



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA E
FLAVAN-3-OL EM EXTRATO DE *Paullinia cupana*
var. *sorbilis* (MART.) DUCKE - SAPINDACEAE**

MARINGÁ

2011

LIA AKINA ITO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA POR ELETROFORESE CAPILAR PARA
SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE CAFEÍNA E
FLAVAN-3-OL EM EXTRATO DE *Paullinia cupana*
var. *sorbilis* (MART.) DUCKE - SAPINDACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, da Universidade Estadual de Maringá, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo
de Mello

MARINGÁ

2011

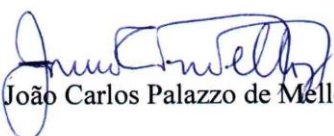
LIA AKINA ITO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR
ELETROFORESE CAPILAR PARA SEPARAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO
DE CAFEÍNA E FLAVAN-3-OL EM EXTRATO DE *PAULLINIA CUPANA*
VAR. *SORBILIS* (MART.) DUCKE - SAPINDACEAE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 26 de agosto de 2011.

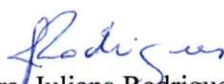
BANCA EXAMINADORA



Dr. João Carlos Palazzo de Mello



Dr. Cláudio Celestino de Oliveira



Dra. Juliana Rodrigues

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá – PR., Brasil)

- I89 Ito, Lia Akina
Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para separação e identificação de cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (MART.) Ducke - Sapindaceae. / Lia Akina Ito. -- Maringá, 2011.
139 f.: il., col, figs.Tabs.
- Orientador: Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.
- Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmaceuticas.
1. *Paullinia Cupana*. 2. Guaraná.3.Metilxantinas.4. Taninos. 5. Eletroforese capilar. 6. validação. I. Mello, João Carlos Palazzo de, orient.
II.Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Departamento de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmaceuticas. III. Título.

615.321CDD 21.ed.

AHS-000011

“Só existem dois dias no ano que nada pode ser feito. Um se chama ontem e o outro se chama amanhã, portanto hoje é o dia certo para amar, acreditar, fazer e principalmente viver.” (Dalai Lama)

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Beth e Valter, pelo amor e carinho incondicional. Ao meu irmão, Edgar, pelo apoio e companheirismo sempre.

A toda minha família, pelo apoio e incentivo em todos os momentos de minha vida.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Elisabeth e Valter, por estarem sempre ao meu lado, incentivando cada escolha tomada.

Ao meu irmão Edgar pelo carinho e amizade.

Ao Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello por compartilhar seus conhecimentos acadêmicos, pela orientação, paciência, amizade e confiança.

Aos que contribuíram com o desenvolvimento estatístico deste trabalho, Profa. Gisely Lopes, Prof. Albertino Oliveira, e doutorandas Traudi e Renata.

Aos técnicos de laboratório, Admir e Cláudio, pela ajuda e amizade.

Aos companheiros de laboratório, Danielle, pela ajuda e cooperação, e Graciele, Mayara, Rafaela e Eduardo pela compreensão.

Aos companheiros de mestrado, Fernanda e Sandra.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Helena, pela ajuda sempre que necessária e pela amizade.

Aos professores da banca de qualificação pela disponibilidade e pelos conhecimentos transmitidos.

À CAPES e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas pelos auxílios e pela bolsa concedida durante o período de trabalho.

RESUMO

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, conhecida como guaraná, é uma planta originária da Amazônia brasileira. Suas sementes são empregadas popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo e sedativo. O guaraná apresenta alto conteúdo de metilxantinas e quantias consideráveis de taninos, que estão relacionadas com seus efeitos medicinais. Já foram citadas uma ampla gama de atividade biológica, tais como atividade antioxidante, antibacteriana, antidepressiva, antienotóxica, anti-agregante e desagregante em plaquetas, melhora no desempenho cognitivo e físico, além de estimulante. Com o intuito de se obter uma metodologia rápida e exata na identificação das substâncias responsáveis por esta atividade biológica, neste trabalho foi desenvolvido uma metodologia empregando a eletroforese capilar na separação, identificação e quantificação de substâncias em fração semipurificada (EPA) de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. Foram empregadas duas técnicas de separação, a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC). Em CZE, utilizou-se tampão borato 50 mmol l⁻¹ em pH 8,5 adicionado de 1,0 mmol l⁻¹ de β-ciclodextrina, voltagem aplicada de 20 kV, detecção em 214 nm, injeção da amostra por 3 s a 0,3 psi, temperatura do capilar em 25 °C, obtendo-se a separação em 7 min dos picos de cafeína, *ent*-catequina, catequina e epicatequina, porém, o eletroferograma não apresentou picos simétricos. Na metodologia por MEKC foi utilizado tampão fosfato 40 mmol l⁻¹ em pH 7,0 adicionado de 30 mmol l⁻¹ de SDS, com voltagem aplicada de 20 kV, detecção a 214 nm, tempo de injeção da amostra de 5 s (0,5 psi) e temperatura do capilar em 25 °C, apresentando um eletroferograma com boa resolução, possibilitando a identificação dos picos de cafeína, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e procianidina B4. O método analítico por MEKC, mostrou-se seletivo, sensível, simples e de alta frequência analítica possibilitando separar as substâncias de referência cafeína, catequina e epicatequina em 20 min com tempos de migração de 8,94±0,22, 9,27±0,24 e 18,29±0,77, e limites de detecção e quantificação de 0,638, 1,465 e 0,965 µg/ml e 2,126, 4,883 e 3,217 µg/ml, respectivamente. No entanto, o método não apresentou robustez, com pequenas variações de voltagem.

Palavras-chave: *Paullinia cupana*, guaraná, metilxantinas, taninos, eletroforese capilar, validação.

ABSTRACT

Paullinia cupana var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, known as Guarana, is a plant native from Brazilian Amazon. Its seeds are popularly used as a stimulator of brain functions, aphrodisiac, tonic, diuretic, febrifuge and sedative. Guarana has a high content of methylxanthines and considerable amounts of tannins, which are related to its medicinal effects. Already been mentioned a wide range of biological activity, such as antioxidant, antibacterial, antidepressant, antigenotoxic, anti-platelet aggregating and disintegrating, improved cognitive and physical performance, and stimulating. In order to obtain a rapid and accurate methodology to identify the substances responsible for this biological activity, in this study was developed a methodology using capillary electrophoresis for separation, identification and quantification of substances in the semipurified fraction (EPA) of *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. Two techniques were employed for separation, the capillary zone electrophoresis (CZE) and micellar electrokinetic chromatography (MEKC). For CZE was used borate buffer 50 mmol l⁻¹ at pH 8,5 with 1,0 mmol l⁻¹ of β -cyclodextrin, applied voltage 20 kV, detection at 214 nm, sample injection for 3 s at 0,3 psi, capillary temperature of 25 °C, resulting in separation of the peaks of caffeine, *ent*-catechin, catechin and epicatechin, however, the electropherogram did not show symmetrical peaks. The methodology used by MEKC was phosphate buffer 40 mmol l⁻¹ at pH 7,0 supplemented with 30 mmol l⁻¹ SDS, applied voltage of 20 kV, detection at 214 nm, sample injection time of 5 s at 0,5 psi and capillary temperature at 25 °C, showing an electropherogram with good resolution, allowing the identification of the peaks of caffeine, catechin, epicatechin, procyanidin B1, procyanidin B2 and procyanidin B4. The analytical method by MEKC proved to be selective, sensitive, simple and high-frequency, allowing separate analytical reference substances caffeine, catechin and epicatechin in 20 min with migration times of $8,94 \pm 0,22$, $9,27 \pm 0,24$ and $18,29 \pm 0,77$, and limits of detection and quantification of 0,638, 1,465 and 0,965 mg/ml and 2,126, 4,883 and 3,217 mg/ml, respectively. However, the method did not provide robustness to small variations in voltage.

Keywords: *Paullinia cupana*, guaraná, methylxanthines, tannins, capillary electrophoresis, validation.

NOTA BIOGRÁFICA



Lia Akina Ito, nasceu em Maringá-Pr, no dia 20 de fevereiro de 1986. Em 2003, concluiu o ensino médio no Colégio Nobel. Em 2004 iniciou o curso de Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá e neste período foi bolsista pela Farmacopéia sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello. Tem participação em artigo na revista Molecules (ISSN 1420-3049). Realizou estágio curricular em Londres, na London Metropolitan University – Microbiology Unit, sob orientação de Profa. Jane Sutherland e Prof. Hamid Ghoddushi, formando-se em 2008. Em 2009, iniciou o curso de mestrado no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos Biologicamente Ativos, sob orientação do Prof. Dr. João Carlos Palazzo de Mello.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - A) Folhas, flores, frutos e sementes (fonte: Plantas Medicinais de Kohler, 1883); B) Flores (fonte: Missouri Botanical Garden, 2005); C) Frutos do guaraná (fonte: Casa do Guaraná); D) Sementes do guaraná: com arilo, em pó e secas (fonte: Embrapa).	29
Figura 2 - I – Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II – Teofilina (1,3-dimetilxantina); III –Teobromina (3,7-dimetilxantina)	34
Figura 3 - Exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina].	38
Figura 4 - Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas.....	39
Figura 5 - Estruturas da catequina e epicatequina.	39
Figura 6 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.....	42
Figura 7 - Injeção hidrodinâmica por pressão (A); Injeção hidrodinâmica por vácuo (B) e Injeção hidrodinâmica por gravidade (C)	43
Figura 8 - Esquema geral de uma injeção eletrocínética.....	44
Figura 9 -Eletroferograma CD-MEKC de mistura de padrões de catequinas e metilxantinas. Condições de separação: 25 mmol l ⁻¹ borato-fosfato (pH 2,5), com SDS 90 mmol l ⁻¹ e hidroxipropil- β -CD 25 mmol l ⁻¹ . Capilar de sílica fundida (50 μ m I.D., 30 cm comprimento total, 8,5 cm comprimento efetivo); voltagem 15 kV; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica a 25 mbar por 2 s; detecção à 200 nm (autorizado pelo autor).....	50
Figura 10 - Perfil de separação por CZE de amostra de resina de ópio nas condições otimizadas. Condições – eletrólito: metanol – acetato de sódio (pH 3,1) em água (7:3; v/v), 15 kV, detecção à 224 nm. Picos: 1-tebaína, 2-codeína, 3-morfina, 4-papaverina, 5-narcotina (autorizado pelo autor).....	51
Figura 11 - Eletroferogramas de oito ácidos fenólicos e cinco diterpenoides determinados por cromatografia eletrocínética com microemulsão pelos métodos: (A) óleo-água e (B) água-óleo. Condições de separação: (A) 0,6% (p/v) ciclohexano, 3,0% (p/v) SDS, 6,0% (p/v) 1-butanol, 3,0% (p/v) acetonitrila e 87,4% (v/v) tampão tetraborato de sódio (pH 8,0); (B) 48% (p/v) 1-butanol, 18% (p/v) SDS, 8,0% (p/v) 2-propanol e 26% (p/v) tampão acetato de sódio (pH 8,0). Onde: EOF - fluxo eletroosmótico, MD – droplets da microemulsão, 1 – aldeído protocatéquico, 2 – ácido rosmarínico, 3 – danshensu, 4 – miltirona, 5 – ácido salvianólico C, 6 – ácido cafeico, 7 – ácido litospérmico, 8 – ácido salvianólico B, 9 – ácido protocatéquico, 10 – diidrotanshinona I, 11 – criptotanshinona, 12 – metileno tanshiquinona, 13 – tanshinona IIA (autorizado pelo autor).....	52

Figura 12 - Eletroferograma dos padrões. Condições: 40 mmol l ⁻¹ tetraborato de sódio (pH 9,4), 2 mmol l ⁻¹ β-CD, 4% (v/v) MeOH, 25 kV a 25 °C, 210 nm. Picos: 1 - ácido oleanólico, 2 - ácido ursólico, 3 - ácido betunílico, 4 - rutina, 5 - quercetina, 6 - ácido <i>p</i> -cumárico, 7 - ácido rosmarínico, 8 - ácido cafeico, IS - padrão interno (autorizado pelo autor).	53
Figura 13 - Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por eletroforese capilar. Picos: 1 - tirosol, 2 - epicatequina, 3 - ácido siríngico, 4 - ácido ferúlico, 5 - ácido <i>p</i> -cumárico, 6 - ácido cafeico, 7 - ácido gálico, 8 - ácido 3,4-diidroxibenzóico, 9 - ácido tartárico <i>cis</i> -cumaroil, 10 - ácido tartárico <i>trans</i> -cumaroil, 11 - ácido tartárico cafeoil; a, b, c - ésteres hidroxicinâmicos (autorizado pelo autor).....	54
Figura 14 - Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por CLAE. Picos como figura anterior (autorizado pelo autor).	54
Figura 15 - Cromatograma capilar de substâncias fenólicas padrões da camomila por eletrocromatografia capilar SCX-C18. Condições: coluna SCX/C18, 50 µm I.D., partícula de 3 µm; injeção de 12 bar/ 0,4 min; voltagem aplicada de 25 kV, temperatura de 25 °C, detecção à 337 nm. Picos: 1 - herniarina, 2 - umbeliferona, 3 - ácido cafeico, 4 - ácido clorogênico, 5 - apigenina, 6 - apigenina-7- <i>O</i> -glucosídeo, 7 - luteolina, 8 - luteolina-7- <i>O</i> -glucosídeo, 9 - quercetina, 10 - rutina e 11 - naringenina (autorizado pelo autor).	55
Figura 16 - Representação do fluxo eletroosmótico no interior do capilar.	58
Figura 17 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke (guaraná), em diferentes pH da solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l ⁻¹ [100 mmol l ⁻¹ em Kofink e col. (2007)]; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.	67
Figura 18 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato em pH 8,5; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.....	69
Figura 19 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke (guaraná), em diferentes voltagens aplicadas. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l ⁻¹ (pH 8,5); detecção: 280 nm; 25 °C; injeção: 0,2 psi por 2 s (15/20 kV) e 0,3 psi por 3 s (30 kV); EPA: 1 mg/ml.	71
Figura 20 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de <i>Paullinia cupana</i> var. <i>sorbilis</i> (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de α-CD adicionados a solução eletrolítica. Picos: 1-Epicatequina; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4.	

Cafeína aparece antes dos 6 min. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); voltagem: 20 kV; detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml. 73

Figura 21 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de γ -CD adicionadas a solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); voltagem: 20 kV; detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.....74

Figura 22 – Eletroferograma do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná). Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ adicionada de 1,0 mmol l⁻¹ de β -CD (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.....75

Figura 23 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de β -CD adicionadas a solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 nm; EPA: 1 mg/ml. 76

Figura 24 – Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes β -CD modificadas. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; detecção: 214 nm; ; injeção: 0,3 psi por 3 s (β -CD) e 0,2 psi por 2 s (β -CD modificadas); EPA: 1 mg/ml..... 77

Figura 25 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes temperaturas do capilar. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 1,0 mmol l⁻¹ β -CD; voltagem: 20 kV; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 nm; EPA: 1 mg/ml..... 79

Figura 26 - Micela de dodecil sulfato de sódio (SDS). Com grupamentos hidrofílicos O-SO₃⁻ em contato com o tampão aquoso na parte exterior da micela, e grupamentos hidrofóbicos CH₃-(CH₂)₁₁ no interior da micela. As micelas de SDS são formadas por 62 moléculas de SDS, porém, as micelas foram desenhadas com apenas 16 moléculas para melhor visualização. 82

Figura 27 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes pH. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B1; 5-Procianidina B2; 6-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão

fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS; voltagem: 22 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....90

Figura 28 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de solução eletrolítica (tampão fosfato). Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....92

Figura 29 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de surfactante (SDS). Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B2. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....94

Figura 30 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes voltagens. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B2. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....96

Figura 31 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) com ou sem a presença de seletor quiral β-CD. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4- Procianidina B1; 5-Procianidina B2; 6-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 22 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....98

Figura 32 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes tempos de injeção de amostra. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4. A epicatequina aparece após 18 min. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; detecção: 214 nm.....100

Figura 33 - Eletroferograma do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná). Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B1; 5-Procianidina B2; 6-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 40 mmol l⁻¹ com 30 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.....101

Figura 34 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para cafeína.	113
Figura 35 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para catequina.	115
Figura 36 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para epicatequina.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Programação utilizada para o primeiro condicionamento do capilar.....	62
Tabela 2 - Programação utilizada para análise da amostra EPA por CZE	63
Tabela 3 - Programação utilizada para enxágue antes e depois das análises	63
Tabela 4 - Programação utilizada para análise da amostra EPA por MEKC	86
Tabela 5 - Eficiência eletroforética obtida para os marcadores químicos de <i>Paullinia cupana</i> utilizando o método proposto	102
Tabela 6 -Tempo de migração, velocidade e mobilidade eletroforética dos marcadores químicos presentes na amostra EPA de <i>Paullinia cupana</i>	103
Tabela 7 - Parâmetros dos picos da cafeína, catequina e epicatequina.....	112
Tabela 8 - Concentração de cafeína e suas respectivas áreas na curva de linearidade	113
Tabela 9 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da cafeína	114
Tabela 10 - Concentração de catequina e suas respectivas áreas na curva de linearidade.....	114
Tabela 11 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da catequina.....	115
Tabela 12 - Concentração de epicatequina e suas respectivas áreas na curva de linearidade	116
Tabela 13 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da epicatequina	117
Tabela 14 - Limites de Detecção (LD), Limites de Quantificação (LQ) e Intervalo para os marcadores químicos de <i>Paullinia cupana</i>	117
Tabela 15 - Concentrações obtidas no teste de precisão com amostras de 100 µg ml ⁻¹ de fração semipurificada de <i>Paullinia cupana</i> para cafeína, catequina e epicatequina	119
Tabela 16 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de <i>Paullinia cupana</i> na análise de cafeína.....	120
Tabela 17 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de <i>Paullinia cupana</i> na análise de catequina.....	120

Tabela 18 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de <i>Paullinia cupana</i> na análise de epicatequina	121
Tabela 19 - Concentrações dos marcadores químicos de <i>Paullinia cupana</i> na análise da robustez.....	122
Tabela 20 - Tempos de migração dos marcadores químicos de <i>Paullinia cupana</i> na análise da robustez.....	122

LISTA DE ABREVIATURAS

μA	Microampére
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CD	Ciclodextrina
CEC	Eletrocromatografia Capilar
CG	Cromatografia Gasosa
CGE	Eletroforese Capilar em Gel
CIEF	Focalização Isoelétrica Capilar
CITP	Isotacoforese Capilar
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CMC	Concentração Crítica Micelar
CZE	Eletroforese Capilar de Zona
DAD	Detecção Arranjo Diodo
DS	Grau de substituição
EBPC	Extrato Bruto de <i>Paullinia cupana</i>
EC	Eletroforese Capilar
EPA	Fração semi-purificada de <i>Paullinia cupana</i>
I.D.	Diâmetro Interno
ICH	Internacional Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use
kV	Kilovolts
LD	Limite de Detecção
LQ	Limite de Quantificação
MEKC	Cromatografia Eletrocínética Micelar
O.D.	Diâmetro Externo
PB1	Procianidina B1
PB2	Procianidina B2

PB4	Procianidina B4
Psi	Libra por polegada quadrada (medida de pressão)
r	Coeficiente de Correlação Linear
Rs	Resolução Eletroforética
SDS	Dodecil Sulfato de Sódio
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
α -CD	α -ciclodextrina
β -CD	β -ciclodextrina
γ -CD	γ -ciclodextrina

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
OBJETIVOS GERAIS	25
CAPÍTULO 1	23
REVISÃO DE LITERATURA	23
1 FAMÍLIA SAPINDACEAE	27
1.1 GÊNERO <i>Paullinia</i>	27
1.2 <i>Paullinia cupana</i> H.B.K. VAR. <i>sorbilis</i> (MART.) DUCKE	28
1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	31
1.4 PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS.....	34
1.4.1 Metilxantinas.....	34
1.4.2 Compostos fenólicos.....	35
1.4.3 Taninos.....	36
1.4.4 Taninos condensados.....	38
2 ELETROFORESE CAPILAR.....	41
2.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	42
2.2 INTRODUÇÃO DA AMOSTRA.....	43
2.3 CAPILARES.....	44
2.4 DETECTORES.....	45
2.4.1 Detector ultravioleta-visível (UV-Vis).....	45
2.5 FONTE DE ENERGIA.....	45
2.6 TRATAMENTO DOS DADOS.....	46
2.7 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO	46
2.7.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)	46
2.7.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).....	46
2.8 SEPARAÇÕES QUIRAIS	47
2.9 APLICAÇÕES EM PRODUTOS NATURAIS.....	49
2.9.1 Flavonoides	49
2.9.2 Alcaloides.....	50
2.9.3 Terpenoides.....	51
2.9.4 Ácidos fenólicos.....	53
2.9.5 Cumarinas	54
CAPÍTULO 2	27

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)	27
1 REVISÃO DE LITERATURA	57
1.1 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)	57
2 OBJETIVO	59
3 MATERIAL E MÉTODOS	60
3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL	60
3.2 MATERIAL	60
3.2.1 Solventes e reagentes	60
3.2.2 Material e Equipamentos	61
3.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATO	61
3.4 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)	62
3.4.1 Condições eletroforéticas	62
3.4.2 Preparo da solução da amostra	63
3.4.3 Preparo da solução enxágue	63
3.4.4 Preparo da solução eletrolítica (tampão)	63
3.4.5 Otimização das condições analíticas	64
3.4.5.1 pH do tampão	64
3.4.5.2 Concentração de tampão	64
3.4.5.3 Voltagem	64
3.4.5.4 Concentração de seletor quiral	64
3.4.5.5 Temperatura do capilar	64
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)	66
4.1.1 Efeito do pH	66
4.1.2 Efeito da concentração da solução eletrolítica	68
4.1.3 Efeito da voltagem	70
4.1.4 Seletores quirais	72
4.1.4.1 α -ciclodextrina	73
4.1.4.2 γ -ciclodextrina	74
4.1.4.3 β -ciclodextrina	75
4.1.4.4 Ciclodextrinas modificadas	77
4.1.5 Efeito da temperatura	78

4.3 CONCLUSÃO	80
CAPÍTULO 3	57
DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC).....	57
1 REVISÃO DE LITERATURA	82
1.1 CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)	82
2. OBJETIVO.....	84
3 MATERIAL E MÉTODOS	85
3.1 MATERIAL	85
3.1.1 Solventes e reagentes	85
3.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)	85
3.2.1 Condições eletroforéticas.....	85
3.2.2 Preparo da solução eletrolítica (tampão).....	86
3.2.3 Otimização das condições analíticas	86
3.2.3.1 pH do tampão	86
3.2.3.2 Concentração de tampão.....	86
3.2.3.3 Concentração de surfactante	86
3.2.3.4 Voltagem aplicada.....	87
3.2.3.5 Seletor quiral	87
3.2.3.6 Tempo de injeção de amostra.....	87
3.2.4 Determinação do tempo do fluxo eletroosmótico (EOF)	87
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	89
4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)	89
4.1.1 Efeito do pH.....	89
4.1.2 Efeito da concentração da solução eletrolítica	91
4.1.3 Efeito do surfactante	93
4.1.4 Efeito da voltagem.....	95
4.1.5 Efeito do seletor quiral	97
4.1.6 Efeito do tempo de injeção.....	99
4.1.7 Determinação do tempo do fluxo eletroosmótico (EOF)	102
5 CONCLUSÃO	104
CAPÍTULO 4	82

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR (MEKC).....	82
1 REVISÃO DE LITERATURA	106
2 OBJETIVO.....	108
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	109
3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA.....	109
3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA	109
3.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR (MEKC)	109
3.3.1 Especificidade e seletividade.....	109
3.3.2 Linearidade	109
3.3.3 Limite de detecção (LD)	110
3.3.4 Limite de quantificação (LQ).....	110
3.3.5 Precisão	110
3.3.6 Exatidão	110
3.3.7 Robustez.....	110
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	112
4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA ELETROKINÉTICA MICELAR (MEKC)	112
4.1.1 Especificidade e Seletividade	112
4.1.2 Linearidade	112
4.1.2.1 Cafeína	113
4.1.2.2 Catequina	114
4.1.2.3 Epicatequina	116
4.1.3 Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Intervalo	117
4.1.4 Precisão	118
4.1.5 Exatidão	120
4.1.6 Robustez.....	121
5 CONCLUSÃO.....	123
REFERÊNCIAS	124
ANEXOS	106

INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta uma das maiores biodiversidades do mundo, tendo em seu território cerca de 20% do número total de espécies do planeta. Sua flora é constituída pela maior variedade de plantas do mundo, correspondendo a mais de 55 mil espécies descritas (22% do total mundial), fazendo parte, grandes ecossistemas como a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. Somente na Floresta Amazônica brasileira, pode-se encontrar mais de 30 mil espécies vegetais, compreendendo cerca de 26% das florestas tropicais remanescentes no planeta (BRASIL, 2009).

No entanto, esta gigantesca biodiversidade brasileira ainda é pouco conhecida, sendo uma das grandes possibilidades de obtenção de novos produtos farmacêuticos. A exploração farmacológica da biodiversidade brasileira ainda é pequena, necessitando de pesquisas de novos recursos genéticos. Atualmente, os fitoterápicos representam aproximadamente 25% do mercado mundial de medicamentos, movimentando entre US\$500 e 800 milhões anuais (BRASIL, 2009).

Nos últimos anos surgiu um grande interesse no uso de terapias complementares e produtos naturais no tratamento terapêutico, devido aos efeitos indesejáveis dos medicamentos sintéticos junto com a crença popular de que o natural é inofensivo, e também pelo difícil acesso a medicamentos de algumas camadas da população (RATES, 2001). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 65-80% da população mundial que vive em países em desenvolvimento utilizam plantas para tratar problemas de saúde, devido à pobreza e a falta de acesso a medicamentos (CALIXTO, 2000; VEIGA JÚNIOR, 2005).

Muitos fatores têm contribuído para o crescimento de fitoterápicos no mercado mundial: a preferência da população pela medicina preventiva; a crença nos benefícios efetivos das plantas medicinais no tratamento de doenças em que as terapias e os medicamentos convencionais não tem sido eficazes; tendência a automedicação; melhoria na qualidade, eficácia e segurança aprovada das plantas medicinais e o alto custo dos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2000).

