



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
LABORATÓRIO DE ELETROFORESE CAPILAR  
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BACHARELADO EM QUÍMICA

**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA  
DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS VEGETAIS E COSMÉTICOS**

Michelle Barcellos

Orientador: Prof. Gustavo Amadeu Micke

Florianópolis  
Novembro, 2008

MICHELLE BARCELLOS

**OTIMIZAÇÃO DA SEPARAÇÃO ELETROFORÉTICA  
DE FLAVONÓIDES EM EXTRATOS VEGETAIS E COSMÉTICOS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao  
Curso de Graduação em Química da Universidade  
Federal de Santa Catarina, como requisito parcial à  
obtenção do título de Bacharel em Química.

Florianópolis

2008

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Catarina;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Amadeu Micke, pela oportunidade oferecida e por todo incentivo e confiança no presente trabalho;

Aos professores da banca examinadora;

Aos professores e demais funcionários do Departamento de Química da UFSC, pela convivência estabelecida nestes anos;

À empresa Farmaservice Bioextract Ltda., pelo acompanhamento nas pesquisas e fornecimento de amostras;

Ao Professor Doutor Moacir Geraldo Pizzolatti pelo fornecimento dos padrões;

À Ana Carolina pelo convívio e pelas melhorias propostas ao trabalho;

Aos amigos do laboratório, Mel, Marcel e Kaline, por toda ajuda prestada e por tornarem esta experiência muito mais interessante;

Aos meus pais, Nando e Rô, que foram o alicerce para a construção dos meus sonhos, sempre com muito amor, força e caráter. Amo vocês!;

Ao meu irmão Gui, pela amizade, alegria e amor que nos une;

Ao meu namorado Marcio, por todo apoio, amor e carinho durante esta etapa da minha vida, e por me ensinar a ter segurança, confiança e perseverança;

Às minhas avós, Kathy e Marlene, por fazer de meus sonhos, os seus sonhos;

Às minhas madrinhas, Irene e Déia, que me apoiaram e me encheram de boas energias para prosseguir com beleza esta caminhada;

À toda minha família que sempre unida me ensinou muito sobre convivência, responsabilidade, harmonia e muita felicidade. Que venham as comemorações!

À Marcia que cuidou da minha espiritualidade e de meus medos, e ao Jorge que sempre me estampou uma boa risada;

Aos meus amigos iônicos, Clari, Patty e Tuim, por toda afinidade, pelas alegrias vividas, ajudas trocadas e torcidas;

Aos meus amigos da vida, Fê, Como, Marcelo, Ogo, Bruna, Dyeson, Lú, Fran, Danielsio, ...que compartilharam esses anos de estudos e expectativas e tornaram esta caminhada muito mais agradável;

Que fique registrado meu mais profundo agradecimento!

**"Não podemos fazer muito sobre a extensão de nossas vidas, mas podemos fazer muito sobre a largura e a profundidade delas."**

Evan Esar

## RESUMO

O presente estudo consiste na elaboração de uma metodologia analítica utilizando eletroforese capilar para determinação de flavonóides em extratos de origem vegetal e produtos cosméticos. Estes biocompostos são metabólitos secundários, ou seja, são compostos utilizados nas funções vitais dos organismos vegetais, estando presentes, de forma combinada, em espécies do reino vegetal com o intuito de proteger o organismo das intempéries e da ação degradativa de outros seres vivos. Dentro do corpo humano os flavonóides atuam em uma série de processos biológicos ligados à produção de radicais livres, isto porque sua estrutura possibilita diminuir a formação destes radicais, o que lhe confere uma ação antioxidante. Para otimização do método de separação e identificação destes compostos, foram promovidos diversos testes para a escolha da composição do eletrólito de corrida. Após os testes preliminares, foram estabelecidas as faixas de Tetraborato de Sódio (TBS) e metanol para a composição do eletrólito, seguido de um planejamento sistemático e tratamentos matemáticos, que nos apresentaram a condição ótima de 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol para a separação dos flavonóides. O método foi então aplicado a extratos vegetais de origem comercial de camomila (*Matricaria chamomilla*), hipérico (*Hypericum perforatum*) e passiflora (*Passiflora incarnata*); extratos vegetais de Tmitu-pinheirinho (*P. Sabulosa*), extratos de folhas e flores de maracujá amarelo (*Passiflora edulis*) e maracujá doce (*Passiflora alata*) e de dois cremes de uso contínuo, contendo extrato de *Passiflora Alata*.

**Palavras chaves:** flavonóides, tetraborato de sódio, eletroforese capilar, extratos vegetais, cosméticos.

## LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1: Estrutura básica dos flavonóides\_\_\_\_\_ 14
- FIGURA 2: Estrutura da miricetina\_\_\_\_\_ 15
- FIGURA 3: Estrutura da quercetina\_\_\_\_\_ 15
- FIGURA 4: Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar\_\_\_\_\_ 18
- FIGURA 5: Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal\_\_\_\_\_ 19
- FIGURA 6: Representação do fluxo eletrosmótico em função do pH\_\_\_\_\_ 20
- FIGURA 7: Representação das condições de análise para ânions\_\_\_\_\_ 20
- FIGURA 8: Estrutura do kaempferol\_\_\_\_\_ 24
- FIGURA 9: Eletroferogramas de diferentes concentrações de TBS. Condições experimentais: eletrólito constituído de 5, 10, 20, 30 e 40 mmolL<sup>-1</sup> de TBS; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_ 24
- FIGURA 10: Eletroferogramas dos diferentes teores de metanol e acetonitrila. Condições experimentais: eletrólito constituído de 30 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e teores de 0 a 40% de metanol e 0 a 40% de acetonitrila; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_ 25
- FIGURA 11: Eletroferogramas comparativo entre 20% de metanol e 20% de acetonitrila. Condições experimentais: eletrólito constituído de 30 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e teores de 20% de metanol e 20% de acetonitrila; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_ 26
- FIGURA 12: Resultados do planejamento sistemático para o grupo A de flavonóides. Condições experimentais: eletrólito constituído conforme descrito nas figuras; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_ 27
- FIGURA 13: Resultados do planejamento sistemático para o grupo B de flavonóides. Condições experimentais: eletrólito constituído conforme descrito nas figuras; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_ 28

- FIGURA 14: Janela de resolução da macro e resultado numérico do planejamento fatorial\_\_\_\_\_29
- FIGURA 15: Resultado gráfico do planejamento fatorial\_\_\_\_\_29
- FIGURA 16: Eletroferograma da mistura de padrões dos flavonóides no método otimizado. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_30
- FIGURA 17: Gráfico de correlação entre as mobilidades dos flavonóides previsto pela Equação 2 e obtido experimentalmente\_\_\_\_\_30
- FIGURA 18: Figura comparativa da separação de flavonóides antes e depois do processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_31
- FIGURA 19: Separação de flavonóides antes e depois do processo de hidrólise para as flores da espécie *P. Sabulosa*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_32
- FIGURA 20: Separação de flavonóides das folhas da espécie *P. Sabulosa*, antes e depois do processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_33
- FIGURA 21: Separação de flavonóides antes e depois do processo de hidrólise para os galhos da espécie *P. Sabulosa*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_33
- FIGURA 22: Comparação dos eletroferogramas para o extrato de camomila antes e após o processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção

hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_34

FIGURA 23: Eletroferogramas comparativos para a análise do extrato de hipérico antes e após o processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_35

FIGURA 24: Comparação dos eletroferogramas antes e após a hidrólise extrato de passiflora. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_35

FIGURA 25: Análise eletroforética das folhas da *P. Edulis*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_36

FIGURA 26: Separação dos flavonóides das flores da espécie *P. Edulis*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_36

FIGURA 27: Análise comparativa da folhas jovens e velhas da espécie *P. Alata*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_37

FIGURA 28: Separação dos compostos presentes nas flores da espécie *P. Alata*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_38

FIGURA 29: Análise comparativa das flores da espécie *P. Alata*. Flores abertas (A), flores fechadas (B), brotos grandes (C) e brotos pequenos (D). Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup>de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_38



FIGURA 30: Análise comparativa dos cremes de uso contínuo, adicionados de extrato de *P. Alata*. Creme dia (A) e creme noite (B). Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm\_\_\_\_\_39

## LISTA DE EQUAÇÕES

EQUAÇÃO 1: Mobilidade efetiva experimental	28
EQUAÇÃO 2: Mobilidade efetiva	29

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1:Correlação dos sinais atribuídos às concentrações das espécies\_\_\_\_26

TABELA 2: Descrição dos experimentos planejados\_\_\_\_\_26

TABELA 3: Divisão dos grupos para os experimentos do planejamento fatorial\_\_\_\_27

## SIGLAS E ABREVIATURAS

TBS – Tetraborato de sódio

UV/VIS – Ultravioleta/visível

ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos

ERMO - Espécies reativas do metabolismo do oxigênio

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CG - Cromatografia Gasosa

EC - Eletroforese Capilar

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CFS - Cromatografia de Fluido Supercrítico

CCCAE - Cromatografia em Contra Corrente de Alta Eficiência

ECZ - Eletroforese Capilar de Zona

FEO – Fluxo eletrosmótico

ECSL – Eletroforese Capilar em Solução Livre

DMSO - Dimetilsulfóxido

$\mu_{ef}$  – Mobilidade efetiva

$L_{det}$  - Comprimento do capilar até o detector

$L_{Tot}$  - Comprimento total do capilar

V - Potencial estabelecido durante a análise

$t_m$  - Tempo de migração do analito

$t_0$  - Tempo de migração do FEO

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
1.1. FLAVONÓIDES	14
1.2. ELETROFORESE CAPILAR	16
1.2.1. Instrumentação	17
1.2.2. Fluxo eletrosmótico	19
1.2.3. Eletroforese capilar de zona	20
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>21</b>
2.1. OBJETIVO GERAL	21
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
<b>3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b>	<b>22</b>
3.1. PREPARO DE PADRÕES	22
3.2. PREPARO DE AMOSTRAS	22
3.3. EQUIPAMENTOS	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>24</b>
4.1. DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO	24
4.2. APLICAÇÃO EM EXTRATOS E PRODUTOS COSMÉTICOS	31
4.2.1. Espécie <i>polygala sabulosa</i>	32
4.2.2. Extratos vegetais comerciais	34
4.2.3. Espécie <i>passiflora edulis</i>	36
4.2.4. Espécie <i>passiflora alata</i>	37
4.2.5. Extratos de cremes de uso contínuo	39
<b>5. CONCLUSÃO</b>	<b>40</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>41</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Os processos de oxidação do corpo humano ocorrem naturalmente durante a respiração. Essas oxidações, no entanto, são multiplicadas pelos poluentes do ar, tabaco, radiação ultravioleta-visível (UV/VIS) e alimentação rica em ácidos graxos poliinsaturados, gerando assim uma série de problemas à pele e ao organismo<sup>1</sup>.

Com o aumento da expectativa de vida do homem, veio também a preocupação em manter uma aparência jovem por mais tempo e com uma menor agressão ao corpo<sup>2</sup>. Isto motivou a indústria de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos a incentivar pesquisas na busca de compostos naturais com bioativos<sup>3</sup>.

Esta mudança serviu não só como atrativo comercial, mas também como contribuição às políticas de não agressão à natureza e às redes sociais envolvidas na fabricação. As vantagens apresentadas por esta mentalidade agradaram tanto à indústria quanto os consumidores. Isto porque os ingredientes naturais são biocompatíveis, agindo sinergicamente sob vários mecanismos, apresentando assim, maior atividade no organismo humano como um todo. Além disso, estes compostos são menos agressivos ao corpo, diminuindo assim as chances de problemas causados por componentes de produtos cosméticos<sup>3, 4</sup>. Todas estas vantagens foram revertidas em lucros para o setor.

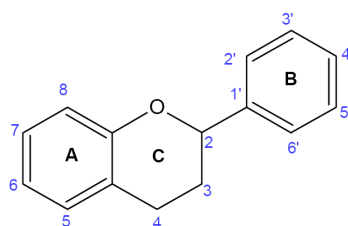
Segundo o levantamento da Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos (ABIHPEC), este setor apresentou um crescimento médio deflacionado de 10,9% nos últimos 12 anos, superando o crescimento tanto do Produto Interno Bruto quanto das demais indústrias<sup>2</sup>.

Este crescimento foi o responsável pela terceira posição do Brasil no ranking Top Ten da Euromonitor, com um faturamento líquido de US\$ 18,2 bilhões em 2006, e um crescimento mundial de 26,2%, o maior apresentado pelo setor. Hoje o Brasil conta com mais de 1590 empresas, sendo 15 delas de grande porte, com faturamento líquido acima dos R\$ 100 milhões<sup>2</sup>.

