkaloids. *Journal of Chromatography-Biomedical Applications* **562**, 713-721.

AKADA, Y., KUROGI, M. (1997). Determination of cinchona alkaloids in Cinchona bark by capillary electrophoresis. *Bunseki Kagaku* **46**, 931-935.

ALFONSO-GOLDFARB, A. M. Da alquimia à química. São Paulo: Landy 2001

ALFONSO-GOLDFARB, A. M. (2005). Alcheny and medicine in the Middle Ages. *Isis* **96**, 426-427.

ANDRADE-NETO, V. F., BRANDAO, M. G. L., STEHMANN, J. R., OLIVEIRA, L. A., KRETTLI, A. U. (2003). Antimalarial activity of Cinchona-like plants used to treat fever and malaria in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* **87**, 253-256.

ASSUNCAO, N. A., BECHARA, E. J. H., SIMIONATO, A. V. C., TAVARES, M. F. M., CARRILHO, E. (2008). Capillary Electrophoresis Coupled to Mass Spectrometry (Ce-Ms): Twenty Years of Development. *Quim Nova* **31**, 2124-2133.

BABY, A. R., MACIEL, C., P. M., SANTOS, I., M. N. S., DIAS, T., C. S., CONSIGLIERI, V., O., VELASCO, M., V. R. (2005). Uso de extratos de plantas em produtos cosméticos. *Cosmetic & Toiletries* **17**, 78-92.

BAKER, D. Capillary Electrophoresis. New York: John Willey & Sons, Inc. 1995

BARROS NETO, B. D., SCARMINIO, I. S., BRUNS, R. E. Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Campinas, SP: Editora Unicamp. 2007 (terceira)

BAUER, M., UNTZ, G. (1980). Analysis of Cinchona Alkaloids by High-Performance Liquid-Chromatography. *J Chromatogr* **192**, 479-484.

BJORNSDOTTIR, I., HANSEN, S. H., TERABE, S. (1996). Chiral separation in non-aqueous media by capillary electrophoresis using the ion-pair principle. *J Chromatogr A* **745**, 37-44.

BRAQUET, P., HOSFORD, D. J. (1991). Ethnopharmacology and the development of natural PAF antagonists as therapheutic agents. *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 135-139.

COENEGRACHT, P. M. J., DIJKMAN, M., DUINEVELD, C. A. A., METTING, H. J., ELEMA, E. T., MALINGRE, T. M. (1991). A New Quaternary Mobile Phase System for Optimization of Tlc Separations of Alkaloids Using Mixture Designs and Response-Surface Modeling. *J Liq Chromatogr* **14**, 3213-3239.

DA SILVA, J. A. F., COLTRO, W. K. T., CARRILHO, E., TAVARES, M. F. M. (2007). "Terminology for Analytical capillary electromigration techniques". *Quim Nova* **30**, 740-744.

DI STASI, L. C. Plantas Medicinais: arte e ciência. São Paulo: Fundação Vunesp. 1995

FEAS, X., FENTE, C. A., CEPEDA, A. (2009). Fast and Sensitive New High Performance Liquid Chromatography Laser Induced Fluorescence (HPLC-LIF) Method for Quinine. Comparative Study in Soft Drinks. *J Liq Chromatogr R T* **32**, 2600-2614.

FERREIRA, S. L. C., BRUNS, R. E., DA SILVA, E. G. P., DOS SANTOS, W. N. L., QUINTELLA, C. M., DAVID, J. M., DE ANDRADE, J. B., BREITKREITZ, M. C., JARDIM, I. C. S. F., NETO, B. B. (2007). Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. *J Chromatogr A* **1158**, 2-14.

FUKUJI, T. S., TONIN, F. G., TAVARES, M. F. M. (2010). Optimization of a method for determination of phenolic acids in exotic fruits by capillary electrophoresis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **51**, 430-438.

GATTI, R., GIOIA, M. G., CAVRINI, V. (2004). Determination of Cinchona alkaloids and Vitamin B-6 by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Anal Chim Acta* **512**, 85-91.