Porém, existem alguns problemas na utilização de fitoterápicos e na implementação da fitoterapia no Brasil como a publicidade de que “o que é natural não faz mal”, que exclui a possibilidade de reações adversas ou efeitos tóxicos; a proliferação da utilização e comercialização de produtos inertes ou tóxicos, independentes da comprovação da eficácia; prescrição e dispensação não regulamentadas, pois a maioria dos fitoterápicos são produtos de venda livre; baixa qualidade dos produtos e o desenvolvimento incipiente das formulações; falta de estudos de interação farmacológica; falta de estudos farmacocinéticos, para determinação de posologias adequadas; prevalência da utilização de literatura promocional

como fonte de informação, dentre outros (RATES, 2001). Frente a esses problemas, torna-se necessário uma melhor regulamentação e o incentivo a estudos farmacológicos para saná-los.

Como a maior parte da flora é quimicamente desconhecida, pesquisas com plantas medicinais baseadas nas informações de uso popular são uma fonte rica para a descoberta de novas moléculas (ELISABETSKY, 1991).

Das drogas vegetais da flora brasileira, o guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é empregado popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo, sedativo, assim como no tratamento da enxaqueca, blenorragia, epilepsia, flatulência, entre outros (CORREA, 1984). O Brasil é, praticamente, o único produtor de guaraná no mundo (SUFRAMA, 2003). São descritas duas variedades desta espécie: variedade *sorbilis*, podendo ser encontrado no baixo Amazonas, e a variedade *typica*, do alto Orenoco (CORREA, 1984). Originário da Amazônia brasileira, sua produção foi expandida para os estados do Pará, Acre, Rondônia, Mato Grosso e Bahia (SUFRAMA, 2003). De acordo com dados do IBGE de 2008, as plantações de guaranazeiros no Brasil ocupam aproximadamente 15.321 ha, dos quais 8.047 ha pertencem ao estado do Amazonas e 6.667 ha ao estado da Bahia (IBGE, 2009).

OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho tem por objetivo desenvolver, otimizar e validar uma metodologia rápida e exata empregando a eletroforese capilar na separação, identificação e quantificação de substâncias em fração semipurificada (EPA) de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná).

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 FAMÍLIA SAPINDACEAE

Pertencente a Divisão Angiospermae e Ordem Sapindales (JOLY, 2002), a família Sapindaceae é representada por cerca de 140 gêneros e 1900 espécies (BUERKI et al., 2009), distribuídas em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, sendo representado no Brasil por 24 gêneros e cerca de 400 espécies (SOUZA; LORENZI, 2005).

A família Sapindaceae constitui-se na maioria por trepadeiras com gavinhas, com caule de crescimento em espessura anômalo, ou também arbustos e mesmo árvores com folhas alternas, compostas, sem estípulas, ou às vezes inteiras (SCHULTZ, 1968). As flores são pequenas, em geral branco-esverdeadas, não vistosas, reunidas em inflorescências paniculadas axilares ou terminais. São hermafroditas ou de sexo separado, às vezes com os três tipos de flores na mesma inflorescência (poligamia), cíclicas, em geral de simetria zigomorfa, diclamídeas. Suas sépalas e pétalas são pentâmeras ou em número menor. Androceu formado em geral por oito estames. Ovário superior, tricarpetal e rilocular, cada lóculo com um só óvulo. Fruto seco indeiscente, de pericarpo de consistência cartilaginosa ou esquizocarpo, com frutículos samaróides, sempre com sementes no ápice. Semente às vezes com arilo (JOLY, 2002).

Na flora brasileira, são representados principalmente pelas espécies dos gêneros *Serjania*, *Paullinia*, *Urvillea* e *Cardiospermum*, muito frequentes nas bordas de florestas. A principal espécie de interesse econômico da família é o guaraná (*Paullinia cupana*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

1.1 GÊNERO *Paullinia*

Paullinia L. é um grupo de plantas neotropical, dentro desse gênero pode-se encontrar aproximadamente 280 espécies (www.tropicos.org) e dessas, 39 apresentam importância econômica. Algumas espécies de *Serjania* e *Paullinia* são venenosas, podendo envenenar o mel produzido por abelhas, serem utilizadas no envenenamento de flechas pelos índios, como também na pescaria mergulhando-se as plantas com raízes na água (timbó) (JOLY, 2002).

Várias espécies são conhecidas por suas propriedades medicinais: *P. barbadensis* Jacq., *P. costaricensis* Radlk., *P. cupana* Kunth, *P. emetica* R.E. Schult., *P. fuscescens* Kunth, *P. imberbis* Radlk., *P. meliifolia* Juss., *P. pinnata* L., *P. pterophylla* Triana & Planch., *P. tomentosa* Jacq., *P. trigonia* Vell. e *P. yoco* R.E. Schult. & Killip. Normalmente, essas espécies são utilizadas no tratamento de nevralgias, dores de cabeça, doenças mentais, diarreia, tensão pré-menstrual, dores pós-parto, arteriosclerose, reumatismo e também há relatos como contraceptivos. Algumas espécies como *P. cupana*, *P. yoco* e *P. pterophylla* são utilizadas na preparação de bebidas estimulantes (BECK, 1990 apud ANDRADE, 1996). Andrade (1996) ainda relata informação sobre usos, distribuição geográfica e composição

química de 41 espécies de *Paullinia*, baseadas em pesquisas de literatura botânica, médica e etnobotânica.

Weckerle, Stutz e Baumann (2003) revelaram a presença de metilxantinas em três espécies *P. cupana*, *P. pachycarpa* Benth. e *P. yoco*. Na *P. cupana*, a teobromina foi encontrada em todas as partes da planta, a teofilina apenas no pericarpo e nas sementes, e a cafeína em quase todas as partes com uma concentração de 4,28% (peso seco) nas sementes. Na *P. pachycarpa* apenas a teobromina foi detectada, em todas as partes da planta, exceto pericarpo e semente. Na *P. yoco* a teobromina e a cafeína foram detectadas em todas as partes exceto pericarpo e semente que não foram analisadas.

1.2 *Paullinia cupana* H.B.K. VAR. *sorbilis* (MART.) DUCKE

Paullinia cupana H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke, pertencente à família Sapindaceae, é um arbusto de pequeno porte, de casca muito escura e ramos tirsóides de 4 a 8 mm de diâmetro. O caule principal e os diferentes ramos apresentam sulcos profundos em número de 4 ou 5. Os ramos são pilosos na extremidade e glabros na base. As folhas (Figura 3-A) são compostas penadas com 5 folíolos, pecíolo comum de 7 a 15 cm de comprimento, nu e glabro, estípulas de 2 a 3 mm de comprimento, folíolos curto ou longo-peciolados. As flores são grandes e aromáticas, dispostas em cachos (Figura 3-B), com sépalas submembranosas de 3 mm, pétalas oblongas de 3 a 5 mm. Os frutos (Figura 3-C) são cápsulas longo-estipitadas, piriformes, elipsóides ou esféricas, apiculadas, de cor vermelha na parte superior e amarela na inferior, medindo de 2 a 3 cm. Possuem uma ou duas sementes ovóides, com tamanho aproximado de 12 mm de comprimento, testa amarelo-claro ou preta e arilo curto e cupuliforme, embrião curvo e cotilédones carnosos (MENEZES JR., 1942; CORRÊA, 1984).



Figura 3 - A) Folhas, flores, frutos e sementes (fonte: Plantas Medicinais de Kohler, 1883); B) Flores (fonte: Missouri Botanical Garden, 2005); C) Frutos do guaraná (fonte: Casa do Guaraná); D) Sementes do guaraná: com arilo, em pó e secas (fonte: Embrapa).

O guaraná necessita de terreno fértil, humoso, permeável e que contenha arenito para um bom desenvolvimento, além de condições climáticas, como chuvas abundantes e altas temperaturas (MACHADO, 1946). A floração é anual e ocorre em julho, com a frutificação começando em setembro e outubro, terminando a maturação somente em novembro e dezembro, quando então se faz a colheita (MENEZES JR., 1942).

São descritas duas variedades desta espécie: variedade *sorbilis*, considerado o guaraná verdadeiro do Brasil, podendo ser encontrado no baixo Amazonas, e a variedade *typica*, do alto Orenoco (CORRÊA, 1984).

No início dos estudos, foi demonstrado que a cafeína era o composto predominante no guaraná (HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984). A partir disso, outras substâncias foram descritas para o guaraná: taninos, saponinas, polissacarídeos, dissacarídeos, gordura, resina, substâncias mucosas, minerais, água, óleos essenciais, ácido nicotínico, colina e alcaloides (MARX, 1990; CARLSON; THOMPSON, 1998). Marx (1990) constatou que as sementes de guaraná (Figura 3-D) são ricas em catequina (6%) e epicatequina (3,8%) representando aproximadamente 80% do total de taninos encontrados.

Os efeitos medicinais do guaraná são atribuídos ao alto conteúdo de cafeína e alcaloides associados, como também quantidades consideráveis de taninos (HENMAN, 1982). O guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*) é empregado popularmente como estimulante das funções cerebrais, afrodisíaco, tônico, diurético, febrífugo, sedativo, assim como no tratamento da enxaqueca, blenorragia, epilepsia, flatulência, entre outros (CORRÊA, 1984). Além das aplicações citadas, outras utilizações já foram relatadas na literatura como: no tratamento da disenteria, arteriosclerose, nevralgia, leucorreia, entre outras (DUKE, 1985; HENMAN, 1982). Têm sido relatados que altas doses de guaraná causam efeitos no sistema nervoso central, tais como, hiperexcitação, tremor, ansiedade, irritabilidade, insônia e hipertermia; sendo contra-indicado para pessoas com hipertensão e problemas cardíacos (GRIEVE, 1967; DUKE, 1985; CASTLEMAN, 1991). Disúria é outro efeito frequentemente produzido pelo uso do guaraná (DUKE, 1985).

O guaraná é muito utilizado na indústria alimentícia na forma de xaropes, extratos e destilados, empregados principalmente como agentes flavorizantes e como uma fonte de cafeína pela indústria de refrigerantes (HENMAN, 1982; DUKE, 1985).

Sementes de guaraná [*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke], obtidas de lugares diferentes, foram analisadas quanto ao teor de taninos totais e metilxantinas. As sementes foram provenientes do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta (AMO1), e do Amazonas, de Maués (AMO2). O teor de taninos totais encontrado para AMO1 foi de $5,92 \pm 0,24\%$ e para AMO2 foi de $4,14 \pm 0,25\%$. No doseamento de metilxantinas obteve-se para AMO1 valor de $6,07 \pm 0,07\%$, enquanto que AMO2 apresentou um valor superior de $7,78 \pm 0,11\%$. A análise por CLAE apresentou, para uma fração semipurificada, tempos de retenção

de catequina, epicatequina e cafeína de 6,17, 8,85 e 11,91 min, respectivamente. Assim, pode-se confirmar a qualidade e semelhança em teores químicos entre as diferentes matérias-primas vegetais (ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004).

Amostras de sementes de guaraná provenientes da região amazônica e secas por diferentes métodos foram analisadas por técnicas farmacopeicas e outras. Realizou-se o doseamento de metilxantinas (MX) e dos taninos totais (TT), através de métodos espectrofotométricos, para a comparação das amostras. O maior teor de MX foi obtido com as sementes secas em tacho metálico por 4 h com adição de água, enquanto que o maior teor de TT foi obtido com a amostra torrada em tacho metálico por 4 h sem água (USHIROBIRA et al., 2004).

1.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O guaraná é usado na medicina popular devido aos possíveis efeitos na estimulação mental e muscular, e também por sugerir efeitos afrodisíacos e rejuvenescedores (MACHADO, 1946; HENMAN, 1982; CORRÊA, 1984). Assim, muitos estudos biológicos estão sendo realizados com o interesse em confirmar os efeitos atribuídos a esta planta.

Bydlowski, Yunker e Subbiah (1988) demonstraram que o guaraná tem ação anti-agregante e desagregante em plaquetas, podendo ser útil na prevenção ou tratamento de trombose e outros problemas vasculares.

Galduroz e Carlini (1994) realizaram uma avaliação dos efeitos da administração crônica de guaraná sobre a cognição de voluntários jovens normais e não se obteve nenhuma mudança significativa. Em voluntários idosos normais também não foi detectada nenhuma manifestação clínica (GALDURÓZ; CARLINI, 1996). No entanto, os resultados de Kennedy e colaboradores (2004) forneceram a primeira demonstração em humanos dos efeitos psicoativos do guaraná, com o desempenho cognitivo melhorado, e em 2008, Kennedy e colaboradores mostraram que a adição do guaraná a um suplemento de vitaminas e minerais pode melhorar ainda mais a performance cognitiva e a redução da fadiga.

Espínola e colaboradores (1997) demonstraram que a administração crônica (9 meses) em baixas doses de guaraná melhorou a capacidade física de camundongos, quando submetidos a uma situação de estresse do nado forçado e um efeito positivo em ratos e camundongos na aquisição de memória, ao reverter parcialmente o efeito de amnésia da escopolamina. Os ratos tratados com cafeína em doses similares ao encontrado no extrato não demonstraram nenhuma melhora nos desempenhos físico e mental. Isto sugere que estes efeitos possam ser atribuídos a outras substâncias além da cafeína, possivelmente aos taninos presentes em alta quantidade (16,0%) no pó utilizado do guaraná. Os animais tiveram a mesma média de vida útil, indicando uma baixa toxicidade do guaraná, mesmo após 23

meses de tratamento. Campos e colaboradores (2005) também obtiveram melhora no nado forçado com camundongos.

Lima e colaboradores (2005) compararam a suplementação com extrato bruto de guaraná e com extrato de guaraná descafeinado sobre o metabolismo lipídico, e demonstraram que a cafeína é responsável por grande parte dos efeitos positivos no metabolismo lipídico.

Sanches, Nagae e Audi (1999) e Otobone, Martins e Audi (2001) testaram o extrato bruto (EBPC) e semipurificado (EPA) das sementes de guaraná quanto à possível atividade antidepressiva em ratos tratados cronicamente e expostos ao modelo experimental do nado forçado e obtiveram uma resposta positiva.

Otobone e colaboradores (2005) estudaram o efeito do extrato bruto (EBPC) do guaraná, e seus constituintes semipurificados (EPA e EPB), sobre o comportamento cognitivo em ratos submetidos ao teste do labirinto aquático de Morris. EBPC e EPA mostraram menor latência para encontrar a plataforma submersa quando comparados ao grupo controle, o que sugere efeito benéfico sobre a cognição. Além disso, aumentou o número de cruzamentos no teste do campo aberto, mostrando efeito estimulante.

O guaraná demonstrou possuir efeito antioxidante inibindo o processo de peroxidação lipídica, um fato que poderia ser relacionado às altas concentrações de taninos presentes no guaraná (MATTEI et al., 1998; BASILE et al., 2005; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007). Além disso, no trabalho de Basile e colaboradores (2005) obteve-se um efeito antibacteriano significativo, expresso como concentração inibitória mínima (CIM) em bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. Em particular, *Pseudomonas aeruginosa* (CIM=16 µg/ml), *Proteus mirabilis* (CIM=32 µg/ml), *Proteus vulgaris* (CIM=32 µg/ml) e *Escherichia coli* (CIM=32 µg/ml) foram as mais inibidas.

Majhenic e colaboradores (2007) testaram atividade antioxidante e antibacteriana de diversos extratos de guaraná (água, metanol, 35% acetona e 60% etanol) com diferentes temperaturas de extração (temperatura ambiente e ebulição), observando que todos os extratos apresentaram atividade antioxidante e antibacteriana.

Extratos aquosos produzidos a partir das sementes de guaraná a 5 e 7,5% foram testados sobre a placa dental bacteriana e comparados ao gluconato de clorexidina a 0,12%, empregando-se o bochecho como forma de aplicação. Os resultados analisados comprovaram estatisticamente a eficiência destes extrativos de guaraná em relação ao controle positivo (BARBOSA; MELLO, 2004). Posteriormente, Yamaguti-Sasaki e colaboradores (2007) testaram o potencial antibacteriano *in vitro* contra *Streptococcus mutans*, confirmando o possível uso de extratos de *Paullinia cupana* na prevenção da placa bacteriana dental.

Campos e colaboradores (2003) demonstraram a atividade protetora do guaraná contra lesões gástricas induzidas por etanol e indometacina em ratos. Fukumasu e colaboradores (2006) avaliaram as propriedades antigenotóxicas/citotóxicas do guaraná em hepatócitos de camundongos injetados com *N*-nitrosodietilamina (DEN) e demonstraram seu efeito protetor contra os danos de DNA induzidos por DEN no fígado de camundongo. Posteriormente, Fukumasu e colaboradores (2008) avaliaram os efeitos do guaraná em um modelo experimental de metástase de pulmão com células de melanoma, e observaram a redução da proliferação e aumento da apoptose das células tumorais. Porém, em ensaios de indução lisogênica em *Escherichia coli* e de mutação genética bacteriana em *Salmonella typhimurium* avaliaram-se as propriedades genotóxicas e mutagênicas do guaraná, que foram positivas. O complexo formado pela cafeína e um flavonoide, provavelmente catequina ou epicatequina na presença de potássio, é o provável responsável pela atividade genotóxica (FONSECA et al., 1994). Santa Maria e colaboradores (1998) também obtiveram resultados citotóxicos *in vitro* em células bacterianas de *Photobacterium phosphoreum* e células do ovário de hamster. No entanto, deve-se notar que ambos os estudos utilizaram uma grande quantidade de guaraná se comparado aos estudos de Fukumasu.

Segundo Mattei e colaboradores (1998) o guaraná não demonstrou efeitos tóxicos em doses altas de 1000-2000 mg/kg (i.p. e p.o.) e não induziu alterações significantes em parâmetros para triagem toxicológica. No entanto, Antonelli-Ushirobira (2010) demonstrou que pelo teste toxicológico agudo em camundongos, a fração semipurificada EPA foi tóxica em altas doses apresentando LD50 de 1,825 g/kg para administração oral, e 0,827 g/kg para administração intraperitoneal. Além disso, no teste de toxicidade por repetição de dose, foram testadas as doses de 30, 150 e 300 mg/kg/dia por via oral durante 90 dias, avaliando-se o comportamento, alterações no peso, testes laboratoriais, e o peso e a histopatologia dos órgãos. Os resultados demonstraram que a fração EPA do guaraná, na menor dose avaliada (30 mg/kg), não causou nenhuma toxicidade em ratos.

1.4 PRINCIPAIS COMPONENTES QUÍMICOS

1.4.1 Metilxantinas

As metilxantinas são consideradas pseudoalcalóides em função do seu caráter anfótero, podendo se comportar como ácido ou base, e também devido aos seus precursores biogénéticos, as bases púricas. Porém, com sua atividade biológica marcante, distribuição restrita e presença de nitrogênio heterocíclico, vários autores classificam como alcalóides verdadeiros, denominados alcalóides purínicos (RATES, 2004).

São encontradas em aproximadamente 60 espécies vegetais, distribuídas nos gêneros *Coffea* (Rubiaceae), *Cola* e *Theobroma* (Sterculiaceae), *Paullinia* (Sapindaceae), *Ilex* (Aquifoliaceae) e *Camellia* (Theaceae = Ternstroemiaceae), com distribuição restrita a regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo raramente em zonas temperadas (RATES, 2004).

O doseamento de metilxantinas é realizado através de métodos gravimétricos, iodométricos, espectrofotométricos no ultravioleta e métodos cromatográficos como a cromatografia líquida de alta eficiência, a cromatografia em fase gasosa e a eletroforese capilar (AURICCHIO et al., 1987; MARX; MAIA, 1990; TAVARES, 1997; CARLSON; THOMPSON, 1998; ANDRADE et al., 1999; FARMACOPÉIA, 2000; 2003; PAGLIARUSSI et al., 2002; USHIROBIRA, 2003; SOMBRA et al., 2005; PELOZO et al., 2008).

As metilxantinas são encontradas em várias bebidas alimentícias ou estimulantes como café, chás, guaraná, cola e chocolate. As três metilxantinas farmacologicamente ativas de ocorrência natural são a cafeína, a teofilina e a teobromina (Figura 4), estando envolvidas no metabolismo do nitrogênio e do carbono nos vegetais.

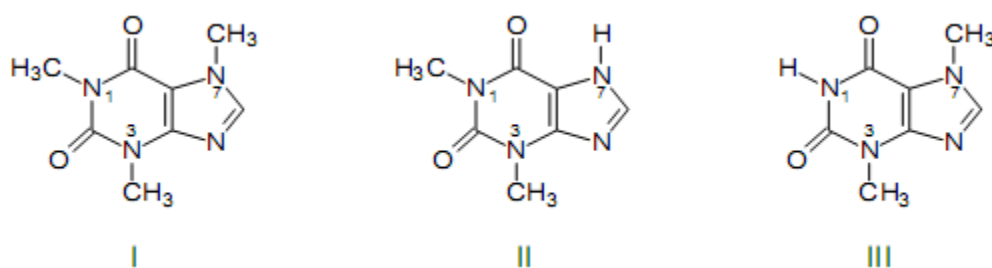


Figura 4 - I – Cafeína (1,3,7-trimetilxantina); II – Teofilina (1,3-dimetilxantina); III – Teobromina (3,7-dimetilxantina)

Em 1826, o botânico Theodor von Martius publicou a primeira análise química do guaraná, revelando ter encontrado uma substância cristalina, branca e amarga, a qual denominou guaranina e que representava 4,24% do peso seco das sementes. Em 1840, Berthelot e Dechastelus concluíram que a guaranina era a cafeína (MACHADO, 1946; HENMAN, 1982; CÔRREA, 1984). Baumann e colaboradores (1995) analisaram as sementes do guaraná (cotilédone) encontrando 4,28% de cafeína, 0,015% de teobromina e 0,007% de teofilina. Observaram que a concentração de cafeína contida no guaraná era cerca de 4 vezes maior que de *Coffea* sp., 30 vezes maior que do cacau e 10 vezes maior que de chá *Yerba*, outras bebidas conhecidas popularmente como estimulantes (EDWARDS et al., 2005).

De acordo com a Farmacopeia Brasileira (2010), o guaraná deve conter no mínimo 5% de metilxantinas. Bebidas contendo cafeína ou preparados a base de guaraná são amplamente utilizados na medicina popular como estimulantes, tônicos e revigorantes (RATES, 2004).

1.4.2 Compostos fenólicos

Compostos fenólicos são caracterizados pela presença de um anel aromático com uma ou mais hidroxilas substituintes, abrangendo uma grande variedade de substâncias encontradas em plantas. Dentre essas substâncias, tem-se os flavonóides, fenóis monocíclicos simples, fenilpropanoides, quinonas, ligninas, taninos, e às vezes podemos encontrar unidades fenólicas em proteínas, alcaloides e terpenoides (HARBORNE, 1998).

As substâncias fenólicas tendem a ser hidrossolúveis, pois ocorrem mais frequentemente combinadas com açúcares como glicosídeos e se localizam geralmente no vacúolo das células (HARBORNE, 1998).

Os compostos fenólicos apresentam a característica de complexação com proteínas por ligações de hidrogênio. Durante os processos de isolamento as membranas celulares são rompidas, fazendo com que todos os constituintes da planta se misturem, ocorrendo rapidamente a complexação de fenóis e proteínas resultando em uma inibição da atividade enzimática em extratos brutos de plantas. Porém, os fenóis são muito susceptíveis a oxidação enzimática por enzimas fenolases específicas presentes em todas as plantas, podendo haver perdas de material fenólico durante o processo de isolamento. Normalmente, previne-se essa oxidação enzimática realizando a extração dos fenóis da planta com álcool em ebulição (HARBORNE, 1998).

Como todos os compostos fenólicos são aromáticos, todos apresentam intensa absorção na região de UV do espectro (HARBORNE, 1998; CARVALHO et al., 2004). Logo, os métodos espectrométricos são especialmente importantes para as análises de identificação e quantificação de fenóis (HARBORNE, 1998).

O procedimento clássico para detectar substâncias fenólicas simples é observando colorações verde, púrpura, azul ou preta, com adição de uma solução aquosa ou alcoólica de cloreto férrico a 1% (HARBORNE, 1998).

Os compostos fenólicos contribuem para o sabor, odor e coloração de diversos vegetais, sendo muitos destes importantes economicamente pela utilização como flavorizantes e corantes de alimentos e bebidas. Têm-se relatado atividade antioxidante, sugerindo que doenças causadas pelas oxidações reativas em sistemas biológicos poderiam ser retardadas pela ingestão de compostos fenólicos (CARVALHO et al., 2004).

1.4.3 Taninos

Taninos são substâncias fenólicas hidrossolúveis, com massa molecular entre 500 e cerca de 3000 u, responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais (SANTOS; MELLO, 2004). Compreendem um grande grupo de substâncias complexas muito disseminadas no reino vegetal; em quase todas as famílias botânicas há espécies que contêm taninos. Quando ocorrem em grande quantidade, geralmente se localizam em determinados órgãos da planta como as folhas, os frutos, o córtex ou o caule (ROBBERS et al., 1997).

Os taninos possuem a habilidade de se complexarem com proteínas, formando copolímeros estáveis insolúveis em água (HARBORNE, 1998). Industrialmente, os taninos são utilizados na transformação de peles de animais em couro, onde ligações são formadas entre as fibras de colágeno na pele do animal, adquirindo resistência ao calor, água e abrasivos (SANTOS; MELLO, 2004).

Uma das maiores funções dos taninos em plantas é a de ser uma barreira para herbívoros. Dentro das células das plantas, os taninos estão localizados separadamente das proteínas e das enzimas do citoplasma, assim, quando ocorre o rompimento dessa célula, quando um animal se alimenta, por exemplo, taninos e proteínas reagem entre si produzindo adstringência e fazendo com que as proteínas se tornem resistentes às enzimas proteolíticas do suco gástrico do animal. Devido à adstringência e a dificuldade na digestão de plantas ricas em taninos, elas são amplamente evitadas pela maioria dos herbívoros (HARBORNE, 1998).

A adstringência é caracterizada como uma sensação de extrema “amarração” e secura na boca. Isto acontece pois a saliva contém entre 1,0 e 3,5 mg de proteína por ml de saliva, contendo de 16 a 33% de prolina. O fenômeno da adstringência deve, provavelmente, estar associada especificamente com a interação de polifenóis com as proteínas ricas em prolina (HASLAM, 1998).

Os taninos são compostos não cristalizáveis que, com água, formam soluções coloidais que apresentam reação ácida. Provocam a precipitação de soluções de gelatina e de alcaloides; com sais de ferro, formam compostos solúveis de coloração azul-escura ou

preto-esverdeada; são precipitados por sais de cobre, chumbo e estanho, bem como por solução forte de dicromato de potássio aquoso. Em soluções alcalinas, muitos desses derivados logo absorvem oxigênio (ROBBERS et al., 1997).