Este panorama possibilita um maior investimento em pesquisas e desenvolvimento científico no ramo de fitocosméticos, que utilizam os efeitos sinérgicos de vários compostos presentes em espécies vegetais na promoção de ações benéficas à saúde e beleza humana. Dentre os compostos ativos estudados para a incorporação em produtos cosméticos cabe destacar os flavonóides.

## 1.1. FLAVONÓIDES

O grupo dos flavonóides é formado por mais de 4000 compostos naturalmente metabolizados pelo reino vegetal, como resultado da adaptação aos sistemas biótico e abiótico sendo nomeados metabólitos secundários por não serem utilizados nas funções vitais das plantas<sup>5-6</sup>. São compostos de baixo peso molecular e composição polifenólica de estrutura básica C6-C3-C6, formada por dois anéis fenil (A e B) ligados entre si por um anel pirano (C), (Figura 1)<sup>1</sup>.



**Figura 1:** Estrutura básica dos flavonóides

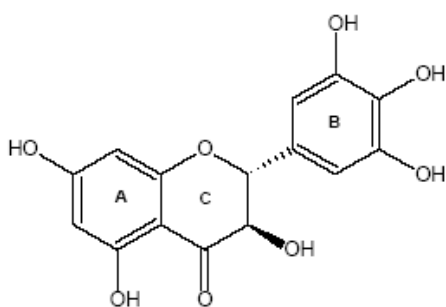
Por ser uma classe de compostos ampla, seus integrantes são divididos em seis principais subclasses: antocianidinas, favanóis, flavanonas, flavonóis, flavonas e isoflavonas<sup>7, 11</sup>. Eles são ainda divididos quanto à existência ou não de açúcares em suas estruturas, sendo chamados de agliconas quando não possuem ligação com moléculas de açúcar e de flavonóides glicosilados ou conjugados quando estão associadas a uma ou mais moléculas de açúcar. Esta ligação pode ocorrer tanto no oxigênio como no carbono. O que ocorre mais comumente é a ligação com o oxigênio nos grupos hidroxila dos carbonos 3 e 7, onde o flavonóide é chamado O-glicosídeo. Já para as associações com o carbono, o flavonóide é identificado como um C-glicosídeo com a ligação nos carbonos 6 e 8<sup>6</sup>.

Os flavonóides foram descobertos em 1930, pelo prêmio Nobel Szent-György, com a extração da citrina da casca do limão. Por apresentar propriedades semelhantes à vitamina C, esta classe foi inicialmente chamada de vitamina C<sub>2</sub>, o que mudou em 1950 pela não caracterização como vitamina<sup>1</sup>. Algumas destas propriedades farmacológicas e bioquímicas no corpo humano são: atividades antiinflamatórias, protetoras cardíacas, analgésicas, antialérgicas, anticancerígenas, antidiabéticas e antiviral. Em geral estas atividades estão diretamente ligadas ao poder antioxidante e à estrutura dos flavonóides<sup>5-7</sup>.

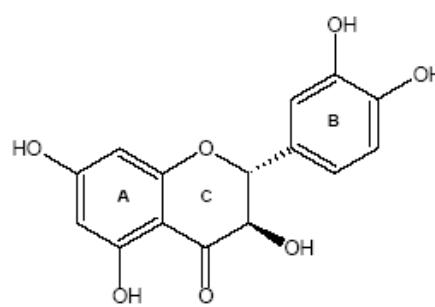
Durante a produção de energia, nosso organismo reage com oxigênio molecular que forma espécies reativas do metabolismo do oxigênio (ERMO) através de reações catalíticas, como a reação de Fenton que é a mais difundida por ser catalisada pelo ferro, metal mais abundante no organismo humano<sup>1, 9</sup>. Dentre as espécies formadas, o radical hidroxila, OH<sup>\*</sup>, é o mais efetivo na formação de lesões nas moléculas celulares, como as paredes lipídicas e as estruturas do DNA<sup>10</sup>.

Diante disto, ao longo da evolução, as células vegetais desenvolveram mecanismos de defesa antioxidantes, como os exercidos pelos flavonóides. Dentre os mecanismos podemos destacar a quelação do metal de transição, catalisador das reações de formação das ERMO<sup>10</sup> e a interceptação e neutralização das cargas pela doação de H ionizáveis. Além disso, a presença de uma dupla ligação com oxigênio em C<sub>4</sub> e de grupos hidroxila no anel B e nas posições C<sub>3</sub> e C<sub>5</sub> aumentam a delocalização eletrônica por toda molécula<sup>1</sup>.

Com base nos mecanismos de defesa que estes compostos apresentam, podemos dizer que eles são considerados antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E<sup>1, 8-9</sup>, sendo a miricetina (Figura 2) e a quercetina (Figura 3) suas duas moléculas mais bioativas<sup>1</sup>.



**Figura 2:** Estrutura da miricetina



**Figura 3:** Estrutura da quercetina

Tais propriedades atribuídas aos flavonóides e sua aplicabilidade em indústrias farmacêuticas e cosméticas mostram a necessidade de identificação, caracterização e quantificação dos constituintes presentes nas misturas complexas existentes em matrizes vegetais. A confirmação é dada pela literatura, que mostra mais de 300 artigos escritos entre os anos de 2000 e 2005 para fins medicinais ou de classificação científica<sup>6</sup>. A análise destes compostos pode ser feita para as agliconas e para os flavonóides glicosilados, porém na falta de padrões que identifiquem estes últimos, podemos comparar as análises antes e depois do



processo de hidrólise, onde todos os conjugados são convertidos à agliconas, e a quantificação de ambos os tipos de flavonóides torna-se possível<sup>6</sup>.

Como descrito nos artigos de revisão de Rijke e Molnár-Perl, os flavonóides podem ser separados por diferentes técnicas analíticas, tais como: a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)<sup>12-19,29</sup>, a cromatografia gasosa (CG)<sup>16,20-22</sup>, a eletroforese capilar (EC)<sup>23-30</sup>, a cromatografia em camada delgada (CCD)<sup>6</sup>, além de outras menos usuais como a cromatografia de fluido supercrítico (CFS) e a cromatografia em contra corrente de alta eficiência (CCCAE)<sup>31</sup>, associados a um ou mais métodos de detecção acoplados aos equipamentos para identificação apropriada das moléculas analisadas, sendo assim possível a análise de plantas, alimentos e fluídos biológicos<sup>6,11</sup>.

Levando em consideração alguns aspectos da eletroforese capilar para análises de diferentes matrizes, tais como a alta eficiência e resolução, esta técnica apresenta-se como uma ferramenta atrativa para o desenvolvimento de métodos de análise de flavonóides em matrizes complexas<sup>30</sup>.

## 1.2. ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é uma técnica de separação e identificação relativamente nova, fundamentada na migração diferenciada de espécies neutras, iônicas ou ionizáveis, em uma solução tampão, quando há aplicação de um campo elétrico<sup>32</sup>.

Desenvolvida por Arne Tiselius na década de 30, em um estudo inédito sobre separação das proteínas do soro sanguíneo, a nova técnica rendeu ao químico sueco o Prêmio Nobel no ano de 1948, além de incentivar a criação de diferentes métodos de separação para ânions, cátions, aminoácidos, drogas, vitaminas, carboidratos, proteínas, peptídeos, entre outros. A criação da técnica gerou interesse para a indústria de biotecnologia em um projeto de larga escala que utilizou a eletroforese como ferramenta no sequenciamento do DNA no Projeto Genoma Humano<sup>32</sup>.

A eletroforese no formato capilar realizada em tubos com dimensões capilares, foi uma solução hábil para conter o efeito Joule, pois devido a fatores geométricos (área superficial interna grande comparada com o volume total do capilar), ocorre uma dissipação de calor bastante eficiente, favorecendo a aplicação de campos

elétricos elevados (100 – 500 V/cm), que resultam em separações de alta eficiência (da ordem de  $10^5$  pratos teóricos)<sup>33,34</sup>.

O primeiro a adotar a idéia foi Hjérten em 1967 com o emprego de um tubo de quartzo de 300 µm de diâmetro e aplicação de 75 V/cm<sup>33,34</sup>. Mais tarde Jorgenson e colaboradores investigaram a viabilidade da EC ser utilizada como uma técnica analítica instrumental ganhando, após sua completa automatização, o status de técnica analítica de rotina<sup>33</sup>.

A apresentação de boas resoluções nas análises e a grande versatilidade da técnica (separação de moléculas orgânicas, inorgânicas, macromoléculas, etc.), foram os principais fatores de credibilidade durante sua criação. Além disso, a técnica se destaca pelo baixo consumo de amostras, reagentes e solventes (da ordem de nanolitros), a completa automação da análise, além da compatibilidade com sistemas de detecção utilizados para a cromatografia, que proporcionam um aumento da sensibilidade e reprodutibilidade da técnica<sup>32-35</sup>.

No que diz respeito à análise de fitoquímicos, o modo de separação eletroforético mais utilizado é a eletroforese capilar de zona (ECZ)<sup>4, 37</sup>, que apresenta tempos de análise reduzidos, de grande importância para análises rotineiras em indústrias de produtos cosméticos e fitomedicamentos<sup>4, 34-37</sup>.

### 1.2.1. Instrumentação

Uma das características favoráveis da eletroforese capilar é a sua simplicidade instrumental (Figura 4). Um equipamento de eletroforese capilar é composto basicamente de uma fonte de alta tensão, dois eletrodos, um capilar e um detector. Além destes, existem ainda o cartucho que comporta o capilar, os recipientes de solução e seu compartimento para armazenamento, e os sistemas de controle de injeção e temperatura.



**Figura 4:** Representação esquemática de um equipamento de eletroforese capilar.

A fonte de alta tensão pode funcionar em voltagem e/ou corrente constante, gerando potenciais de até 30 kV e correntes de até 100  $\mu$ A. Ligados à fonte estão os dois eletrodos, em geral de platina, que criam a diferença de potencial para o estabelecimento da eletromigração<sup>33, 38</sup>.

O capilar onde ocorrerá a separação dos analitos pode ser feito de vidro, teflon ou sílica, sendo protegido por um cartucho plástico, com as extremidades próximas aos eletrodos. Seu diâmetro interno varia entre 10 e 300  $\mu$ m, com comprimentos entre 32 a 100 cm que se estendem até os recipientes que contém o eletrólito de corrida ou da amostra. Os capilares de sílica fundida com revestimento externo de poliimida possuem boa resistência mecânica, além de possibilitarem a retirada do revestimento externo próximo a uma das extremidades do capilar, formando assim uma janela transparente que permite ao detector a visualização da passagem dos analitos<sup>32-33,38-39</sup>.

Ao se iniciar uma corrida eletroforética, é preciso primeiramente condicionar o capilar. Após isto, o eletrólito de corrida é introduzido no capilar por pressão, preenchendo toda sua extensão. Na seqüência a amostra é introduzida pelo mesmo sistema, porém com uma pressão menor e com um volume dependente do tempo de injeção, da pressão aplicada, das dimensões do capilar e da viscosidade da solução. Suas extremidades são então introduzidas nos recipientes do eletrólito, onde é aplicada uma diferença de potencial que faz com que as moléculas migrem em direção à janela de detecção<sup>32-33</sup>.

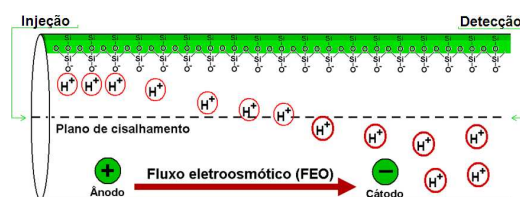
Dentre os modos de detecção mais empregados em EC, destaca-se o espectrofotométrico no UV/VIS por englobar uma série de substâncias e por

possibilitar o acoplamento de um multiplicador de sinais do tipo arranjo de diodos, que gera um espectro para cada substância detectada<sup>39</sup>.

### 1.2.2. Fluxo eletrosmótico

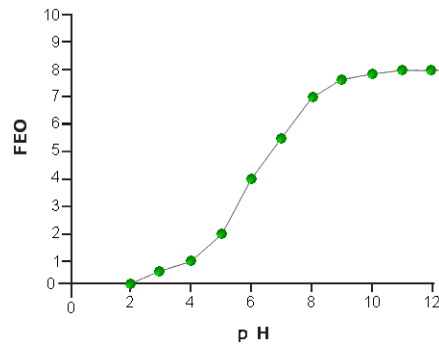
Capilares de sílica fundida são extensivamente utilizados em eletroforese capilar por apresentarem boa condutividade térmica e transparência no UV. Um fenômeno muito importante que ocorre durante a execução da técnica é o fluxo eletrosmótico (FEO). Ele ocorre devido a presença de grupos silanóis na parede interna do capilar (Figura 5) que apresentam um caráter ácido, e se ionizam quando em contato com soluções com pH superior a 3. Com isto, a parede interna do capilar torna-se carregada negativamente, gerando o potencial zeta<sup>32-33,38-39</sup>.

