CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1.1 - PLANTAS MEDICINAIS

Desde os tempos mais remotos, as plantas foram usadas pelos homens em rituais festivos, como fonte de medicamentos para o tratamento de doenças, para o efeito da beleza e mesmo como veneno. A extração e caracterização de compostos ativos de plantas medicinais resultaram na descoberta de drogas de alto valor terapêutico. Dos fármacos empregados atualmente nos países industrializados, em torno de 25% advém direta ou indiretamente de produtos naturais, principalmente das plantas.[1] Há uma longa tradição do uso de plantas de uso cosmético, como exemplo, a beladona (*Atropa belladona* L.) era colocada dentro dos olhos para produzir a dilatação das pupilas; atualmente a henna (*Lawsonia inermis*) é ainda usada para a coloração dos cabelos.[2]

Talvez uma das plantas mais antigas empregadas pelo homem seja a *Papaver somniferum*, que originou o ópio e contém alcalóides e substâncias naturais, como a morfina. O ópio era conhecido pelas civilizações antigas, havendo relatos que confirmam seu uso desde 400 a.C., Galeno prescrevia o ópio para dores de cabeça, epilepsia, asma, cólica, febre e estados melancólicos. Os estudos químicos sobre o ópio começaram no século XIX, e em 1804 Armand Séquin isolou seu principal componente, a morfina, batizada em homenagem ao deus grego do sono Morpheu. A estrutura química da morfina foi elucidada em 1923 por Robert Robinson e colaboradores, e sua síntese foi descrita em 1952.[3]

A quinina, um dos principais componentes da casca da *Cinchona officinalis*, originou os fármacos anti-maláricos cloroquina e mefloquina.[3]

Para caçar ou pescar, os ameríndios empregavam poções capazes de envenenar ou imobilizar sua presa, sem que houvesse manifestação de efeitos tóxicos ao comê-la, como exemplo, temos o curare, conhecido pelos índios da Amazônia pelas propriedades ictiotóxicas.[3]

A aspirina é o analgésico mais consumido e vendido no mundo. Muito embora derive do produto salicina, foi o primeiro fármaco sintético empregado na terapêutica, tendo sua síntese concluída em 1897, pelo químico alemão Felix Hoffman, do laboratório Bayer (está relatado na história que seu pai sofria de reumatismo crônico e não suportando mais o desconforto causado pelo tratamento com salicina, incentivou o filho a

preparar derivados que pudessem ser mais tolerados). A salicina foi isolada pela primeira vez em 1829 pelo farmacêutico francês H. Leurox, contudo, seu potencial terapêutico era conhecido desde a antiguidade. Substância presente em espécies do gênero *Salix* e *Populus*, a salicina já havia sido mencionada no século V a.C., de forma empírica pelo pensador grego Hipócrates. Em sua época, Hipócrates indicava extratos preparados a partir das folhas e casca de salgueiro branco (*Salix alba*), para o combate da febre e da dor. Em 1838, o químico italiano Raffaele Piria obteve o ácido salicílico sintético, através da hidrólise oxidativa da salicina.[4]

As flores de *Hypericum perforatum* L, conhecida como erva de São João, são utilizadas para o tratamento de depressão leve a moderada. Na Alemanha são feitas 3,7 milhões de prescrições por ano o que corresponde a 25% do total de prescrições de antidepressivos naquele país.[5]

Outra fonte de metabólitos secundários do ponto de vista econômico e farmacológico é a *Catharanthus roseus*. Essa planta é capaz de produzir e acumular mais de 90 compostos alcaloídicos com destaque a dois alcalóides de maior importância para a indústria farmacêutica: vincristina, utilizada no tratamento de leucemia linfoblástica aguda infantil em diferentes graus de tratamento quimioterápico e a vimblastina, de grande aplicação no tratamento de diferentes linfomas, como o de Hodgkins, o sarcoma de Karposi, câncer de ovário e tumores do testículo. Seus valores de mercado estão estimados em U$ 6000/g (vincristina) e U$ 12000/g (vimblastina).[5]

Além destes, têm-se os medicamentos de origem natural usados no tratamento do câncer – taxol, campotequinas,[1] entre outros.[5]

1.2 - METABOLISMO DAS PLANTAS[6,7]

Durante a fotossíntese, a clorofila, um pigmento magnésio-porfirina, absorve energia do sol para transformar dióxido de carbono e água em glicose. Treze nutrientes minerais são absorvidos diretamente do solo através das raízes das plantas, de acordo com sua importância, os nutrientes minerais são classificados como macronutrientes primários (nitrogênio, fósforo e potássio), macronutrientes secundários (cálcio, magnésio e enxofre) e micronutrientes (boro, cobre, ferro, cloro, manganês, molibdênio e zinco).

O metabolismo das plantas é dividido didaticamente em metabolismo primário e secundário, sendo que não existe uma divisão exata entre eles. Metabolismo primário ou básico refere-se aos processos bioquímicos envolvidos na assimilação e transporte de nutrientes para a produção (anabolismo), degradação (catabolismo) ou simplesmente biotransformação de moléculas que são essenciais para a manutenção da vida e comum a todos os organismos vivos. Metabólitos primários, tais como carboidratos, aminoácidos, ácidos graxos e nucleotídeos são, portanto, encontrados em todas as plantas independentemente das espécies, e são diretamente associados ao crescimento e desenvolvimento das plantas.

Substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas e que estão restritas a determinados grupos de organismos são produtos do metabolismo secundário. Possuem características químicas variadas e, às vezes, complexas sendo que a função de muitos destes compostos ainda permanece desconhecida. Os metabólitos secundários têm sido associados à adaptação do ambiente e interações ecológicas. Considerando a ausência do movimento e a falta de sistemas sofisticados de imunidade e processos neurológicos, as plantas tiveram que desenvolver seus próprios mecanismos de defesa e estratégias para assegurar sua disseminação. Muitos metabólitos secundários exibem mecanismos de proteção contra patógenos e predadores, como repelentes, liberando mau cheiro e sabor e até mesmo como veneno. Pigmentos de flores podem mostrar cores atrativas para polinizadores e insetos e preventiva contra predadores.

O mecanismo do metabolismo secundário e sua ligação com o metabolismo primário são mostrados de maneira simplificada na Figura 1. Todos os metabólitos secundários derivam de duas maiores rotas biossintéticas principais: acetato, na forma de seu tioéster com a coenzima A e ácido chiquímico, ou da combinação de ambos. Acetato também é o precursor dos ácidos graxos, através da reação de condensação do mevalonato, um intermediário chave na síntese de isoprenóides e derivativos. Através do ciclo do ácido cítrico, acetato gera aminoácidos alifáticos, tais como ornitina e lisina, os precursores de várias classes de alcalóides (tropano, pirrolidina, etc). Ácido chiquímico produz diretamente ácido gálico, o progenitor de taninos hidrolisáveis, e aminoácidos aromáticos

(triptofano, fenilalanina, tirosina) envolvidos na síntese de outros alcalóides (indóis, etc). Via aminoácidos aromáticos, o ácido chiquímico é também ligado à síntese de outros importantes intermediários, como o ácido cinâmico, o precursor de numerosos compostos aromáticos (fenilpropanóides, cumarinas, etc). O esqueleto básico de flavonóides (dois anéis aromáticos conectados a três pontes de carbonos) bem como os taninos condensados, originam de duas rotas separadas: a rota do ácido chiquímico, via fenilalanina e ácido cinâmico, e a rota do acetato, via ácido malônico.

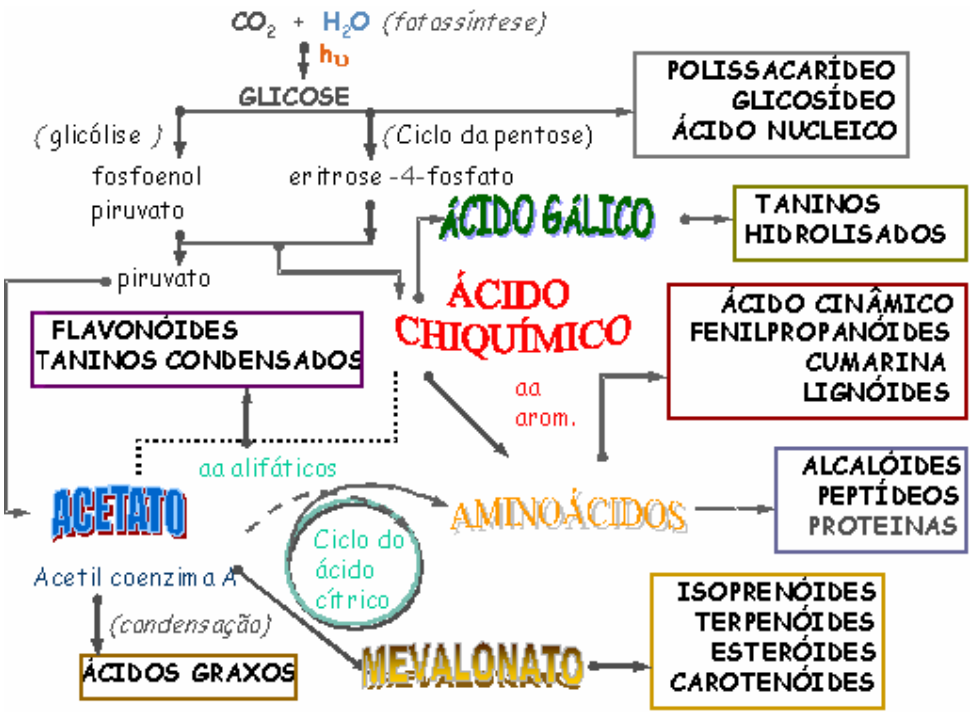

Figura 1 - Esquema geral do metabolismo das plantas.