GEISER, L., VEUTHEY, J. L. (2009). Non-aqueous capillary electrophoresis 2005-2008. *Electrophoresis* **30**, 36-49.

GIROUD, C., VANDERLEER, T., VANDERHEIJDEN, R., VERPOORTE, R., HEEREMANS, C. E. M., NIESSEN, W. M. A., VANDERGREEF, J. (1991). Thermospray Liquid-Chromatography Mass-Spectrometry (Tsp Lc Ms) Analysis of the Alkaloids from Cinchona Invitro Cultures. *Planta Medica* **57**, 142-148.

GIUFFRIDA, A., LEON, C., GARCIA-CANAS, V., CUCINOTTA, V., CIFUENTES, A. (2009). Modified cyclodextrins for fast and sensitive chiral-capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Electrophoresis* **30**, 1734-1742.

GÜBITZ, G., SCHMID, M. G. (2001). Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques. A Review. *Biopharmaceutics & Drug Disposition* **22**, 291-336.

HARINO, H., TANAKA, M., ARAKI, T., YASAKA, Y., MASUYAMA, A., NAKATSUJI, Y., IKEDA, I., FUNAZO, K., TERABE, S. (1995). Double-Chain Surfactants with 2 Sulfonate Groups as Micelle-Forming Reagents in Micellar Electrokinetic Chromatography of Naphthalene Derivatives. *J Chromatogr A* **715**, 135-141.

HEAD, W. F., BEAL, H. M., LAUTER, W. M. (1956). Ultrasonic Extraction of Cinchona-Succirubra. *Journal of the American Pharmaceutical Association* **45**, 239-242.

HOFFMANN, C. V., LAMMERHOFER, M., LINDNER, W. (2009). Separation of Cinchona alkaloids on a novel strong cation-exchange-type chiral stationary phase-comparison with commercially available strong cation exchanger and reversed-phase packing materials. *Anal Bioanal Chem* **393**, 1257-1265.

HORIE, M., OISHI, M., ISHIKAWA, F., SHINDO, T., YASUI, A., OGINO, S., ITO, K. (2006). Liquid chromatographic analysis of Cinchona alkaloids in beverages. *J Aoac Int* **89**, 1042-1047.

HOSTETTMAN, K., QUEIROZ, E. F., VIEIRA, P. C. Princícpios ativos de plantas superiores. São Carlos, SP: EDUFSCar. 2003

JÄVERFALK, E. M., AMINI, A., WESTERLUND, D., ANDRÉN, P. E. (1998). Chiral separation of local anaesthetics by a capillary electrophoresis/partial filling technique coupled on-line to micro-electrospray mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry* **33**, 183-186.

JOHNSTON, M. A., SMITH, W. J., KENNEDY, J. M., LEA, A. R., HAILEY, D. M. (1980). Reversed-Phase High-Performance Liquid-Chromatographic Analysis of Cinchona Alkaloids in Pharmaceuticals. *J Chromatogr* **189**, 241-247.

KABULOV, B. D., DYAKONOV, A. L., ZALYALIEVA, S. V. (1991). High-Performance Liquid-Chromatography of Alkaloids. *Khimiya Prirodnykh Soedinenii*, 595-613.

KLEIN, E. J., RIVERA, S. L. (2000). A review of criteria functions and response surface methodology for the optimization of analytical scale HPLC separations. *J Liq Chromatogr R T* **23**, 2097-2121.

LANDERS, J. P. Handbook of Capillary and Microchip Electrophoresis and Associated Microtechniques. Third Edition Virginia: CRC Press. 2008

LUONG, J. H. T., NGUYEN, A. L. (1997). Achiral selectivity in cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **792**, 431-444.

LURIE, I. S. (1997). Separation selectivity in chiral and achiral capillary electrophoresis with mixed cyclodextrins. *J Chromatogr A* **792**, 297-307.

MCCALLEY, D. V. (1983a). Analysis of Cinchona Alkaloids by High-Performance Liquid-Chromatography. *J Chromatogr* **260**, 184-188.

MCCALLEY, D. V. (1983b). Analysis of the Cinchona Alkaloids by Liquid-Chromatography - Reversed-Phase Chromatography on Octadecylsilyl Columns. *Chromatographia* **17**, 264-266.