Os íons  $H^+$  provenientes da parede do capilar são solvatados por moléculas de água e migram para o seio da solução. A partir de uma determinada distância da parede, chamada de plano de cisalhamento, essas moléculas de água não sofrem mais atração pela parede do capilar, e migram, em direção ao eletrodo de carga oposta, quando submetidas à um campo elétrico, gerando assim, um fluxo com um perfil plano por toda solução, denominado fluxo eletrosmótico. Por convenção, o fluxo que migra do ânodo para o cátodo é chamado de fluxo eletrosmótico normal<sup>32-33,38-39</sup>.



**Figura 5:** Representação esquemática do fluxo eletrosmótico normal.

Este fluxo é responsável pelo transporte diferenciado de todas as espécies presentes na amostra até o detector. No entanto como depende do grau de ionização da parede do capilar, o eletrólito utilizado deve ser tamponado para que não haja variações da velocidade dos analitos estabelecida durante uma análise. Uma solução tampão de baixo pH gera um FEO bastante lento (Figura 6), pois os grupos silanóis ainda estão protonados, já em pH alto, o grau de ionização é maior, e, portanto o fluxo é mais rápido<sup>32-33,39</sup>.



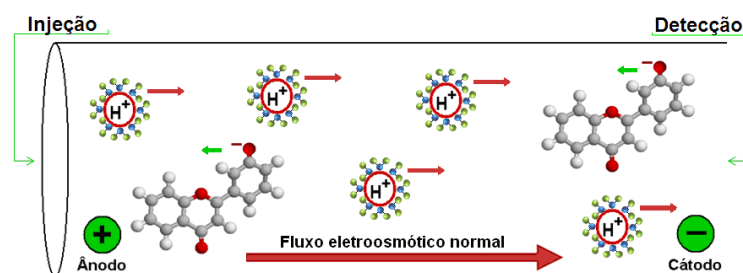
**Figura 6:** Representação da variação do fluxo eletrosmótico em função do pH.

### 1.2.3. Eletroforese Capilar de Zona

A eletroforese capilar possui vários modos de análise que envolve separações com aplicação de campo elétrico em um capilar preenchido de solução tampão, sendo o modo mais comumente usado a eletroforese capilar de zona ou eletroforese capilar em solução livre (ECSL) como também é conhecida<sup>39</sup>.

Este modo eletroforético se baseia nas diferenças de velocidade de migração que os analitos apresentam frente à solução tampão, ou seja, nas diferentes mobilidades eletroforéticas, definidas pela razão volume/carga em um determinado pH. Além disso, o eletrólito utilizado na separação pode estar acrescido de aditivos, alterando as mobilidades eletroforéticas dos analitos, modificando o fluxo eletrosmótico, solubilizando compostos presentes na amostra ou ainda reduzindo a interação de algumas espécies com a parede do capilar, e melhorando assim a separação dos analitos<sup>38-39</sup>.

Para a análise de ânions grandes e lentos, a separação pode ser efetuada sob aplicação de voltagem positiva e fluxo eletrosmótico normal, alto o suficiente para arrastar os analitos em direção a janela de detecção (Figura 7)<sup>34</sup>.



**Figura 7:** Representação das condições de análise para ânions.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para a separação e identificação de flavonóides e aplicação em extratos vegetais e produtos cosméticos.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimização da composição do eletrólito de corrida através da utilização de métodos numéricos;
- Utilização de softwares de simulação de eletroforese capilar para a otimização da separação;
- Aplicação do método otimizado em extratos vegetais e produtos cosméticos.

### 3. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Todas as soluções foram preparadas com água desionizada (desionizador Mili-Q, Milipore, Bedford, Ma, E.U.A.).

#### 3.1. PREPARO DOS PADRÕES

Os padrões dos flavonóides apigenina, miricetina, quercetina e rutina, das cumarinas escopoletina e umberliferona e do resveratrol foram adquiridos da empresa Sigma Aldrich (São Paulo, SP, Brasil). Os padrões de flavonóides apiina, aromadendrin, eriodectiol, fustin, galangina, hispidulina, isoquercetrina, kaempferol, luteolina-7-oglu, naringerina, naringina, taxifolina, taxifolina-3-ac. e vitexina foram isolados pelo grupo de trabalho do Professor Doutor Moacir Geraldo Pizzolatti através de cromatografia líquida, utilizando coluna de sílica, com caracterização via RMN de hidrogênio e carbono. Todos os padrões de flavonóides foram preparados com metanol:água (90:10, v/v) (Cinética) em soluções padrões de 1000 mg L<sup>-1</sup>. Foi feita então, a mistura de padrões com concentração de 30 mg L<sup>-1</sup> por flavonóide.

Para a hidrólise foram adicionados 20 µL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> à 100 µL da mistura dos padrões. A mistura foi aquecida a 95°C, por uma hora, secas com nitrogênio e ressuspensas em 200 µL de etanol:água (75:25, v/v) (Nuclear, São Paulo).

#### 3.2. PREPARO DE AMOSTRAS

As amostras de extratos vegetais hidroalcoólicos de camomila, hipérico e passiflora foram cedidas pela empresa Farmaservice Bioextract Ltda (São Paulo, SP, Brasil), e diluídas na proporção 1:3 (v/v) com água desionizada.

As amostras dos extratos das flores, folhas e galho da *Polygala Sabulosa* foram cedidas pelo grupo de trabalho do Professor Doutor Moacir Geraldo Pizzolatti, e foram diluídas na proporção 1:3 (v/v) com água desionizada.

A hidrólise dos extratos vegetais de camomila, hipérico, passiflora e *Polygala Sabulosa* foi realizada com a adição de 20 µL de HCl 6 mol L<sup>-1</sup> à 100 µL do extrato das plantas. A mistura foi aquecida a 95°C, por uma hora, secas com nitrogênio e ressuspensas em 200 µL de etanol:água (75:25, v/v) (Nuclear, São Paulo).

As amostras de folhas e flores de *Passiflora Alata* e *Passiflora Edulis* foram adquiridas em diferentes localidades da ilha de Florianópolis/SC. As folhas das espécies foram secas em estufa elétrica (DeLeo) a 70°C, maceradas, extraídas durante 1 hora em solução contendo etanol hidratado:água (90:10, m/m), submetidas a agitação, centrifugadas a 4000 rpm (centrífuga CentriBio) e o sobrenadante foi diluído na proporção 1:1 (v/v) com solução de etanol hidratado:água (50:50, v/v). As flores foram trituradas com solução de etanol hidratado:água (80:20, m/m), extraídas durante 1 hora sob agitação, centrifugadas a 4000 rpm (centrífuga CentriBio) e o sobrenadante foi diluído na proporção 1:1 (v/v) com solução de etanol hidratado:água (50:50, v/v).

As amostras de cremes de uso diário foram adquiridas em comércio local. Seu preparo consistiu em uma diluição na proporção 1:3 (m/m) em solução de etanol:água (75:25, v/v) (Nuclear, São Paulo), agitado em vórtex (QL-901) e centrifugado por 20 minutos (centrífuga MiniStar). O sobrenadante foi então diluído em água desionizada 1:1 (v/v) e analisado.

### 3.3. EQUIPAMENTOS

O equipamento de EC utilizado para as análises foi da marca Agilent Technologies modelo HPCE<sup>3D</sup> (Palo Alto, CA, E.U.A.), equipado com detector de arranjo de diodos. As medidas foram efetuadas a uma temperatura de 25 °C em capilar de sílica fundida com revestimento externo de poliimida (45 cm x 50 µm D.I. x 375 µm D.E.) procedente da empresa Polymicro Technologies (Phenix, E.U.A.).

O primeiro condicionamento do capilar foi realizado a 25 °C da seguinte forma: 30 minutos com uma solução de NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>, 30 minutos com água desionizada e 20 minutos com o eletrólito de corrida a ser utilizado na análise. O condicionamento entre as corridas foi de 1 minuto com o eletrólito de corrida.

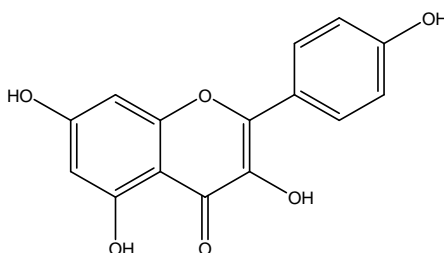
Após o auto zero, as soluções padrões e as amostras são introduzidas pelo *inlet* (extremidade do capilar mais distante do detector) sob injeção hidrodinâmica, com uma pressão positiva de 50 mbar por 3 s. A separação dos analitos foi efetuada sob aplicação uma tensão de 30 kV com polaridade positiva e detecção UV/VIS e monitoramento em 200 nm de comprimento de onda, com a constituição do eletrólito otimizada por planilhas eletrônicas e métodos numéricos utilizando o software Microsoft Excel XP.



## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1. DESENVOLVIMENTO E OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

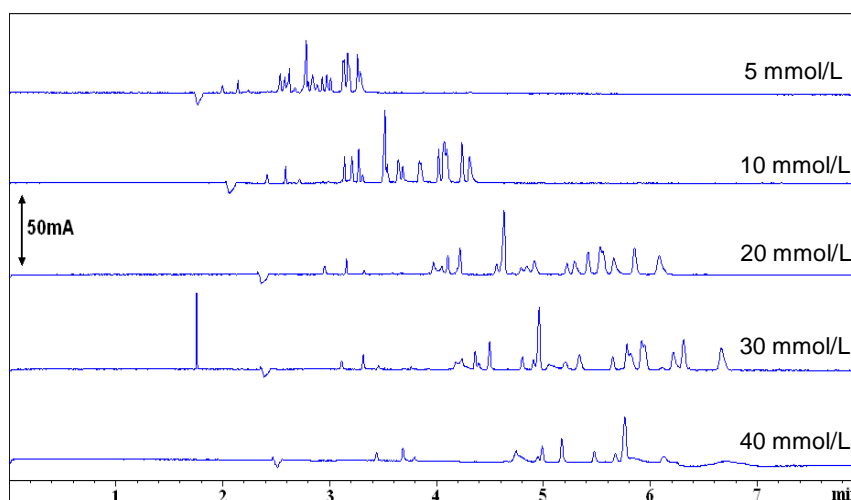
Segundo características dos flavonóides, como demonstrado pela estrutura do kaempferol na Figura 8, estes absorvem luz na região do UV/VIS e possuem pKa superior a 7.



**Figura 8:** Estrutura do Kaempferol

Assim sendo, o TBS apresenta-se como uma boa escolha para compor o eletrólito de corrida, uma vez que em meio aquoso o sal forma um tampão de pH 9,36, gerando um fluxo eletrosmótico com alta mobilidade, responsável por conduzir os analitos aniônicos em direção ao detector. Além disso, o TBS não absorve na região do UV, possibilitando uma análise com detecção direta.

Foram testadas as concentrações de 5 a 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS para a separação da mistura de padrões de 21 compostos (Figura 9).

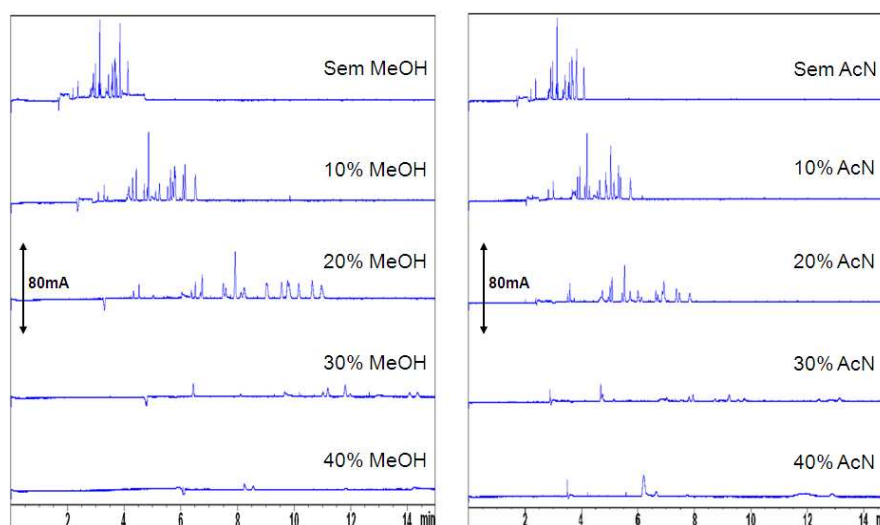


**Figura 9:** Eletroferogramas de diferentes concentrações de TBS. Condições experimentais: eletrólito constituído de 5, 10, 20, 30 e 40 mmolL<sup>-1</sup> de TBS; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3 s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

É possível observar que na concentração de 5 mmol L<sup>-1</sup> a velocidade de migração dos analitos é alta, gerando uma baixa resolução. Com 40 mmol L<sup>-1</sup> de TBS, ocorre uma redução significativa da velocidade de análise, o que aumenta significativamente o tempo de análise e gera deformação das bandas dos analitos. Sendo assim, a faixa de concentrações de TBS de 10 a 30 mmolL<sup>-1</sup> apresentou melhores resoluções.