Plantas com grande concentração de taninos são empregadas popularmente como remédios para o tratamento de diversas moléstias orgânicas, tais como diarreia, hipertensão arterial, reumatismo, hemorragias, feridas, queimaduras, distúrbios estomacais, distúrbios renais e do sistema urinário e processos inflamatórios em geral (HASLAM, 1996). Acredita-se que as atividades farmacológicas dos taninos sejam consequentes de três características: complexação com íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de complexação com outras moléculas (HASLAM, 1998).

Vários pesquisadores têm investigado as atividades farmacológicas e biológicas dos taninos, identificando diversas atividades, como ação bactericida e fungicida (SCALBERT, 1991), antiviral (OKUDA et al., 1993), moluscicida (MARSTON; HOSTETTMANN, 1985), inibição de enzimas como glucosiltransferases de *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* (HATTORI et al., 1990; OOSHIMA et al., 1993) e ação antitumoral (OKUDA et al., 1989).

No tratamento de feridas, queimaduras e inflamações, as proteínas dos tecidos expostos se complexam com os taninos e formam uma camada protetora ligeiramente anti-séptica, sob a qual pode ocorrer o processo natural de cura, como pode ser observado nos trabalhos com *Stryphnodendron* spp. (barbatimão) (SANTOS; MELLO, 2004).

Quimicamente, os taninos são divididos em duas classes, com base na identidade dos núcleos fenólicos existentes e na maneira como se unem, sendo classificados como taninos hidrolisáveis e taninos condensados (ROBBERS et al., 1997).

Taninos são uma das classes mais abundantes e importantes presentes nas sementes do guaraná, sendo objeto de estudo há várias décadas (NIERENSTEIN, 1922; MARX, 1990; CARLSON; THOMPSON, 1998; USHIROBIRA, 2003).

1.4.4 Taninos condensados

Taninos condensados são oligômeros e polímeros formados pela policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3-óis e flavan-3,4-dióis para formar dímeros (Figura 5) ou oligômeros. Esta classe de taninos também é denominada como proantocianidina (SANTOS; MELLO, 2004). Os taninos condensados ocorrem em samambaias e gimnospermas e são muito comuns entre as angiospermas, estando amplamente distribuídos em espécies lenhosas (HARBORNE, 1998).

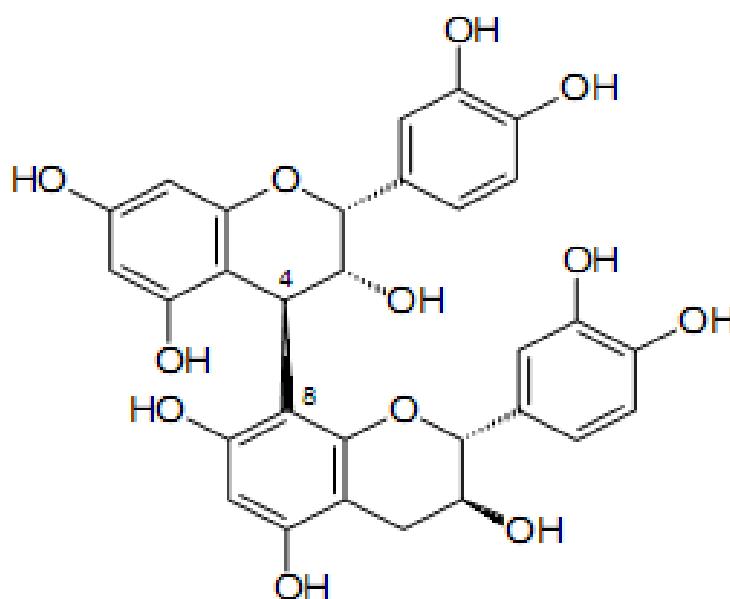


Figura 5 - Exemplo de tanino condensado [epicatequina-(4 β →8)-catequina].

Os dímeros de procianidinas são divididos em dois grupos A e B (Figura 6). Procianidinas do grupo B possuem uma ligação carbono-carbono entre C-4 da unidade “superior” e o C-8 ou C-6 da unidade “inferior”, enquanto que o grupo A possui complementarmente uma ligação do tipo éter entre o C-2 do anel C e a hidroxila na posição 7 do anel D. Normalmente, a nomenclatura é formada a partir da estrutura básica dos flavan-3-óis (SANTOS; MELLO, 2004).

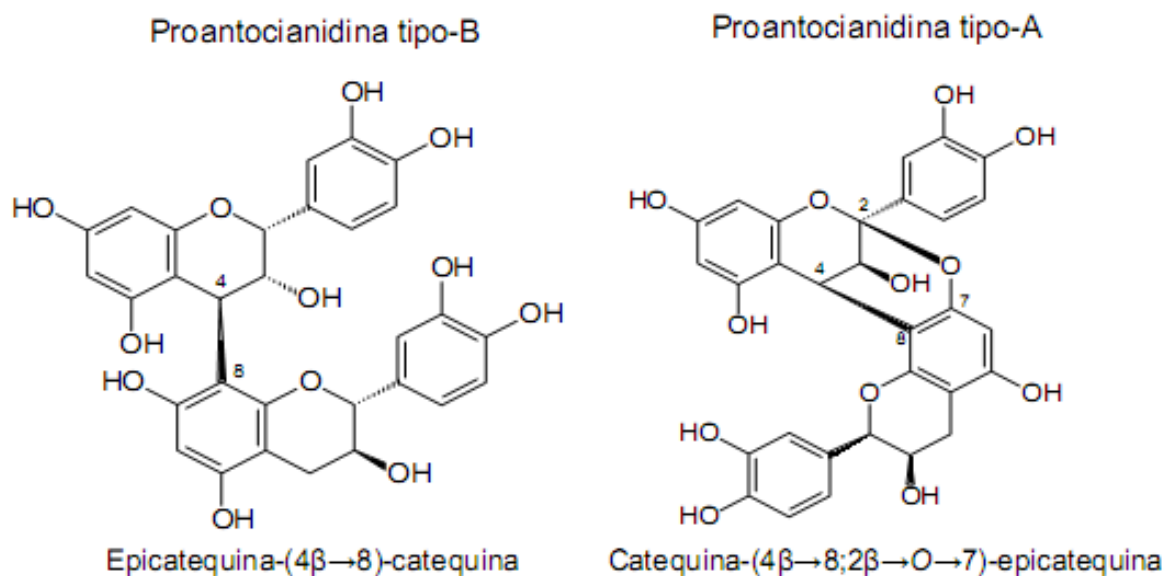


Figura 6 - Exemplos de estruturas de proantocianidinas diméricas.

Os flavan-3-óis mais encontrados são os pares diastereoisoméricos catequina e epicatequina (Figura 7) (HASLAM, 1998) e estão presentes nas sementes do guaraná (MARX, 1990; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2004; USHIROBIRA et al., 2004; ANTONELLI-USHIROBIRA et al., 2007; YAMAGUTI-SASAKI et al., 2007; PELOZO et al., 2008). Marx (1990) mostrou que as sementes de guaraná são ricas em catequina (6%) e epicatequina (3,8%) representando aproximadamente 80% do total de taninos.

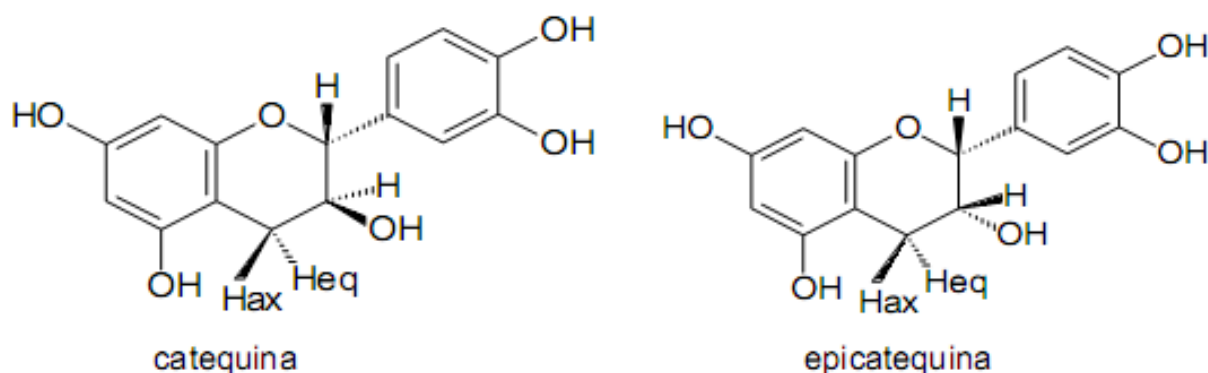


Figura 7 - Estruturas da catequina e epicatequina.

A partir do extrato bruto das sementes de guaraná, Antonelli-Ushirobira e colaboradores (2007) obtiveram a fração semipurificada EPA, a qual foi fracionada através de cromatografia em coluna de Sephadex® (CC), sendo isoladas e identificadas: cafeína,

epicatequina, catequina, procianidina B2, procianidina B3 e procianidina B4. Posteriormente, Yamaguti-Sasaki e col. (2007) identificaram mais 4 substâncias na fração semipurificada EPA, *ent*-epicatequina, procianidina B1, procianidina A2 e procianidina C1. Além disso, apresentaram testes *in vitro* comprovando potencial atividade antioxidante e antibacteriana contra *Streptococcus mutans*.

2 ELETROFORESE CAPILAR

A eletroforese é definida como o movimento, em solução eletrolítica, de substâncias carregadas eletricamente sob a influência de um campo elétrico, no qual a separação entre dois solutos ocorre de acordo com diferenças entre suas mobilidades eletroforéticas (SUNTORNUSUK, 2010). Essa técnica separa substâncias baseado nas diferenças de mobilidade eletroforética, partição de fase, potencial hidrogeniônico (pH), tamanho molecular, ou uma combinação de uma ou várias dessas propriedades (KVASNICKA, 2007).

A eletroforese capilar (EC) surgiu como um método analítico de separação e análise de substâncias químicas, complementando técnicas de separação clássicas como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), cromatografia em fase gasosa (CG) e eletroforese em gel (PREINERSTORFER et al., 2009).

As técnicas de CLAE e CG são semelhantes à EC na exibição, manipulação de dados e na automação, tendo essencialmente a união dos mecanismos de separação de eletroforese com os conceitos de instrumentação e automação da cromatografia.

A EC oferece várias vantagens quando comparada com as demais técnicas de separação, sendo rápida e eficiente, apresentando alta resolução, relativamente econômica, colunas capilares duradouras, utilização de pequenas quantidades de amostra, baixo consumo de reagentes, instrumentação altamente automatizada, e mecanismos de separação simples (ALTRIA, 1999; LECHTENBERG et al., 2004; CAO et al., 2008; PREINERSTORFER et al., 2009).

A EC pode ser empregada na análise e caracterização de uma grande variedade de analitos, desde íons inorgânicos, pequenas moléculas orgânicas, peptídeos, proteínas, ácidos nucleicos, vírus, fungos e bactérias (KVASNICKA, 2007).

A técnica de EC é frequentemente empregada na análise de produtos naturais em extratos, formulações farmacêuticas e suplementos alimentícios, sendo especialmente aplicada na análise qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários de plantas (ISSAQ, 1997, 1999; SUNTORNUSUK, 2002; UNGER, 2009).

2.1 INSTRUMENTAÇÃO

Uma das principais vantagens da EC é a utilização de uma instrumentação simples (Figura 8). O equipamento consiste de frasco de amostra, frascos de origem e destino, capilares (geralmente de sílica fundida), eletrodos (platina), uma fonte de alta tensão, um detector apropriado e um computador para o gerenciamento do sistema e tratamento de dados (TAGLIARO et al., 1998; SANTORO et al., 2000; SUNTORNUSUK, 2010).

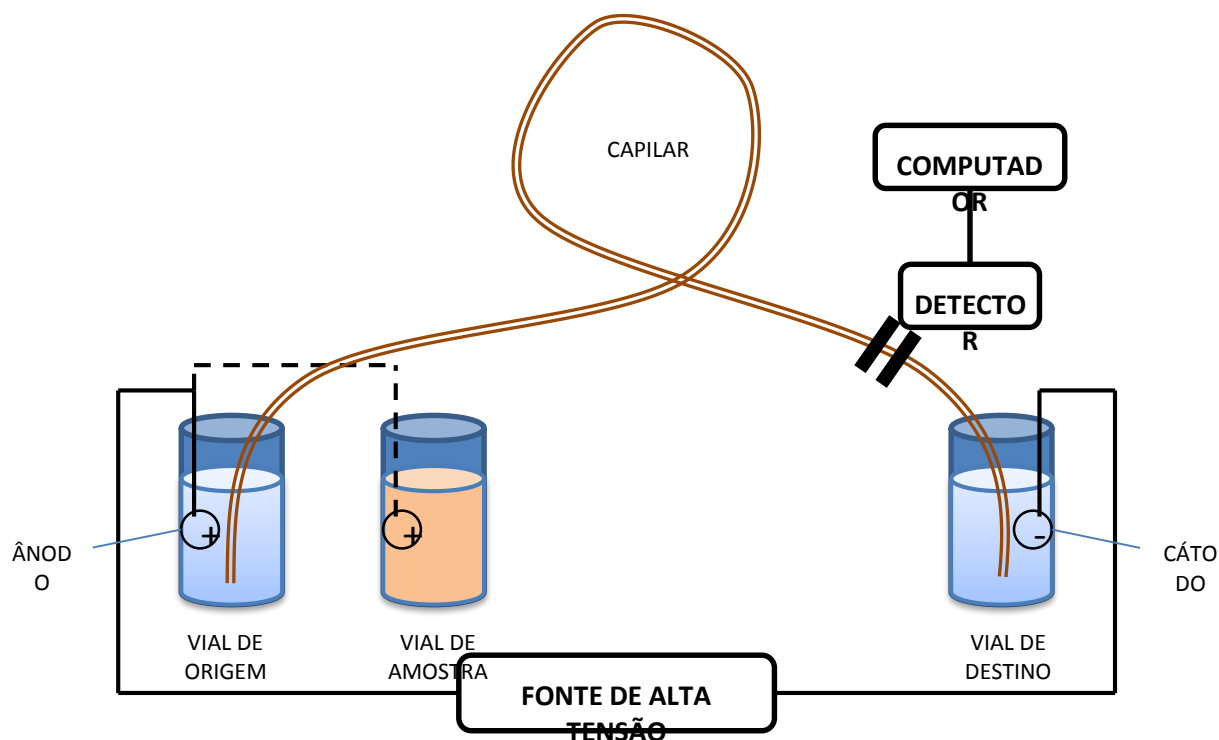


Figura 8 - Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar

Na EC, o capilar, os frascos de origem e destino são preenchidos com uma solução eletrolítica, normalmente uma solução de tampão aquoso. A extremidade de entrada do capilar é colocada no frasco de amostra, na qual a amostra é introduzida, e o capilar volta a ser colocado no frasco de origem. Posteriormente, é aplicado um campo elétrico entre os frascos de origem e destino. Os solutos migram através do capilar pela interação do fluxo eletroosmótico do tampão e da mobilidade eletroforética dos solutos, sendo então detectados e os sinais transformados e representado por eletroferograma (resposta do detector versus o tempo em minutos). Como os solutos migram através do capilar com velocidades diferentes dependendo de suas razões massa-carga, passam pelo detector em tempos diferentes, aparecendo no eletroferograma com diferentes tempos de migração.

2.2 INTRODUÇÃO DA AMOSTRA

Na EC são utilizados volumes pequenos de amostra. São colocados nos frascos de amostra de poucos microlitros a poucos mililitros, já que são introduzidos no capilar volumes na ordem de nanolitros (ISSAQ, 1997). A introdução da amostra é realizada posicionando a extremidade de entrada do capilar no frasco de amostra, podendo a amostra ser introduzida por diferentes técnicas, sendo as mais comuns as injeções hidrodinâmica e eletrocinética (LI et al., 2006).

A injeção hidrodinâmica, também conhecida como hidrostática, pode ser realizada por pressão ou gravidade. A injeção por pressão (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**-A e 7-B) pode ser feita colocando a extremidade de entrada do capilar no frasco de amostra e aplicando uma pressão nesse frasco, ou aplicando um vácuo no frasco de destino enquanto a extremidade de entrada do capilar estiver no frasco de amostra (SCHMITT-KOPPLIN; FROMMBERGER, 2003). A injeção por gravidade (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**-C) é conhecida também por sifonamento, onde a extremidade de entrada do capilar é introduzida no frasco de amostra, esse frasco é elevado acima do frasco de destino, permitindo que a amostra sifone para dentro do capilar (SUNTORNUSUK, 2002; LI et al., 2006).

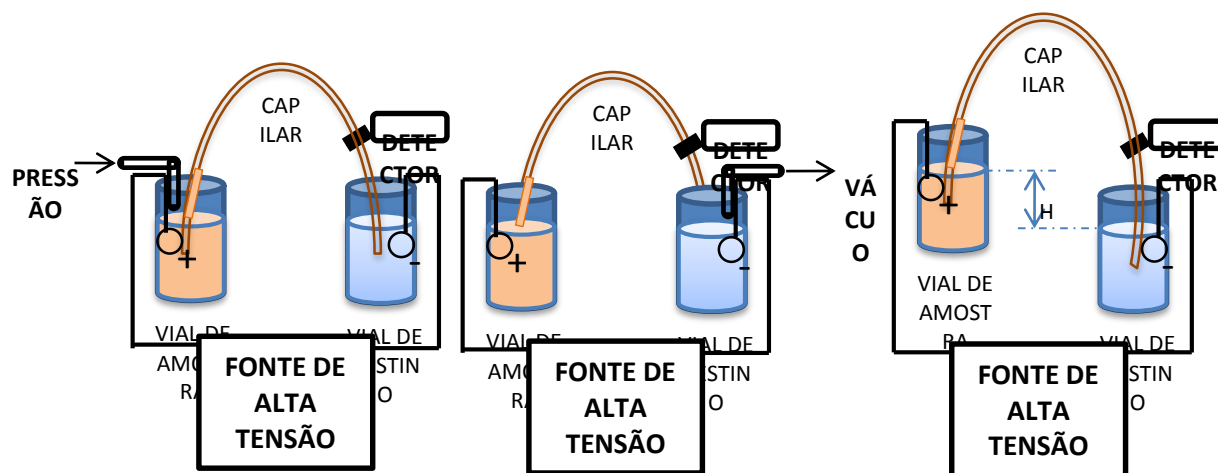


Figura 9 - Injeção hidrodinâmica por pressão (A); Injeção hidrodinâmica por vácuo (B) e Injeção hidrodinâmica por gravidade (C)

A injeção eletrocinética (Figura 10), também conhecida como eletromigração, é realizada colocando o capilar e o ânodo no frasco de amostra sendo aplicada voltagem por determinado período de tempo. Nesse caso, a amostragem não será homogênea, já que a quantidade de amostra injetada vai depender da mobilidade eletroforética de suas substâncias, ou seja, como os solutos serão introduzidos com a aplicação de um campo elétrico, solutos com alta mobilidade eletroforética migrarão mais rapidamente e em maior quantidade para o interior do capilar do que os solutos com menores mobilidades eletroforéticas (TAGLIARO et al., 1998; SUNTORNUSUK, 2002; LI et al., 2006). A injeção

eletrocinética é empregada quando se utiliza capilares preenchidos com gel, pois este oferece maior resistência para injeções por gravidade e injeções por pressão podem empurrar o gel para fora do capilar (TAVARES, 1997).

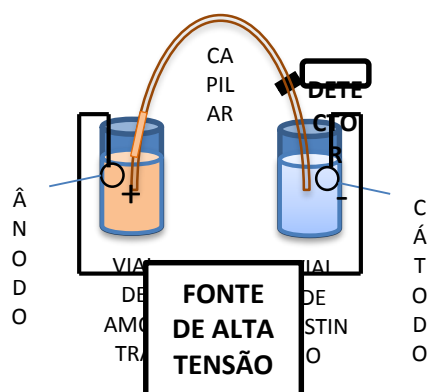


Figura 10 - Esquema geral de uma injeção eletrocinética.

2.3 CAPILARES

Geralmente são utilizados capilares de sílica fundida com diâmetro interno de 50 ou 75 μm e diâmetro externo de 375 μm , variando o comprimento de 30 a 100 cm. O capilar de sílica fundida é transparente para a luz ultravioleta e visível, permitindo o uso de baixos comprimentos de onda, podendo-se obter a detecção *on-column*, ou seja, detectando os solutos ainda dentro do capilar com o próprio capilar sendo utilizado como célula do detector, quando for utilizado o detector UV-Vis ou de fluorescência. O capilar de sílica fundida por ser facilmente quebrável, é revestido por uma camada externa de polimida, portanto é necessário fazer uma janela óptica removendo uma pequena seção de aproximadamente um centímetro deste revestimento. Retira-se por raspagem ou pela queima desse revestimento, posicionando essa janela no caminho da luz do detector (TAGLIARO et al., 1998).

2.4 DETECTORES

Na eletroforese capilar podem ser utilizados diversos tipos de detectores: ultravioleta-visível (UV-Vis), fluorescência, fluorescência induzida por laser, espectrometria de massas, condutividade, índice amperométrico, índice radiométrico e índice de refração.

Os critérios para a escolha de determinado detector são os mesmos aplicados na cromatografia líquida de alta eficiência, incluindo sensibilidade, faixa linear dinâmica e seletividade.

Os limites de detecção na eletroforese capilar são aproximadamente de 1 mg/L (ppm) a 1 µg/L (ppb).

2.4.1 Detector ultravioleta-visível (UV-Vis)

A detecção na luz ultravioleta ou visível é a mais amplamente utilizada na eletroforese capilar. A maioria das substâncias apresenta grupamentos cromóforos, ou seja, que absorvem luz. Assim, quando uma luz é incidida sobre a molécula, parte da luz é absorvida e parte é transmitida, sendo essa detectada pelo fotodetector apresentando eletroferogramas da absorbância versus tempo (ZEMANN et al., 1998). Pela lei de Lambert-Beer, a quantidade de luz absorvida ou transmitida por uma determinada solução é dependente da concentração do soluto e do caminho óptico.

$$T = e^{-a \cdot l \cdot c}$$

Onde, T – transmitância; e - logaritmo natural de Euler; a – constante; l - espessura da solução; c - concentração da solução.

Existem dois tipos de detecção por UV-Vis, um com comprimentos de onda fixos e outro por arranjo de diodos (DAD). O detector por arranjo de diodos é mais vantajoso, pois com a detecção em diferentes comprimentos de onda e com a possibilidade de análise do espectro, essa técnica permite a determinação da pureza e a identificação de alguns picos (TAGLIARO et al., 1998).

2.5 FONTE DE ENERGIA

A fonte de alta tensão é utilizada para estabelecer um campo elétrico ao longo do capilar permitindo que a eletroforese aconteça. As fontes podem ser operadas à tensão ou corrente constante, com valores que variam de 0 – 30 kV e de 0 – 300 µA, respectivamente.

Geralmente nos capilares de sílica, a direção do fluxo eletroosmótico é direcionado para o cátodo, a polaridade normal é do eletrodo positivo, ânodo, para o eletrodo negativo, o cátodo. No entanto, em casos particulares, é possível utilizar polaridade reversa, onde a

amostra é injetada no pólo negativo e os solutos migram em direção ao pólo positivo (TAGLIARO et al., 1998).

Com o uso de altas voltagens, o controle da temperatura do capilar é fundamental para uma boa análise. Com a dissipação efetiva do calor, o uso de altas voltagens apresenta vantagens como separações com alta eficiência, tempos de separação curtos e uma boa resolução entre os picos. Porém, aumentos na temperatura interna do capilar pela dissipação inadequada do calor causam mudanças na viscosidade do tampão e, conseqüentemente, na velocidade de migração dos analitos (LI et al., 2006).

2.6 TRATAMENTO DOS DADOS

Como na cromatografia líquida de alta eficiência, a eletroforese capilar dispõe de injeções de amostra automatizadas e controle do instrumento, sendo muito útil no desenvolvimento de métodos.

Podem ser realizadas análises qualitativas comparando tempos de migração de amostras e padrões, determinando qual pico corresponde a qual padrão; e análises quantitativas, já que as alturas e áreas dos picos são proporcionais à sua concentração.

2.7 TÉCNICAS DE SEPARAÇÃO

A eletroforese capilar apresenta uma grande versatilidade devido à disponibilidade de diferentes modos de separação. As técnicas de separação mais comumente utilizadas na eletroforese capilar são eletroforese capilar de zona (CZE), cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), eletrocromatografia capilar (CEC), isotacoforese capilar (CITP), eletroforese capilar em gel (CGE) e focalização isoelétrica capilar (CIEF) (SUNTORNUSUK, 2002; SILVA et al., 2007; SUNTORNUSUK, 2010).

2.7.1 Eletroforese capilar de zona (CZE)

A eletroforese capilar de zona é a mais simples das técnicas de separação, sendo também conhecida como eletroforese capilar em solução livre. É a técnica mais utilizada, pois é aplicável na separação de substâncias ionizáveis na mesma corrida, embora não seja útil na separação de substâncias neutras (TAVARES, 1997).

2.7.2 Cromatografia eletrocinética micelar (MEKC)

A cromatografia eletrocinética micelar é a técnica de escolha para separação de substâncias neutras em eletroforese capilar, sem essa técnica a aplicabilidade da eletroforese capilar seria restrita somente a separação de substâncias ionizáveis.

Essa técnica é baseada na partição dos solutos entre micelas e o tampão de corrida. A diferença entre essa técnica e a eletroforese capilar de zona é a adição de surfactantes à

solução tampão, que irão produzir as micelas (ALTRIA, 1999; SUNTORNUSUK, 2002; UNGER, 2009).

2.8 SEPARAÇÕES QUIRAIS

Separações quirais são um dos tópicos mais promissores no emergente campo da eletroforese capilar e permitem a observação de interações intermoleculares fracas e até mesmo efeitos estereosseletivos fracos nessas interações (SUNTORNUSUK, 2010). A separação de enantiômeros com seletos quirais neutros é realizada por eletroforese capilar de zona (CZE) e a separação com seletos quirais carregados realizada com cromatografia eletrocínica (MEKC) (CHANKVETADZE, 1997).