1.3 - ÍNDICES ECONÔMICOS

A Organização Mundial da Saúde (OMS) apresentou dados em 1994, nos quais 90% da população do mundo faziam uso de plantas medicinais pelas propriedades curativas e 81% não tinham acesso a drogas sintéticas. A importância das plantas medicinais é demonstrada, até pelo fato que, 35% das drogas prescritas são de origem natural em países desenvolvidos.[8,9]

Em 2000, o mercado mundial de plantas medicinais movimentou um valor estimado de 22 bilhões de dólares, com taxas de crescimento entre 10

e 20%.[10,11] Nos Estados Unidos (E.U.A.), o setor faturou 6,6 bilhões de dólares e 8,5 bilhões na Europa, sendo a Alemanha, o maior mercado mundial de fitoterápicos.[11] Na Alemanha, em particular, mais de 80% dos médicos utilizam regularmente medicamentos a base de plantas.[12]

Boa parte do comércio de fitoterápicos nos países subdesenvolvidos não é formalizada. Considerando ainda que esses países devem consumir proporcionalmente mais fitoterápicos que os países desenvolvidos, pode-se concluir que o valor das vendas registradas no mundo esteja subestimado.[12]

1.3.1 - A Situação Brasileira

No Brasil, as plantas medicinais podem ser adquiridas em farmácias de manipulação, supermercados e feiras livres, sendo que o controle de qualidade é precário ou inexistente. A alta demanda e as dificuldades no estabelecimento de controle de qualidade de tais produtos fazem com que ocorram problemas de adulteração e baixa qualidade da matéria-prima ou produto final.[12] Como exemplo de tal situação, tem-se a adulteração de folhas de espécie da *Salvia officinalis* com folhas de *S. Triloba L.,* neste caso a caracterização pode ser feita através de análises químicas, pois o teor de cineol na *Salvia officinalis* é aproximadamente duas vezes maior que de tujona, sendo que na segunda espécie ocorre o inverso.[13] Um programa de avaliação de camomila foi realizado em Minas Gerais e verificou-se que somente metade das amostras apresentava os constituintes dos óleos essenciais necessários à atividade anti-inflamatória da planta.[14] Em um trabalho realizado em 1973, de 100 insumos vegetais obtidos por um laboratório, constataram-se 21 adulterações, consistindo na substituição do vegetal pela contaminação com outras espécies vegetais, ou na total substituição do vegetal.[15]

1.3.1.1 - Vigilância Sanitária

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é o órgão responsável pela legislação, fiscalização e aprovação da utilização de plantas ligados à área cosmética, farmacêutica e de alimentos.[16]

Em 1995, a ANVISA, estabeleceu regras para o registro de produtos fitoterápicos, de acordo com a portaria nº 6 de 31/01/1995, que definiu que

fitoterápico é um medicamento com componentes ativos de origem vegetal, devendo apresentar estudos de eficácia e toxicidade dos produtos já existentes no mercado, estabelecendo-se um controle mais efetivo por parte dos fabricantes e revendedores de fitoterápicos. Segundo a portaria, o fabricante deveria elaborar um relatório técnico que contenha informações sobre a matéria-prima vegetal, droga vegetal, preparo fitoterápico intermediário, produto fitoterápico, segurança e eficácia, incluindo também dados sobre a planta fresca, características macroscópicas e microscópicas, testes de pureza, análise qualitativa e quantitativa dos princípios ativos, entre outros.[17]

Esta legislação foi reformulada, mantendo suas características essenciais.[18] Em 2004, novos critérios foram avaliados para a produção de fitoterápicos sendo publicado no Diário Oficial da União (DOU) por meio da Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. A base principal da legislação é a garantia de qualidade do medicamento para o consumidor, exigindo a reprodutibilidade dos fitoterápicos fabricados, a partir de um "marcador" (Apêndice 1), assegurando ao paciente o consumo da mesma quantidade da substância ativa na troca da cartela, ou mesmo a opção por outro fabricante. Outro critério é a comprovação da eficácia e segurança dos fitoterápicos.[16]

1.3.1.2 – Dados Econômicos Brasileiros

No Brasil, em 1998, os produtos naturais foram responsáveis pelo controle de 5,5% do mercado total de medicamentos, representando aproximadamente 566 milhões de dólares.[19] Além do uso fitoterápico, indústrias de perfumes, cosméticos e alimentos utilizam uma grande variedade de essências e óleos essenciais, oriundas de plantas, com taxa de crescimento anual de aproximadamente 6% para perfumes, 8% na área de alimentos e 7,5% em óleos essenciais.[20]

O forte crescimento verificado neste setor deve-se à procura da população por produtos naturais, a melhoria da qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor, com a regulamentação da ANVISA e a entrada de grandes empresas farmacêuticas no setor de fitoterápicos.[21] Em 2004, a ANVISA aprovou o único medicamento à base de isoflavona da soja

(elaborado à base de extrato seco de *Glycine max* padronizado), do Aché Laboratórios.[22]

1.4 - EXTRAÇÃO

No século 18, a extração do aroma das flores era feita por uma técnica denominada *enfleurage*, na qual, gordura era colocada em contato com as flores, extraindo os odores da matriz da planta.[23]

O conceito básico de preparação de amostra é converter uma matriz em uma amostra no formato que é desejado para análise, os modos de extração têm em comum alguns objetivos:

- remover interferentes da amostra, portanto, aumentando a seletividade do método,
- aumentar a concentração do analito e desta forma a sensibilidade do ensaio,
- se necessário, converter o analito em uma forma mais desejável para detecção ou separação,
- providenciar um procedimento robusto e reprodutível que é independente das variações na matriz da amostra.

Os objetivos dos recentes procedimentos para a extração de sólidos tendem a reduzir a quantidade de solvente e de amostra, um diferencial sob o aspecto ambiental, minimizando a geração de resíduo químico. Ainda, reduzir o tempo e melhorar a seletividade da extração,[24] além do uso de métodos validados, melhorando a qualidade e credibilidade do produto.

A extração de compostos bioativos de materiais vegetais pode ser realizada de diversas formas, entre as quais: extração por solvente, maceração, percolação, fluido super crítico, Soxhlet, destilação, ultrassom, entre outros. Pela Farmacopéia americana, os métodos mais utilizados para extração de constituintes de plantas são ultrassom, aquecimento sob refluxo e extração por Soxhlet. A extração exaustiva mais freqüentemente utilizada é a extração por Soxhlet.[25]

Nos próximos itens são mencionados alguns tipos de extrações.

É essencial que o solvente usado para a extração de plantas para uso cosmético seja adequado para as necessidades do produto final, por exemplo, seria inapropriado incorporar um extrato contendo uma mistura de

água e propilenoglicol em um spray para cabelos, onde o solvente deixaria um resíduo indesejado, um extrato alcoólico seria preferível para tal preparação.

Exemplos de tipos de preparações nos quais os extratos de plantas poderiam ser incorporados em cosméticos são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1 - Preparações de uso cosmético.

Meio extrator	Usos
Água	Água de banho, shampoos
Água / Propilenoglicol	Condicionadores, loções para cabelo e corpo, banho de espuma
Etanol / Propanol	Sprays para cabelos, pós-barba
Miristato de isopropila / óleos fixos	Óleos para banho, aromaterápicos

Os extratos glicólico e hidroglicólico[26] possuem alta concentração de propilenoglicol, misturado água em menor ou maior proporção. Uma das vantagens deste tipo de extrato é sua ampla afinidade com formulações cosmiátricas, por possuir caráter emulsificante. O propilenoglicol é ainda um excelente agente umectante e desinfetante, além de inibir a fermentação e o crescimento de leveduras e ainda estabilizar vitaminas.

1.4.1 - Extração Sólido-Líquido[49]

A extração de plantas é geralmente conhecida como extração sólido-líquido, pois geralmente a planta, na sua forma sólida, é extraída em um meio líquido.

Três estágios ocorrem durante a extração: a penetração do solvente dentro das células da planta e seu inchamento, a dissolução das substâncias extrativas e a difusão das substâncias para fora da célula.

A forma mais simples de extração sólido-líquido é o tratamento do sólido com um dado solvente em um frasco seguido pela decantação ou filtração. Este tipo de extração é muito útil quando o principal componente da fase sólida é apreciavelmente solúvel no solvente.

Os processos de extração podem ser divididos em dois maiores grupos: processo que resulta em um estabelecimento de um equilíbrio de

concentração entre a solução e o resíduo sólido e o processo no qual a droga é extraída exaustivamente (remove completamente as substâncias desejadas da planta).[27] No primeiro método pode-se citar extração por maceração e por ultrassom, e no segundo método, extração por Soxhlet e percolação.

1.4.1.1 – Extração por Maceração

Na maceração, de acordo com a USP 26,[28] o material que está sendo extraído é primeiramente reduzido em um tamanho desejável, misturado com o solvente extrator e mantido a temperatura ambiente por um tempo apropriado e com freqüente agitação até que o material solúvel seja dissolvido. A mistura é filtrada, o material insolúvel é lavado com o mesmo solvente usado para a maceração e o filtrado é combinado e concentrado, usualmente a pressão reduzida, até desejável consistência. De acordo com Simões *et al.*[6], a extração é realizada em recipiente fechado, mantido a diversas temperaturas, durante um período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Este procedimento não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, devido `a saturação do meio extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Os fatores que influenciam a eficiência da maceração incluem: tamanho do material, capacidade de intumescimento, temperatura, agitação, tempo de extração, proporção planta/solvente, etc.

1.4.1.2 - Extração por Ultrassom

O ultrassom tem sido utilizado para a extração de componentes ativos de plantas devido ao seu baixo custo, por reduzir o tempo de extração e aumentar o seu rendimento. Este melhoramento de extração é atribuído ao fenômeno denominado de cavitação, produzido no solvente pela passagem do ultrassom. Isto ocorre devido a formação de bolhas, sendo que a implosão das cavidades cria altas pressões e temperaturas no micro-ambiente.[29] O tamanho das bolhas é muito pequeno, relativo ao volume do líquido total, então o aquecimento produzido é rapidamente dissipado com apreciável mudança nas condições do meio extrativo.[30] O efeito das ondas

ultrassônicas no material vegetal rompe as células e libera o seu conteúdo para o meio de extração.