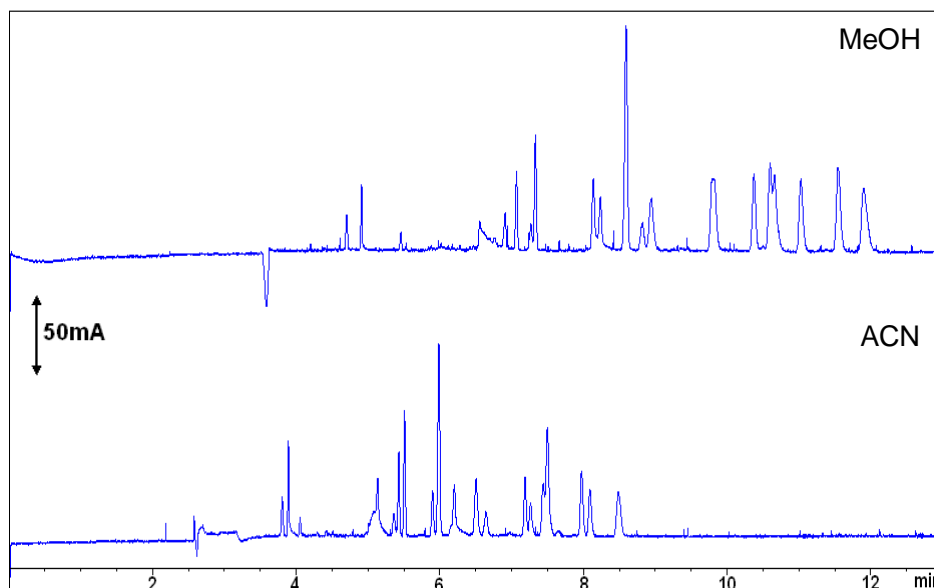
Um parâmetro válido para modificação da mobilidade do fluxo eletrosmótico, e por conseqüência, da mobilidade dos analitos, é a utilização de modificadores orgânicos. Dentre as possibilidades, o metanol e a acetonitrila foram testados devido sua solubilidade em água.

Foram avaliadas porcentagens de 0 a 40% de metanol e acetonitrila (separadamente) para a separação da mistura de padrões de 18 flavonóides, duas cumarinas e um estilbeno, com eletrólito fixado em 30 mmolL<sup>-1</sup> de TBS (Figura 10).



**Figura 10:** Eletroferogramas dos diferentes teores de metanol e acetonitrila. Condições experimentais: eletrólito constituído de 30 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e teores de 0 a 40% de metanol e 0 a 40% de acetonitrila; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

O metanol apresentou-se como um modificador mais efetivo que a acetonitrila na separação dos compostos de interesse, como mostra a Figura comparativa 11, já que o mesmo reduz o fluxo eletrosmótico e melhora a separação dos analitos. A faixa de porcentagem de metanol satisfatória ficou entre 10 e 30%.



**Figura 11:** Eletroferogramas comparativo entre 20% de metanol e 20% de acetonitrila. Condições experimentais: eletrólito constituído de  $30 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e teores de 20% de metanol e 20% de acetonitrila; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Depois de serem determinadas as variáveis, a otimização da composição do eletrólito foi realizada através de um planejamento fatorial, como mostrado nas Tabelas 1 e 2. O objetivo do planejamento fatorial foi estudar a concentração de TBS e metanol favorável à separação dos analitos.

**Tabela 1:** Correlação dos sinais atribuídos às concentrações das espécies.

Sinal	[TBS]	% MeOH
-	15	10
0	20	20
+	25	30

**Tabela 2:** Descrição dos experimentos planejados.

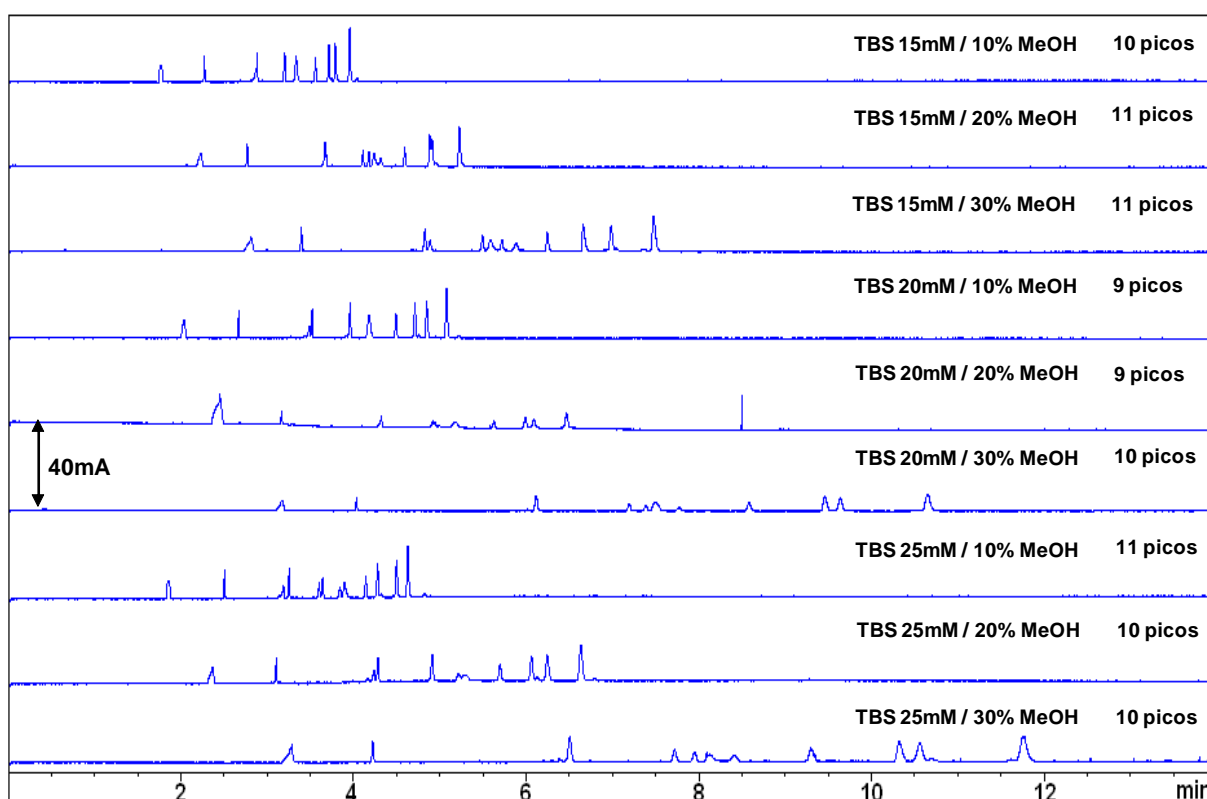
Experimento	[TBS]	% MeOH
1	-	-
2	-	0
3	-	+
4	0	-
5	0	0
6	0	+
7	+	-
8	+	0
9	+	+

Para facilitar a identificação de cada analito em cada condição de análises do planejamento, os 21 padrões de flavonóides, cumarinas e estilbeno foram divididos em dois grupos, como mostra a Tabela 3.

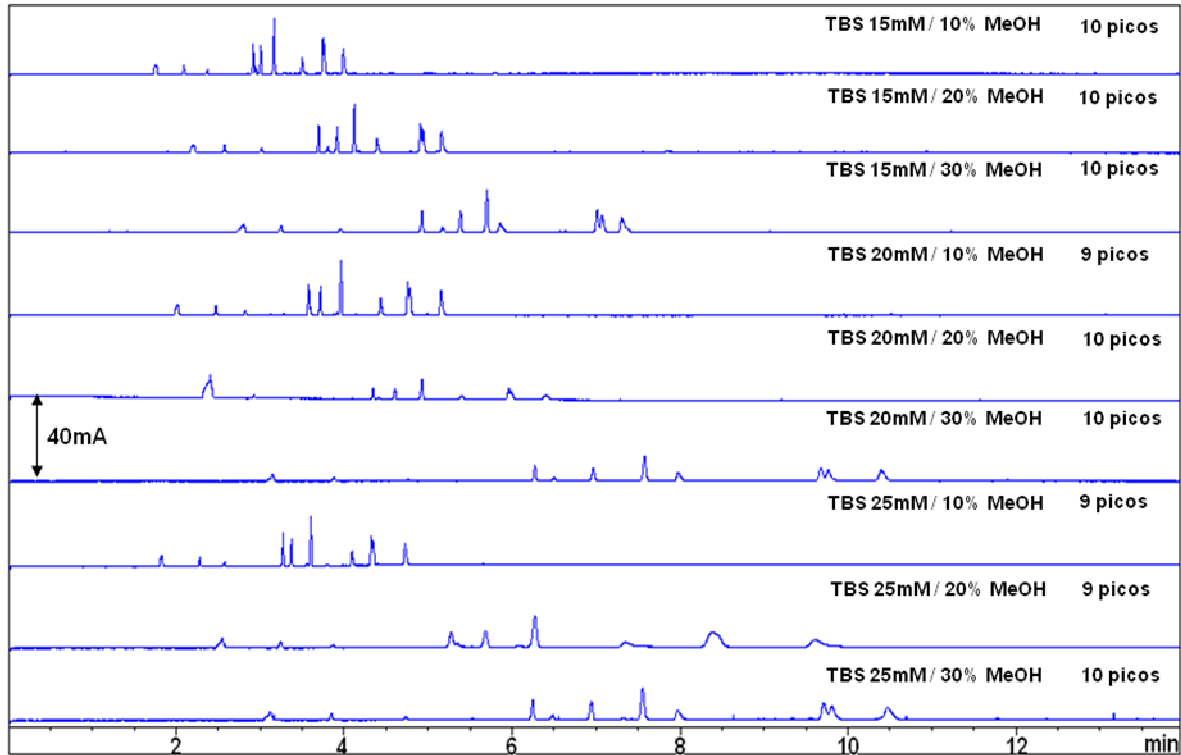
**Tabela 3:** Divisão dos grupos para os experimentos do planejamento fatorial.

<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
Apigenina	Escopoletina
Apiina	Fustin
Aromadendrin	Kaempferol
Eriodectiol	Luteolina-7-oglu
Galangina	Naringerina
Hispidulina	Naringina
Isoquercetrina	Quercetina
Miricetina	Rutina
Resveratrol	Taxifolina
Taxifolina-3-ac	Umberliferona
Vitexina	

Em um primeiro momento, a resposta do planejamento foi dada em função do número de picos separados para a mistura dos padrões de cada grupo, conforme as Figuras 12 e 13.



**Figura 12:** Resultados do planejamento sistemático para o grupo A de flavonóides. Condições experimentais: eletrólito constituído conforme descrito nas Tabelas 1 e 2; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.



**Figura 13:** Resultados do planejamento sistemático para o grupo B de flavonóides. Condições experimentais: eletrólito constituído conforme descrito nas Tabelas 1 e 2; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Utilizando-se a Equação 1 foram calculadas as mobilidades efetivas ( $\mu_{ef}$ ) experimentais de cada flavonóide em cada uma das condições testadas, a partir dos tempos de migração de cada flavonóide e do fluxo eletrosmótico, marcado pelo solvente dimetilsulfóxido (DMSO).

$$\mu_{ef} = \frac{L_{det} - L_{Tot}}{V \cdot 60} \cdot \left( \frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_0} \right) \quad (1)$$

Sendo  $L_{det}$  = Comprimento do capilar até o detector;

$L_{Tot}$  = Comprimento total do capilar;

$V$  = Potencial estabelecido durante a análise;

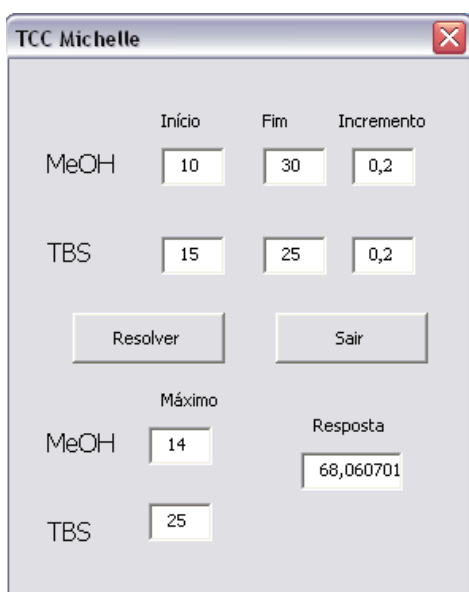
$t_m$  = Tempo de migração do analito;

$t_0$  = Tempo de migração do FEO.