A separação por CZE é baseada na mobilidade eletroforética dos analitos carregados numa solução tampão sob efeito do campo elétrico aplicado. As mobilidades eletroforéticas dos analitos são resultados de suas diferentes densidades de carga efetiva, porém, a efetiva razão massa-carga (densidade de carga) não diferencia os enantiômeros em meio isotrópico. Logo, enantio-separação se torna impraticável na eletroforese capilar de zona original. As enantio-separações descritas para a eletroforese capilar de zona envolvem a adição de um seletor quiral na solução tampão. Logo, a enantio-separação é baseada na interação estereosseletiva dos enantiômeros com o seletor quiral e não na diferença das densidades de carga efetiva (CHANKVETADZE, 1997).

Recentemente, tem sido mostrado que a eletroforese capilar é uma excelente técnica de separação quiral. As principais vantagens dessa técnica são a alta eficiência, o rápido equilíbrio do sistema, e a possibilidade de uso de seletos quirais caros, já que são necessárias poucas quantidades. Encontram-se disponíveis dois métodos de eletroforese capilar para separação quiral: direto e indireto. O método indireto é baseado na formação de diastereoisômeros estáveis a partir de derivatização quiral com reagentes. Esses diastereoisômeros podem ser separados com um tampão eletrolítico aquiral, baseados nas propriedades físico-químicas dos diastereoisômeros. Porém, o método indireto necessita de muitos reagentes, e o próprio procedimento é demorado, podendo ocorrer racemização durante o processo. Como o método direto não apresenta essas desvantagens, é o mais utilizado atualmente. A determinação quiral direta é realizada adicionando seletos quirais diretamente na solução tampão. Seletos quirais incluem sais biliares e alguns antibióticos como a estreptomicina, mas os mais utilizados são as ciclodextrinas (CD). A cavidade da CD é relativamente hidrofóbica e capaz de receber substância de diferentes tipos, particularmente aquelas com grupos não polares. A parte exterior da CD por outro lado, é relativamente hidrofílica devido à presença de grupos hidroxilas e é capaz de interagir com partes hidrofílicas da molécula. Se os enantiômeros se encaixarem dentro da cavidade ou interagirem com a superfície externa da CD, formam diferentes constantes de ligação, sendo possível separá-

los (DEEB et al., 2008). Além disso, são utilizados mecanismos de resolução para separações enantioméricas por eletroforese capilar que incluem: complexação-inclusão, troca de ligante quiral, interações de afinidade e pares de íons, entre outros (PAN et al., 2008; FANALI, 2009).

A seletividade da separação enantiomérica para determinado analito é dependente da natureza e concentração das CD adicionadas à solução tampão, do seu grau de substituição, e da posição dos substituintes. Além disso, fatores como pH, a natureza e a concentração da solução tampão, a superfície do capilar, o modo de polaridade, a voltagem aplicada também afetam a enantioseparação (FILLET et al., 1998).

2.9 APLICAÇÕES EM PRODUTOS NATURAIS

2.9.1 Flavonoides

Lee e Ong (2000) realizaram uma análise comparativa de catequinas e teaflavinas de vários tipos de chás chineses por eletroforese capilar (EC) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os polifenóis analisados incluíram a catequina, catequina galato, epicatequina, epicatequina-3-galato, epigalocatequina, epigalocatequina-3-galato, teaflavina, teaflavina-3-monogalato, teaflavina-3'-monogalato, teaflavina-3,3'-digalato. Estas substâncias foram separadas por CLAE em 27 min, enquanto que a separação por EC foi obtida em menos de 10 min. A análise por EC foi três vezes mais rápida, no entanto, foi cinco vezes menos sensível do que a CLAE. Os autores concluíram que ambas as técnicas eram confiáveis e compatíveis com a análise, porém a pequena quantidade de solvente utilizada na análise por EC minimiza o desperdício de solvente utilizado na CLAE, sendo considerada a EC uma ferramenta prática e rápida na análise rotineira de chás.

Gotti e colaboradores (2009) avaliaram a qualidade dos extratos de chás, além de proporcionar a diferenciação de amostras de chás baseadas em suas origens geográficas, variações sazonais e processamento. Podem-se encontrar naturalmente nos chás epicatequina e epigalocatequina, no entanto, durante o processo de fabricação envolvendo aquecimento ou condições de estocagem precárias, essas substâncias podem sofrer epimerização para *ent*-catequina e *ent*-galocatequina, respectivamente. Assim, *ent*-catequina e *ent*-galocatequina quando presentes atuam como marcadores das amostras de chás que foram sujeitas a tratamento térmico. A separação por cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) foi otimizada para as substâncias mais encontradas na composição dos chás (Figura 11), sendo elas a epicatequina [(-)-EC], epicatequina galato [(-)-ECG], epigalocatequina [(-)-EGC], cafeína [CF], epigalocatequina galato [(-)-EGCG], catequina [(+)-C], *ent*-catequina [(-)-C], *ent*-galocatequina galato [(-)-GCG], teobromina [TB], teofilina [TF], *ent*-galocatequina [(-)-GC], galocatequina [(+)-GC]. Depois de validado o método, foram identificadas e quantificadas as catequinas de diversos chás provenientes de diferentes regiões da China, Japão e Ceilão. O método aplicado possibilitou a diferenciação rápida de chás com base no conteúdo de catequinas associado com o processamento e armazenamento desses produtos.

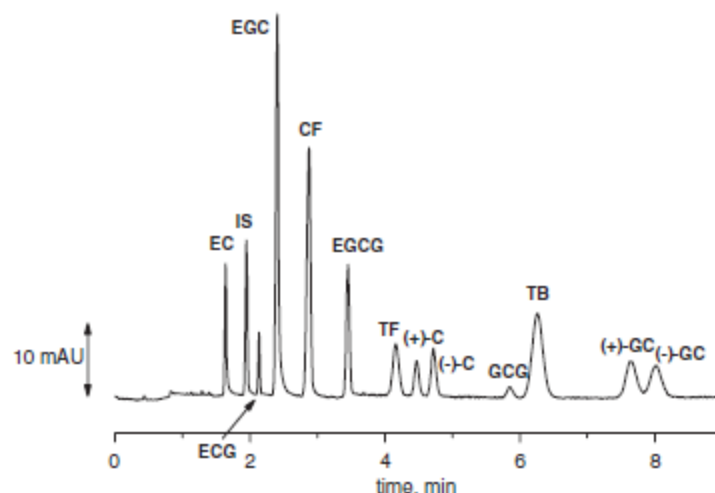


Figura 11 -Eletroferograma CD-MEKC de mistura de padrões de catequinas e metilxantinas. Condições de separação: 25 mmol l⁻¹ borato-fosfato (pH 2,5), com SDS 90 mmol l⁻¹ e hidroxipropil- β -CD 25 mmol l⁻¹. Capilar de sílica fundida (50 μ m I.D., 30 cm comprimento total, 8,5 cm comprimento efetivo); voltagem 15 kV; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica a 25 mbar por 2 s; detecção à 200 nm (autorizado pelo autor).

2.9.2 Alcaloides

Os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados em uma variedade de plantas, além de serem identificados como carcinogênicos. Yu e colaboradores (2005) desenvolveram uma metodologia para separação de quatro alcaloides pirrolizidínicos tóxicos, senquirquina, senecionina, retrorsina e senecifilina. Os alcaloides foram separados em 17 min. A determinação destes alcaloides pirrolizidínicos foi realizada em dois fitomedicamentos tradicionais chineses (*Qian liguang* e *Kuan donghua*), porém nenhum deles foram encontrados em *Qian liguang*, e somente um alcaloide foi detectado em *Kuan donghua*.

Yuan e colaboradores (2010) desenvolveram um método para separação de alcaloides tropânicos, entre eles atropina, anisodamina e escopolamina, por EC não aquosa acoplada com dois detectores, o detector de eletroquimioluminescência (ELC) e de eletroquímica. Os alcaloides foram separados em 4,5 min (utilizado capilar curto de 18 cm). Essa metodologia foi aplicada na determinação desses alcaloides em extrato de *Flos daturae*, com a identificação dos picos realizada por adição de padrões a amostra.

Na ciência forense, diversos métodos analíticos são utilizados a fim de identificar substâncias presentes em narcóticos. Um bom exemplo são as drogas opioides derivadas de *Papaver somniferum* L. No ópio já foram reportados mais de 40 alcaloides, sendo de importância medicinal e forense, a morfina, codeína, tebaína, papaverina e narcotina. Reddy et al. (2003) descreveram uma metodologia por CZE para análise qualitativa e quantitativa dessas cinco substâncias no ópio (Figura 12). Os alcaloides foram separados dentro de 20

min, com limites de detecção de 850 ng/ml para morfina, 450 ng/ml para tebaína, 500 ng/ml para codeína e narcotina e 550 ng/ml para papaverina.

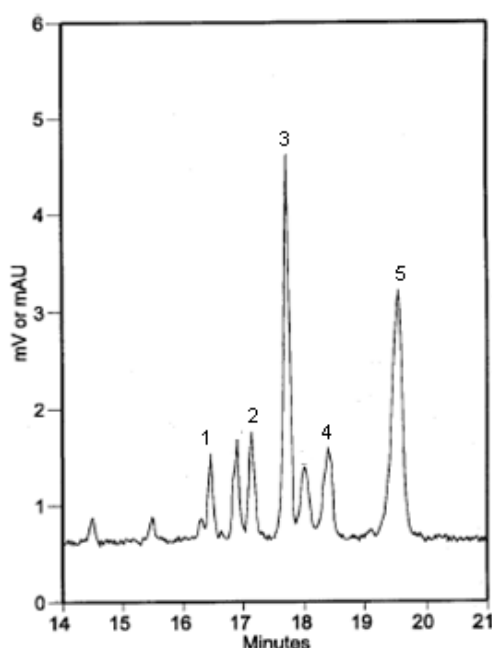


Figura 12 - Perfil de separação por CZE de amostra de resina de ópio nas condições otimizadas. Condições – eletrólito: metanol – acetato de sódio (pH 3,1) em água (7:3; v/v), 15 kV, detecção à 224 nm. Picos: 1-tebaína, 2-codeína, 3-morfina, 4-papaverina, 5-narcotina (autorizado pelo autor).

2.9.3 Terpenoides

A separação quiral de monoterpenos, incluindo α -pineno, β -pineno, canfeno e limoneno, foi apresentado por Gahm e colaboradores (1997) utilizando β -CDs sulfatadas e α -CD como seletos quirais na CZE com polaridade reversa. Inicialmente foi utilizado somente β -CDs sulfatadas e não se observou a enantioseparação dos terpenoides, no entanto, com a adição da α -CD no eletrólito contendo $6,5 \text{ mmol l}^{-1}$ de β -CDs sulfatadas, obtiveram-se diferenças na mobilidade dos enantiômeros dos terpenoides resultando na sua separação. Dos quatro monoterpenos estudados, concluiu-se que o α -pineno é o terpenoide que se liga mais fortemente com os seletos quirais testados, e o limoneno o que se liga mais fracamente.

A cromatografia eletrocinética com microemulsão foi utilizada para analisar oito ácidos fenólicos e cinco diterpenoides por Cao e colaboradores (2008). Foram desenvolvidos e comparados dois tipos de métodos da cromatografia eletrocinética com microemulsão, um utilizando uma microemulsão óleo-água e outro água-óleo (Figura 13). Para otimização dos métodos foram estudados os efeitos do tipo e concentração de óleo, da concentração do modificador orgânico, SDS e tampão, na separação das substâncias. Comparando os dois

métodos, a desvantagem mais aparente do método água-óleo foram baixas eficiências e simetria dos picos relativamente pobres. Além disso, no método óleo-água se obteve uma separação mais rápida de todos os analitos em 35 min comparado aos 39 min do método água-óleo. Com base na comparação definiu-se o método óleo-água como sendo o melhor, sendo este validado e aplicado na análise de um tradicional medicamento chinês derivado a partir das raízes e rizomas secos de *Salvia miltiorrhiza* Bunge, conhecido como *Radix et Rhizoma Salviae Miltiorrhiza* (RRSM).

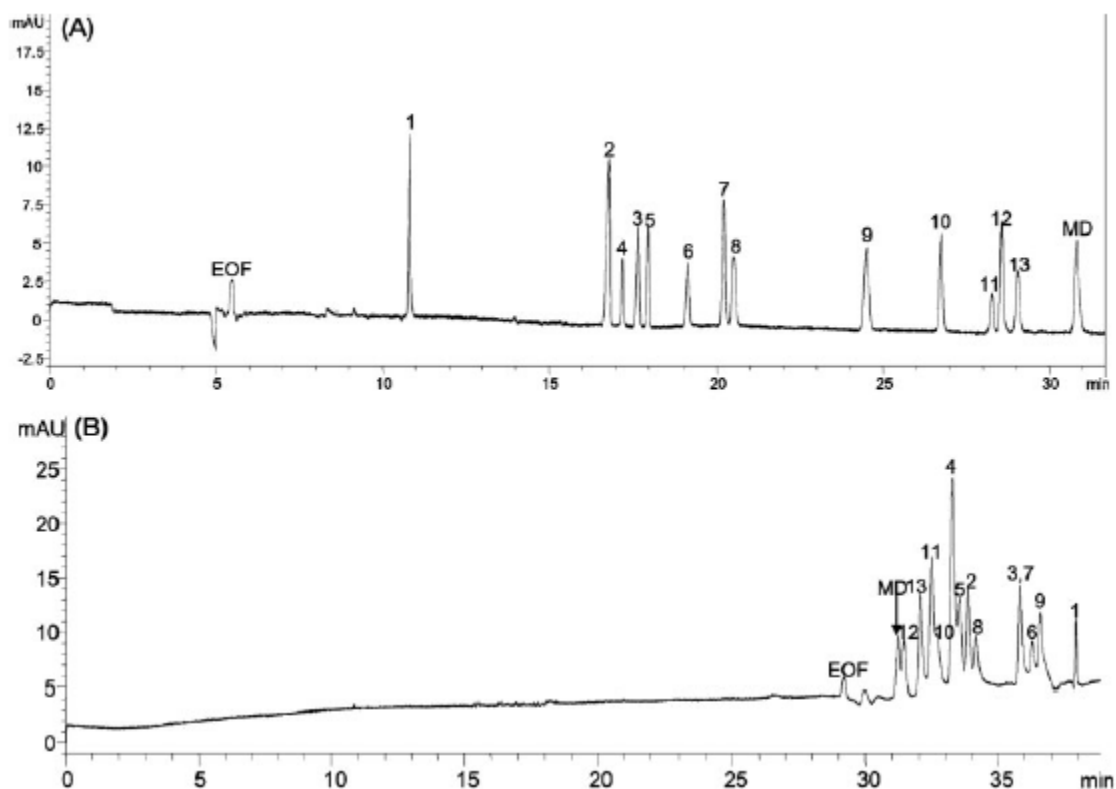


Figura 13 - Eletroferogramas de oito ácidos fenólicos e cinco diterpenoides determinados por cromatografia eletrocínética com microemulsão pelos métodos: (A) óleo-água e (B) água-óleo. Condições de separação: (A) 0,6% (p/v) ciclohexano, 3,0% (p/v) SDS, 6,0% (p/v) 1-butanol, 3,0% (p/v) acetonitrila e 87,4% (v/v) tampão tetraborato de sódio (pH 8,0); (B) 48% (p/v) 1-butanol, 18% (p/v) SDS, 8,0% (p/v) 2-propanol e 26% (p/v) tampão acetato de sódio (pH 8,0). Onde: EOF - fluxo eletrosmótico, MD – droplets da microemulsão, 1 – aldeído protocatéquico, 2 – ácido rosmarínico, 3 – danshensu, 4 – miltirona, 5 – ácido salvianólico C, 6 – ácido cafeico, 7 – ácido litospérmico, 8 – ácido salvianólico B, 9 – ácido protocatéquico, 10 – diidrotanshinona I, 11 – criptotanshinona, 12 – metileno tanshiquinona, 13 – tanshinona IIA (autorizado pelo autor).

Cheung e Zhang (2008) desenvolveram uma metodologia em eletroforese capilar de zona com adição de CDs para separação de triterpenos, flavonoides e substâncias fenólicas. Oito substâncias, sendo três triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido betunílico),

três ácidos fenólicos (ácido rosmarínico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico) e dois flavonoides (quercetina e rutina), foram separadas dentro de 20 min (Figura 14). A metodologia foi aplicada na determinação dessas substâncias em amostras de *Prunella vulgaris* L. e em bebidas derivadas dessa planta, sendo detectado o ácido rosmarínico e os três triterpenos (ácidos ursólico, oleanólico e betunílico) nas amostras de *P. vulgaris* e somente o ácido rosmarínico nas bebidas.

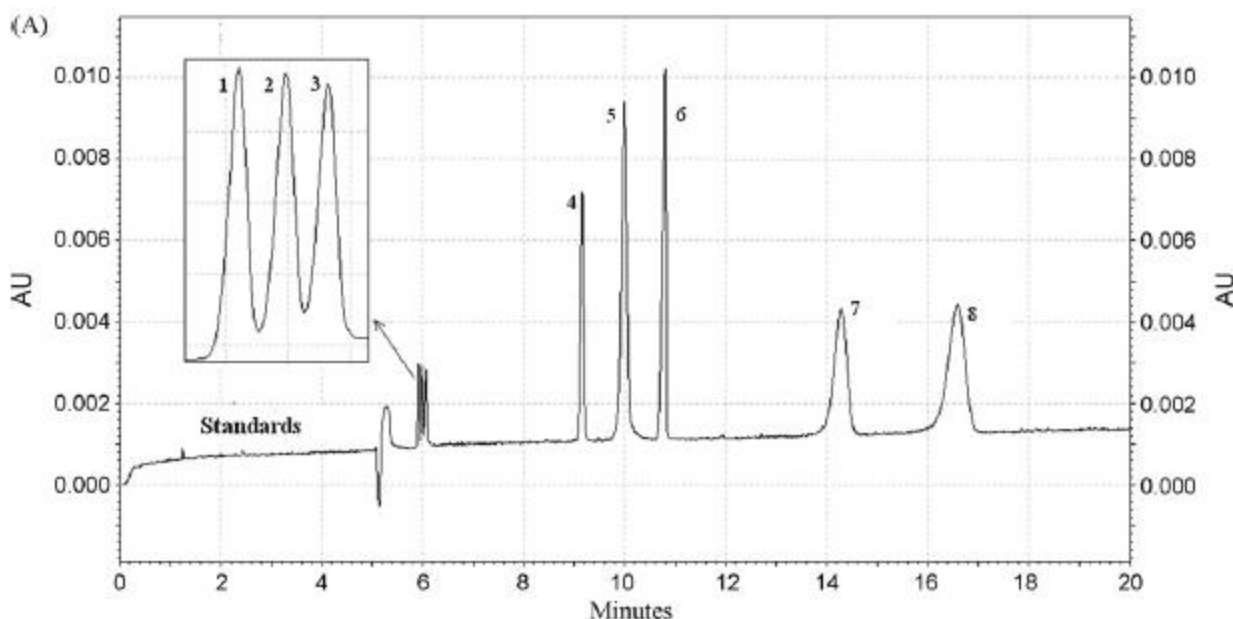


Figura 14 - Eletroferograma dos padrões. Condições: 40 mmol L⁻¹ tetraborato de sódio (pH 9,4), 2 mmol L⁻¹ β-CD, 4% (v/v) MeOH, 25 kV a 25 °C, 210 nm. Picos: 1 - ácido oleanólico, 2 - ácido ursólico, 3 - ácido betunílico, 4 - rutina, 5 - quercetina, 6 - ácido *p*-cumárico, 7 - ácido rosmarínico, 8 - ácido cafeico, IS - padrão interno (autorizado pelo autor).

2.9.4 Ácidos fenólicos

Andrade e colaboradores (2001) compararam a CZE com a CLAE com relação à análise de substâncias fenólicas em vinhos. Foram testados diversas amostras de vinhos Albarinho (espanhol), Alvarinho (português) e Loureiro (português), sendo que todos apresentaram um perfil qualitativo semelhante, porém apresentaram diferentes perfis quantitativos dependendo da variedade da uva. As principais substâncias fenólicas detectadas e identificadas foram tirosol, epicatequina, ácido sirínico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido 3,4-dihidroxibenzóico, ácido tartárico *cis*-cumaroil, ácido tartárico *trans*-cumaroil, ácido tartárico cafeoil. Pela comparação das metodologias, a eletroforese capilar provou ser mais conveniente para análises rotineiras desses vinhos, devido a melhor separação das diferentes substâncias, melhores formatos dos picos e menor tempo de análise que a CLAE (Figura 15 e Figura 16).

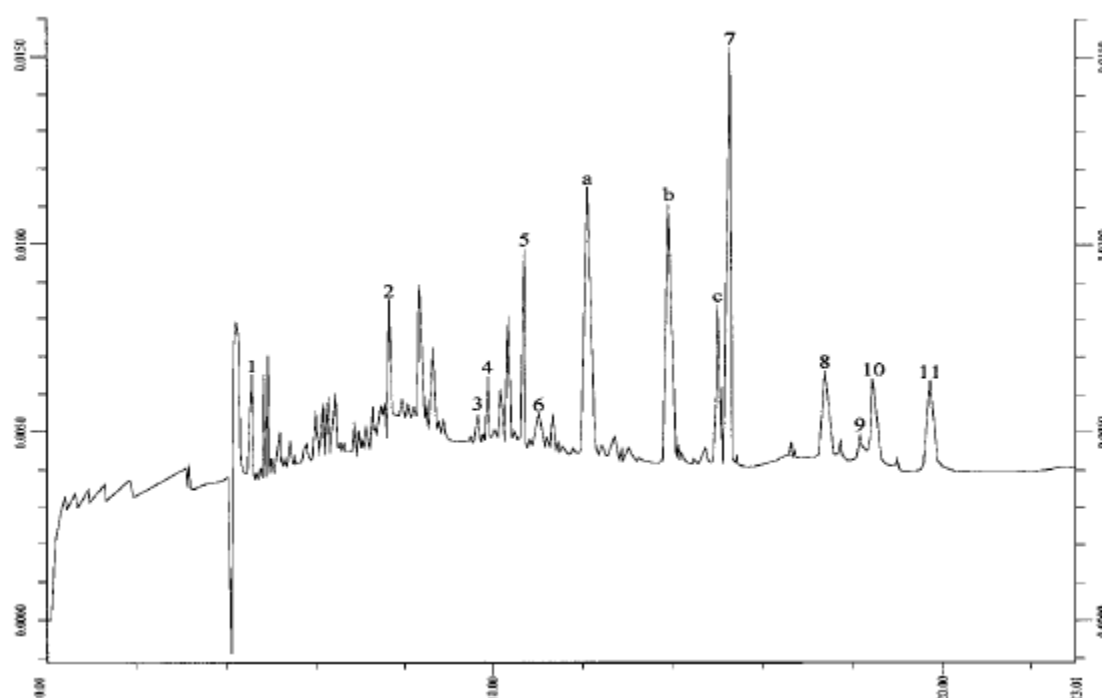


Figura 15 - Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por eletroforese capilar. Picos: 1 – tirosol, 2 – epicatequina, 3 – ácido sirínico, 4 – ácido ferúlico, 5 – ácido *p*-cumárico, 6 – ácido cafeico, 7 – ácido gálico, 8 – ácido 3,4-dihidroxibenzóico, 9 – ácido tartárico *cis*-cumaroil, 10 - ácido tartárico *trans*-cumaroil, 11 - ácido tartárico cafeoil; a, b, c – ésteres hidroxicinâmicos (autorizado pelo autor).

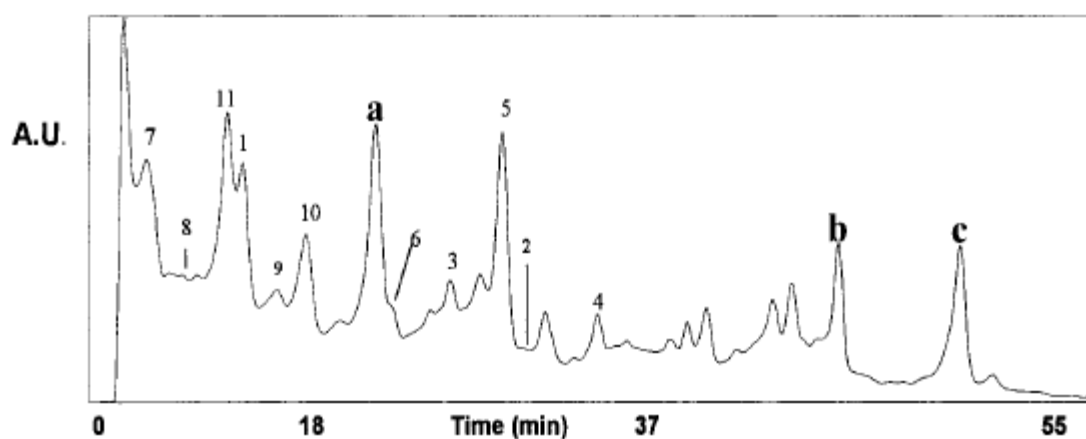


Figura 16 - Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por CLAE. Picos como figura anterior (autorizado pelo autor).

2.9.5 Cumarinas

A determinação simultânea de cumarinas foi descrita por Wang et al. (2007) utilizando a CZE com detecção indireta de fluorescência induzida por laser. Nesse trabalho foram separados a esculetina, isofraxidina, genisteína, naringina e soforicosídeo. Essa metodologia

foi aplicada para análise de diversas cumarinas de amostras de *Fructus sophorae japonicae* e *Herb sarcandrae*, porém algumas substâncias não puderam ser bem separadas devido a complexidade dos componentes da amostra, muitas vezes coexistindo com outras substâncias desconhecidas. No extrato de *Fructus sophorae japonicae* foi quantificado o soforicosídeo, já no extrato de *Herb sarcandrae* foi possível quantificar 3 cumarinas, sendo elas a esculina, isofraxidina e esculetina.

A eletrocromatografia capilar foi utilizada na análise de extratos de camomila (*Chamomilla recutita* (L.) Rauschert) por Fonseca et al. (2007). Em menos de 7,5 min, 11 substâncias fenólicas foram bem separadas (Figura 17), sendo elas cumarinas (herniarina, umbeliferona), fenilpropanoides (ácido clorogênico, ácido cafeico) e flavonoides (apigenina, apigenina-7-O-glucosídeo, luteolina, luteolina-7-O-glucosídeo, quercetina, rutina e naringenina). A metodologia foi aplicada a diversos extratos de camomila (metanólico, etanólico e glicólico), e todos apresentaram o mesmo perfil sendo capaz de se identificar os ácidos cafeico e clorogênico, apigenina, quercetina, umbeliferona e herniarina; as demais substâncias não puderam ser identificadas devido a baixa intensidade dos picos.