A extração de material seco envolve dois estágios: o passo inicial em que o solvente penetra no vegetal facilitando o processo de inchamento e de hidratação. E o segundo passo, em que ocorre a transferência de massa de constituintes solúveis do material para o solvente por difusão e processo osmótico. É durante este estágio que energia adicional é usada para acelerar o processo, tal como agitação, aumento de temperatura e vibração.[31]

Numerosos fatores afetam a extração, entre os quais, as propriedades do material vegetal, quantidade, solvente (seletividade e quantidade). Reduzindo o tamanho do vegetal aumenta-se o número de células diretamente expostas para extração por solvente em ultrassom, este efeito pode ser utilizado moendo-se o material antes da extração.[31]

Para a extração por ultrassom, vibrações com freqüências acima de 20 kHz são aplicadas à amostra, porém, a sonicação pode causar decomposição ou oxidação de compostos.[8] O ultrassom pode produzir alguns efeitos químicos devido à produção de radicais livres dentro das bolhas de cavitação, não sendo benéfico para o processo de extração. A sonicação da água resulta na formação de radicais livres, os quais podem combinar-se para formar peróxido de hidrogênio.

A extração por ultrassom é efetiva para extrair vários analitos de diferentes tipos de amostras. Altas temperaturas (que aumentam a solubilidade e difusividade) e pressões (que favorecem a penetração e transporte da interface entre a solução aquosa ou orgânica sujeita à energia ultrassônica e uma matriz sólida) resultam em alto poder extrativo.[30] De acordo com Vinatoru e colaboradores poucas plantas requerem mais de duas horas de sonicação.[32]

O benefício de usar o ultrassom na extração de plantas já tem sido demonstrado por um grande número de compostos de interesse da indústria de alimentos, farmacêutica e cosmética. A redução do tempo de maceração de 8 h para 15 min, usando ultrassom, tem sido reportada na extração do alcalóide reserpina de *Rawolfia serpentina.*[33] A extração de compostos farmacologicamente ativos da *Salvia officinalis* aumentou a eficiência de

extração em 60% de alguns compostos, com o uso de ultrassom por 2 h em temperatura ambiente.[34]

O ultrassom tem sido aplicado também para a extração de compostos voláteis, como os presentes no vinho branco[35] e alho (*Allium sativum*).[36]

A aplicação da técnica de ultrassom para extração de ácido clorogênico foi feita nas folhas de *Eucommi ulmodies* Oliv. Em métodos convencionais a extração de ácido clorogênico é feita por aquecimento e refluxo cuja desvantagem é a perda do composto devido a ionização, hidrólise e oxidação durante a extração.[37] Um enriquecimento dos extratos das plantas de sálvia (*Salvia officinalis L.*) e de valeriana (*Valeriana officinalis L*) foi observado quando a sonicação foi aplicada continuamente, mas este modo não é considerado desejável para propósitos em escala industrial devido a razões econômicas.[38] Um procedimento simplificado de extração usando o ultrassom foi obtido por Li e colaboradores para análise de óleos em semente de soja.[39] Ultrassom também foi usado por Albu e colaboradores para aumentar a eficiência de extração do ácido carnósico de *Rosmarinus officinalis*, reduzindo o tempo de extração em comparação com métodos convencionais.[34]

1.4.1.3 - Dispersão de Matriz em Fase Sólida

Dispersão de matriz em fase sólida**,** conhecida como MSPD (do inglês, Matrix Solid Phase Dispersion), é um processo patenteado por Barker, reportado em 1989.[40]

MSPD é uma técnica de limpeza de amostra, tendo um procedimento simplificado que permite a eliminação da etapa de extração líquido-líquido, portanto, este processo evita o uso de grande quantidade de solvente, a ocorrência de emulsão e a lentidão associada a extração líquido-líquido, além de sua simplicidade e robustez.

Neste processo, a amostra é homogeneizada agregando-se uma quantidade de sorvente (como, por exemplo, octadecilsílica), sendo mecanicamente misturada com pistilo em almofariz para o completo rompimento e dispersão da amostra. MSPD emprega, em geral, pequena quantidade de amostra, aproximadamente 0,5 g, misturada com 2,0 g do suporte sólido (na proporção de 4:1). A mistura é transferida para uma

coluna de vidro, contendo uma barreira que retém a amostra, por exemplo, vidro sinterizado, e eluída com solvente apropriado. Neste processo a extração, fracionamento e purificação são realizadas em uma única coluna. Cuidados devem ser tomados para que não ocorra a formação de canais e a não compactação do material. O procedimento da extração realizada por MSPD é mostrado na Figura 2.

MSPD conduz simultaneamente o rompimento e extração de amostras sólidas, semi-sólidas e viscosas em um suporte sólido, este, dispersa os componentes da amostra, aumentando a área superficial e os componentes distribuem-se entre as fases de acordo com suas polaridades. Os componentes apolares dispersariam na fase apolar e seriam afetados pelas mudanças dinâmicas que ocorrem durante o processo. Moléculas polares pequenas (como a água) associariam-se com silanóis, bem como componentes da matriz capazes de fazer ligações por ligações de hidrogênio.[41]

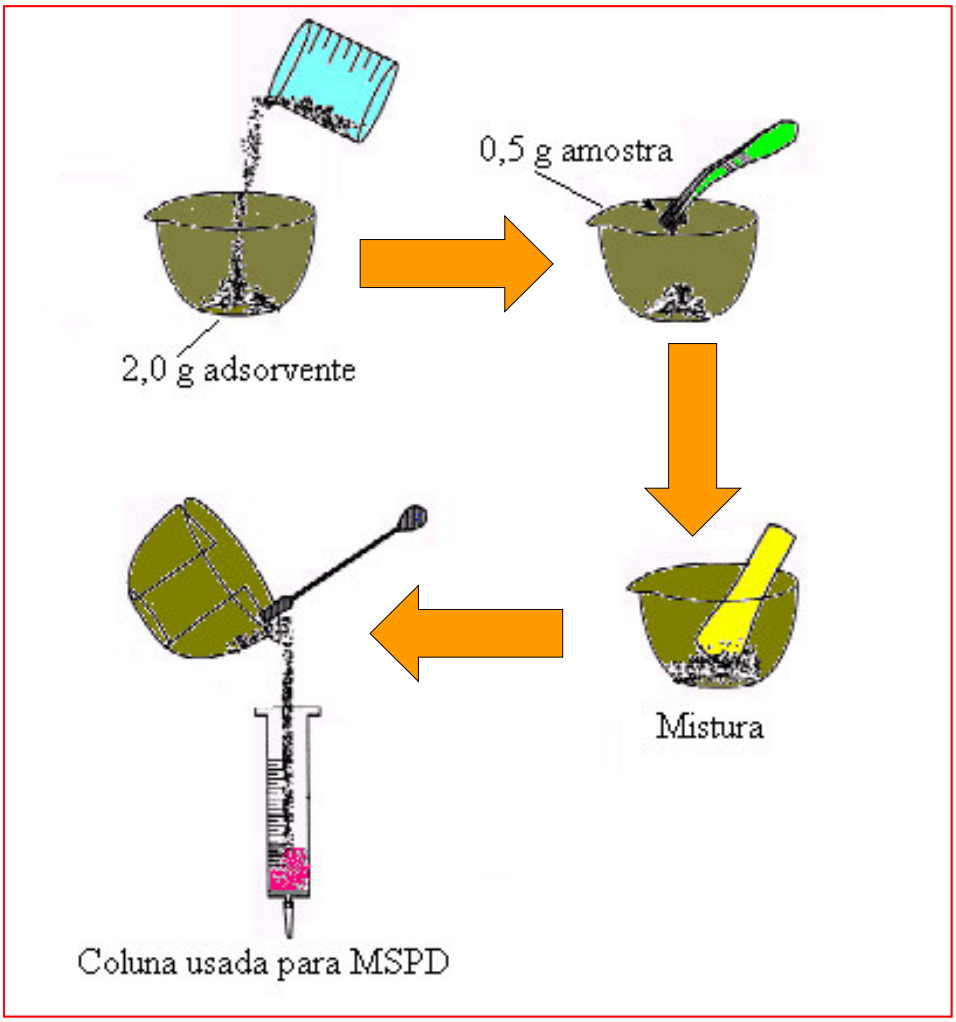

Figura 2 – Procedimento para extração por MSPD.

MSPD tem sido usada na extração de compostos fenólicos do chá verde, como ácido gálico, ácido siríngico, catequinas, rutina e epigalocatequina.[42] MSPD também foi usada para a determinação de isoflavonóides em *Radix astragali* [43] e na extração de ácidos fenólicos de *Melissa officinalis.* [44]

Um sorvente, conhecido como Florisil, consiste de grânulos brancos e porosos, composto de 15,5% de óxido de magnésio, 84% de dióxido de silício e 0,5% de sulfato de sódio[45] e possui como centro aceptor de elétrons, os íons Mg^{2+}, que retêm compostos com pares de elétrons livres de átomos de nitrogênio (ou enxofre), tais como quinolina, purina e derivativos de pirimidina e aminoácidos, removendo-os dos extratos.[46] Compostos básicos

de nitrogênio são fortemente retidos em Florisil.[47] Florisil tem sido usado na extração de compostos fenólicos de folhas de *Pinus sylvestris*.[46]

1.4.1.4 - Extração por Soxhlet

O método de extração por Soxhlet é considerado tradicional e tem sido usado há mais de 100 anos.[48] Neste procedimento, a amostra sólida é colocada em um filtro de papel na parte superior do Soxhlet (dedal), e o solvente, que está na parte inferior (balão), é continuamente aquecido, condensando e preenchendo o dedal. Após determinado volume, a solução, já contendo os analitos dissolvidos, retorna para o balão e o processo é repetido até o analito ser removido da amostra sólida, ficando concentrado no balão. O ciclo é repetido numerosas vezes e, desta forma, a espécie desejada é concentrada no balão de destilação. A velocidade de extração pode ser influenciada pela escolha do solvente e a temperatura.[49] A amostra deve ser estável na temperatura de ebulição do solvente. A extração é considerada exaustiva, seu custo é baixo, obtendo-se boa recuperação, o tempo de extração é de 6 - 48 h, o consumo de solvente é de geralmente 200 - 600 mL e o desenvolvimento do método é simples.[8] A extração de metabólitos secundários por Soxhlet pode ser revista em vários artigos.[50,51,52]

1.4.1.5 – Extração por Percolação

Na percolação, de acordo com a USP 26,[28] o material que está sendo extraído é primeiramente reduzido em tamanho desejável sendo misturado com um solvente específico e mantido parado por 15 min. A mistura é transferida para um percolador com suficiente quantidade de solvente para cobrir toda a planta e a mistura é percolada com solvente lentamente (menor que 1 mL min^{-1} para 1000 g do material). Todo o material é concentrado, geralmente por destilação a pressão reduzida.