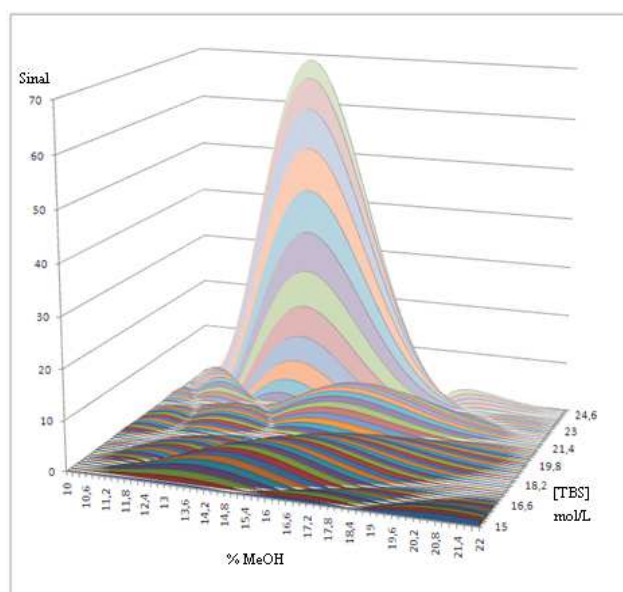
A fim de se calcular a mobilidade dos flavonóides em função de diferentes variáveis, construiu-se a Equação 2, e através de métodos numéricos obtem-se os coeficientes desta equação para cada flavonóide em cada condição experimental. Com isso foi possível determinar a mobilidade efetiva teórica de cada analito dentro dos limites de concentração de TBS e metanol estudados.

$$\mu = b_0 + b_1[TBS] + b_2[MeOH] + b_3[TBS][MeOH] + b_4[TBS]^2 + b_5[MeOH]^2 \quad (2)$$

A partir das mobilidades teóricas e do método de mínimos quadrados, os seis coeficientes da equação foram determinados. Através de uma macro criada no software Microsoft Excel XP (Figuras 15 e 16), foi possível então resolver o sistema matemático e prever a melhor condição do eletrólito para efetuar a separação dos analitos.

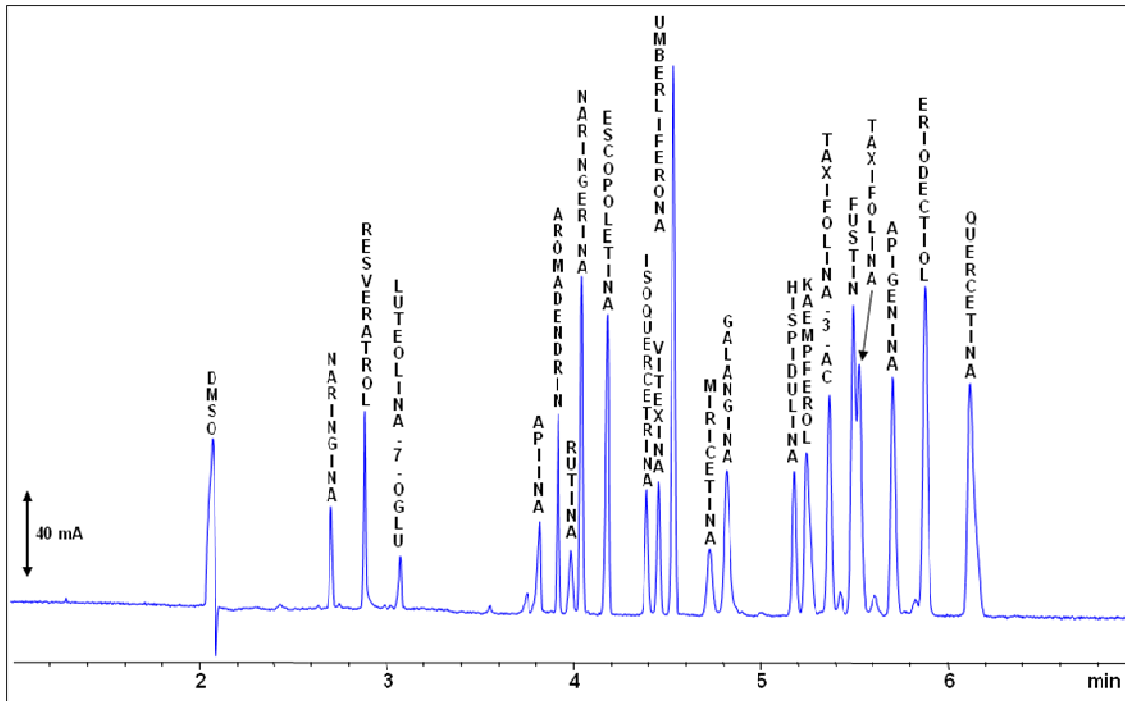


**Figura 14:** Janela de resolução da macro e resultado numérico do planejamento fatorial.



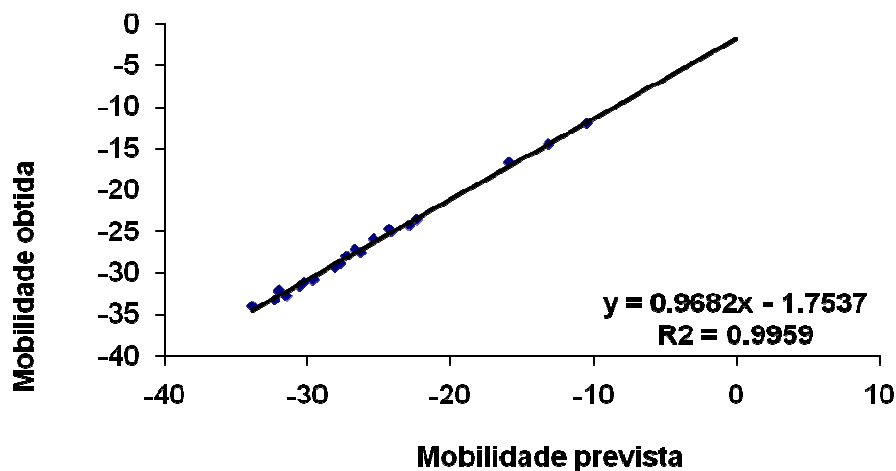
**Figura 15:** Resultado gráfico do planejamento fatorial.

A Figura 15 mostra que, após a otimização, o eletrólito ótimo deve ser composto de 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol. A separação obtida para os 21 padrões apresentou tempo de análise bastante satisfatório, 6,135 minutos, com uma boa resolução dos analitos, apresentando apenas uma pequena coeluição dos flavonóides fustin e taxifolina, como demonstrada pela Figura 16.



**Figura 16:** Eletroferograma da mistura de padrões dos flavonóides no método otimizado. Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

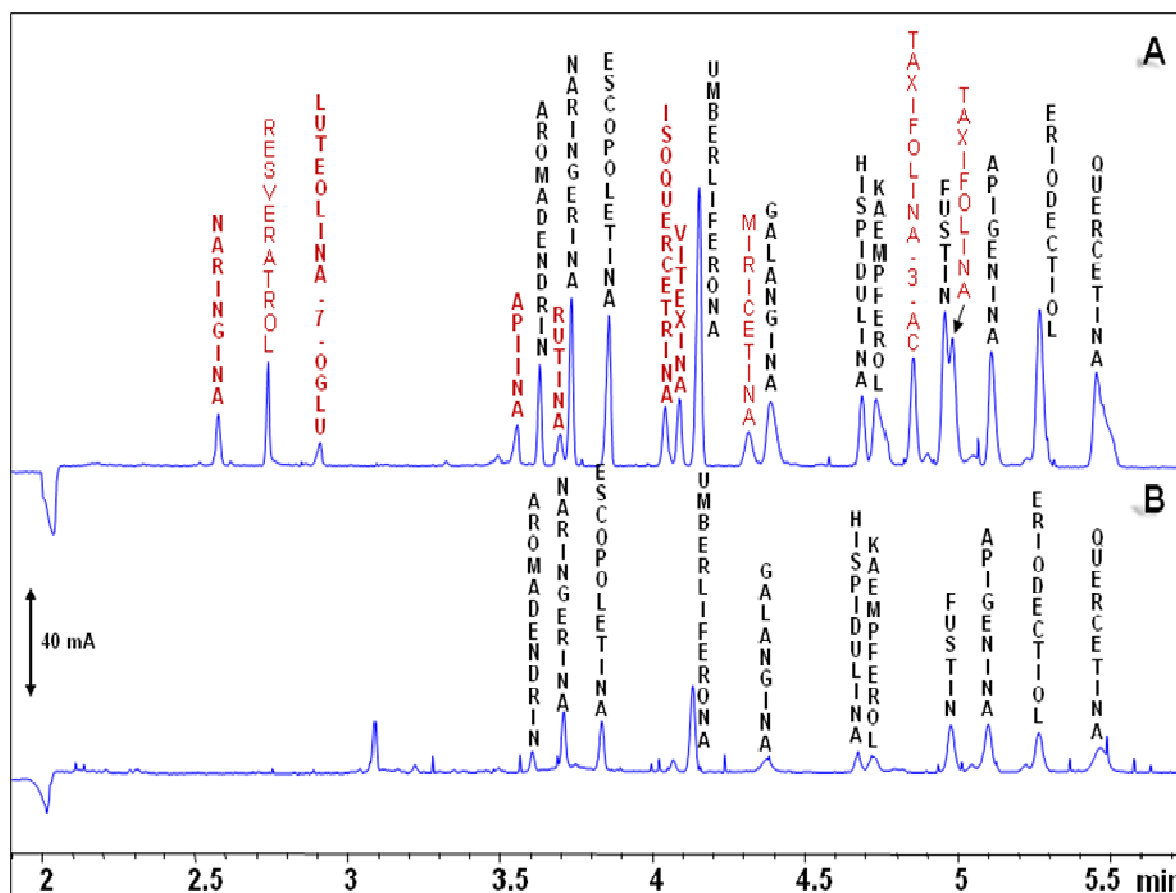
Relacionando as mobilidades dos flavonóides na proporção  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol, previstas pela Equação 2 e as obtidas experimentalmente pela Equação 1, obtemos uma boa correlação dos resultados ( $R^2 = 0,9959$ ), segundo a Figura 17, o que demonstra a validade do método obtido.



**Figura 17:** Gráfico de correlação entre as mobilidades dos flavonóides previsto pela Equação 2 e obtido experimentalmente.

Um ensaio comparativo entre a separação dos padrões dos flavonóides antes e após o processo de hidrólise ilustra que os compostos resveratrol, miricetina, taxifolina-3-ac e taxifolina foram decompostos durante a reação de hidrólise, talvez

pela temperatura elevada gerada pelo aquecedor. Os flavonóides glicosilados naringina, luteolina-7-oglu, apiina, rutina, isoquercetrina e vitexina foram convertidos em suas respectivas agliconas.



**Figura 18:** Figura comparativa da separação de flavonóides antes (A) e depois (B) do processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmol L<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Algumas amostras de interesse fitoterápico e cosmetológico foram selecionadas então e analisadas no referido método.

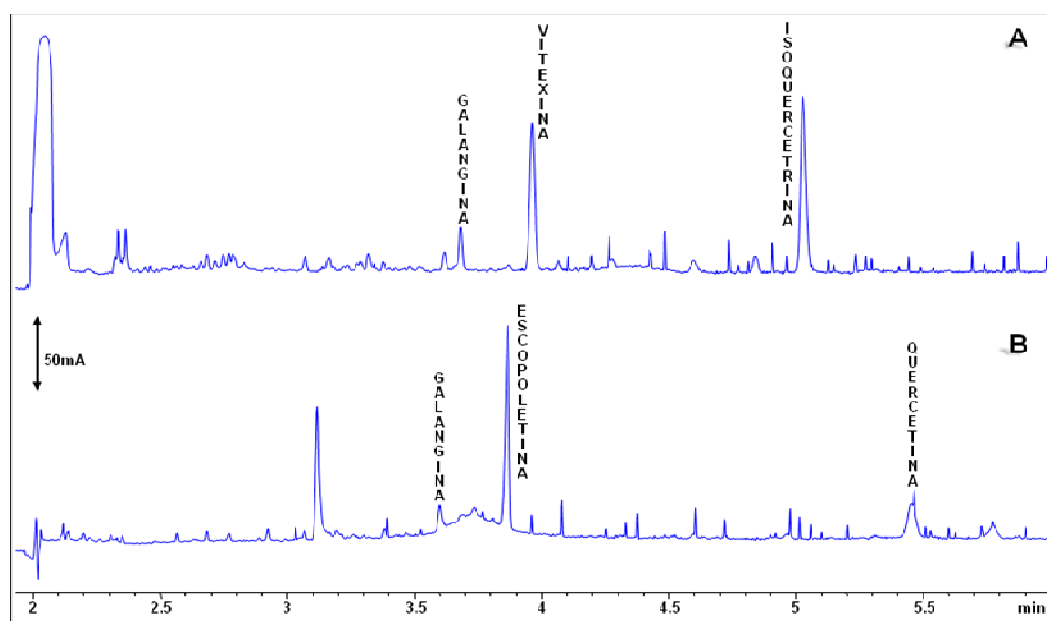
#### 4.2. APLICAÇÃO EM EXTRATOS E PRODUTOS COSMÉTICOS

Os analitos foram identificados pelo espectro UV/VIS e pelo tempo de migração dos compostos.