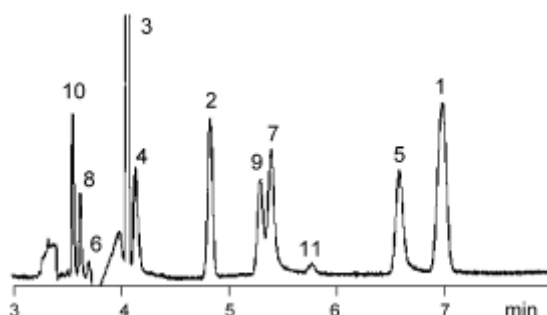


Figura 17 - Cromatograma capilar de substâncias fenólicas padrões da camomila por eletrocromatografia capilar SCX-C18. Condições: coluna SCX/C18, 50 μ m I.D., partícula de 3 μ m; injeção de 12 bar/ 0,4 min; voltagem aplicada de 25 kV, temperatura de 25 $^{\circ}$ C, detecção à 337 nm. Picos: 1 - herniarina, 2 - umbeliferona, 3 - ácido cafeico, 4 – ácido clorogênico, 5 - apigenina, 6 - apigenina-7-O-glucosídeo, 7 - luteolina, 8 - luteolina-7-O-glucosídeo, 9 - quercetina, 10 - rutina e 11 – naringenina (autorizado pelo autor).

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)

A eletroforese capilar de zona é também chamada de eletroforese capilar em solução livre, sendo a técnica mais comumente utilizada devido a sua ampla aplicabilidade em separações de substâncias iônicas. No entanto, por essa técnica não é possível a separação de substâncias neutras, pois estas saem todas em um único pico no eletroferograma (TAVARES, 1997).

Antes da corrida da amostra, normalmente é feito uma lavagem do capilar com uma solução básica. No caso dos capilares de sílica fundida, na presença dessa solução básica, os grupamentos silanóis (Si-OH) da superfície do capilar serão ionizados para grupamentos silanoatos (Si-O⁻) carregados negativamente. Após essa ionização, o capilar é enxaguado com tampão, assim, os grupamentos silanoatos atrairão fortemente os cátions positivamente carregados do tampão, formando uma camada interna de cátions e moléculas de águas orientadas na parede do capilar, permanecendo fixos à superfície definindo um plano conhecido como plano interno de Helmholtz (IHP) (TAVARES, 1996; TAGLIARO et al., 1998; SCHMITT-KOPPLIN; FROMMBERGER, 2003). Os íons próximos do plano interno de Helmholtz interagem com a superfície dependendo de suas propriedades químicas (adsorção não-específica), formando um plano conhecido como plano externo de Helmholtz (OHP), delimitando a camada compacta da dupla camada elétrica. A concentração desses íons vai diminuindo gradualemente à medida que a distância dos íons em relação à superfície negativa aumenta, alcançando uma concentração próxima a dos íons na solução tampão. Esta região é conhecida como camada difusa da dupla camada elétrica, e como não se encontra fortemente ligada à superfície apresentam certa movimentação (TAVARES, 1996; SUNTORNSUK, 2002; VALLS et al., 2009).

Entre essas duas camadas existe um plano de cisalhamento, e quando aplicado o campo elétrico, é criada uma diferença de potencial entre essas duas camadas, chamado de potencial zeta (ζ). Assim, quanto maior a espessura da dupla camada, maior o potencial zeta (ζ), e maior o fluxo eletroosmótico. Lembrando que a espessura da dupla camada é inversamente proporcional à concentração do tampão. Quando um campo elétrico é aplicado, os cátions da camada difusa são atraídos em direção ao cátodo carregado negativamente. Como estes íons são solvatados, transportam suas águas de hidratação induzindo um fluxo da solução como um todo, o fluxo eletroosmótico (Figura 18) (SCHMITT-KOPPLIN; FROMMBERGER, 2003).

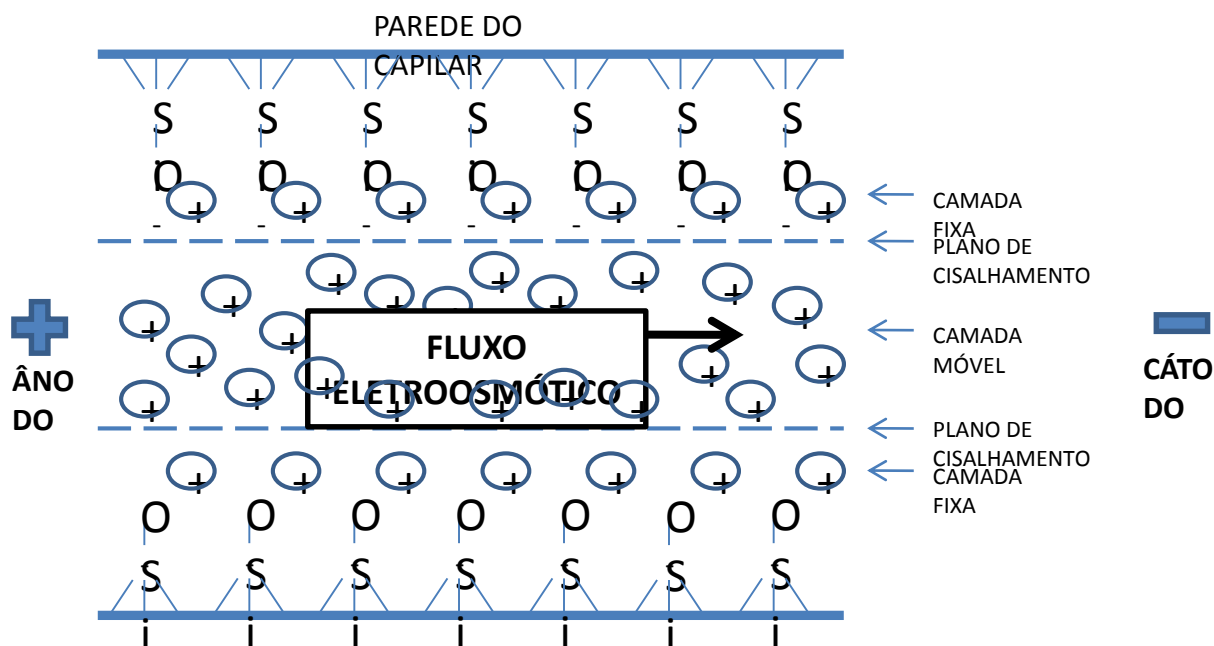


Figura 18 - Representação do fluxo eletroosmótico no interior do capilar.

Na eletroforese capilar de zona, tanto o capilar quanto os frascos de origem e destino são preenchidos com o mesmo tampão. A partir do momento que a amostra é introduzida no capilar e a voltagem é aplicada, os solutos vão migrar pelo capilar em forma de zonas. A diferença de potencial entre os eletrodos produz um fluxo eletroosmótico que carrega todos os solutos pelo capilar do ânodo para o cátodo, no entanto, os solutos serão separados pela diferença entre as suas mobilidades eletroforéticas. A mobilidade eletroforética é baseada na razão massa-carga (m/z) de cada soluto, sendo causada pela atração que os solutos com carga sofrem ao eletrodo com carga oposta a sua, ou seja, solutos carregados negativamente serão atraídos pelo ânodo e solutos carregados positivamente serão atraídos pelo cátodo. Ou seja, a velocidade de cada soluto será a interação da mobilidade eletroforética de cada soluto com o fluxo eletroosmótico do sistema. Assim, a ordem de eluição será cátions, neutros e ânions. Porém, os íons serão totalmente separados enquanto as substâncias neutras, por apresentarem a mesma mobilidade eletroforética, eluirão todas no mesmo pico sofrendo a ação somente do fluxo eletroosmótico (TAGLIARO et al., 1998).

2 OBJETIVO

Esse capítulo do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar utilizando a técnica de separação eletroforese capilar de zona (CZE), com o intuito de separar e identificar marcadores químicos de extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná), possibilitando a análise dos enantiômeros da catequina e epicatequina.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATÉRIA-PRIMA VEGETAL

As sementes da planta *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke foram adquiridas do Sr. José Augusto de Souza, do Estado de Mato Grosso, região de Alta Floresta, Sítio Nossa Senhora Aparecida, Rodovia MT 325, km 8. Uma exsicata foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Maringá sob número HUEM 9.065. Sua identificação foi realizada pela Profa. Dra. Cássia Mônica Sakuragui. As sementes foram torradas e secas em tacho de ferro no local de coleta. No laboratório de Biologia Farmacêutica (PALAF) foram moídas em moinho de martelos.

3.2 MATERIAL

3.2.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas Baker®, Sigma®, Synth® ou quando especificadas.

- Acetato de etila
- Acetona
- Ácido bórico
- Água destilada - UEM
- Água Ultrapura (Milli-Q) - Millipore
- Hidróxido de sódio
- Metanol
- Nitrogênio líquido - UEM
- Tetraborato de sódio anidro
- α -ciclodextrina
- β -ciclodextrina
- γ -ciclodextrina
- β -ciclodextrina carboxilada (DS = 3) – Laboratório Química (UEM)
- β -ciclodextrina acetilada (DS = 4) – Laboratório Química (UEM)
- β -ciclodextrina acetilada (DS = 5) – Laboratório Química (UEM)
- Padrões de cafeína, $\pm$ catequina, epicatequina, procianidina B1 (PB1), procianidina B2 (PB2) e procianidina B4 (PB4).

3.2.2 Material e Equipamentos

- Aparelho de Eletroforese Capilar modelo P/ACE System MDQ da Beckman Coulter, equipado com detector UV-vis e software Karat versão 8.0 de aquisição e tratamento de dados.
- Aparelho de ultra-som Unique USC Cleaner 1450, 25 KHz
- Balança Mettler Toledo AT 201
- Bomba a vácuo Vaccubrand Labortechnik tipo MZ 2C
- Capilares de sílica fundida revestidos externamente com poliimida com diâmetro interno de 50 µm, diâmetro externo de 375 µm.
- Evaporadores rotatórios Buchi R-114
- Liofilizadores Christ Alpha 1-4
- Membrana Millipore HAWP01300 0,45 µm
- Micropipeta Eppendorf (10 a 1000 µl)
- Moinho de martelos Tigre ASN-5
- Medidor de pH microprocessado de bancada Gehaka mod PG1800

3.3 PREPARAÇÃO DE EXTRATO

O extrato foi preparado das sementes do guaraná (1000 g) com líquido extrator acetona:água (7:3, v/v) por 15 min em turbólise. Após remoção do solvente orgânico, o extrato foi liofilizado obtendo-se o extrato bruto (EBPC – patente PI0006638-9). A partir do EBPC, realizou-se a partição com acetato de etila (10x0,5 l), resultando-se em duas frações semipurificadas, a fração aquosa e a fração acetato de etila (EPA - patente PI0006638-9). A amostra testada foi a fração semipurificada EPA, sendo solubilizada em água e metanol antes da injeção no equipamento de eletroforese capilar.

3.4 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)

O início do desenvolvimento baseou-se no trabalho de Kofink e colaboradores (2007). Nesse artigo, demonstrou-se a separação quiral dos enântiômeros catequina e *ent*-catequina, epicatequina e *ent*-epicatequina, com as condições: capilar de sílica fundida 75 µm I.D. x 375 µm O.D., cortado em 50 cm, com comprimento efetivo de 40 cm, solução eletrolítica de 100 mmol l⁻¹ tampão borato (pH 8,5) adicionado de 12,0 mmol l⁻¹ (2-hidroxi)-propil-γ-ciclodextrina, voltagem de 18 kV, detecção em 280 nm, temperatura de 20 °C, injeção de amostra por pressão por 3 s a 0,3 psi. A partir dessas informações, tentou-se reproduzir a mesma separação.

3.4.1 Condições eletroforéticas

Foi utilizado um sistema capilar eletroforético Beckman P/ACE MDQ equipado com sistema de detecção de UV-Vis. Os dados foram processados em software Beckman 32 Karat versão 8.0. Capilar não revestido de sílica fundida de 375 µm O.D. x 50 µm I.D. foi obtido da Beckman Coulter e cortado com 50 cm (40 cm de comprimento efetivo). O primeiro condicionamento de um capilar novo foi realizado conforme especificações da Tabela 1. Na análise, a temperatura do capilar foi ajustada para 25 °C e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente. Injetou-se água ultrapura antes e depois de injetar a amostra dentro do capilar, evitando-se a contaminação do vial da amostra com pequenas quantidades de tampão. As condições empregadas nas análises estão especificadas na Tabela 2. A identificação dos analitos foi alcançada adicionando-se padrões na amostra. Após o fim das análises e antes do início das mesmas, era realizado um enxágue do capilar (Tabela 3).

Tabela 1 - Programação utilizada para o primeiro condicionamento do capilar

Condicionamento	60 min	20 psi	1,0 mol l ⁻¹ NaOH
Condicionamento	60 min	20 psi	água ultrapura

Tabela 2 - Programação utilizada para análise da amostra EPA por CZE

Condicionamento	5 min	20 psi	1,0 mol l ⁻¹ NaOH
Condicionamento	7 min	20 psi	Água ultrapura
Condicionamento	10 min	20 psi	Tampão de separação
Injeção	2 s	0,2 psi	Água ultrapura
Injeção	3 s	0,3 psi	Amostra
Injeção	2 s	0,2 psi	Água ultrapura
Separação	12 min	20 kV	Separação

Tabela 3 - Programação utilizada para enxágue antes e depois das análises

Condicionamento	10 min	20 psi	1,0 mol l ⁻¹ NaOH
Condicionamento	20 min	20 psi	água ultrapura

3.4.2 Preparo da solução da amostra

A amostra foi preparada pesando-se 10,0 mg de fração semipurificada EPA, solubilizando em 100 µl de metanol e completando-se o volume para 10,0 ml de água ultrapura, obtendo-se uma solução de amostra na concentração de 1,0 mg/ml. A solução foi filtrada utilizando membrana Millipore de 0,45 µm antes de ser injetada no aparelho de CE. Em todas as análises deste capítulo foi utilizada a fração semipurificada EPA na concentração de 1 mg/ml.

3.4.3 Preparo da solução enxágue

Uma solução básica de hidróxido de sódio 1 mol l⁻¹ foi preparada pesando-se 4,0 g de hidróxido de sódio e solubilizando em 100,0 ml de água ultrapura. A solução foi filtrada utilizando membrana Millipore de 0,45 µm, e foi injetada por 5 min entre corridas. Além disso, após cada enxágue com a solução básica, foi realizado um enxágue com água ultrapura por 7 min.

3.4.4 Preparo da solução eletrolítica (tampão)

Primeiramente foram preparadas as soluções de ácido bórico (200 mmol l⁻¹) e tetraborato de sódio anidro (200 mmol l⁻¹), utilizando o ultra-som por 15 min para solubilização completa. Obtiveram-se as soluções eletrolíticas realizando diluições de quantidades apropriadas de solução de ácido bórico e de tetraborato de sódio anidro ajustando-se para as concentrações e pH desejados. Foram testados diversos seletos quírais que foram solubilizados em diferentes concentrações no tampão carreador. Antes de serem usadas, as soluções tampão foram filtradas através de uma seringa com membrana Millipore de 0,45 µm.

3.4.5 Otimização das condições analíticas

Foram testados parâmetros que afetam o desempenho da separação.

3.4.5.1 pH do tampão

Foram avaliados os valores de pH 8,13, 8,50, 8,65, 8,67 e 8,93. As respectivas soluções eletrolíticas foram obtidas misturando as soluções de ácido bórico (200 mmol L⁻¹) e tetraborato de sódio anidro (200 mmol L⁻¹) previamente preparadas, até o valor de pH desejado. Posteriormente, foi realizada diluição para concentração de 50 mmol L⁻¹. A fração semipurificada EPA (1mg/ml) foi injetada nas seguintes condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol L⁻¹; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm.

3.4.5.2 Concentração de tampão

A concentração de solução eletrolítica foi testada nas concentrações de 20, 40, 50, 60, 80 e 100 mmol L⁻¹. Essas concentrações foram obtidas por diluição, após preparo de solução 200 mmol L⁻¹ em pH 8,5. As condições eletroforéticas foram: tampão borato em pH 8,5; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s a 0,3 psi; detecção: 280 nm.

3.4.5.3 Voltagem

As voltagens de 15, 20 e 30 kV, foram analisadas sob as condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 8,5); 25 °C; detecção: 280 nm; injeção: 0,3 psi por 3 s (30kV) e 0,2 psi por 2 s (15 e 20 kV); EPA: 1 mg/ml.

3.4.5.4 Concentração de seletor quiral

Seis ciclodextrinas foram testadas: 1) α -CD; 2) β -CD; 3) γ -CD; 4) β -CD carboxilada (DS = 3); 5) β -CD acetilada (DS = 4) e 6) β -CD acetilada (DS = 5). A α -CD e γ -CD foram adicionadas à solução eletrolítica nas concentrações de 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 15,0 e 20,0 mmol L⁻¹. A β -CD foi dissolvida em quantidades suficientes na solução eletrolítica para se obter as concentrações de 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0 e 10,0 mmol L⁻¹. Para cada uma das β -CD modificadas, preparou-se uma solução eletrolítica 50 mmol L⁻¹ adicionando-se 1,5 mg mL⁻¹ de cada uma delas. As demais condições eletroforéticas foram: tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 ou 280 nm. As CDs 4, 5 e 6 foram sintetizadas no Laboratório de Química (UEM), por Marcos Roberto Maurício, sob orientação do Prof^o. Dr. Adley Forti Rubira.

3.4.5.5 Temperatura do capilar

Para verificar o efeito da temperatura do capilar, foi analisada a fração semipurificada de *Paullinia cupana* nas temperaturas de 15, 18, 20, 23 e 25 °C; sob as seguintes condições

eletroforéticas: tampão borato 50 mmol L⁻¹ (pH 8,5); 1,0 mmol L⁻¹ β-CD; voltagem: 20 kV; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 nm.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR ELETROFORESE CAPILAR DE ZONA (CZE)

Em todas as análises os picos foram identificados com injeção de padrões de cafeína, catequina, epicatequina, PB1, PB2 e PB4, nas amostras de fração semipurificada (EPA) de *Paullinia cupana*.

4.1.1 Efeito do pH

Neste trabalho foram testadas inicialmente pequenas variações a partir do pH 8,5, com valores de: 8,13, 8,50, 8,65, 8,67 e 8,93. No entanto, nesta primeira análise não foi adicionado o seletor quiral, portanto, não se esperava a separação dos enantiômeros. Segundo Kofink et al. (2007) a melhor separação dos enantiômeros foi realizada com solução tampão composta pela mistura de tetraborato de sódio e ácido bórico em pH 8,5.

Pelos eletroferogramas é possível observar que pequenas diferenças nos valores de pH da solução eletrolítica causam alterações no fluxo eletroosmótico e na mobilidade eletroforética dos solutos (Figura 19). No maior pH analisado, 8,93, houve um maior fluxo eletroosmótico não sendo possível a completa separação da catequina e da epicatequina, apresentando uma resolução entre picos de 0,58. Já no pH 8,13, ocorre uma drástica queda no fluxo eletroosmótico, prejudicando visivelmente a resolução e simetria dos picos de catequina e epicatequina, além de aumentar os tempos de migração. Nos valores de pH 8,50, 8,65 e 8,67 conseguiu-se uma boa separação dos picos de catequina e epicatequina com resoluções de 2,69, 2,45, 2,10, respectivamente. Nestes eletroferogramas observa-se que a mínima diferença no valor de pH, de 8,65 para 8,67, foi capaz de alterar os tempos de migração da catequina de 7,32 para 6,70 min e da epicatequina de 7,16 para 6,58 min, respectivamente.

O pH da solução eletrolítica é um importante parâmetro no desenvolvimento de uma metodologia, pois influencia significativamente o tempo de migração e seletividade. Mudanças no pH alteram o grau de ionização dos grupamentos silanoatos na parede interna do capilar, modificando o fluxo eletroosmótico. Portanto, quando se aumenta o valor do pH, há uma maior concentração de cargas negativas na superfície da sílica, aumentando o fluxo eletroosmótico. Ao contrário, quando se reduz o valor do pH, os grupamentos silanoatos são protonados tornando-se grupamentos silanóis, fazendo com que o fluxo eletroosmótico caia. Além disso, as mobilidades eletroforéticas dos solutos iônicos também variam com o pH (BAKER, 1995).

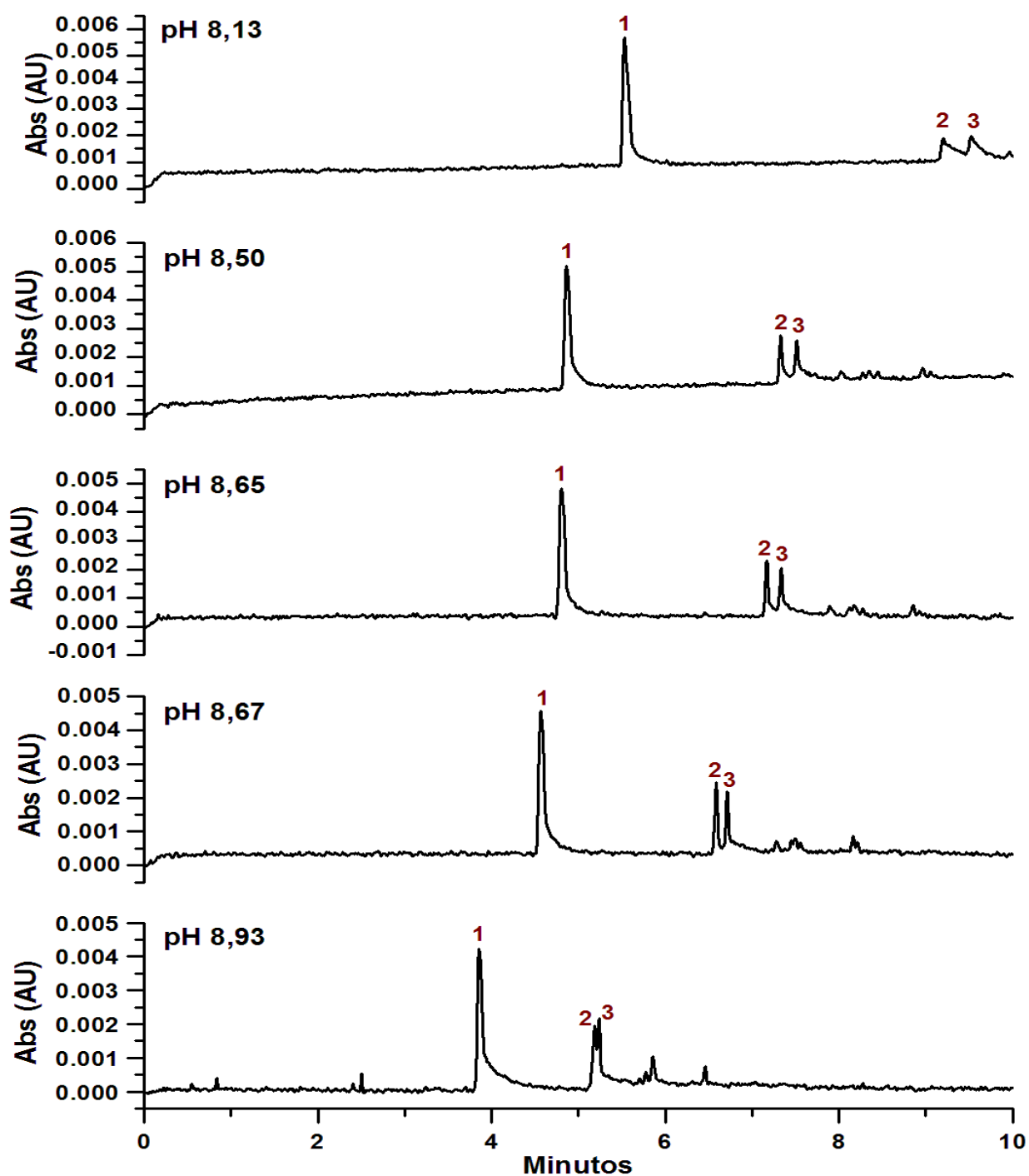


Figura 19 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná), em diferentes pH da solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ [100 mmol l⁻¹ em Kofink e col. (2007)]; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.1.2 Efeito da concentração da solução eletrolítica

O efeito da concentração de solução eletrolítica na amostra EPA com concentrações de tampão, desde 20 mmol L⁻¹ até 100 mmol L⁻¹ pode ser observado na Figura 20.

Visualizando os eletroferogramas, confirma-se o efeito nas diferenças de concentração de tampão. Com o tampão 100 mmol L⁻¹, obteve-se picos com baixa eficiência e resolução, além de prolongar os tempos de migração. Enquanto que com a redução gradual das concentrações se observa uma melhora na eficiência da separação dos picos e uma redução nos tempos de migração. A partir desses resultados optou-se por continuar o trabalho com a concentração de 50 mmol L⁻¹. Porém, de acordo com Kofink e colaboradores (2007), a concentração ideal de solução eletrolítica para a separação dos enantiômeros seria de 100 mmol L⁻¹, o que vai contra o observado na análise.

A concentração da solução eletrolítica influencia o tempo de migração e pode também afetar a simetria do pico. Quanto maior a espessura da dupla camada de íons formada na superfície da sílica na parede interna do capilar, maior o potencial zeta (ζ), e maior o fluxo eletroosmótico. Lembrando que a espessura da dupla camada é inversamente proporcional à concentração do tampão, ou seja, quanto maior a concentração do tampão, menor o fluxo eletroosmótico e vice-versa (SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003).