1.4.2 - Extração Líquido-Líquido

A extração líquido-líquido (LLE) é usada extensivamente em laboratório,[53] sendo os constituintes hidrofóbicos das amostras extraídos da fase aquosa com um solvente imiscível. Vários solventes podem ser usados,

incluindo pentano, hexano, éter dietílico, acetato de etila, clorofórmio e cloreto de metila.

Para um analito *i*, o processo de extração pode ser ilustrado como:

$$i_{\text{amostra}} \rightleftharpoons i_{\text{fase orgânica}}$$

onde a amostra representa a solução da amostra e a fase orgânica representa o solvente utilizado na extração.

No equilíbrio, o coeficiente de partição (K_i) de um analito em um sistema de duas fases é:

$$K_i = C_{i,\ fase\ orgânica} / C_{i,\ amostra}$$

onde, $C_{i,\ fase\ orgânica}$ é a concentração de *i* no solvente de extração e $C_{i,\ amostra}$ é o equilíbrio da concentração de *i* na fase da amostra, sendo que o analito deveria ser extraído quantitativamente da amostra na fase orgânica.

Para compostos com características ácidas ou básicas, o ajuste do pH é de grande importância para assegurar alto coeficiente de partição. Na extração de compostos básicos, o pH é ajustado na faixa alcalina, enquanto que para os compostos ácidos, na faixa ácida.

Na extração ácido-base utilizam-se processos de partição entre solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água (éter, clorofórmio, acetato de etila). Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar (etanol ou metanol), para mais de uma extração utilizam-se 3 tipos de solventes: apolar (hexano, éter de petróleo), de polaridade moderada (diclorometano, clorofórmio) e polar (metanol, etanol), no entanto, devido a protocolos internacionais, que condenaram o uso de solventes clorados, estes solventes já não devem ser utilizados para a preparação de extratos, sendo, portanto, indicadas duas extrações.[54]

Um dos princípios que os químicos usam para predizer a solubilidade de uma substância é que ela tende a dissolver em um solvente que é quimicamente similar, por exemplo, a solubilidade em água requer que as espécies tenham algumas características neste meio. O grupo hidroxila é polar, por causa da diferença na eletronegatividade entre os átomos de hidrogênio e oxigênio, em outras palavras, a ligação tem também caráter iônico parcial.[49]

Etanol possui um grupo hidroxila similar ao da água, portanto, quando etanol é adicionado na água, ambos são miscíveis em todas as proporções. A atração entre as moléculas é enfraquecida pela presença de unidades apolares de hidrocarbonetos, por exemplo, a solubilidade de octanol em água é de 2%, isto ocorre devido a sua característica estrutural dominante, por possuir unidades de hidrocarbonetos. A atração do grupo polar OH para a água não é suficientemente forte, portanto a solubilidade de octanol seria maior em um solvente apolar.

Em geral, se um composto tem um grupo polar e apolar em sua estrutura, aquele tendo cinco ou mais átomos de carbono na porção de hidrocarboneto da molécula seria mais solúvel em solventes apolares como éter dietílico, pentano ou cloreto de metila.

1.4.3 - Extração em Fase Sólida[55]

Uma das técnicas usadas para limpeza de amostra é a extração em fase sólida, conhecida como SPE (do inglês, Solid Phase Extraction), a qual envolve o uso de cartuchos, onde a amostra passa através do sorvente ativado, e os analitos concentram-se em sua superfície, enquanto outros componentes passam através deste. O equilíbrio entre o analito e o sorvente é alcançado rapidamente por causa da grande superfície do sorvente. Usualmente, o tamanho das partículas varia de 10 - 60 μm. Como os materiais são similares aos usados em cromatografia líquida (exceto, pelo tamanho da partícula), a grande variedade de fases estacionárias da cromatografia líquida são também aplicadas à SPE. A escolha do sorvente depende da matriz da amostra, do analito interesse e seus interferentes.

A extração é conduzida em quatro etapas:

1 - condicionamento - o grupo funcional do sorvente é solvatado para fazê-lo interagir com a amostra,

2 - retenção - os analitos são ligados à superfície,

3 - lavagem - espécies indesejáveis são removidas e,

4 - eluição - os analitos são dessorvidos e coletados para análise.

1.5 - ELETROFORESE CAPILAR (CE)

1.5.1 - Fundamentos da Eletroforese Capilar

Eletroforese capilar é uma técnica de separação baseada na migração diferenciada de compostos iônicos ou ionizáveis sob ação de um campo elétrico. A eletroforese como técnica de separação foi introduzida por Tiselius[56] em 1937, que obteve a separação parcial de algumas proteínas constituintes de soro sangüíneo em solução livre em tubos verticais em formato de "U". Em 1967, Hjérten[57] descreveu o primeiro trabalho com uso de campo elétrico elevado empregando tubo de quartzo com dimensões de 300 μm de diâmetro interno e 36 cm de comprimento, com tensão de 2,5 a 3,0 kV. Em 1979, Everaerts *et al.*[58] demonstraram o uso de tubos de teflon com diâmetro interno de 200 μm, para a separação de 16 ânions, constituindo a primeira publicação de eletroforese capilar. Na década de 80, Jorgenson e Lukacs[59] realizaram avanços, com o uso de capilares de sílica fundida de 75 μm de diâmetro interno.

O rápido avanço da eletroforese capilar deve-se em parte, pela simplicidade instrumental, mas principalmente pela variedade dos modos de separação que podem ser efetuados em uma única coluna capilar e pela diversidade dos compostos passíveis de análise em cada modo.

A eletroforese capilar é realizada em tubos com dimensões capilares, tipicamente 25 - 75 μm de diâmetro interno e 375 μm de diâmetro externo. O uso do capilar apresenta numerosas vantagens, particularmente por favorecer a dissipação de calor, que é causado pela passagem de corrente através do meio condutor (efeito Joule). Um dos fatores desfavoráveis decorrente do efeito Joule é que moléculas localizadas na região central do meio de separação migrarão mais rapidamente que as moléculas localizadas nas bordas, causando o efeito de dispersão de zona; altas temperaturas também podem causar degradação térmica de algumas moléculas. A alta resistência elétrica do capilar permite o estabelecimento de campos elétricos elevados (100 - 500 V cm^{-1}), resultando em separações de alta eficiência (geralmente excede 10^5 pratos teóricos).[60]

A eletroforese capilar oferece outras vantagens sobre os métodos eletroforéticos convencionais, como a injeção do volume reduzido de

amostra (1 - 10 nL), baixo consumo de reagentes e a completa automação da análise, com possibilidade de injeção e detecção em fluxo. A configuração instrumental básica de um equipamento de eletroforese capilar está esquematizada na Figura 3.[61]

O sistema consiste de uma fonte de alta tensão, capilares (o mais comumente usado é o de sílica fundida), eletrodos (usualmente platina) e um detector apropriado. As extremidades do capilar são imersas nos reservatórios contendo um eletrólito adequado, sendo preenchido com o mesmo. Uma fonte de alta tensão é usada para estabelecer um campo elétrico, sendo conectada através de eletrodos aos dois reservatórios.

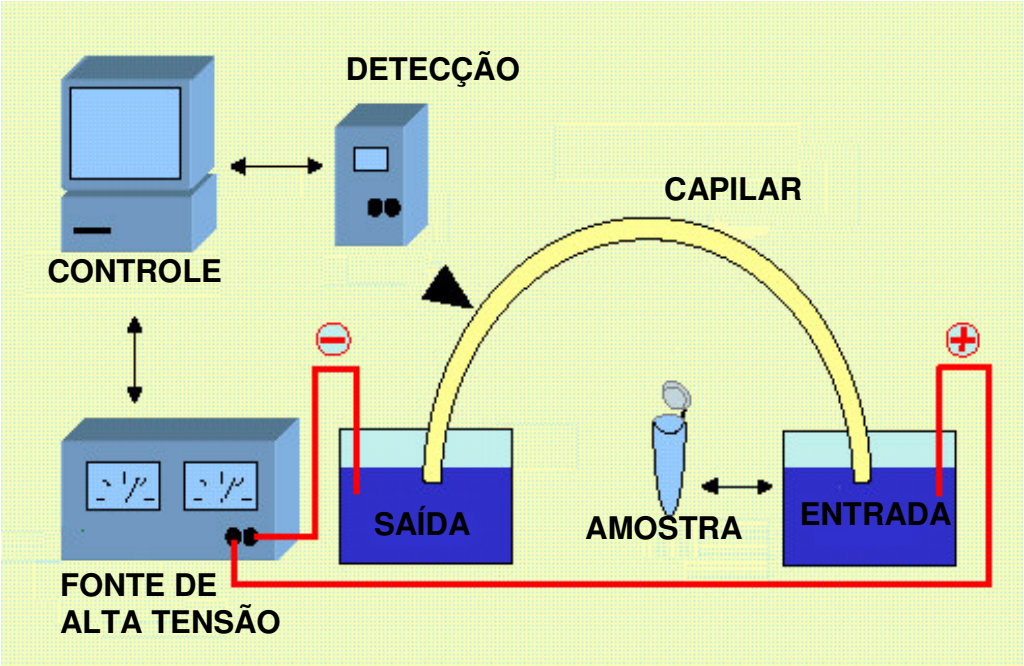

Figura 3 – Instrumentação para eletroforese capilar.