MCCALLEY, D. V. (1986). Analysis of the Cinchona Alkaloids by High-Performance Liquid-Chromatography - Use as Probes of Activity Towards Basic Compounds Shown by Reversed-Phase Columns. *J Chromatogr* **357**, 221-226.

MCCALLEY, D. V. (1990). Quantitative-Analysis of Alkaloids from Cinchona Bark by High-Performance Liquid-Chromatography. *Analyst* **115**, 1355-1358.

MCCALLEY, D. V. (2002). Analysis of the Cinchona alkaloids by high-performance liquid chromatography and other separation techniques. *J Chromatogr A* **967**, 1-19.

MCCALLEY, D. V. (2008). Liquid Chromatographic Separations of Basic Compounds. *Adv Chromatogr* **46**, 305-350.

MORAES, E. P. Avaliação quimiométrica de mapas peptídicos urinários visando o diagnóstico clínico. 2008Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2008.

MORAES, M. C. B., LAGO, C. L. (2003). Electrospray ionization mass spectrometry applied to study inorganic and organo-metallic species. *Quim Nova* **26**, 556-563.

MROCZEK, T., GLOWNIAK, K. (2000). TLC and HPTLC assay of quinoline and quinuclidine alkaloids in Cinchonae cortex and pharmaceutical preparations. *Jpc-Journal of Planar Chromatography-Modern Tlc* **13**, 457-462.

OZAKI, H., ITOU, N., TERABE, S., TAKADA, Y., SAKAIRI, M., KOIZUMI, H. (1995). Micellar electrokinetic chromatography--mass spectrometry using a high-molecular-mass surfactant on-line coupling with an electrospray ionization interface. *J Chromatogr A* **716**, 69-79.

PINTO, A. C., BOLZANI, V. D., LOPES, N. P., SILVA, D. H. S., EPIFANIO, R. A. (2002). Current Status, Challenges and Trends on Natural Products in Brazil. *Quim Nova* **25**, 45-61.

QUIRINO, J. P., HADDAD, P. R. (2009). Neutral analyte focusing by micelle collapse in partial-filling MEKC with UV and ESI-MS detection. *Electrophoresis* **30**, 1670-1674.

RIBANI, M., BOTTOLI, C., B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, I. C. S. F., MELLO, L., F. C (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Quim Nova* **27**, 771-780.

RIEKKOLA, M. L., JUSSILA, M., PORRAS, S. P., VALKO, I. E. (2000). Non-aqueous capillary electrophoresis. *J Chromatogr A* **892**, 155-170.

RODRIGUES, M. I., IEMMA, A. F. Planejamento de experimentos e otimização de processos: uma estratégia seqüencial de planejamentos. Campinas, SP: Casa do Pão. 2005

RUDAZ, S., CHERKAOUI, S., GAUVRIT, J. Y., LANTERI, P., VEUTHEY, J. L. (2001). Experimental designs to investigate capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry enantioseparation with the partial-filling technique. *Electrophoresis* **22**, 3316-3326.

SARSUNOV.M, HRIVNAK, J. (1974). Separation and Evaluation of Alkaloids of Cinchona by Thin-Layer Chromatography and Gas-Liquid Chromatography. *Pharmazie* **29**, 608-609.

SCHNEIDERMAN, E., STALCUP, A. M. (2000). Cyclodextrins: a versatile tool in separation science. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **745**, 83-102.

SHAMSI, S. A., MILLER, B. E. (2004). Capillary electrophoresis-mass spectrometry: Recent advances to the analysis of small achiral and chiral solutes. *Electrophoresis* **25**, 3927-3961.

SHAMSI, S. A., ZHENG, J., AKBAY, C., RIZVI, S. A. A. (2004). Capillary electrophoresis-mass spectrometry for chiral analysis: Recent development of new modes and applications. *Abstracts of Papers of the American Chemical Society* **228**, U112-U112.