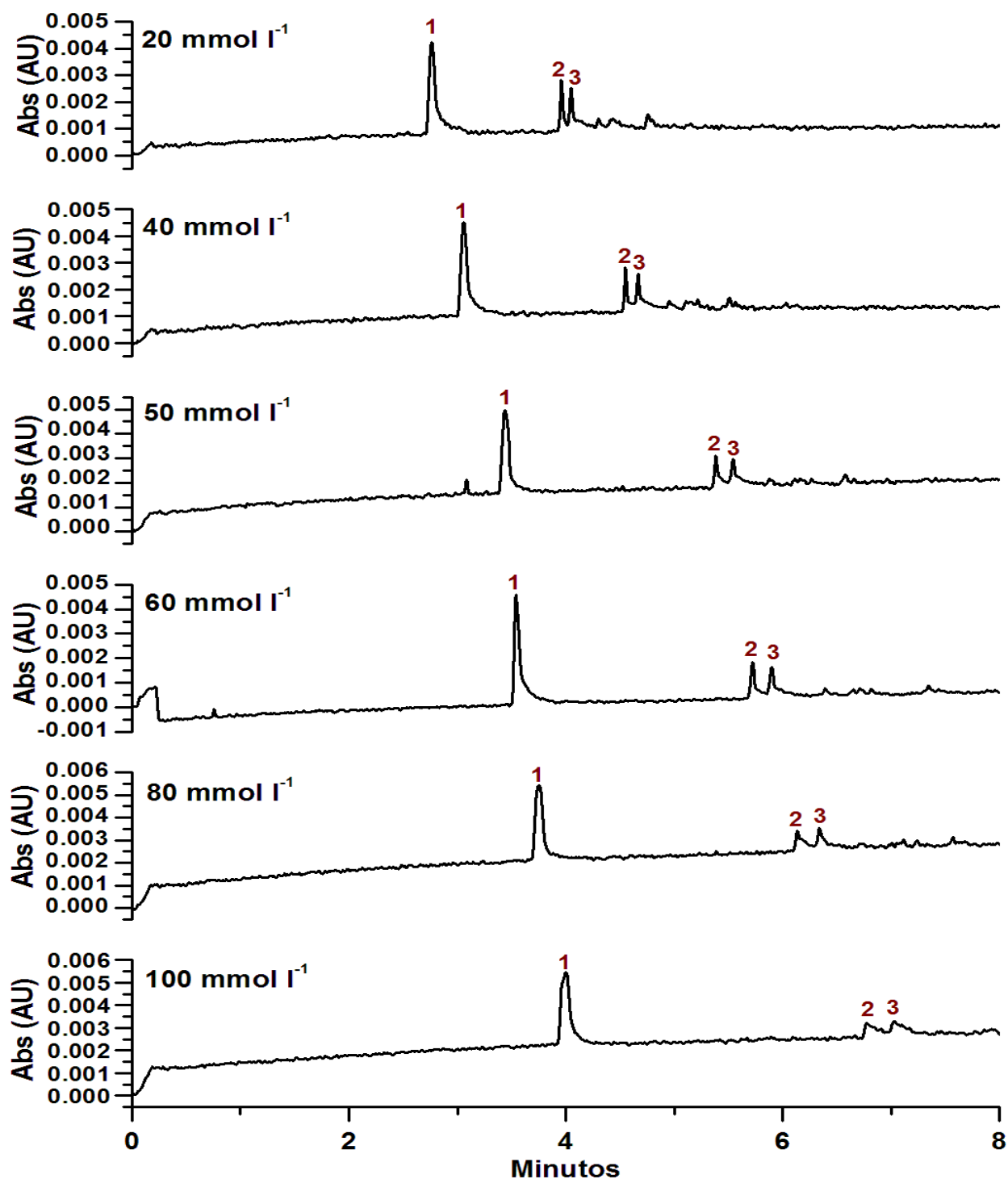


Figura 20 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações da solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato em pH 8,5; voltagem: 30 kV a 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.1.3 Efeito da voltagem

Os testes relacionados à voltagem entre 15 e 30 kV pode ser visualizado na Figura 21. Com a redução da voltagem de 30 para 15 kV, observa-se o aumento dos tempos de migração de 5,13 para 10,41 min no pico da catequina e de 5,02 para 10,17 min no pico da epicatequina. Na voltagem de 30 kV foi produzido uma corrente de 21 μA , enquanto que para 20 kV e 15 kV houve uma redução da amperagem para 13 μA e 9,5 μA , respectivamente. Apesar da voltagem de 30 KV apresentar uma corrida mais rápida, não garantiu a melhor separação dos picos de catequina e epicatequina, com uma resolução entre picos, com valor de 2,69. Enquanto que em 20 kV a separação das substâncias foi melhor, com resolução entre picos de 3,18, já em 15 kV ocorre o alargamento dos picos, diminuindo a eficiência do sistema.

Existe a possibilidade de se utilizar voltagens de até 30 kV, que dependendo da composição da solução eletrolítica vão produzir correntes de no máximo 300 μA . Altas voltagens produzem um maior fluxo eletroosmótico, resultando em separações mais rápidas; portanto o ideal é adequar a metodologia à maior voltagem possível onde se garanta alta eficiência e boa resolução na separação. Contudo, a utilização de altas voltagens causa aumento na temperatura do capilar, e se essa temperatura não for bem dissipada pode ocorrer o efeito Joule, levando a problemas como o espalhamento de zonas com picos largos, decomposição da amostra, formação de bolhas no capilar, dessa forma, interferindo no campo elétrico (BAKER, 1995).

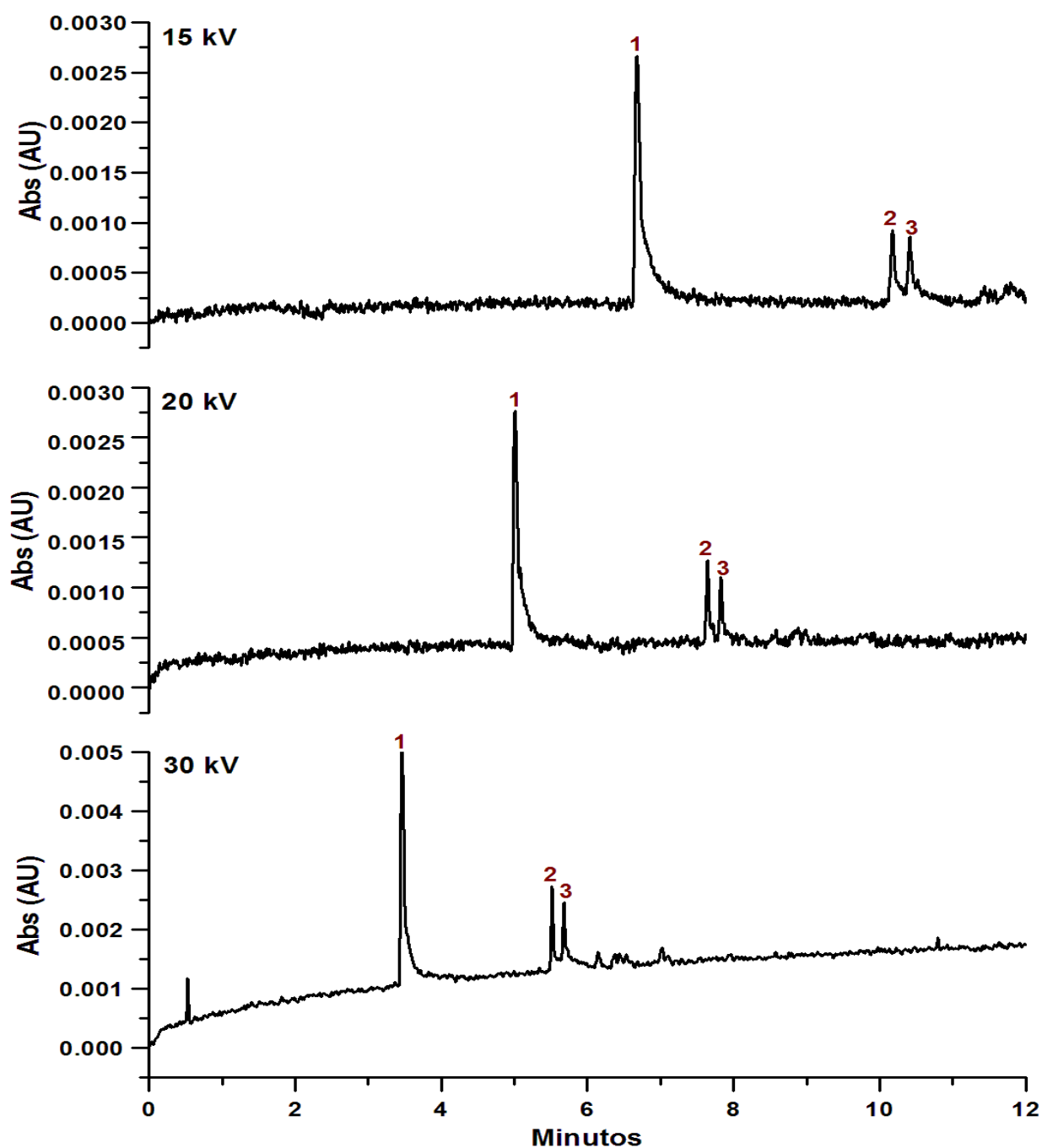


Figura 21 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná), em diferentes voltagens aplicadas. Picos: 1-Cafeína; 2-Epicatequina; 3-Catequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); detecção: 280 nm; 25 °C; injeção: 0,2 psi por 2 s (15/20 kV) e 0,3 psi por 3 s (30 kV); EPA: 1 mg/ml.

4.1.4 Seletores quirais

Neste trabalho foram testadas seis ciclodextrinas disponíveis, sendo elas: 1) α -CD; 2) β -CD; 3) γ -CD; 4) β -CD carboxilada (DS = 3); 5) β -CD acetilada (DS = 4) e 6) β -CD acetilada (DS = 5). Para efeito comparativo, Kofink e col. (2007) testaram duas ciclodextrinas modificadas, a 6-O- α -maltosil- β -CD e a (2-hidroxi)-propil- γ -CD, para separação dos enantiômeros da catequina e epicatequina.

4.1.4.1 α –ciclodextrina

Uma solução-mãe de 20 mmol l⁻¹ de α -CD foi preparada e a partir dela realizadas diluições, obtendo-se soluções eletrolíticas nas seguintes concentrações: 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 15,0 e 20,0 mmol l⁻¹. Cada uma das concentrações foi testada com detecção em 280 nm, e voltagens de 20 e 30 kV. A voltagem em 20 kV apresentou uma melhor separação, já que em 30 kV os picos de catequina e epicatequina ficaram sobrepostos. Nos eletroferogramas, foi possível identificar os picos da cafeína, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e procianidina B4. No entanto, a catequina e epicatequina não estavam bem separadas, e a procianidina B1 e B2 estavam sobrepostas; além disso, não se observou a enantioseparação dos isômeros da catequina e epicatequina. As diferentes concentrações de α -ciclodextrina analisadas não apresentaram diferenças significativas nos eletroferogramas (Figura 22).

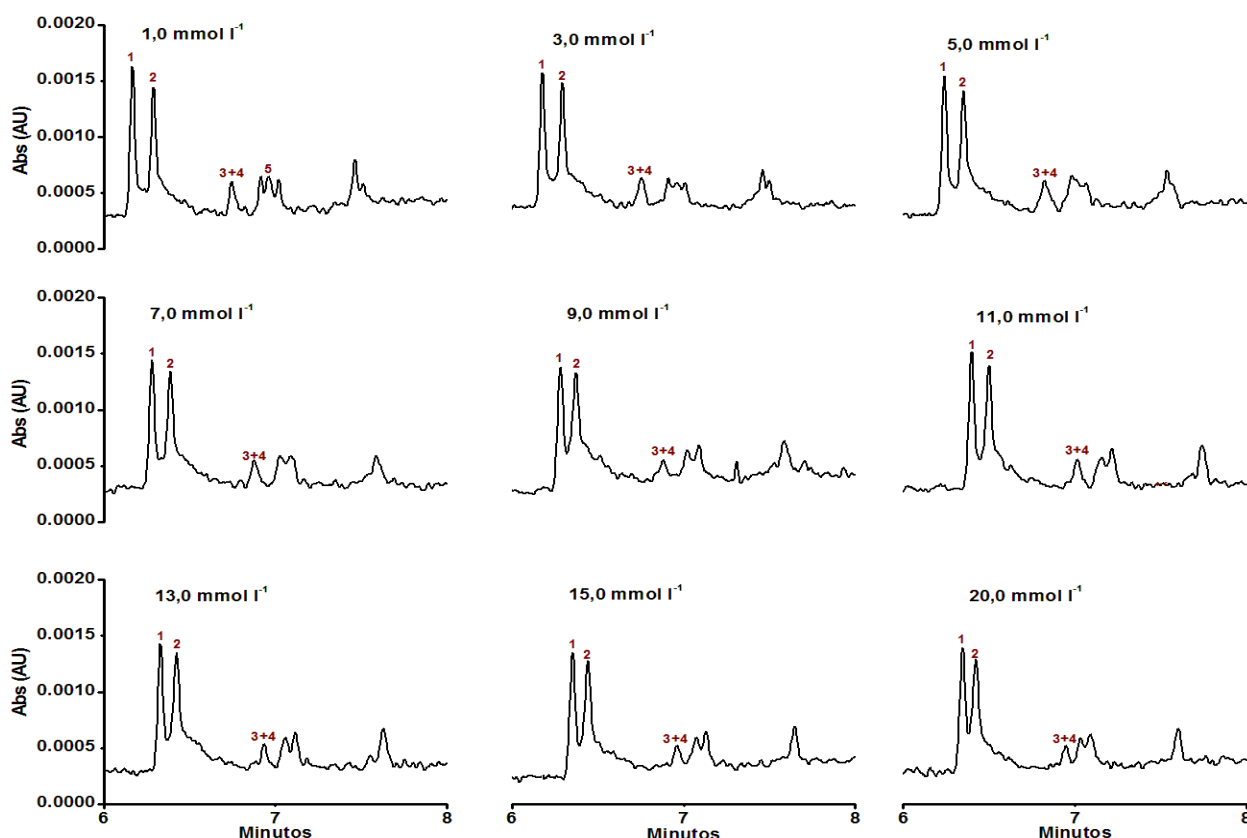


Figura 22 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de α -CD adicionados a solução eletrolítica. Picos: 1-Epicatequina; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4. Cafeína aparece antes dos 6 min. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); voltagem: 20 kV; detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.1.4.2 γ -ciclodextrina

Uma solução-mãe de 20 mmol l⁻¹ de γ -CD foi preparada e realizadas diluições, obtendo-se soluções eletrolíticas com concentrações de: 1,0, 3,0, 5,0, 7,0, 9,0, 11,0, 13,0, 15,0 e 20,0 mmol l⁻¹. Testou-se cada uma das concentrações à 280 nm, nas voltagens de 20 e 30 kV. Em ambas voltagens os eletroferogramas apresentaram quase a mesma resolução, porém em 20 kV o tempo de migração foi prolongado. Visualizaram-se nos eletroferogramas somente três picos, a cafeína, a catequina e a epicatequina, porém, nenhuma enantioseparação (Figura 23).

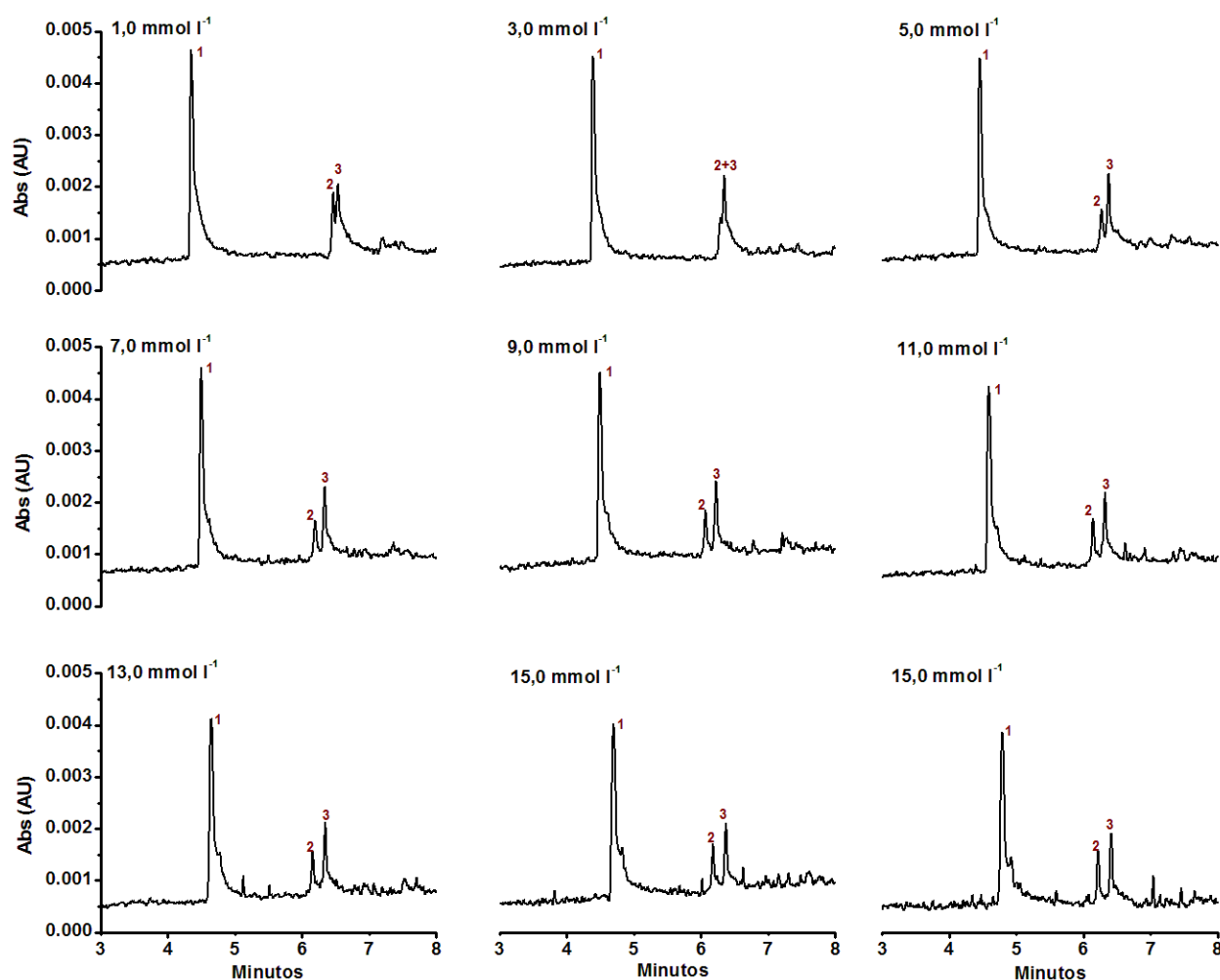


Figura 23 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de γ -CD adicionadas a solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); voltagem: 20 kV; detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.1.4.3 β -ciclodextrina

Uma análise foi realizada com solução eletrolítica de borato 50 mmol l^{-1} adicionada de 1,0 mmol l^{-1} de β -CD, com detecção em 280 nm e voltagem de 20 kV. Obteve-se um eletroferograma com separação dos enantiômeros da catequina, porém sem a separação dos enantiômeros da epicatequina (Figura 24).

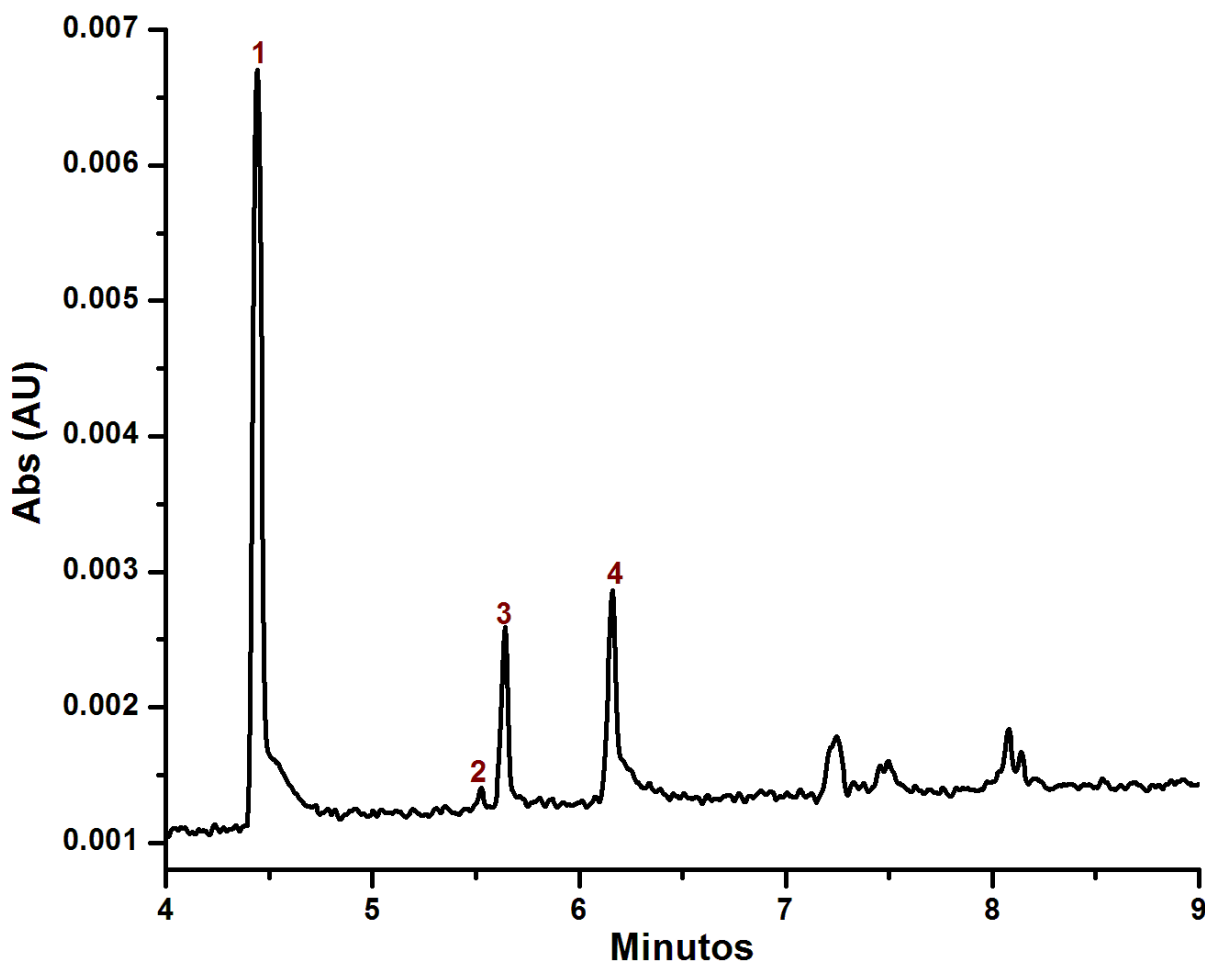


Figura 24 – Eletroferograma do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná). Picos: 1-Caféina; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l^{-1} adicionada de 1,0 mmol l^{-1} de β -CD (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 280 nm; EPA: 1 mg/ml.

Optou-se pela utilização da detecção em 214 nm ao invés de 280 nm devido a difícil visualização da pequena quantidade de *ent*-catequina.

Assim, foram avaliadas concentrações de 1,0, 2,0, 4,0, 6,0, 8,0, 10,0 mmol l^{-1} de β -CD na solução eletrolítica. As análises foram realizadas com detecção em 214 nm e voltagem de 20 kV. Os eletroferogramas demonstraram a separação dos enantiômeros da catequina, que é alcançada empregando a concentração de 1,0 mmol l^{-1} de β -ciclodextrina. Entretanto, a

partir de $2,0 \text{ mmol l}^{-1}$ de β -CD os picos da *ent*-catequina e catequina começam a se sobrepor, maiores concentrações do seletor quiral prejudicam a separação, não somente dos enantiômeros, mas inclusive a seletividade do sistema em relação as outras substâncias (Figura 25).

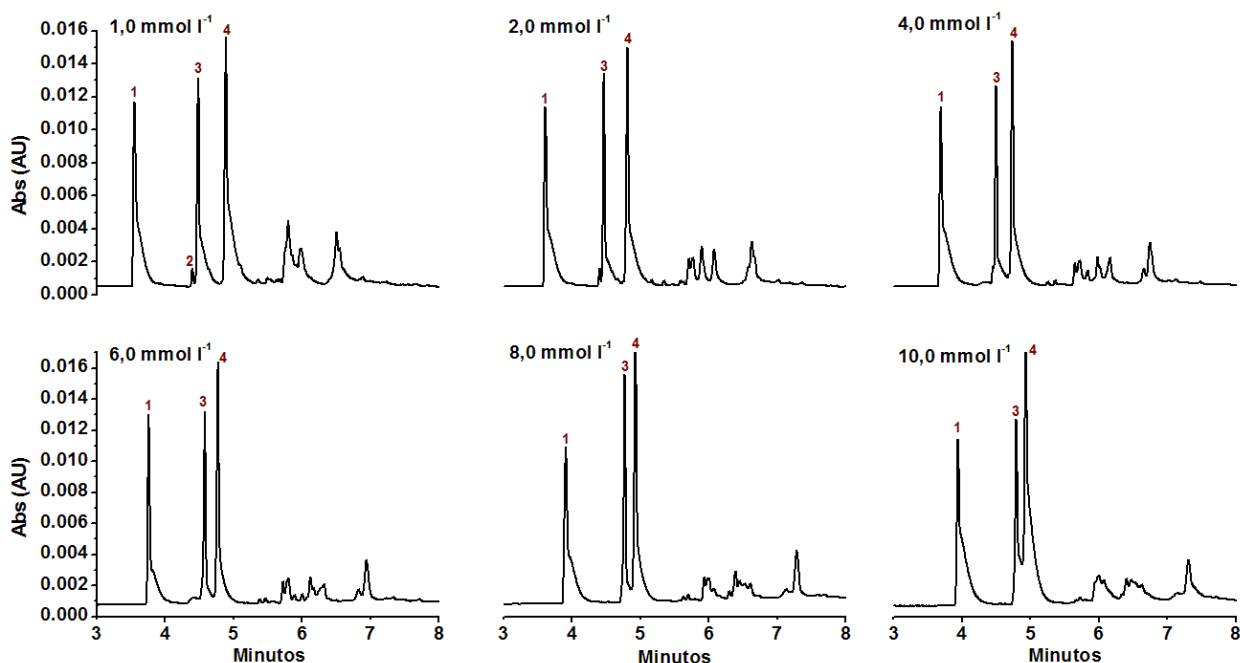


Figura 25 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de β -CD adicionadas a solução eletrolítica. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l^{-1} (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25°C ; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.1.4.4 Ciclodextrinas modificadas

O emprego de três β -CD modificadas na avaliação do extrato semipurificado EPA foi realizada com diferentes graus de substituição (DS): 1) β -CD carboxilada (DS = 3); 2) β -CD acetilada (DS = 4) e 3) β -CD acetilada (DS = 5). Os resultados mostraram que as três ciclodextrinas modificadas apresentaram um perfil semelhante, porém não melhor do que o perfil utilizando a β -CD não modificada (Figura 26).