Capilares de sílica fundida são tipicamente usados como uma célula de detector, pois são transparentes à luz ultravioleta (UV) e visível (Vis). A janela da célula pode ser simplesmente queimada em uma pequena seção do capilar, retirando-se a cobertura externa de poliimida. Esta seção é então colocada no caminho de luz do detector. Capilares são freqüentemente inseridos em cartuchos dotados de sistema de circulação de líquido que permite o controle termostático do capilar. Um outro sistema utiliza ventiladores para dissipação do calor.

Na eletroforese capilar as amostras podem ser introduzidas no capilar pelos modos eletrocinético ou hidrodinâmico. Na injeção eletrocinética, um gradiente de potencial é estabelecido ao longo do comprimento do capilar por um período de tempo conhecido, enquanto que na injeção hidrodinâmica utiliza-se um gradiente de pressão. O gradiente de pressão pode ser estabelecido por diferentes mecanismos: pressurização ou vácuo em um dos reservatórios de solução, ou por gravidade, onde um dos reservatórios é elevado em relação ao outro e a amostra é introduzida por sifonagem.

O desenvolvimento de novos sistemas de detecção em eletroforese capilar tem sido uma área de intensa pesquisa desde a implementação da técnica.[62] O rápido avanço técnico nessa área tem sido atribuído a relativa facilidade com que alguns detectores, de uso geral em cromatografia líquida, são adaptados para eletroforese capilar. Pequenas modificações nestes detectores são suficientes para acomodar capilares de sílica fundida, como células de detecção em fluxo.

Uma variedade de detectores tem sido usada na eletroforese capilar, incluindo detecção por ultravioleta-visível (UV/Vis), por fluorescência, por condutividade, amperométrica, espectrometria de massas, etc. O detector mais amplamente utilizado é o de UV/Vis, sendo um tipo deste utilizado o arranjo de diodos, que tem a vantagem de detecção em múltiplos comprimentos de onda e a habilidade de fornecer dados espectrais.

1.5.2 - Mobilidade Eletroforética

Solutos carregados são separados devido às diferenças em suas mobilidades eletroforéticas (μ_{ef}). Sob ação de um campo elétrico (E) e na ausência de fluxo, um soluto carregado migrará através do tampão com uma velocidade eletroforética (v_{ef}) expressa pela Equação [1].

.

$$v_{ef} = E \cdot \mu_{ef} \qquad [1]$$

Sendo a velocidade eletroforética e o campo elétrico expressos pelas Equações [2] e [3].

$$v_{ef} = L_d / t_{mig} \qquad [2]$$

$$E = V / L_{tot} \qquad [3]$$

onde, L_d é o comprimento do capilar até a localização da janela do detector, t_{mig} é o tempo de migração, V é a tensão aplicada e L_{tot} é o comprimento total do capilar. Desta forma, rearranjando as Equações [1], [2] e [3] a equação da mobilidade eletroforética é expressa por:

$$\mu_{ef} = \frac{L_d \cdot L_{tot}}{V \cdot t_{mig}} \qquad [4]$$

1.5.3 - Mobilidade Efetiva

A mobilidade efetiva é um parâmetro usado para descrever a migração de analitos parcialmente dissociados, consistindo de espécies iônicas e neutras que interagem por um equilíbrio dinâmico ácido-base. Sob a influência de um campo elétrico, todas as espécies migram como um todo.

Somente as mobilidades iônicas da base ou do ácido conjugado são consideradas, cada um com um valor particular de mobilidade, dependendo do pH do meio. Assim, da mesma forma que os íons simples são caracterizados por um valor de mobilidade iônica (μ_j), a mobilidade efetiva (μ_{ep}) pode ser calculada pela definição clássica de Tiselius.[63]

$$\mu_{ep} = \Sigma\ (\mu_j \cdot \alpha_j) \qquad [5]$$

onde: μ_{ep} é a mobilidade efetiva, μ_j é a mobilidade iônica de cada espécie individual e α_j é a fração molar.

A fração molar depende da magnitude das constantes de dissociação do soluto e do pH do meio e, para sistemas monopróticos, é definida como:

$$\alpha_j = \frac{K_a}{K_a + [H^+]} \qquad [6]$$

onde: α_j é a fração molar e K_a é a constante de dissociação.

1.5.4 - Fluxo Eletrosmótico

Quando um eletrólito é introduzido dentro do capilar, a superfície interna do capilar adquire carga. Quimicamente, a sílica fundida é caracterizada pela presença de grupos silanóis que são carregados negativamente em pH superior a 3. Os grupos silanoato atraem cátions do eletrólito, formando uma camada interna na parede do capilar (camada fixa). Como estes cátions não neutralizam todas as cargas negativas, uma segunda camada de cátions é formada (camada difusa). Este modelo é conhecido como dupla camada elétrica. Quando um campo elétrico é aplicado, parte dos cátions da camada difusa é atraída em direção ao eletrodo de carga oposta. Durante a migração, os íons transportam moléculas de água, induzindo um fluxo de solução como um todo, conhecido como fluxo eletrosmótico (EOF, do inglês electrosmotic flow).

A mobilidade do fluxo eletrosmótico (μ_{osm}) é dependente das características do tampão, como a constante dielétrica, a viscosidade, o pH e a concentração, e é expressa pela Equação [7].

$$\mu_{osm} = \frac{-\varepsilon \cdot \varepsilon_0 \cdot \zeta}{\eta} \qquad [7]$$

onde, ε é a constante dielétrica, ε_0 é a permissividade do vácuo, ζ é o potencial zeta e η é a viscosidade.

Os dois maiores parâmetros que influenciam o fluxo eletrosmótico são o potencial zeta e a viscosidade. O potencial zeta é influenciado pela concentração do tampão e carga da superfície. A concentração do tampão pode ser facilmente mantida constante. Há formas para mudar a carga da superfície, a qual subseqüentemente influencia o EOF, mas muitas delas podem ser facilmente controladas, tais como pH do tampão. O EOF pode ser pouco reprodutível em pH menor que 2,5 e pH na faixa de 8 a 10, onde um maior tempo de pré-condicionamento do capilar é recomendado. O EOF é fortemente influenciado pela adsorção de molécula na parede do capilar. A

viscosidade depende da temperatura e do conteúdo de polímeros ou de solvente orgânico.[64]

A mobilidade aparente (μ_{ap}) de um analito pode ser expressa como a soma da mobilidade eletroforética (μ_{ef}) e a mobilidade do fluxo eletrosmótico do sistema (μ_{osm}), expressa pela Equação [8].

$$\mu_{ap} = \mu_{ef} + \mu_{osm} \qquad [8]$$

1.5.5 - Inversão do Fluxo Eletrosmótico [65]

Na eletroforese capilar no modo normal, o fluxo eletrosmótico é do ânodo para o cátodo, sendo que o detector está localizado no cátodo. Dessa forma, ânions são atraídos para o ânodo e o fluxo eletrosmótico deve ser suficientemente forte para carregá-los em direção ao cátodo. Sob estas condições, a ordem de migração dos compostos é de solutos catiônicos, neutros e aniônicos. Para a análise de ânions o tempo de separação pode ser reduzido revertendo-se a direção do fluxo eletrosmótico e a polaridade dos eletrodos, neste caso, o fluxo eletrosmótico é do cátodo para o ânodo.

O fluxo eletrosmótico pode ser invertido, adicionando-se um sal quaternário de amônio ao tampão. Como mostrado na Figura 4, as cargas positivas da amina quaternária ligam-se através de interações iônicas com os grupos silanoatos da parede do capilar. O grupo hidrofóbico da amina quaternária associa-se através de interações hidrofóbicas com as aminas quaternárias que estão em solução. A cabeça hidrofílica do tensoativo, carregada positivamente, atrai os ânions do tampão. Quando um campo elétrico é aplicado, estes ânions são atraídos para o eletrodo positivo e seu movimento desloca o fluxo como um todo em direção ao eletrodo positivo, resultando na inversão do fluxo eletrosmótico.

Uma variedade de sais de amônio quaternário tem sido usada como modificadores de fluxo, como o brometo de cetiltrimetilamônio (CTAB), cloreto de cetiltrimetilamônio (CTAC), brometo de tetradeciltrimetilamônio (TTAB), entre outros.