SILVA, C. A. Estudos fundamentais e aplicações envolvendo hormônios esteróides por meio de eletroforese capilar. 2008 Doutorado - Instituto de Química, Universidade de São Paulo - USP, São Paulo, 2008.

SIMIONATO, A. V. C., MORAES, E. P., CARRILHO, E., TAVARES, M. F. M., KENNDLER, E. (2008). Determination of amino acids by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry: An evaluation of different protein hydrolysis procedures. *Electrophoresis* **29**, 2051-2058.

SIMÕES, C. M. O., SCHENZEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre, RS: UFRGS Editora. 2007

SMITH, E. (1984). Analysis of Cinchona Alkaloids by High-Performance Liquid-Chromatography - Application to the Analysis of Quinidine Gluconate and Quinidine Sulfate and Their Dosage Forms. *J Chromatogr* **299**, 233-244.

TANAKA, Y., OTSUKA, K., TERABE, S. (2000). Separation of enantiomers by capillary electrophoresis-mass spectrometry employing a partial filling technique with a chiral crown ether. *J Chromatogr A* **875**, 323-330.

TANAKA, Y., TERABE, S. (1995). Partial Separation Zone Technique for the Separation of Enantiomers by Affinity Electrokinetic Chromatography with Proteins as Chiral Pseudo-Stationary Phases. *J Chromatogr A* **694**, 277-284.

TANAKA, Y., TERABE, S. (1997). Separation of the enantiomers of basic drugs by affinity capillary electrophoresis using a partial filling technique and alpha(1)-acid glycoprotein as chiral selector. *Chromatographia* **44**, 119-128.

TAVARES, M. F. M. (1996). Capillary electrophoresis: Basic concepts. *Quim Nova* **19**, 173-181.

TAVARES, M. F. M. (1997). Separation mechanisms in capillary electrophoresis. *Quim Nova* **20**, 493-511.

TERABE, S., OTSUKA, K., ICHIKAWA, K., TSUCHIYA, A., ANDO, T. (2002). Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries. *Anal Chem* **56**, 111-113.

THEODORIDIS, G., PAPADOYANNIS, I., HERMANSLOKKERBOL, A., VERPOORTE, R. (1995). A Study of the Behavior of Some New Column Materials in the Chromatographic Analysis of Cinchona Alkaloids. *Chromatographia* **41**, 153-160.

TSIMACHIDIS, D., CESLA, P., HAJEK, T., THEODORIDIS, G., JANDERA, P. (2008). Capillary electrophoretic chiral separation of Cinchona alkaloids using a cyclodextrin selector. *J Sep Sci* **31**, 1130-1136.

TSOCHATZIDIS, N. A., GUIRAUD, P., WILHELM, A. M., DELMAS, H. (2001). Determination of velocity, size and concentration of ultrasonic cavitation bubbles by the phase-Doppler technique. *Chem Eng Sci* **56**, 1831-1840.

USP. United State Pharmacopeia. 32: U.S.P.C. 2009

VALTCHEVA, L., MOHAMMAD, J., PETTERSSON, G., HJERTEN, S. (1993). Chiral Separation of Beta-Blockers by High-Performance Capillary Electrophoresis Based on Non-Immobilized Cellulase as Enantioselective Protein. *J Chromatogr* **638**, 263-267.

VEIGA, V. F., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. (2005). Medicinal plants: Safe cure? *Quim Nova* **28**, 519-528.

VELICKOVIC, D. T., MILENOVIC, D. M., RISTIC, M. S., VELJKOVIC, V. B. (2006). Kinetics of ultrasonic extraction of extractive substances from garden (Salvia officinalis L.) and glutinous (Salvia glutinosa L.) sage. *Ultrasonics Sonochemistry* **13**, 150-156.

VERPOORTE, R., MULDERKRIEGER, T., WIJNSMA, R., VERZIJL, J. M., SVENDSEN, A. B. (1984). Hplc Analysis of Alkaloids in Extracts of Callus-Cultures of Cinchona Species. *Zeitschrift Fur Naturforschung C-a Journal of Biosciences* **39**, 680-682.