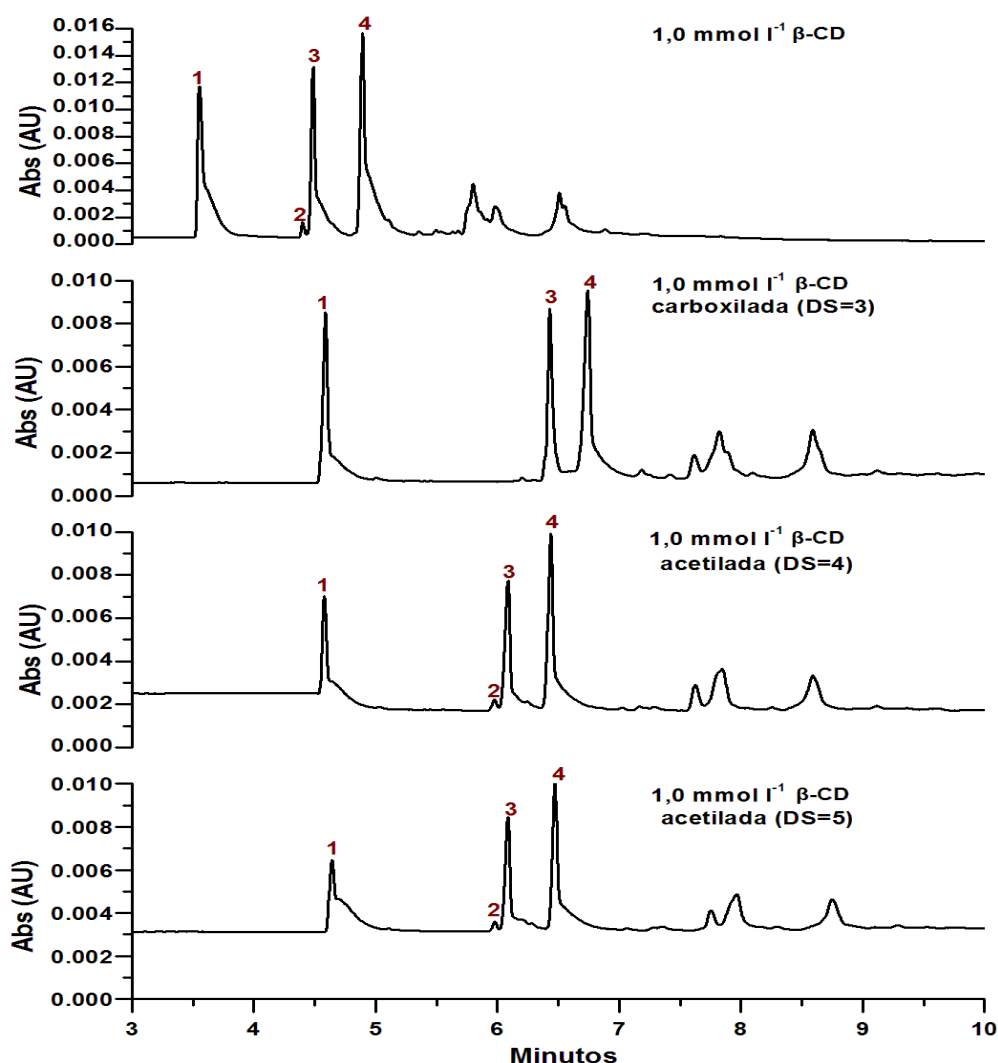


Figura 26 – Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes β -CD modificadas. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5), voltagem de 20 kV, 25 °C; detecção: 214 nm; ; injeção: 0,3 psi por 3 s (β -CD) e 0,2 psi por 2 s (β -CD modificadas); EPA: 1 mg/ml.

4.1.5 Efeito da temperatura

Para analisar o efeito da temperatura no perfil do eletroferograma da amostra, foram testadas mudanças na temperatura do capilar que podem ser observadas na Figura 27.

Nos eletroferogramas, o efeito da temperatura é observado pelas variações nos tempos de migração. Na temperatura de 15 °C observam-se os picos de cafeína, *ent*-catequina, catequina e epicatequina nos tempos de 5,73, 7,04, 7,14 e 7,78 min, respectivamente. Já utilizando 25 °C, os tempos de migração reduzem para 4,51, 5,61, 5,71 e 6,23 min, respectivamente.

A temperatura do capilar pode causar variações na eficiência, tempos de migração e resposta do detector. Quando a temperatura do capilar diminui, a viscosidade da solução eletrolítica aumenta elevando também sua resistência, levando a uma redução no fluxo eletroosmótico, aumentando os tempos de migração. Além disso, alterações na temperatura do capilar levam a variações nas áreas dos picos. A partir do momento que o tempo de migração varia, o tempo de permanência do soluto no detector também varia, alterando a área do pico medida. A resposta do detector também é afetada, pois a absorvidade do soluto pode variar com a temperatura (BAKER, 1995).

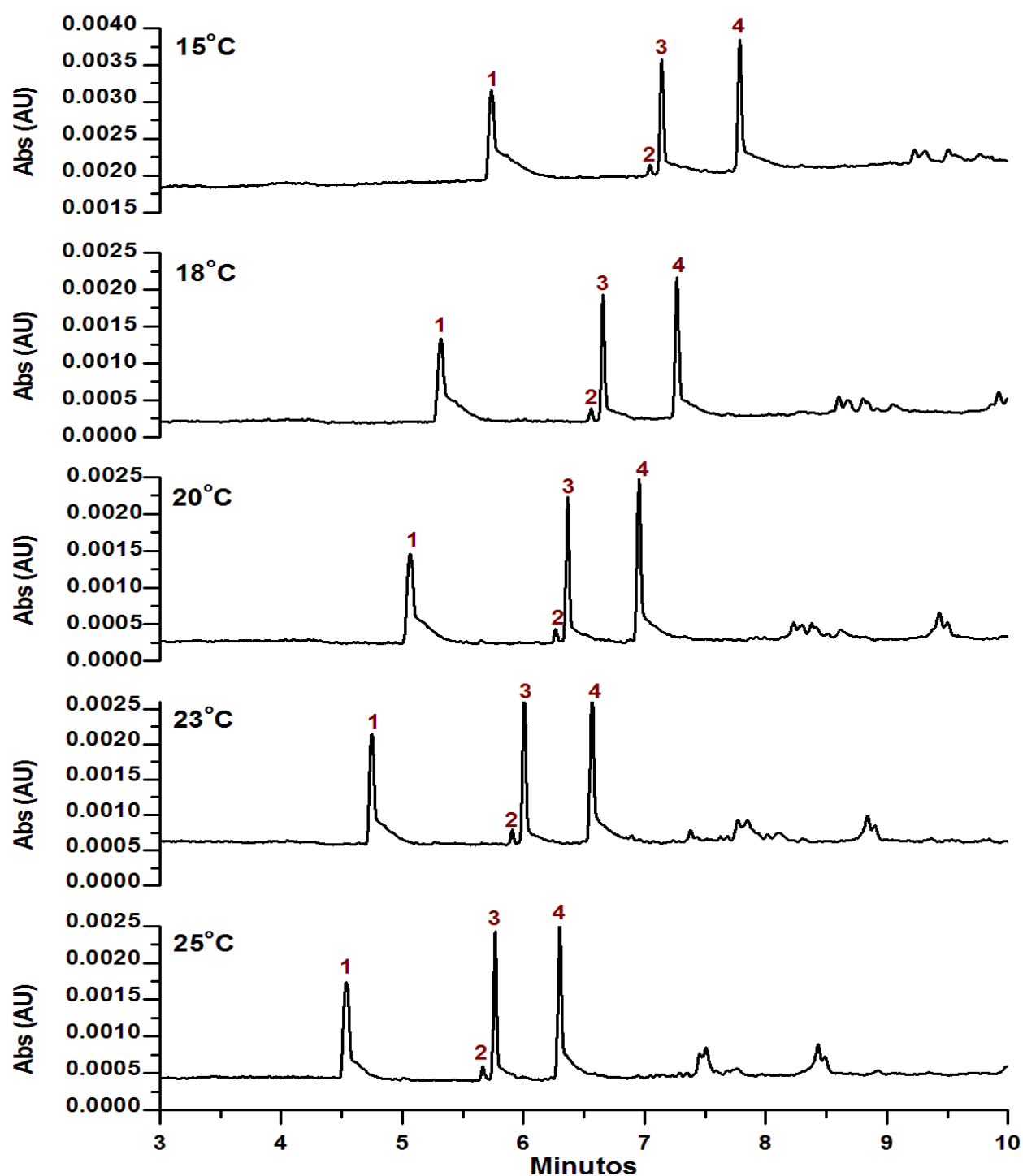


Figura 27 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes temperaturas do capilar. Picos: 1-Cafeína; 2-*ent*-Catequina; 3-Catequina; 4-Epicatequina. Condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol l⁻¹ (pH 8,5); 1,0 mmol l⁻¹ β-CD; voltagem: 20 kV; injeção: 3 s (0,3 psi); detecção: 214 nm; EPA: 1 mg/ml.

4.3 CONCLUSÃO

No desenvolvimento da metodologia por eletroforese capilar de zona vários parâmetros foram avaliados, porém não se alcançou o objetivo da enantioseparação dos isômeros da catequina e epicatequina. Esse desenvolvimento foi baseado no trabalho de Kofink e colaboradores (2007), que utilizaram a 6-*O*- α -maltosil- β -CD e a (2-hidroxi)-propil- γ -CD como seletores quirais. No entanto, neste trabalho não foram utilizadas estas CDs e os parâmetros analisados neste capítulo mostram eletroferogramas completamente diferentes dos apresentados pelo artigo, provavelmente a utilização dessas CDs modificadas do artigo promoveu a enantioseparação. Neste capítulo, de todas as análises realizadas, as melhores condições eletroforéticas atingidas foram tampão borato 50 mmol L⁻¹ em pH 8,5 adicionado de 1,0 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina, voltagem aplicada de 20 kV, detecção em 214 nm, injeção da amostra por 3 s a 0,3 psi, temperatura do capilar em 25 °C. Assim, utilizando essas condições obteve-se um eletroferograma com a separação dos picos de cafeína, *ent*-catequina, catequina, epicatequina, alcançando somente a enantioseparação dos isômeros da catequina. Além disso, em todas as análises houve o aparecimento de caudas nos picos da cafeína, catequina e epicatequina; para se obter picos simétricos um importante parâmetro a ser avaliado é a composição da solução eletrolítica, já que a mobilidade da solução tampão deve ser semelhante à mobilidade dos solutos. Nesse caso, provavelmente o tampão borato apresentou uma mobilidade maior que a mobilidade dos solutos, e estes, com mobilidade menor não conseguiam formar uma zona, e, por conseguinte, formaram a cauda. A presença destas caudas impossibilitou a validação da metodologia.

CAPÍTULO 3

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

1 REVISÃO DE LITERATURA

1.1 CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

A cromatografia eletrocínética micelar (MEKC) é utilizada na separação de substâncias neutras, baseando-se na partição dos solutos entre micelas e o tampão de corrida. Para formação das micelas é adicionado surfactantes à solução tampão (ALTRIA, 1999; SUNTORN SUK, 2002; UNGER, 2009).

Os surfactantes, também conhecidos como detergentes, são moléculas que apresentam uma porção hidrofílica em uma extremidade da molécula e uma porção hidrofóbica na outra extremidade. Quando o surfactante está presente em solução em uma concentração maior do que sua concentração crítica micelar (CMC), as moléculas do surfactante se agregam formando micelas. As micelas apresentam as porções hidrofílicas voltadas para a parte externa da micela estando em contato com a solução tampão aquosa, e as porções hidrofóbicas voltadas para o centro da micela (SUNTORN SUK, 2002).

O surfactante mais amplamente utilizado na MEKC é o dodecil sulfato de sódio (SDS), pois apresenta alta estabilidade, baixa absorvância no UV, alta solubilidade, alta pureza e baixo valor de “Krafft point”. A CMC do SDS em solução tampão é inferior a $3,0 \text{ mmol L}^{-1}$, enquanto em água pura é de $8,1 \text{ mmol L}^{-1}$. A micela apresenta o grupamento hidrofílico SO_3^- em uma extremidade e o grupamento hidrofóbico $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}$ em outra (Figura 28) (TAVARES, 1997; PAPPAS et al., 2005; UNGER, 2009).

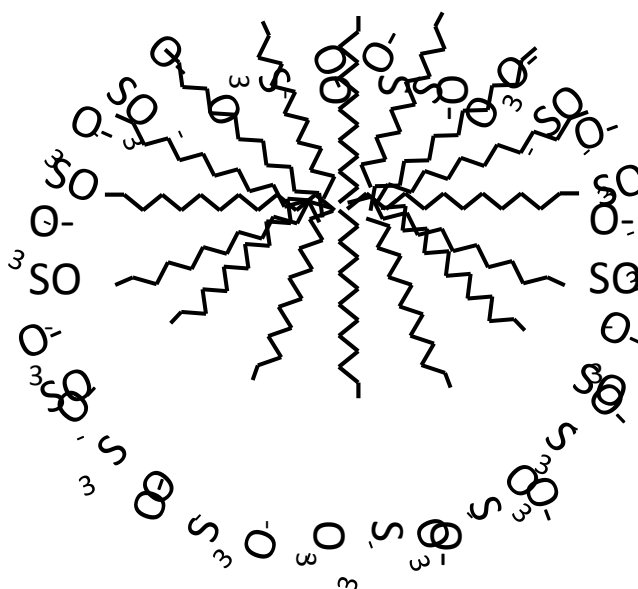


Figura 28 - Micela de dodecil sulfato de sódio (SDS). Com grupamentos hidrofílicos O-SO_3^- em contato com o tampão aquoso na parte exterior da micela, e grupamentos hidrofóbicos $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}$ no interior da micela. As micelas de SDS são formadas por 62 moléculas de SDS, porém, as micelas foram desenhadas com apenas 16 moléculas para melhor visualização.

Na presença das micelas, substâncias insolúveis em água vão particionar nas porções hidrofóbicas da micela, ao contrário das substâncias solúveis em água que vão ficar presentes na solução tampão. As substâncias com solubilidade intermediária irão particionar entre a solução tampão aquosa e as micelas (ALTRIA, 1999; VALLS et al., 2009).

Em uma corrida utilizando o SDS como surfactante e considerando a presença de substâncias eletricamente neutras, quando aplicada a voltagem será criado um fluxo eletroosmótico que carregará a amostra, solução tampão e micelas do ânodo para o cátodo, porém as micelas carregadas negativamente serão atraídas para o ânodo possuindo uma mobilidade eletroforética menor do que o fluxo eletroosmótico. Assim, moléculas hidrofílicas presentes na solução tampão serão carregadas pelo capilar sofrendo ação do fluxo eletroosmótico e eluirão primeiro, enquanto que as moléculas hidrofóbicas eluirão juntamente com as micelas. As moléculas parcialmente solúveis em água irão particionar entre as micelas e a solução tampão dependendo de sua hidrofobicidade, com tempos de migração proporcionais ao tempo que permanecem dentro das micelas (TAGLIARO et al., 1998).

2. OBJETIVO

Esse capítulo do trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia por eletroforese capilar utilizando a técnica de separação cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), com o intuito de separar e identificar marcadores químicos de extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná).

3 MATERIAL E MÉTODOS

Os seguintes itens: MATÉRIA-PRIMA VEGETAL, MATERIAL E EQUIPAMENTOS, PREPARAÇÃO DE EXTRATO, PREPARO DA SOLUÇÃO DA AMOSTRA e PREPARO DA SOLUÇÃO ENXÁGUE, estão descritos no capítulo 2, em MATERIAL E MÉTODOS (p. 60-63)

3.1 MATERIAL

3.1.1 Solventes e reagentes

Todos os solventes e reagentes possuíam grau de pureza pró-análise (p.a.), das marcas J.T. Baker®, Sigma®, Synth® ou quando especificadas.

- Acetato de etila
- Acetona
- Água destilada - UEM
- Água ultrapura (Milli-Q) - Millipore
- Fosfato de sódio bibásico anidro
- Fosfato de sódio monobásico monohidratado
- Hidróxido de sódio
- Metanol
- Nitrogênio líquido - UEM
- Sulfato dodecil de sódio
- Padrões de cafeína, $\pm$ catequina, epicatequina, procianidina B1 (PB1), procianidina B2 (PB2) e procianidina B4 (PB4).

3.2 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

3.2.1 Condições eletroforéticas

Foi utilizado um capilar não revestido de sílica fundida de 375 μm O.D. x 50 μm I.D. cortado com 58,3 cm (48,4 cm de comprimento efetivo). O primeiro condicionamento do capilar foi realizado conforme especificações da **Erro! Fonte de referência não encontrada..** Para as análises, a temperatura do capilar foi ajustada para 25 °C e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente. Injetou-se água ultrapura antes e depois de injetar a amostra dentro do capilar, evitando-se a contaminação do vial da amostra com pequenas quantidades de tampão. As condições empregadas nas análises estão especificadas na Tabela 4. A identificação dos analitos foi alcançada adicionando-se padrões na amostra. Após o fim das análises e antes do início das mesmas, era realizado um enxágue do capilar (Tabela 3).

Tabela 4 - Programação utilizada para análise da amostra EPA por MEKC

Condicionamento	3 min	20 psi	1,0 mol l ⁻¹ NaOH
Condicionamento	4 min	20 psi	Água ultrapura
Condicionamento	6 min	20 psi	Tampão de separação
Injeção	2 s	0,2 psi	Água ultrapura
Injeção	5 s	0,5 psi	Amostra
Injeção	2 s	0,2 psi	Água ultrapura
Separação	30 min	20 kV	Separação

3.2.2 Preparo da solução eletrolítica (tampão)

Primeiramente, foram preparadas as soluções de fosfato de sódio monobásico monohidratado (200 mmol l⁻¹), fosfato de sódio bibásico anidro (200 mmol l⁻¹) e sódio dodecil sulfato (200 mmol l⁻¹), todas solubilizadas com o auxílio de ultra-som (15 min). Obtiveram-se as soluções eletrolíticas realizando diluições de quantidades apropriadas das soluções preparadas previamente ajustando-se para as concentrações e pH desejadas. Antes de serem usadas, as soluções tampão foram filtradas através de uma seringa com membrana Millipore de 0,45 µm.

3.2.3 Otimização das condições analíticas

Foram testados parâmetros que afetam o desempenho da separação tais como:

3.2.3.1 pH do tampão

Soluções eletrolíticas foram preparadas misturando-se soluções de fosfato de sódio monobásico monohidratado e fosfato de sódio bibásico anidro até pH 6,5, 7,0, 7,5 e 8,0. As demais condições eletroforéticas foram tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS; voltagem: 22 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

3.2.3.2 Concentração de tampão

Tampão fosfato (pH 7,0), nas concentrações de 30, 50, 70 e 90 mmol l⁻¹ foram avaliadas sob as seguintes condições eletroforéticas: SDS 60 mmol l⁻¹, voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

3.2.3.3 Concentração de surfactante

A análise do efeito do surfactante foi realizada adicionando diferentes concentrações de sulfato dodecil de sódio (SDS) na solução eletrolítica, sendo elas 40, 50, 60 e 80 mmol l⁻¹. Foram utilizadas as condições eletroforéticas tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

3.2.3.4 Voltagem aplicada

O efeito da voltagem foi testado aplicando-se 15, 18, 20, 23 e 25 kV para a mesma amostra e nas mesmas condições eletroforéticas (tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm).

3.2.3.5 Seletor quiral

Adicionou-se 1,0 mmol l⁻¹ de β-CD em tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS em pH 7,0. Posteriormente, analisou-se a amostra nas mesmas condições, porém na ausência de seletor quiral. As demais condições eletroforéticas foram: 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

3.2.3.6 Tempo de injeção de amostra

O efeito do tempo de injeção foi testado injetando-se a mesma amostra por tempos diferentes. Duas amostras foram injetadas hidrodinamicamente por pressão de 0,5 psi, por 10 e por 15 s, nas seguintes condições: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; detecção: 214 nm.

3.2.4 Determinação do tempo do fluxo eletroosmótico (EOF)

Na determinação do tempo do fluxo eletroosmótico, utilizou-se como marcadores metanol e etanol. A amostra foi preparada adicionando 0,5 ml do marcador em 2,0 ml de tampão e injetada nas mesmas condições estabelecidas para a separação.

A velocidade do fluxo eletroosmótico (V_{EOF}) foi calculada utilizando a fórmula:

$$V_{EOF} = \frac{L_D}{t_{EOF}}$$

Onde, L_D = comprimento do capilar da extremidade de entrada até a janela de detecção

t_{EOF} = tempo de migração do marcador

A velocidade aparente de migração (V_{ap}) de cada íon foi calculada pela fórmula:

$$V_{ap} = \frac{L_D}{t_{ap}}$$

Onde, L_D = comprimento do capilar da extremidade de entrada até a janela de detecção

t_{ap} = tempo de migração do composto

Com os valores da velocidade aparente (V_{ap}) e da velocidade eletroosmótica (V_{EOF}), calculou-se a velocidade eletroforética (V_e) de cada íon pela fórmula:

$$V_e = V_{ap} - V_{EOF}$$

A mobilidade eletroforética (μ_e) de cada composto foi encontrada pela fórmula:

$$\mu_e = \frac{V_e L_T}{H}$$

Onde, μ_e = mobilidade eletroforética do composto (cm² V⁻¹ s⁻¹)

V_e = velocidade eletroforética do composto (m s^{-1})

L_T = comprimento total do capilar (m)

H = potencial aplicado no capilar (V)

Em sistemas que apresentam o fluxo eletroosmótico, a mobilidade total do íon (μ_{ap}) é a soma da sua mobilidade eletroforética (μ_e) mais a mobilidade eletroosmótica (μ_{EOF}).

$$\mu_{ap} = \mu_e + \mu_{EOF}$$

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

Em todas as análises os picos foram identificados com injeção de padrões de cafeína, catequina, epicatequina, PB1, PB2 e PB4, nas amostras de fração semipurificada (EPA) de *Paullinia cupana*.

4.1.1 Efeito do pH

Para o início do desenvolvimento da metodologia, foi analisado o efeito do pH, já que este parâmetro como visualizado no capítulo 1, foi o que mais alterou o perfil eletroforético. Na Figura 29 pode ser observado o comportamento do extrato semipurificado EPA em diferentes pH.

Observando os eletroferogramas, quanto menor o pH, maior o tempo de migração dos solutos. Na solução com pH 6,5, aparecem os picos de cafeína, catequina, PB1, PB2 e PB4, todos muito bem separados até 15 min, no entanto, a epicatequina se liga a micela e demora para passar pelo detector, saindo do capilar após 25 min. Na solução com pH 7,0 também se observa separação das substâncias e o pico da epicatequina aparece no eletroferograma em 22,82 min. Na solução com pH 7,5, o pico da epicatequina surge em 17,68 min, porém, a partir deste valor de pH já não se tem a separação de todos os picos havendo a sobreposição do pico da procianidina B2 com outro não determinado. Optou-se, assim, por continuar o desenvolvimento empregando o pH 7,0, onde se tem a separação de todos os picos desejados em um menor tempo de análise (25 min).

Em MEKC, quando se analisa substâncias neutras o pH do tampão não influencia na separação, pois as moléculas são separadas de acordo com suas hidrofobicidades. Na partição entre micelas e solução eletrolítica, moléculas hidrofílicas permanecem no tampão sendo carregadas pelo fluxo eletroosmótico, enquanto moléculas hidrofóbicas se ligam às micelas e são carregadas dependendo da mobilidade eletroforética da micela. Neste caso, o pH da solução eletrolítica deve ser capaz de ionizar as micelas para estas apresentarem mobilidade eletroforética. Para moléculas ionizadas, os solutos migram pela influência de duas mobilidades eletroforéticas: 1) a mobilidade eletroforética de cada soluto como na CZE, e 2) em associação com micelas. Logo, para moléculas ionizadas o pH altera o grau de ionização dos solutos e conseqüentemente sua hidrofobicidade, afetando tanto o tempo de migração quanto a seletividade (BAKER, 1995). No caso das substâncias catequina (2*R*,3*S*) e epicatequina (2*R*,3*R*) outro fator que pode alterar o tempo de retenção na micela é a estereoquímica das mesmas.

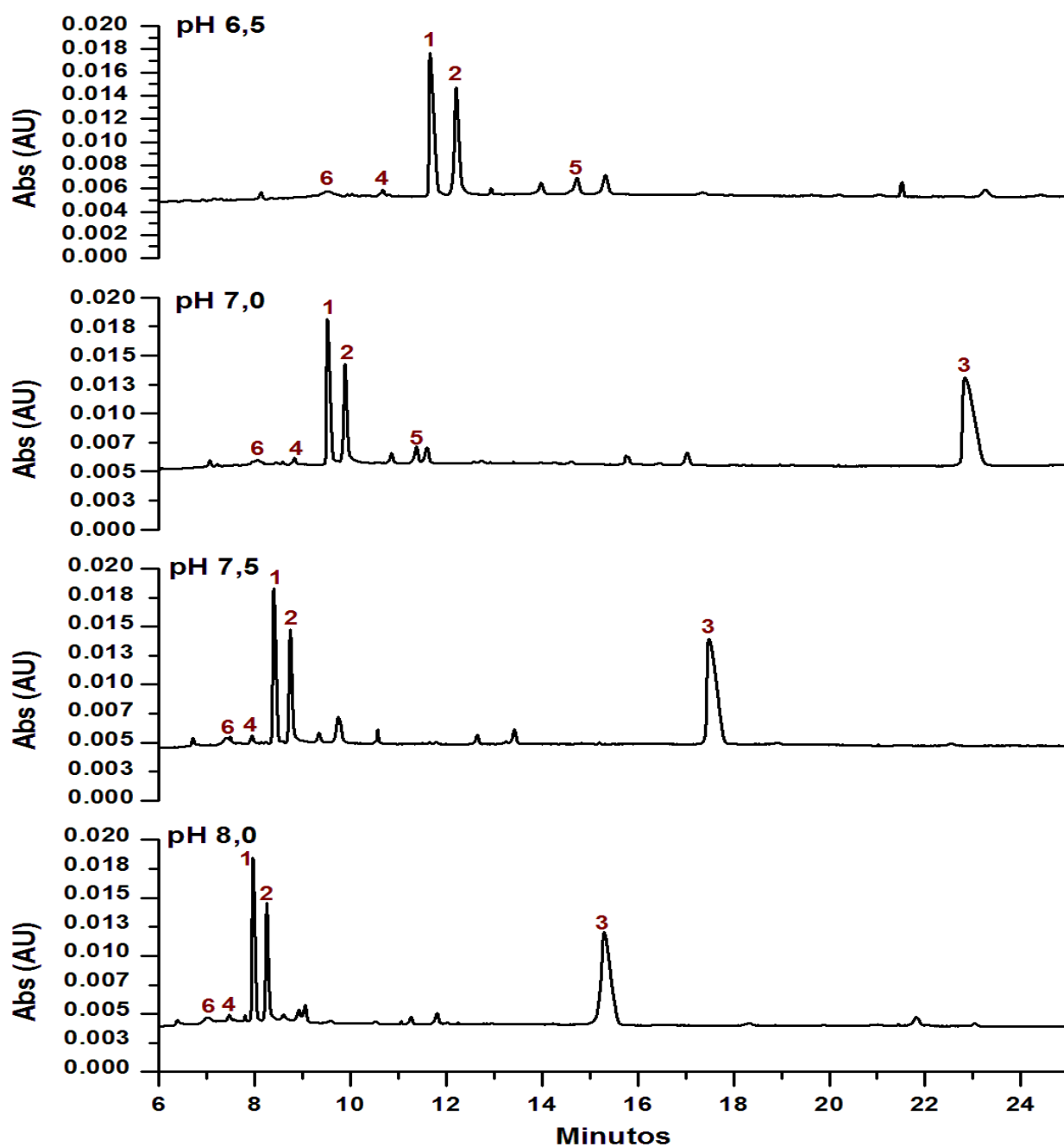


Figura 29 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes pH. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procyanidina B1; 5-Procyanidina B2; 6-Procyanidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS; voltagem: 22 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

4.1.2 Efeito da concentração da solução eletrolítica

O efeito da concentração de solução eletrolítica foi avaliada a partir da análise da amostra EPA utilizando diversas concentrações de tampão, 30, 50, 70 e 90 mmol L⁻¹ como demonstrado na Figura 30.