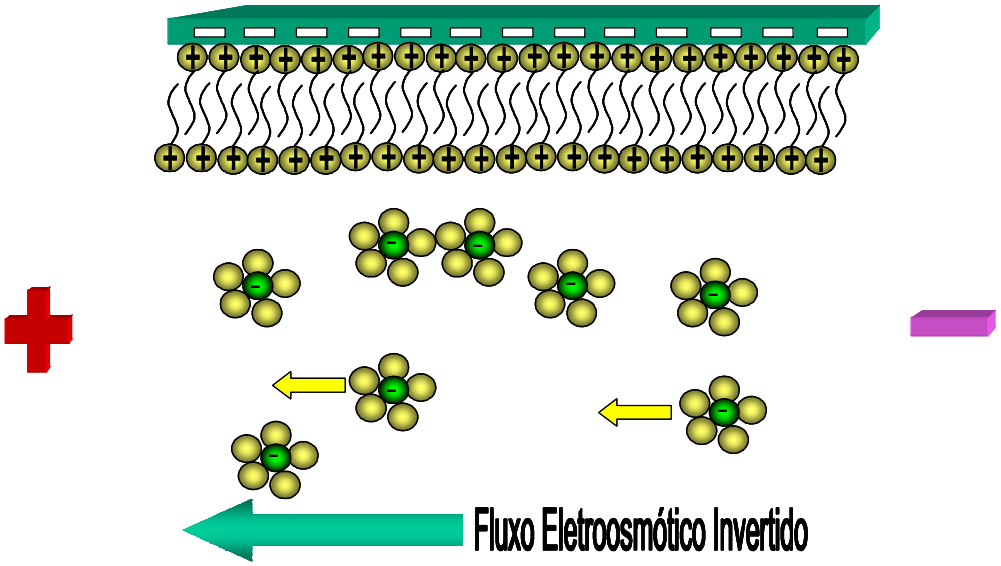

Figura 4 - Representação do interior do capilar de sílica fundida mostrando a inversão do fluxo eletrosmótico pela adição do sal de amônio quaternário. (Os ânions estão representados hidratados)

1.5.5.1 - Método de Detecção Indireta na Análise de Compostos Aniônicos

A detecção indireta envolve a adição ao eletrólito de uma espécie que absorve fortemente na região do ultravioleta (cromóforo). Assim sendo, a absorbância de um cromóforo aniônico é monitorada continuamente no decorrer da análise. Quando a banda do soluto aniônico atinge o detector, o ânion do cromóforo é deslocado e o sinal da absorbância decai, retornando a sua posição original assim que o soluto deixa o detector, como representado na Figura 5.

Figura 5 - Representação da análise de ânions pelo método de detecção indireta.

A simetria dos picos dos ânions depende do tipo de tampão utilizado. A banda se torna simétrica quando a mobilidade do soluto é próxima da mobilidade do anion do eletrólito. Diferentes mobilidades tornam as bandas distorcidas. Os picos são assimétricos quando a presença da banda da amostra gera variações no campo elétrico.[66]

Cromato é comumente usado para análise de anions inorgânicos devido a sua alta mobilidade, entretanto, para a análise de compostos com menor mobilidade, tais como ácidos carboxílicos (C1 - C8), o benzoato é mais desejável. Hidrogenoftalato de sódio e o ácido 3,5 dinitrobenzóico são popularmente usados para análise de ácidos orgânicos de média mobilidade, sendo a mobilidade do piridinodicarboxílico (PDC) similar ao hidrogenoftalato.

1.5.5.2 - Método de Detecção Indireta na Análise de Compostos Catiônicos

Cátions inorgânicos são pequenos e têm maior densidade de carga (proporção carga/raio) comparada a muitos íons orgânicos, portanto sua mobilidade eletroforética é maior. O problema na análise de cátions inorgânicos é devido a pequena diferença na mobilidade e baixa absorção pela radiação UV. Somente os metais alcalinos exibem grande diferença em

suas mobilidades e, portanto, podem ser facilmente separados. Cátions bivalentes e trivalentes, tais como alcalinos terrosos, metais de transição, não podem ser separados com um simples eletrólito, pois suas mobilidades são muito similares devido a proporção carga/massa. Reações de complexação são empregadas nestes casos para melhorar a diferença em suas mobilidades. A complexação de cátions com ligantes é usada para mudar a seletividade da separação ou para facilitar a detecção. Se os complexos são rapidamente formados, então a complexação dentro da coluna pode ser usada. Um ligante é adicionado ao eletrólito de corrida e um rápido equilíbrio entre o íon metálico livre e seu complexo é estabelecido com a formação de diferentes graus de complexação com várias cargas nos complexos formados, sendo que diferentes íons metálicos terão diferentes velocidades de migração. O modo CZE (item 1.5.6) e a detecção indireta são empregados neste caso.

Vários agentes complexantes têm sido utilizados, o ácido α-hidroxibutírico (α-HIBA), pKa = 3,79, é freqüentemente usado. O equilíbrio de complexação com os ligantes é influenciado pelo pH do eletrólito e a concentração do agente complexante. Separação de cátions também pode ser influenciada por sua interação com éter coroa, o qual depende do tamanho do cátion e da cavidade do éter coroa. O melhor resultado tem sido obtido com 18,6 - éter coroa sendo as mudanças de seletividades maiores. O uso de éter coroa possibilita a separação do potássio de amônio.[67]

Cromóforo, como o imidazol, é usado para análise de cátions.[68] Imidazol possui mobilidade eletroforética próxima dos cátions metálicos, sendo o seu pKa igual a 6,9.[69]

A versatilidade da eletroforese capilar é parcialmente derivada de numerosos modos de operação: eletroforese capilar em solução livre, cromatografia eletrocinética micelar, eletroforese capilar em gel, focalização isoelétrica capilar e isotacoforese. Neste trabalho foram utilizados os dois primeiros modos de operação, discutidos em maiores detalhes nas próximas seções.

1.5.6 - Eletroforese Capilar em Solução Livre

Na eletroforese capilar em solução livre, conhecida como FSCE (do inglês, Free Solution Capillary Electrophoresis), o capilar é preenchido com um eletrólito, geralmente com características tamponantes. Sob a influência de um campo elétrico, o eletrólito move-se através do capilar devido ao fluxo eletrosmótico. Moléculas carregadas são separadas devido a diferenças em suas mobilidades eletroforéticas e tenderão a migrar em direção ao eletrodo de carga oposta. O fluxo eletrosmótico é usualmente maior que a mobilidade eletroforética dos solutos orgânicos carregados negativamente, sendo arrastados pelo eletrólito em direção ao detector, geralmente posicionado no terminal catódico. Solutos neutros não possuem mobilidade eletroforética e movem-se através do capilar com a mesma velocidade que o fluxo eletrosmótico. Solutos carregados positivamente migram em direção ao cátodo sob a influência de ambos, mobilidade eletroforética e fluxo eletrosmótico, movendo-se mais rápido que o fluxo eletrosmótico. Portanto, a ordem na qual os solutos migram através do capilar é de cátions, neutros e ânions. A velocidade com que os solutos carregados migram em direção ao detector depende da relação carga/massa: solutos pequenos com maior mobilidade são os primeiros a migrar através do capilar (cátions altamente carregados), ânions pequenos altamente carregados são os últimos a migrar (Figura 6).

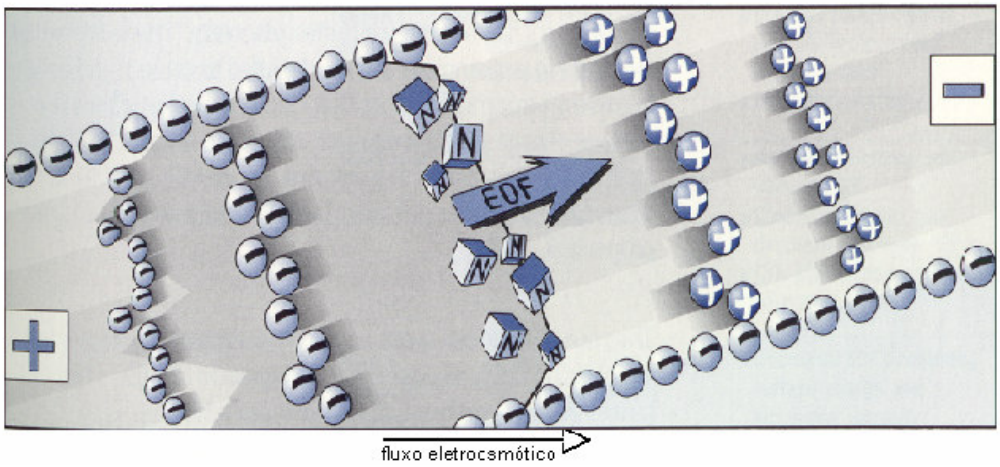

Figura 6 - Representação esquemática da eletroforese em solução livre (FSCE). "+", "N" e "-" representam solutos catiônicos, neutros e aniônicos, respectivamente, EOF é o fluxo eletrosmótico.

O fluxo eletrosmótico é responsável pela condução dos solutos, sem distinção de carga, em direção ao detector, permitindo assim a análise simultânea de amostras contendo solutos catiônicos, neutros e aniônicos, muito embora não haja discriminação temporal entre diferentes solutos neutros. Estes podem ser separados usando um tipo de eletroforese capilar conhecido como cromatografia eletrocinética micelar.

Na FSCE é bastante comum o uso de eletrólitos aditivados. O uso de aditivos é bastante indicado em quatro situações: para alterar a mobilidade do soluto, modificar o fluxo eletrosmótico, solubilizar solutos ou compostos na matriz da amostra e reduzir a interação de certos solutos com a parede do capilar.[66]

A adição de modificadores orgânicos ao eletrólito permite a análise de alguns analitos que não são normalmente solúveis em sistema aquoso, aumentando sua solubilidade ao tampão. Também são indicados para melhorar a seletividade, por influenciar a mobilidade efetiva e a mobilidade do fluxo eletrosmótico. Solventes orgânicos podem afetar a propriedade eletroforética dos compostos de duas maneiras: alterando a própria mobilidade (os íons carregados dependem da viscosidade da solução), assim como, influenciando os valores dos pKa´s dos eletrólitos fracos.[70] Solventes orgânicos são também conhecidos por reduzir o fluxo

eletrosmótico, o qual pode resultar em melhor resolução as custas de um maior tempo de análise. Por exemplo, os álcoois interagem fortemente com a parede do capilar, resultando em maior concentração aparente do álcool dentro da dupla camada, estas interações resultam em maior viscosidade aparente dentro da dupla camada. A mudança do fluxo é menor no caso da acetonitrila (ACN), devido a mais fraca interação entre ACN e a parede do capilar. O conteúdo de ACN acima de 10% é aceitável, sem causar perdas por evaporação, concentração de 15% (v/v) já aumenta o efeito de evaporação significantemente e maiores quantidades de ACN não são aceitáveis.[64]

1.5.7 - Cromatografia Eletrocinética Micelar

A cromatografia eletrocinética micelar, conhecida como MEKC (do inglês Micellar Electrokinetic Chromatography), foi introduzida por Terabe *et al.*[71] em 1984 e o seu desenvolvimento foi um dos maiores avanços na eletroforese capilar por providenciar a separação de compostos neutros. Pela adição de um tensoativo numa concentração acima de sua concentração micelar crítica (CMC), ocorre a formação de micelas, agregados de moléculas de detergentes individuais. A MEKC tem a capacidade de separar em uma única análise espécies aniônicas, catiônicas e neutras. O tensoativo aniônico mais comumente utilizado é o dodecil sulfato de sódio (SDS), geralmente tensoativos com cadeias menores que 8 não formam micelas e tensoativos com cadeias acima de 14 são pouco solúveis. O valor da CMC do SDS é de 8,1 mmol L^{-1} e do CTAB é de 1 mmol L^{-1}.[70]

A Figura 7 ilustra o princípio da separação utilizando a MEKC. Para o propósito dessa discussão assume-se que:

1 - o tensoativo usado é o SDS, em uma condição na qual a concentração está acima de sua concentração micelar crítica para formar micelas; 2 - o valor do pH do tampão é tal que existe um fluxo eletrosmótico elevado; 3 - as moléculas da amostra são eletricamente neutras.