VERZELE, M., REDANT, G., QURESHI, S., SANDRA, P. (1980). High-temperature quantitative glass capillary gas chromatography. Analysis of piperine and of quinine-quinidine. *J Chromatogr* **199**, 105-112.

VESPALEC, R., BOCEK, P. (1999). Chiral separations in capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **20**, 2579-2591.

VIEGAS, C., BOLZANI, V. D., BARREIRO, E. J. (2006). The natural products and the modern medicinal chemistry. *Quim Nova* **29**, 326-337.

WALBROEHL, Y., JORGENSON, J. W. (1984). On-column UV absorption detector for open tubular capillary zone electrophoresis. *J Chromatogr A* **315**, 135-143.

WANG, F., KHALEDI, M. G. (1996). Chiral Separations by Nonaqueous Capillary Electrophoresis. *Anal Chem* **68**, 3460-3467.

WESTON, A., BROWN, P. R. High Performance Liquid Chromatography & Capillary Electrophoresis: Principles and Practices. Portland: Book News. 1999

WHO, W. H. O., 2009. World Malaria Report 2008.

XIA, S. F., ZHANG, L., LU, M. H., QIU, B., CHI, Y. W., CHEN, G. N. (2009). Enantiomeric separation of chiral dipeptides by CE-ESI-MS employing a partial filling technique with chiral crown ether. *Electrophoresis* **30**, 2837-2844.

YANG, B., JIANG, Y., ZHAO, M., SHI, J., WANG, L. (2008). Effects of ultrasonic extraction on the physical and chemical properties of polysaccharides from longan fruit pericarp. *Polymer Degradation and Stability* **93**, 268-272.

ZHANG, Y. Q., XIE, J. B., CHEN, W. Q., ZHOU, T. Y., LU, W. (2009). Development of a Sensitive High-Performance Liquid Chromatographic Method with Simple Extraction for Simultaneous Determination of Huperzine A and Huperzine B in the Species Containing Lycopodium Alkaloids. *J Aoac Int* **92**, 1060-1063.

ZIMINA, T. M., SMITH, R. M., MYERS, P. (1997). Comparison of ODS-modified silica gels as stationary phases for electrochromatography in packed capillaries. *J Chromatogr A* **758**, 191-197.

DADOS PESSOAIS
VIVIANE DO NASCIMENTO
Local e data de nascimento:
Guarulhos, São Paulo, 02 de abril de 1983.

EDUCAÇÃO

Universidade Federal de São Carlos, São Carlos – SP, 2006.
Graduação em Química

OCUPAÇÃO
Bolsista de Mestrado, CNPQ, março 2007 – fevereiro 2009.

PUBLICAÇÕES
1. Do Nascimento, V.; Tonin, F.G.; Tavares, M.F.M.; "Method development and validation for the alkaloids of *Cinchona* by capillary electrophoresis", manuscrito em preparação.
2. Do Nascimento, V.; Tonin, F.G.; Tavares, M.F.M.; "Confirmatory analysis of the alkaloids of *Cinchona* by capillary electrophoresis coupled to mass spectrometry ", manuscrito em preparação.
3. Do Nascimento, V.; Tonin, F.G.; Farah, J.P.S.; Tavares, M.F.M.; "Solvent effects on the separation of the alkaloids from *Cinchona*", manuscrito em preparação.

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS
14º Encontro Nacional de Química Analítica, João Pessoa – PB, 2007; Análise dos principais alcalóides presentes na *Cinhona* por eletroforese capilar acoplada a espectrometria de massas (CE-MS).

13º LACE, Santiago, Chile, 2007; Analysis of *Cinchona calisaya* alkaloids by CE-DAD and confirmatory identification by CE-ESI-MS.

16º International Symposium on Capilary Electroseparation Techniques, Catania, Italia, 2008; Selectivity in the nonaqueous separations of bark *Cinchona calisaya* alkaloids.

14º LACE, Puerto Vallarta, México, 2008; Determination of bark *Cinchona calisaya* alkaloids by CE-DAD using MEKC.

15º LACE, Sevilha, Espanha, 2009; Validation of capillary electrophoretic method for quantitative determination of alkaloids present in *Cinchona* bark.