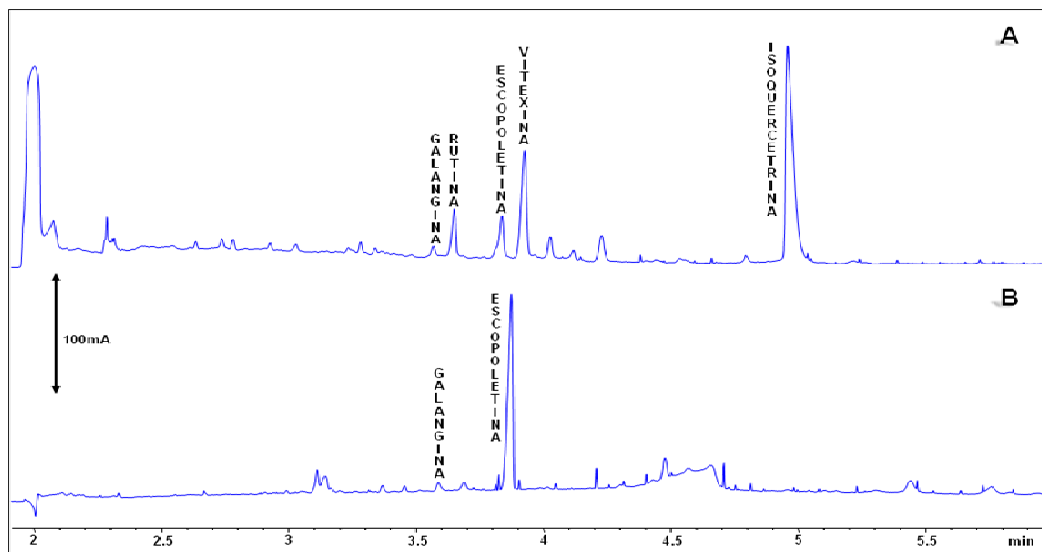
#### 4.2.1. Espécie *Polygala Sabulosa*

Primeiramente foi analisada a amostra das flores, folhas e galhos de *P. Sabulosa*. As análises das flores antes e depois do processo de hidrólise (Figura 19) mostraram a conversão do flavonóide glicosilado isoquercetrina à sua respectiva aglicona, quercetina, a provável degradação da vitexina, além do aparecimento da escopoletina, proveniente da escopoletina prenilada que aparece junto do fluxo eletrosmótico antes da hidrólise.



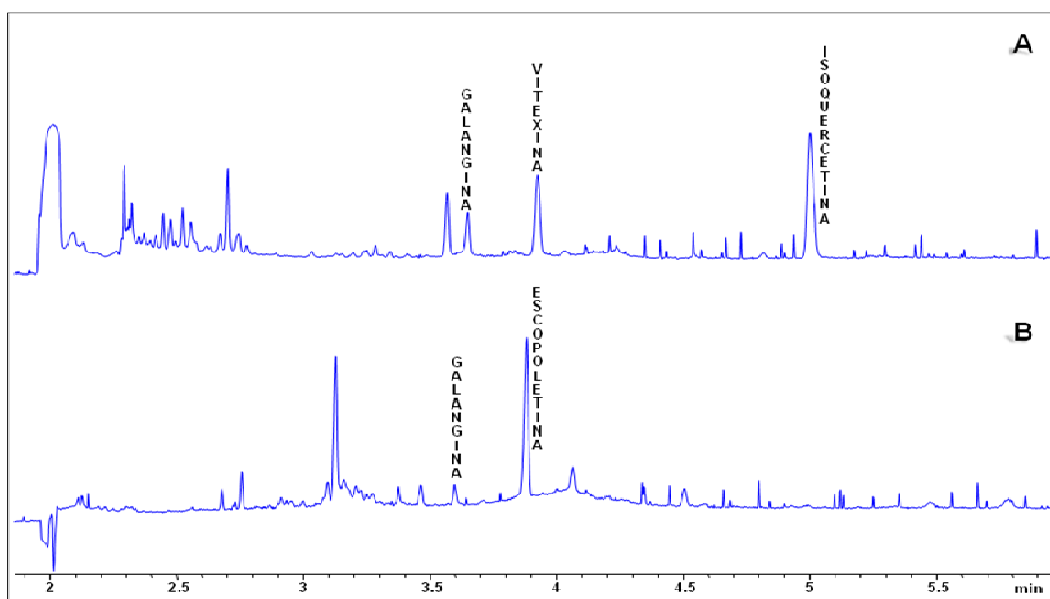
**Figura 19:** Separação de flavonóides antes (A) e depois (B) do processo de hidrólise para as flores da espécie *P. Sabulosa*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Para as folhas de *P. Sabulosa* as análises antes e depois da hidrólise (Figura 20), mostraram o pico da aglicona galangina antes e após a hidrólise e o aumento do pico da cumarina escopoletina que estava prenilada antes do processo. Não foi possível, porém, a visualização o pico de aglicona da conversão dos glicosídeos rutina, vitexina e isoquercetrina, que podem ter sofrido decomposição durante o processo de hidrólise.



**Figura 20:** Separação de flavonóides das folhas da espécie *P. Sabulosa*, antes (A) e depois (B) do processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Na análise dos galhos de *P. Sabulosa* (Figura 21) observou-se o aparecimento do pico da escopoletina após o processo de hidrólise. A conversão da isoquercetrina e da vitexina em suas respectivas agliconas não foram observadas pela provável decomposição das moléculas. Além disso, o pico da aglicona galangina manteve-se após o processo de hidrólise.

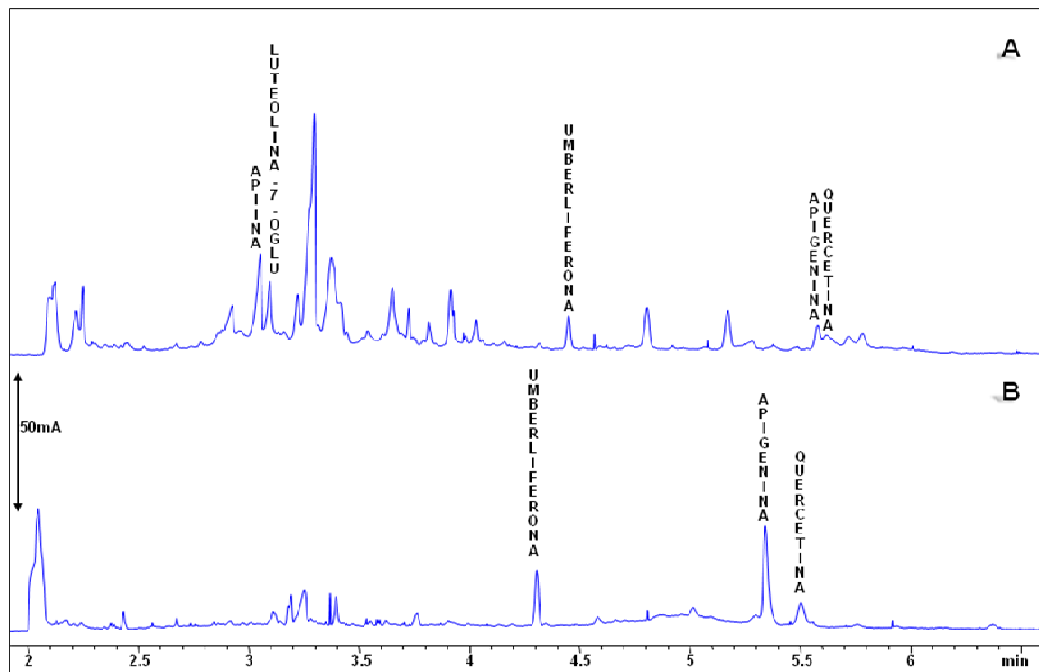


**Figura 21:** Separação de flavonóides antes (A) e depois (B) do processo de hidrólise para os galhos da espécie *P. Sabulosa*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

#### 4.2.2. Extratos vegetais comerciais

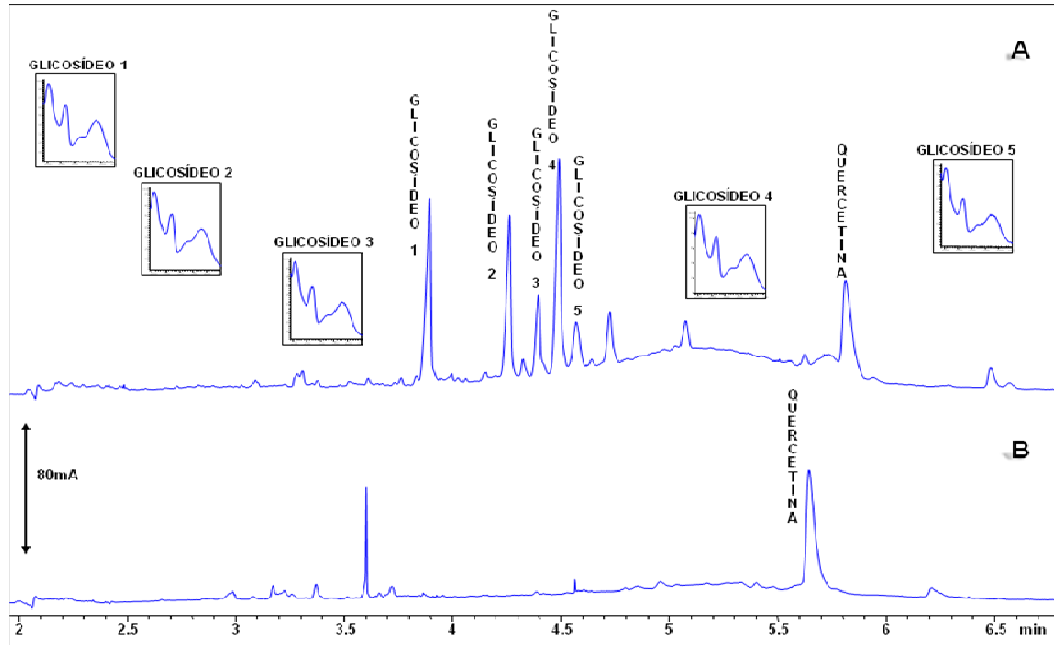
Foram feitas análises de extratos vegetais hidroalcoólicos de camomila, hipérico e passiflora, antes e depois do processo de hidrólise.

Na análise dos extratos de camomila (Figura 22) foi possível observar o aumento do pico da apigenina devido à conversão da apiina, e a permanência dos picos da umberliferona e da quercetina. Além disso, nota-se que a luteolina-7-oglu provavelmente se converteu em composto não identificado ou degradou durante a hidrólise.