No capilar, as micelas aniônicas são atraídas em direção ao ânodo, mas o fluxo eletrosmótico carrega-as em direção ao cátodo. Este modo de separação por MEKC é baseado no particionamento do soluto entre as

micelas e o tampão de corrida. Quando um composto insolúvel hidrofóbico é adicionado à solução que contêm as micelas ele particionará dentro da porção hidrofóbica das micelas e será carregado na mesma velocidade da micela com um tempo t_{mc}. Porém, se um composto hidrofílico é adicionado à solução ele não particionará dentro da micela, estes compostos serão carregados através do capilar na velocidade do fluxo eletrosmótico e serão os primeiros a eluir, com o tempo do fluxo, t_o. Um composto com solubilidade intermediária na água particionará entre a fase aquosa e a micela, dependendo da hidrofobicidade do composto. As moléculas neutras particionam dentro e fora das micelas, com base na hidrofobicidade de cada analito, conseqüentemente estas migrarão com o tempo intermediário entre t_{mc} e t_o, portanto, os compostos distribuem-se entre as micelas e a fase aquosa e a quantidade de tempo gasto nas micelas é proporcional à sua hidrofobicidade. Todos os outros solutos com hidrofobicidade intermediária migrarão dentro da janela de migração (Figura 8).

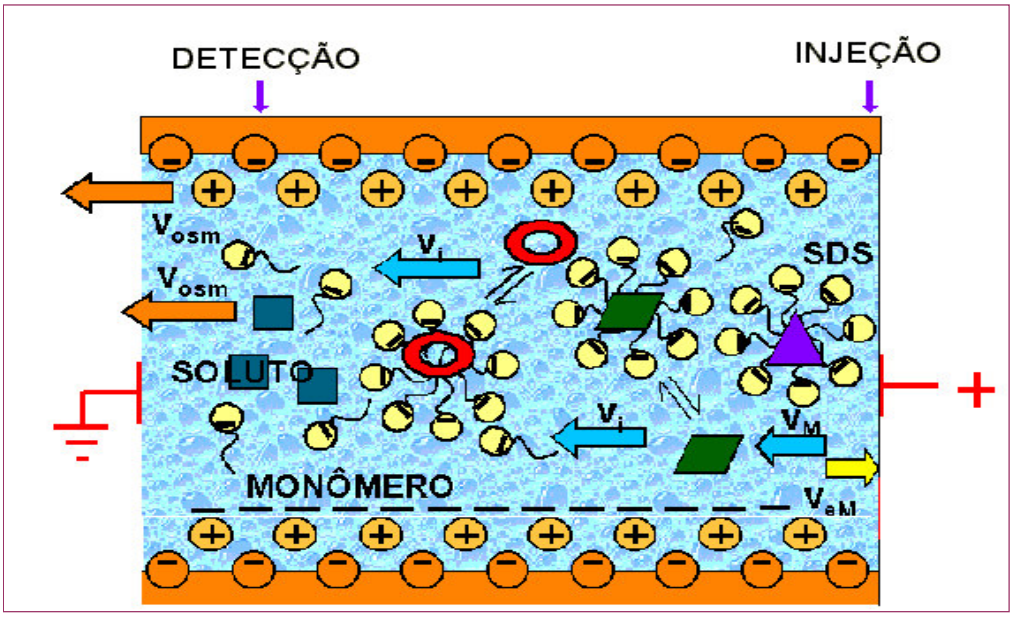

Figura 7 **-** Representação esquemática da migração de solutos neutros por cromatografia eletrocinética micelar com tensoativos aniônicos e fluxo normal. Um soluto não retido pela micela migra com a velocidade do fluxo eletrosmótico, v_{osm}. A velocidade eletroforética da micela é v_{eM}, enquanto que sua velocidade aparente final é V_M e v_i ($=v_{ap}$) é a velocidade aparente do soluto.

A MEKC pode ser usada tanto para a separação de compostos neutros como para compostos iônicos ou ionizáveis. A combinação da proporção carga/massa, hidrofobicidade e interações de carga na superfície micelar combinam para afetar a separação dos analitos.[72]

Vários fatores afetam a seletividade em MEKC: o tensoativo usado, pH, temperatura e adição de solvente orgânico ou outros aditivos. O problema do aquecimento Joule encontrado com tensoativos iônicos é evitado quando se faz uso de tensoativo não iônico, o qual pode ser adicionado em altas concentrações e utilizada alta tensão. Adicionando-se solvente orgânico em sistema MEKC leva à extensão da janela de eluição, a adição de solvente orgânico ao tampão também aumenta a solubilidade de compostos hidrofóbicos no tampão aquoso. A mudança do EOF com a adição de solvente orgânico é devida à mudança da viscosidade do tampão ou do potencial zeta da parede de sílica.[73]

A Figura 8 ilustra um eletroferograma de uma análise realizada em MEKC.

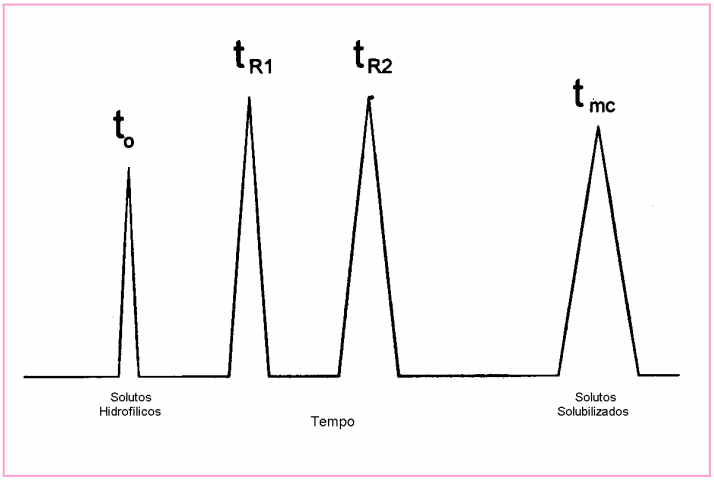

Figura 8 – Representação de um eletroferograma de uma análise realizada em MEKC, sob fluxo eletrosmótico normal e micelas aniônicas. t_0 = tempo do fluxo, t_{R1} = tempo do composto R1, t_{R2} = tempo do composto R2, t_{mc} = tempo da micela.

A adição de surfactante neutro como Polioxiletileno-23-lauril-éter, mais conhecido como Brij-35, à solução com micelas carregadas resultam na formação de micelas mistas, a densidade de cargas das micelas mista

seria menor que sem Brij-35, como conseqüência, a mobilidade eletroforética das micelas mistas diminuem o qual resultam na diminuição do tempo da micela (t_{mc}), portanto a janela de separação se torna menor.[74]

O efeito da adição de solvente orgânico, como metanol e acetonitrila acima de 20% muda o coeficiente de partição do soluto entre a micela e o líquido ao redor, foi sugerido que a mudança pode parcialmente ser atribuído à redução do tamanho das micelas e da densidade de carga da superfície na interface micela-líquido com o aumento da quantidade de solvente. A adição de solvente reduz o EOF e, portanto, estende a janela de separação.

1.5.8 - Eletroforese Capilar de Extratos Vegetais e Produtos Naturais

As vantagens da CE para preparações botânicas e herbais são:

1 – alta seletividade e habilidade de analisar compostos em matrizes complexas, sem passo adicional de preparação de amostra,

2 – significante redução ou completa eliminação de solvente orgânico do eletrólito ou tampão de corrida,

3 – boa faixa linear,

4 – fácil automação,

5 – velocidade de análise.[52]

A aplicação da eletroforese em produtos naturais[75,76] e mais especificamente a análise de metabólitos secundários[77,78] foi revista cobrindo o período de 1992 a 2002.

1.6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 - YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B., *Plantas Medicinais Sob a Ótica da Química Medicinal Moderna*, Santa Catarina, Argos Editora Universitária, 2001.

2 - GRIEVSON, M.; BARBER, J. E; HUNTING A.L.L., *Natural Ingredients in Cosmetics, Based on symposium organized by the Society of Cosmetics Scientists*, texto de Keith Helliwell, Inglaterra, Micelle Press, 21-31, 2001.

3 - BARREIRO, E.J., *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola – Química de Fármacos*, v.3, p.4-9, 2001.

4 - MENEGATTI, R.; FRAGA, C.A.M.; BARREIRO, E.J., *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola – Química de Fármacos*, v.3, p.16-22, 2001.

5 - ALVES, H.M., *Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola – Química de Fármacos*, v.3, p.10-15, 2001.

6 - SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMAN, G.; DE MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*, 5.ed., Porto Alegre / Florianópolis, editora da UFSC/ UFRGS, 2003.

7 - MANN, J., *Chemical Aspects of Biosynthesis*, Nova York, Oxford University Press, 1994.

8 - NYIREDY, S., *J. Chromatogr. B*, v.812, p.35-51, 2004.

9 - MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S., *Quim. Nova*, v.24, n.1, p. 105-111, 2001.

10 - MARCHESE, J.A.; BROETTO, F.; MING, L.C., *Hortic. bras.*, v.22, n.2, p.332-335, 2004.

11 - PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A., *Quim. Nova*, v.25, n.1, p.45-61, 2002.

12 - FERREIRA, S.H.; BARATA, L.E.S.; SALLES, S.M.L.; QUEIRÓS, S.R.R.; NETO, N.E.H.; CORAZZA, R., FARIAS, R.C., *Medicamentos a Partir de Plantas Medicinais do Brasil*, Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro,1998.

13 - Deutsches Arzneibuch 10.ed., (1991), 1 Supplement (1992), 2 Supplement (1993).

14 - BRANDÃO, M.G.L.; FREIRE, N.; VIANNA-SOARES C.D., *Cad. Saúde Pública*, v.14, n.3, p.613-616, 1998.

15 - FARIAS, M.R.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M.; PETROVICK, P.R., *Cad. Farm*. v.1, n.2, p.73-82, 1985.

16 - BABY, A.R.; SALGADO-SANTOS, I.M.N.; DIAS, T.C.S., KANEKO, T.M.; CONSIGLIERI, V.O.; VELASCO, V.R., *Cosmet. Toil.* (Edição em português), v.15, p.80-82, 2003.

17 - www.anvisa.gov.br, acessado em janeiro / 2006.

18 - Resolução RDC 17, de 24 de fevereiro de 2000.

19 - www.herbarium.com.br, acessado em novembro / 2005.

20 - www.icepa.rct-sc.br, acessado em novembro / 2005.

21 - RODRIGUES, G., *Phytociência*, v.1, n.1, 2004.

22 - www.ache.com.br, acessado em junho / 2005.

23 - STARMANS D.A.J.; NIJHUIS H.H., *J. Trends Food Sci. Technol.*, v.7, n.6 p.191-197, 1996.

24 - SMITH, R.M., *J. Chromatogr. A,* v.1000, p.3-27, 2003.

25 - DAWIDOWICZ, A.L.; WIANOWSKA, D. K. P., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004.

26 - FONSECA, F.N., *Técnicas Modernas de Separação e Análise de Extratos Vegetais*, São Paulo, 2002, Tese de doutorado, Instituto de Química de São Paulo – Universidade de São Paulo.

27 - LIST, P.H.; SCHMIDT P.C., *Phytopharmaceutical Technology*, CRC Press, 1989.

28 - United States Pharmacopoeia 26.ed. Rockville, United States Pharmacopeial Convention, 2003.

29 - PANIWNYK, L.; BEAUFOY, E.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J., *Ultrason. Sonochem.*, v.8, p.299-301, 2001.

30 - LUQUE-GARCIA, J.L.; LUQUE DE CASTRO, M.D., *Trends Anal. Chem.*, v.22, n.1, p.41-47, 2003.

31 - VINATORU, M., *Ultrason. Sonochem.*, v.8, p.301-313, 2001.

32 - VINATORU, M.; TOMA, M.; RADU, O.; FILIP, P.I.; LAZUREA, D.; MASON, T.J., *Ultrason. Sonochem.*, v.4, p.135-139, 1997.

33 - PANCHEV, J.N.; KIRTCHEV, N.A.; KRATCHANOV, C.G., *Int. J. Food Sci. Technol.*, v.23, p.337, 1988.

34 - ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNYK, L.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J., *Ultrason. Sonochem.* v.11, p. 261-265, 2004.

35 - VILA, D.H.; MIRA, F.J.H.; LUCENA, R.B.; RECAMALES, M.A.F., *Talanta,* v.50, p.413-421, 1999.

36 - KIMBARIS, A.C.; SIATIS, N.G.; DAFERERA, D.J.; TARANTILIS, P.A.; PAPPAS, C.S.; POLISSIOU, M.G., *Ultrason. Sonochem.* (2005).

37 - LI, H.; CHEN, B.; YAO, S., *Ultrason. Sonochem.* v.12, p.295-300, 2005.

38 - VALACHOVIC, P.; PECHOVA, A.; MASON, T.J., *Ultrason. Sonochem.,* v.8 p.111-117, 2001.

39 - LIU, H.; PORDESIMO, L.; WEISS, *J. Food Res. Inter.,* v. 37 p.731-738, 2004.

40 - BARKER S.A., *J. Chromatogr. A*, v.885, p.115-127, 2000.

41 - BARKER S.A., *J. Chromatogr. A*, v.880, p.63-68, 2000.

42 - KARASOVÁ, G.; LEHOTAY, J., *J. Liq Chromatogr. Relat. Technol.*, v.27, n.18, p.2837-2845, 2004.

43 - XIAO, H.B.; KRUCKER, M.; ALBERT, K.; LIANG, X.M., *J. Chromatogr. A*, v.1032 p.117-124, 2004.

44 - ZIAKOVÁ, A.; BRANDSTETEROVA, E.; BLAHOVA, E., *J. Chromatogr. A*, v.983, p. 271-275, 2003.

45 - CARROLL, K.K., *J. Lipid Res.*, v.2, n.2, p.135-141, 1961.

46 - JAROSZÝNSKA, J*., Anal. Bioanal. Chem.*, v.377, p.702-708, 2003.

47 - ASATOOR, A.; DALGLIESH, C.E., *J. Chem. Soc.*, p.1717-1718, 1958.

48 - SNYDER, L.R.; KIRKLAND,J.J., *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 2.ed., Nova York, Wiley-Interscience Publication, 1979.

49 - MAYO, D.W.; PIKE, R.M.; BUTCHER, S.S.; TRUMPER, P.K., *Microscale Techniques for the Organic Laboratory*, Nova York, John Wiley & Sons, Inc.

50 - STARMANS, D.A.; NIJHUIS, H.H., *J. Trends Sci. Technol.,* v.7, n.6, p.191-197, 1996.

51 - PAWLISZYN, *J. Anal. Chem.*, v.75, p.2543-2558, 2003.

52 - ONG, E.S., *J. Chromatogr. B*, v.812, p.23-33, 2004.

53 - PEDERSEN-BJERGARD, S.; RASMUSSEN. K.E.; HALVORSEN, T.G., *J. Chromatogr. A*, v.902, p.91-105, 2000.

54 - MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA J.r.; V.F., GRYNBERG; N.F., ECHEVARRIA, A., *Quim. Nova*, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

55 - BULDINI, P.L.; RICCI, L.; SHARMA, J.L., *J. Chromatogr. A*, v.975, p.47-70, 2002.

56 - TISELIUS, A., *Trans. Faraday Soc.*; v.33, p.524, 1937.

57 - HJÉRTEN, S., *Chromatogr. Rev.*, v.9, p.122, 1967.

58 - EVERAERTS, F.M.; MIKKERS, F.E.P.; VERHEGGEN, T.P.E.M., *J. Chromatogr.*, v.169, p.11, 1979.

59 - JORGENSON, J.; LUKACS, K.D., *Anal. Chem.*, v.53, p.1298, 1981.

60 - LANDERS, J.P., *Handbook of Capillary Electrophoresis*, 2.ed., Nova York, CRC Press, 1997.

61 - WEINBERGER, R., *Practical Capillary Electrophoresis*, San Diego Academic Press Inc., 1996.

62 - TAVARES, M.F.M.*, Quím. Nova,* v.19, n.2, p.173-181, 1996.

63 - COLOMBARA R.; TAVARES M.F.M.; MASSARO S.; RUBIM, J.C.*, J. Cap. Elec.*, v.003:3, p.147, 1996.

64 - BAUR, L.; GRIEND, C.S.; WATZIG, H., *J. Chromatogr. A*, v.979, p.97-103, 2002.

65 - BAKER, D. R., *Capillary Electrophoresis*, New York, John Wiley & Sons, 1995.

66 - TAVARES, M.F.M., *Quím. Nova,* v.10, p.5, 1997.

67 - PACAKOVA, V.; COUFAL, P.; STULIK, K., *J. Chromatogr. A*, v.834, p. 257-275, 1999.

68 - BILLIET, H.A.H.; ANDERSON, P.E.; HADDAD, P.R., *Electrophoresis*, v.17, p.1367-1372, 1996.

69 - QUANG, C.; KHALEDI, M., *J. Chromatogr. A*, v.659, p. 459-466, 1994.

70 - SARMINI, K.; KENNDLER, E., *J. Chromatogr. A*, v.792, p.3-11, 1997.

71 - TERABE, S.; OTSUKA, K.; ANDO. T., *Anal. Chem.* v.57, p.834-841, 1984.

72 - TERABE, S.; MATSUBARA, N.; ISHIHAMA, Y.; OKADA, Y., *J. Chromatogr.* v.608, p.23, 1992.

73 - RIEKKOLA, M.L.; WIEDMER, S.K.; VALKO, I.E.; SIREN, H., *J. Chromatogr. A,* v.792, p.13-35, 1997.

74 - ERIM, F.B.; XU, X.; KRAAK, J.C., *J. Chromatogr. A*, v.694, p. 471-479, 1995.

75 - ISSAQ, H.J., *Electrophoresis*, v.20, p.3190-3202, 1999.

76 - ISAAQ, H.J., *Electrophoresis,* v.18, p.2438-2452, 1997.

77 - TOMÁS-BARBERÁN, F.A., *Phytochem. Anal.*, v.6, p.177-192, 1995.

78 - SUNTORNSUK, L., *J Pharm. Biom. Anal.*, v.27, p.679-698, 2002.