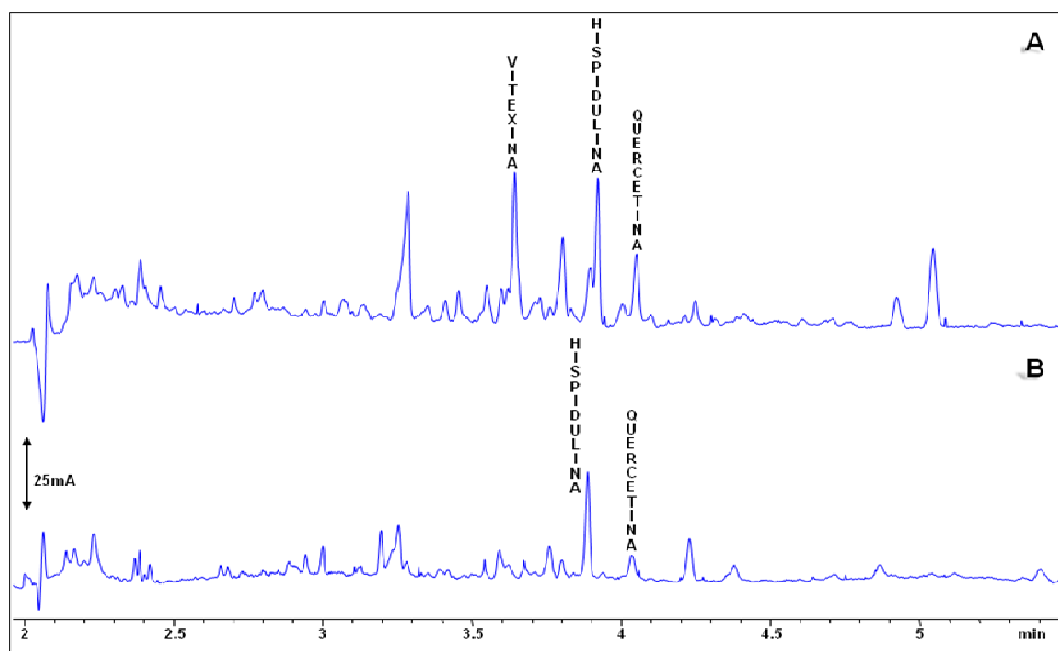
**Figura 22:** Comparação dos eletroferogramas para o extrato de camomila antes (A) e após (B) o processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Os eletroferogramas para a análise de hipérico (Figura 23) mostraram a conversão completa das quercetinas glicosiladas 1, 2, 3, 4 e 5 à aglicona quercetina.



**Figura 23:** Eletroferogramas comparativos para a análise do extrato de hipérico antes (A) e após (B) o processo de hidrólise. Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

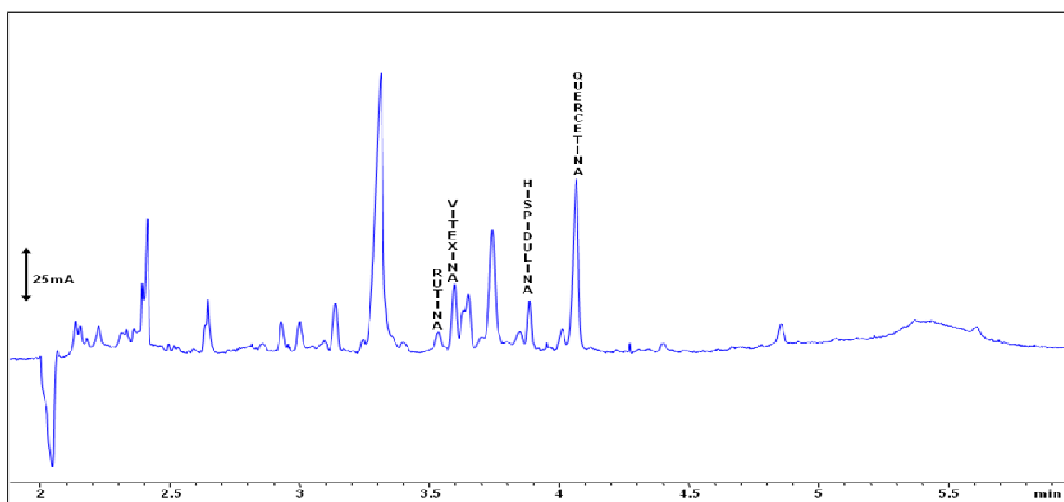
As bandas das agliconas hispidulina e quercetina para o extrato de passiflora mantiveram-se no mesmo tempo de migração após a hidrólise. A vitexina possivelmente foi degradada durante a hidrólise, como mostra a Figura 24.



**Figura 24:** Comparação dos eletroferogramas antes (A) e após (B) a hidrólise extrato de passiflora. Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

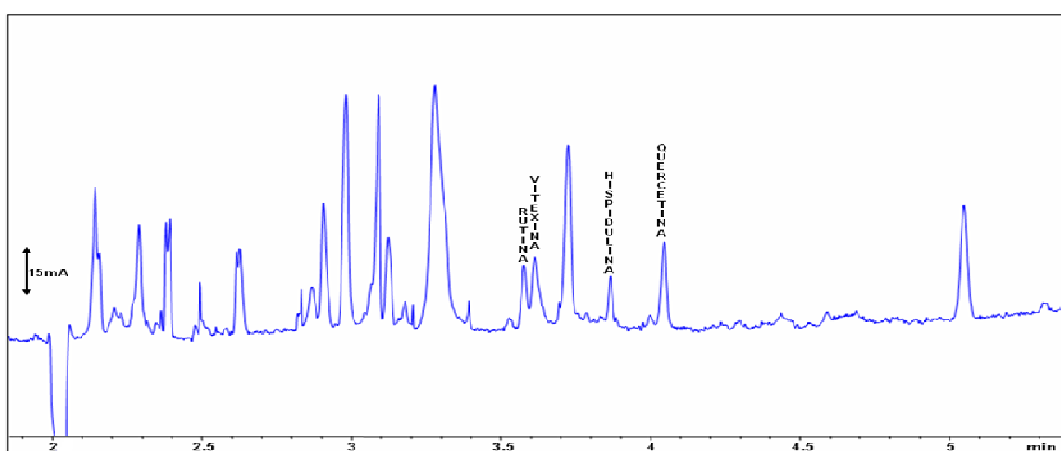
### 4.2.3. Espécie *Passiflora Edulis*

A análise das folhas do maracujá amarelo (*P. Edulis*), segundo a Figura 25, mostra a presença de dois flavonóides glicosilados, rutina e vitexina, e duas agliconas, hispidulina e quercetina.



**Figura 25:** Análise eletroforética das folhas da *P. Edulis*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Para as flores da espécie (Figura 26), foram encontrados os mesmos flavonóides das folhas, rutina, vitexina, hispidulina e quercetina. Porém ao se comparar seus eletroferogramas é possível perceber que nas flores os compostos estão em menor concentração do que nas folhas.

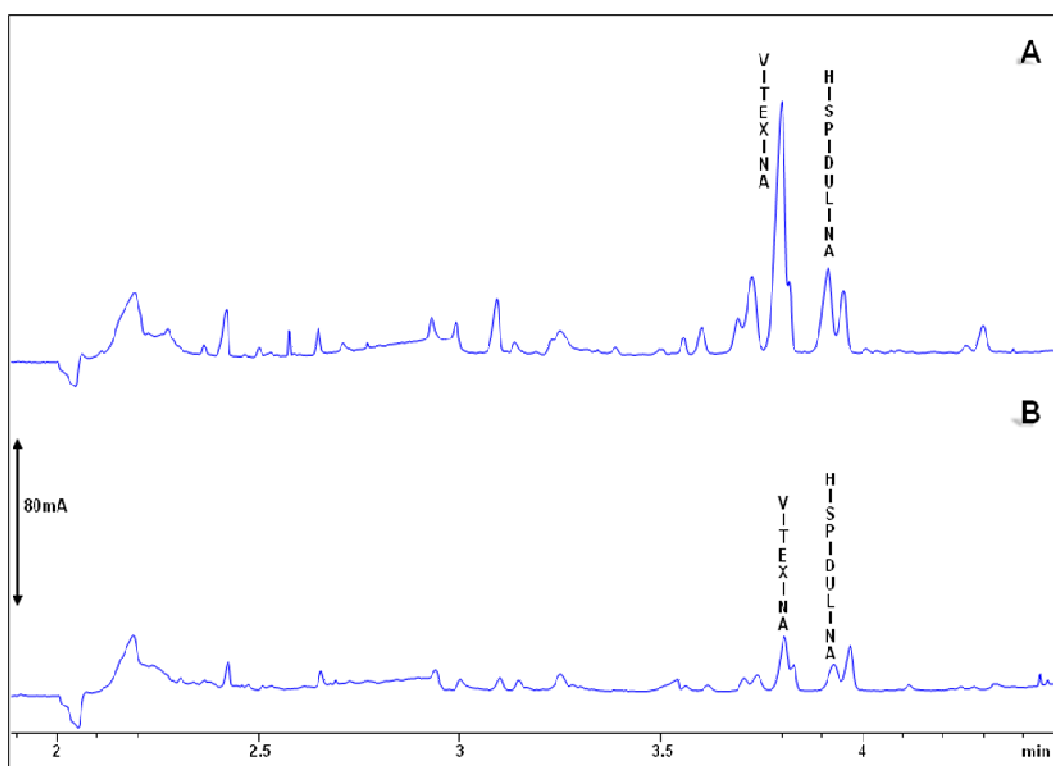


**Figura 26:** Separação dos flavonóides das flores da espécie *P. Edulis*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

#### 4.2.4. Espécie *Passiflora Alata*

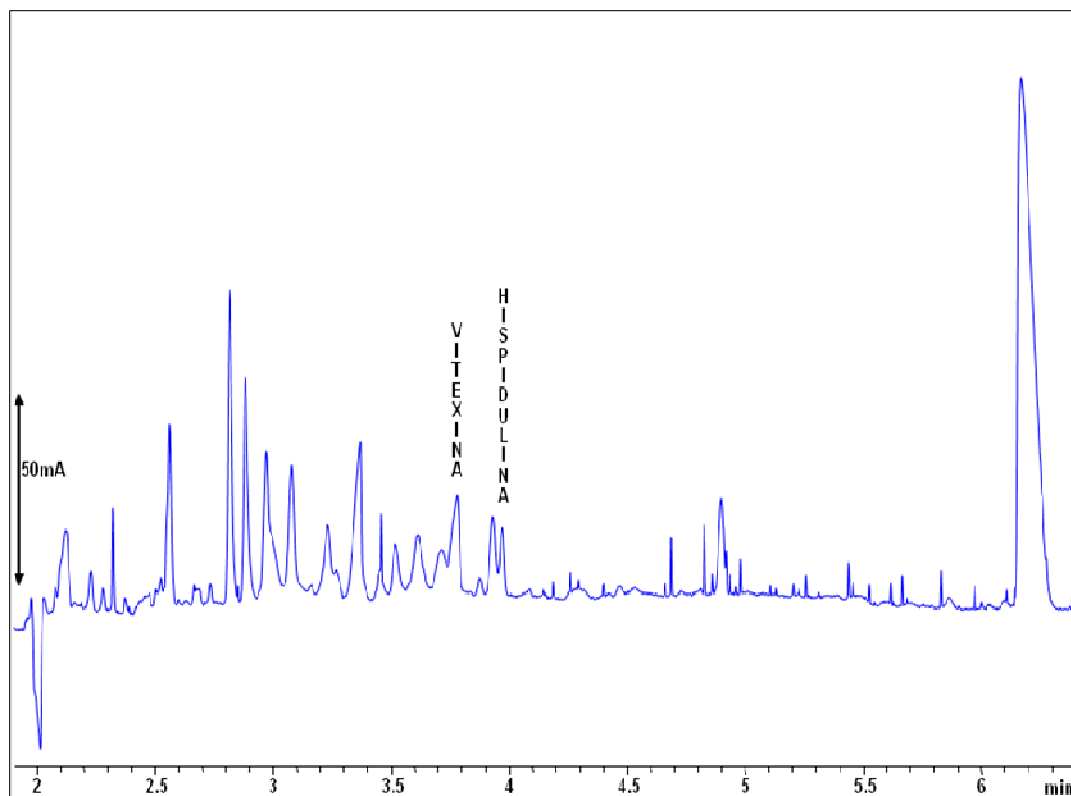
Segundo FREITAS a *Passiflora Alata* é extensivamente estudada como fitoterápico por ser rica em flavonóides, sendo o principal a vitexina<sup>40</sup>.

A análise comparativa de folhas jovens e velhas do maracujazeiro doce (Figura 27) mostra que a composição das folhas praticamente não se modifica, mas a concentração diminui em folhas mais antigas. A análise confirma além da presença de vitexina, a existência da aglicona hispidulina.

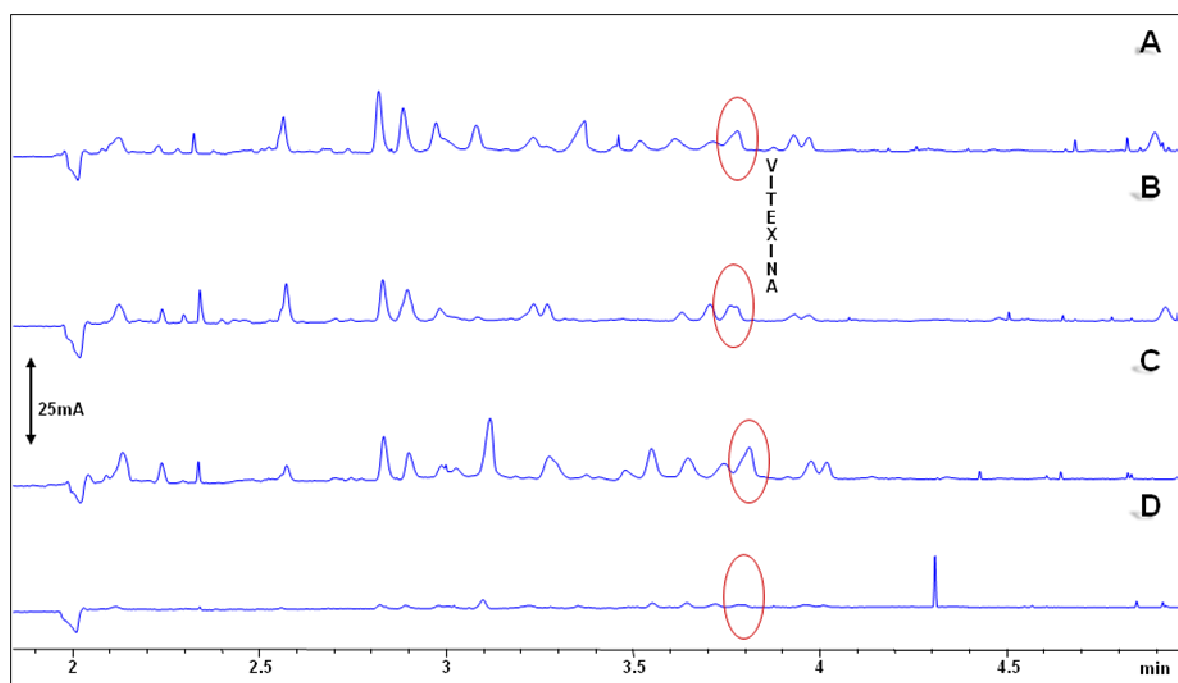


**Figura 27:** Análise comparativa da folhas jovens (A) e velhas (B) da espécie *P. Alata*. Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

Para as flores da espécie, o eletroferograma (Figura 28) mostrou a presença da vitexina e hispidulina. Uma análise comparativa (Figura 29) mostra que a concentração destas espécies, marcadas pela vitexina, é maior em flores abertas e em botões grandes, e menor em flores fechadas e botões pequenos.



**Figura 28:** Separação dos compostos presentes nas flores da espécie *P. Alata*. Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

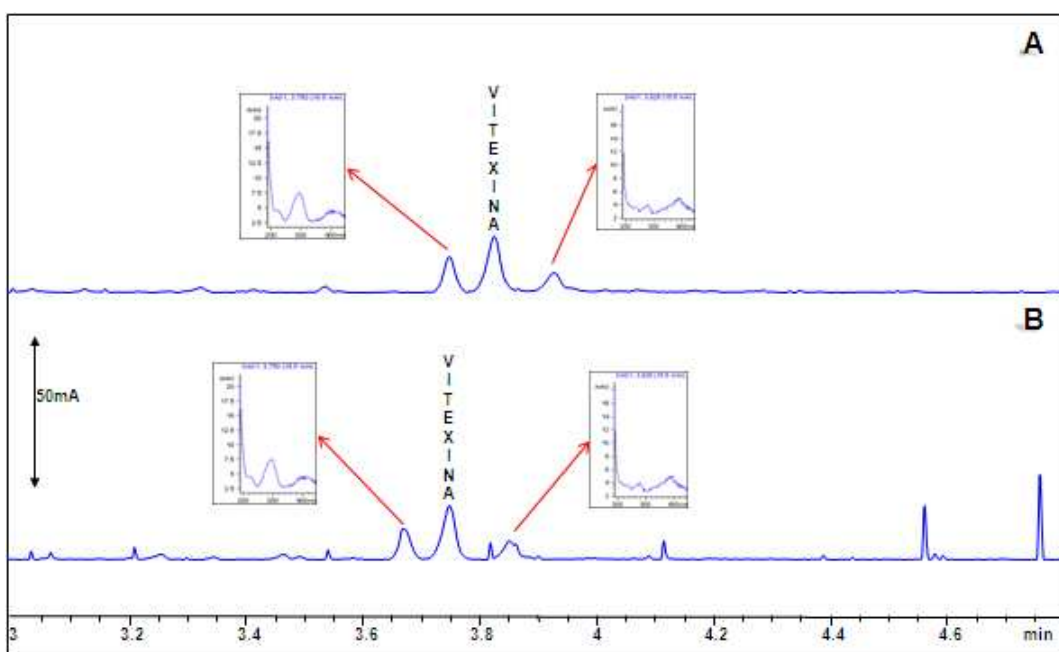


**Figura 29:** Análise comparativa das flores da espécie *P. Alata*. Flores abertas (A), flores fechadas (B), brotos grandes (C) e brotos pequenos (D). Condições experimentais: eletrólito constituído por  $25 \text{ mmolL}^{-1}$  de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.

#### 4.2.5. Extratos de cremes de uso contínuo

Foram feitas análises de dois cremes de uso diário (creme para o dia e creme para a noite), adicionados de extrato de *Passiflora Alata*.

A análise dos cremes (Figura 30) confirmou a presença do flavonóide marcador da espécie *Passiflora Alata*, a vitexina, além de outros dois compostos fenólicos com características de flavonóides (espectro UV/VIS e tempo de migração).



**Figura 30:** Análise comparativa dos cremes de uso contínuo, adicionados de extrato de *P. Alata*. Creme dia (A) e creme noite (B). Condições experimentais: eletrólito constituído por 25 mmolL<sup>-1</sup> de TBS e 14% de metanol; injeção hidrodinâmica 50 mbar por 3s; tensão aplicada 30 kV com polaridade positiva e detecção direta em 200 nm.



## 5. CONCLUSÃO

O estudo mostrou que a técnica de eletroforese capilar é uma ferramenta rápida e eficaz na separação de dezoito flavonóides, duas cumarinas e um estilbeno, com tempos de análise inferiores a 6,5 minutos.

O uso de modelos e softwares matemáticos durante o planejamento fatorial, facilitou a otimização do método com uma boa correlação de 0,9959 entre os valores de mobilidade teóricos e experimentais, mostrando a validade do modelo obtido.

A aplicação do método em diferentes extratos vegetais e cosméticos, sem necessidade de muitos tratamentos prévios, mostrou a versatilidade do método, reforçando sua capacidade de aplicação a análises de rotina.

## REFERÊNCIAS

1. SILVA, M. B. S. Flavonóides com capacidade antioxidante. Faculdade de Ciências e Tecnologia, Universidade de Nova de Lisboa.
2. ABIHPEC – Associação Brasileira da Indústria de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosmética. Dados de mercado. **Panorama do Setor – 2007-2008**. Disponível em: [http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado\\_panorama\\_setor.php](http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado_panorama_setor.php). Acesso em: 13/08/08.
3. COSMÉTICA NATURAL. **Bem-vindo ao Cosmetica-Natural.org**. Disponível em: <http://www.cosmetica-natural.org/>. Acesso em: 13/08/08.
4. YUNES, R. et al. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**. v. 24, p.150, 2001.
5. PENG, Y. et al. Quantitative and qualitative analysis of flavonoid markers in *Fruscus aurantii* of different geographical origin by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 830, p. 224, 2005.
6. RIJKE, E., et al. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 31-63, 2006.
7. WANG, S-P., HUANG, K-J. Determination of flavonoids by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 273-279, 2004.
8. ALVES, C. Q. et al. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. **Diálogos & Ciência – Revista da Faculdade de Tecnologia e Ciências**, Ano 5, n. 12, 2007. Disponível em: <http://dialogos.ftc.br>. Acessado em 21/05/08.

9. FERREIRA, A. L. A. et al. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistemas de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**. v. 43, p. 61-68, 1997.
10. BIANCHI, M. L. P. et al. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**. v. 12, p. 123-130, 1999.
11. MOLNÁR-PERL, I., FÜZFAI Zs. Chromatographic, capillary electroforetic and capillary electrochromatographic techniques in the analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**. v. 1073, p. 201-227, 2005.
12. HAN, J. et al. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 355-362, 2006.
13. WANG, H. et al. Determination of flavonols in green and black tea leaves and green tea infusions by high-performance liquid chromatography. **Food Research International**, v. 34, p. 223-227, 2001.
14. FIGUEIRINHA A. et al. *Cymbopogon citrates* leaves: Characterization of flavonoids by HPLC-PDA-ESI-NS/MS. **Food Chemistry**, v.110, p. 718-728, 2008.
15. MERKEN, H. M., BEECHER G. R. Measurement of food flavonoids by High-Performance Liquid Chromatography: A Review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 577-599, 2000.
16. FARAG, M. A. et al. Metabolic profiling and systematic identification of flavonóides in roots and cell suspension cultures of *Medicago*. **Phytochemistry**, v.68. p. 342-354, 2006.

17. LAI, J-P. et al. Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three *Compositae* plants. **Journal of Chromatography B**, v. 848, p. 215-225, 2007.
18. SURYAWANSHI, S. et al. Simultaneous estimation of mangiferin and four secoiridoid glycosides in rat plasma using liquid chromatography and its application to pharmacokinetic study of herbal preparation. **Journal of Chromatography B**, v. 858, p. 211-219, 2007.
19. HAN, J. et al. Characterization of phenolic compounds in the Chinese herbal drug *Artemisia annua* by liquid chromatography coupled to electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 47, p. 516-525, 2008.
20. FÜZFAI, Zs., MOLNÁR-PERL, I. Gas chromatographic-mass spectrometric fragmentation study of flavonoids as their trimethylsilyl derivatives: Analysis of flavonoids, sugar, carboxylic and amino acids in model systems and in citrus fruits. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, p. 88-101, 2007.
21. CANINI, A. et al. Gas chromatography-mass spectrometry analysis of phenolic compounds from *Carica papaya* L. leaf. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 20, p. 584-590, 2007.
22. ZHANG, K., ZUO, Y. GC-MS Determination of Flavonoids and Phenolic and Benzoic Acids in Human Plasma after Consumption of Cranberry Juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 222-227, 2004.
23. XU, X., Yu, L., CHEN, G. Determination of Flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 41, p. 493-499, 2006.
24. POLÁŠEK M., et al. Use of molybdate as novel complex-forming selector in the analysis of polyhydric phenols by capillary zone electrophoresis. **Talanta**, v. 69, p. 192-198, 2006.

25. LUO, M. et al. Separation and determination of flavonoids in *Lamiophlomis rotata* by capillary electrophoresis using borate as electrolyte. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 44, p. 881-886, 2007.
26. ZHANG S. et al. Simultaneous determination of flavonoids in chrysanthemum by capillary zone electrophoresis with running buffer modifiers. **Talanta**. v. 76, p. 780-784, 2008.
27. URBONAVIČIŪTĖ A., et al. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. **Journal of Chromatography A**. v. 1112, p. 339-344, 2006.
28. ŠAFRA, J., et al. Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration. **Journal of Chromatography A**. v. 1171, p. 124-132, 2007.
29. KOČEVAR N., et al. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 46, p. 609-614, 2008.
30. SUNTORNSUK L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 27, p. 679-698, 2002.
31. TSAO, R., DENG, Z. Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **Journal of Chromatography B**. v. 812, p. 85-99, 2004.
32. SKOOG, D. A., HOLLER, F. J., NIEMAN, T. **Princípios de análise instrumental**. Tradução de Ignez Caracelli [et al.] 5. Ed. Porto Alegre: Bookman, 2002. cap. 30.
33. TAVARES, M. F. M. Eletroforese Capilar: Conceitos Básicos. **Química Nova**, v. 19, p.173-180, 1996.

34. TAVARES, M. F. M. Mecanismos de separação em Eletroforese Capilar. **Química Nova**, v. 20, p.493-498, 1997.
35. HELALI, N. Capillary zone electrophoresis method for the determination of famotidine and related impurities in pharmaceuticals. **Talanta**. v. 74, p. 694, 2008.
36. LIANG, Y-Z. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**. v. 812, p.56-57, 2004.
37. URBONAVIČIŪTĖ, A. et al. Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts. **Journal of Chromatography A**. v. 1112, p. 339-341, 2006.
38. SILVA, J. A. F. et al. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**. v. 30, p. 740-744, 2007.
39. Chemkeys. **Eletroforese capilar**. Disponível em: <http://www.chemkeys.com/artigo/1/0>. Acesso em 02/10/2008.
40. FREITAS, M. S. M. **Flavonóides e nutrientes minerais em folhas de maracujazeiro amarelo e deficiência de macronutrientes e boro em maracujazeiro doce**. 2006. 119f. Tese (Doutorado em Produção Vegetal) – Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Rio de Janeiro.