Com o tampão fosfato em 30 mmol L⁻¹, observa-se a separação dos picos de cafeína, catequina, PB1, PB2, PB4 e da epicatequina, sendo que a epicatequina aparece após 20 min. Pode-se observar pelos eletroferogramas que quanto menor a concentração da solução eletrolítica, mais rápido é o tempo de análise, portanto, para otimização da metodologia é preferível a utilização da menor concentração de solução eletrolítica possível que apresente uma boa eficiência e seletividade de todas as substâncias.

A concentração da solução eletrolítica em MEKC influencia da mesma forma que em CZE, afetando principalmente o tempo de migração. Quanto mais concentrado o tampão, menor o fluxo eletroosmótico, aumentando o tempo de migração das substâncias, como discutido no capítulo 1.

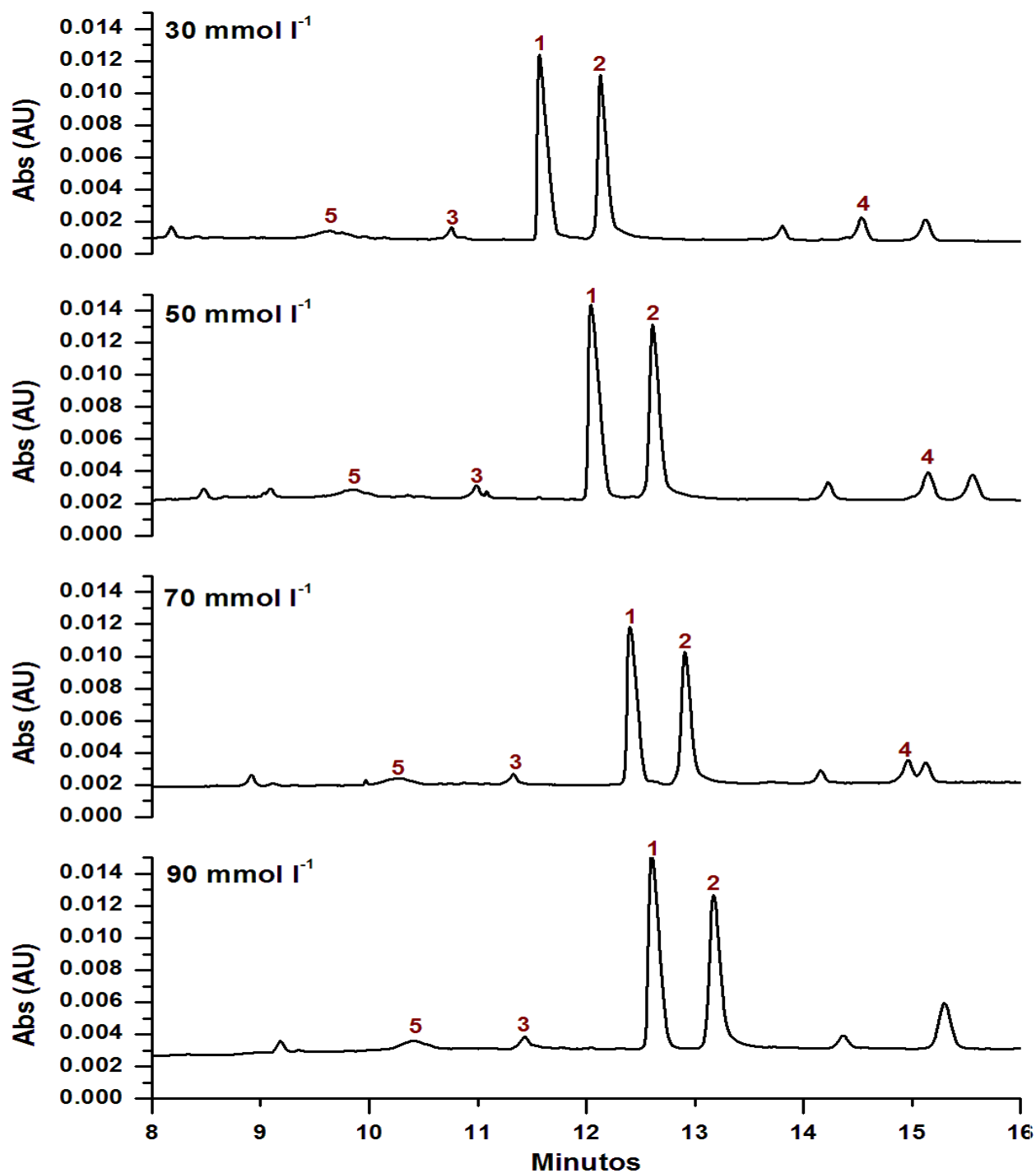


Figura 30 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de solução eletrolítica (tampão fosfato). Picos: 1-Caféina; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

4.1.3 Efeito do surfactante

O efeito do surfactante foi analisado com diferentes concentrações de sódio dodecil sulfato (SDS) na solução eletrolítica, e está apresentado na Figura 31.

Nos eletroferogramas, utilizando uma concentração de 40 mmol l^{-1} , a epicatequina fica retida por menor tempo nas micelas aparecendo no eletroferograma em 13,82 min. Enquanto que na concentração de 80 mmol l^{-1} , a sua detecção ocorre após 30 min. Os demais picos, nas demais concentrações de SDS, permanecem com o mesmo perfil.

Na cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), o surfactante é adicionado à solução eletrolítica em uma concentração maior do que sua concentração crítica micelar (CMC) promovendo a formação de micelas. A separação ocorre pela partição dos solutos entre micelas e solução eletrolítica, sendo que o grau de retenção do analito na micela vai depender da sua hidrofobicidade e da concentração de micelas na solução eletrolítica (SUNTORN SUK, 2002).

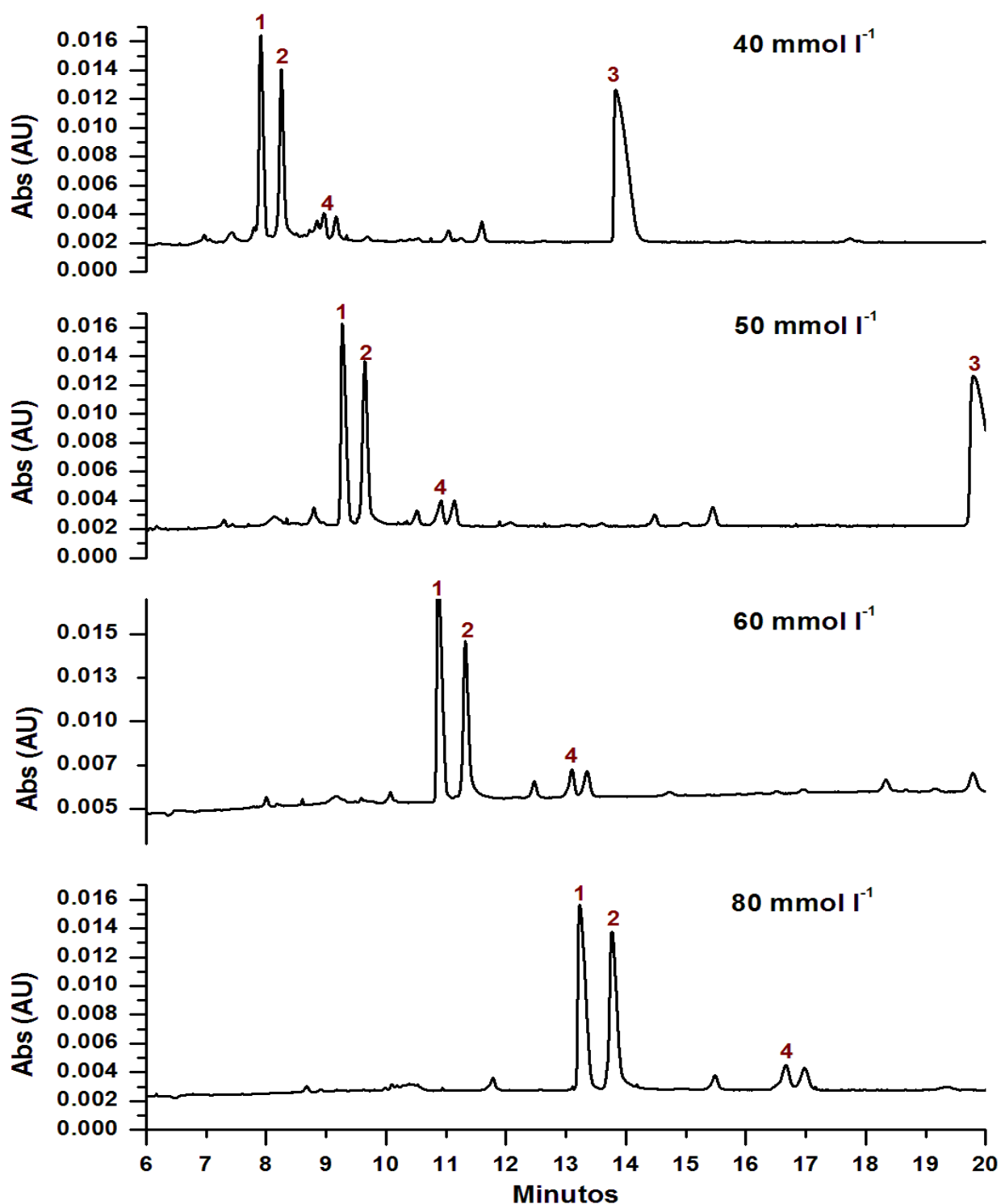


Figura 31 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes concentrações de surfactante (SDS). Picos: 1-Caféína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B2. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

4.1.4 Efeito da voltagem

Os eletroferogramas apresentados na Figura 32 representam o efeito de diferentes voltagens sobre o extrato semipurificado de guaraná.

Em 15 kV, os tempos de migração observados para cafeína e catequina foram de 14,16 e 14,79 min, respectivamente. Entretanto, o pico da epicatequina não apareceu dentro do tempo programado de corrida (30 min). Já em 25 kV, os tempos de migração para cafeína, catequina e epicatequina foram 7,99, 8,27 e 18,07 min, respectivamente. Nesta análise ocorre o esperado para o efeito da voltagem nos perfis eletroforéticos, ou seja, com menores voltagens, ocorre a redução do fluxo eletroosmótico, prolongando o tempo da corrida. Para todas as voltagens avaliadas, visualizou-se uma boa eficiência e resolução dos picos.

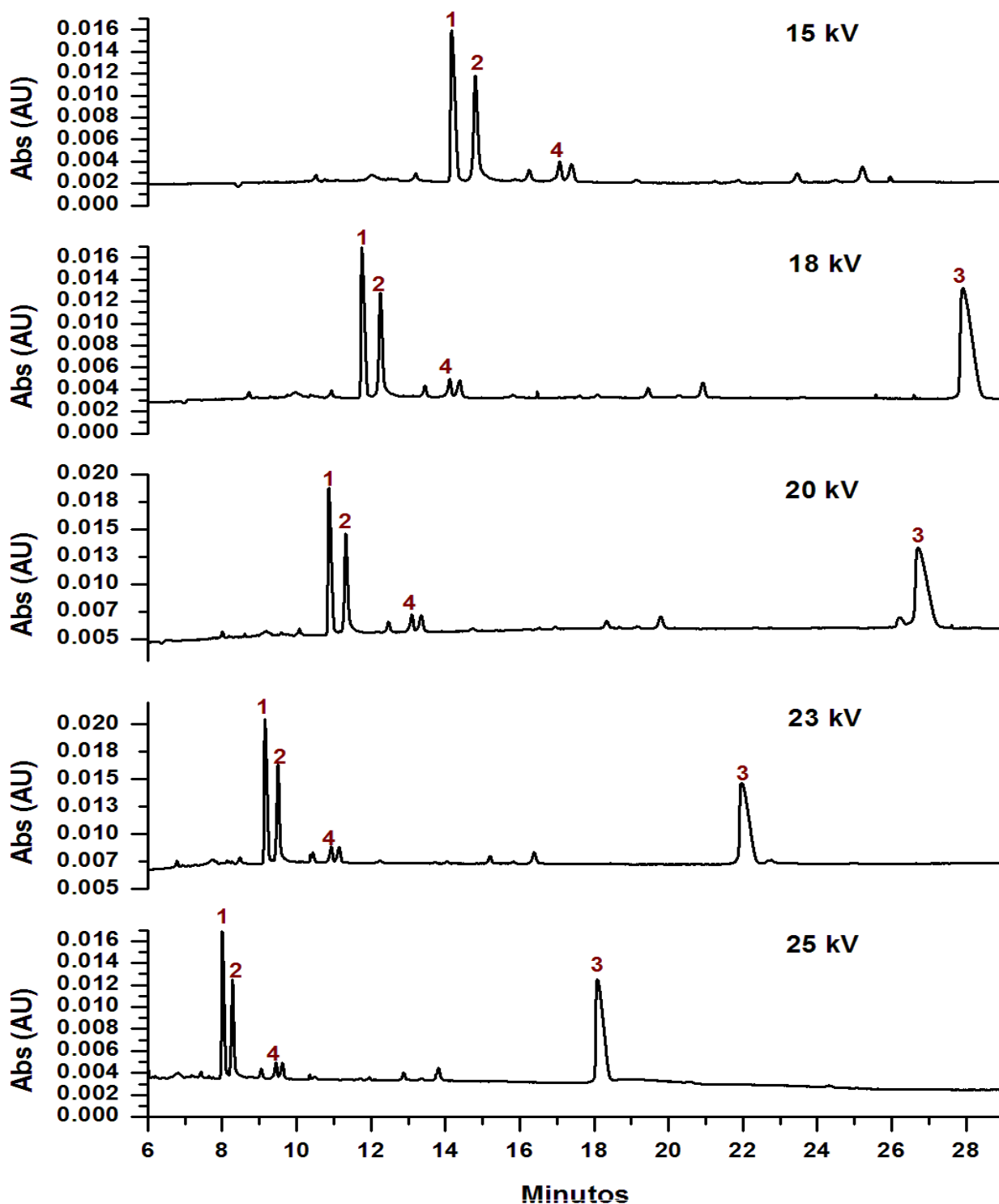


Figura 32 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes voltagens. Picos: 1-Caféina; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B2. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

4.1.5 Efeito do seletor quiral

O seletor quiral β -CD foi adicionado na solução eletrolítica e analisando os eletroferogramas, sem a adição do seletor quiral têm-se uma boa separação de todos os picos com resolução entre os picos da cafeína e catequina de 2,91, no entanto, a partir do momento da adição da β -CD a resolução dos picos de cafeína e catequina foi perdida ($R_s=0,72$) (Figura 33).

A adição do seletor quiral no sistema de MEKC visa a separação de substâncias quirais e auxilia na separação de substâncias muito apolares e hidrofóbicas que passam todo o tempo ligados dentro das micelas, eluindo em um só pico no eletroferograma. Essa separação de substâncias apolares ocorre devido à partição dos solutos entre as ciclodextrinas e as micelas (BAKER, 1995). Porém, na análise realizada com a adição de β -CD não se observou melhora no eletroferograma.

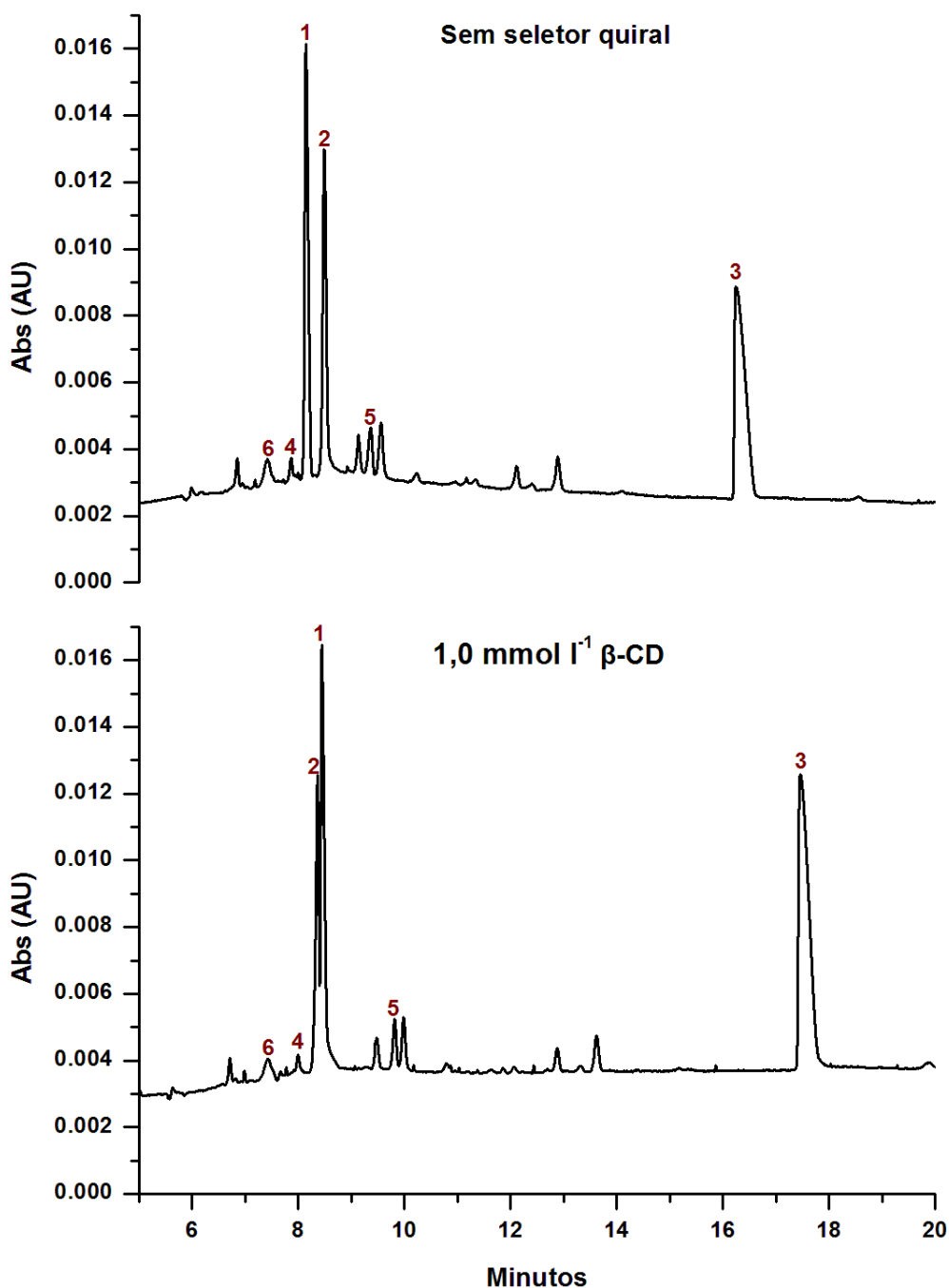


Figura 33 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) com ou sem a presença de seletor quiral β -CD. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4- Procianidina B1; 5-Procianidina B2; 6-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 22 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

4.1.6 Efeito do tempo de injeção

Na Figura 34 observa-se o efeito que o tempo de injeção da amostra pode causar no eletroferograma, com 10 e 15 s de injeção a 0,5 psi.

Os eletroferogramas apresentaram o mesmo perfil eletroforético, porém observam-se picos mais estreitos quando a amostra foi injetada por 10 s. O tempo de injeção está relacionado com a quantidade de amostra injetada dentro do capilar. Para máxima eficiência, deve ser injetada a menor quantidade possível de amostra que apresente quantidades detectáveis do soluto desejado.

Portanto, optou-se trabalhar com tempo de injeção da amostra de 5 s a 0,5 psi, onde se obteve perfil semelhante ao apresentado utilizando 10 s de injeção.

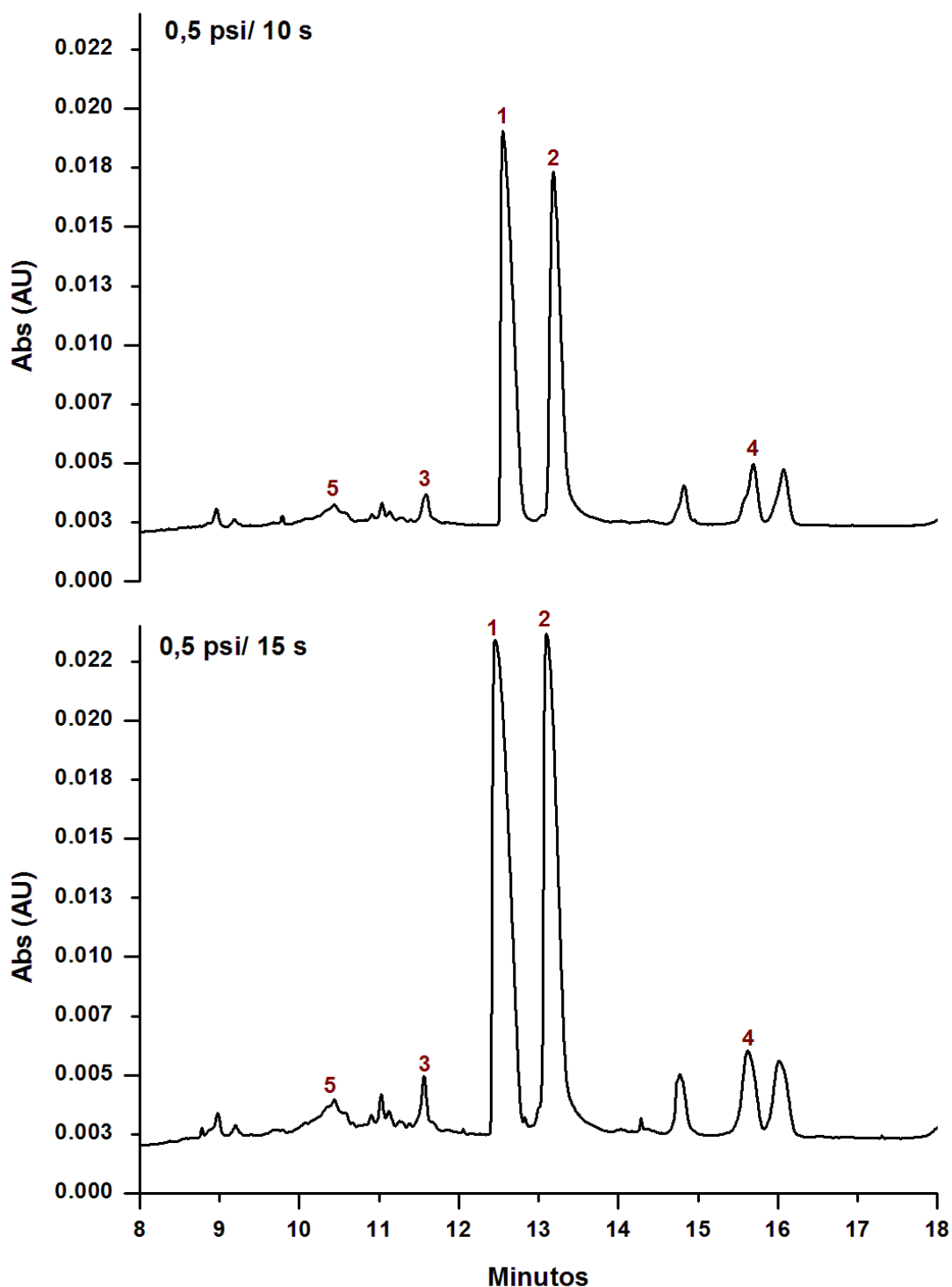


Figura 34 - Eletroferogramas do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná) em diferentes tempos de injeção de amostra. Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Procianidina B1; 4-Procianidina B2; 5-Procianidina B4. A epicatequina aparece após 18 min. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 50 mmol l⁻¹ com 60 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 20 kV; 25 °C; detecção: 214 nm.

Após as análises verificou-se que o sistema utilizando concentração de tampão fosfato de 50 mmol l⁻¹ adicionado de 60 mmol l⁻¹ de SDS em pH 7,0, com voltagem aplicada de 20 kV a 25 °C, tempo de injeção da amostra de 5 s (0,5 psi) e detecção a 214 nm, apresentou um eletroferograma com a melhor separação para o extrato semipurificado de guaraná. No entanto, o pico da epicatequina surge em aproximadamente 27 min, prolongando o tempo da análise. Assim, realizou-se teste com o objetivo de diminuir esse tempo de migração mantendo a boa resolução da separação, alterando os seguintes parâmetros: 1) concentração de tampão fosfato (pH 7,0) de 50 mmol l⁻¹ para 40 mmol l⁻¹ e 2) concentração de SDS de 60 mmol l⁻¹ para 30 mmol l⁻¹. Como observado nas análises anteriores, esses parâmetros alteram visivelmente o tempo de migração, e diminuíram o tempo de eluição da epicatequina para 20 min, como pode ser observado no eletroferograma (Figura 35).

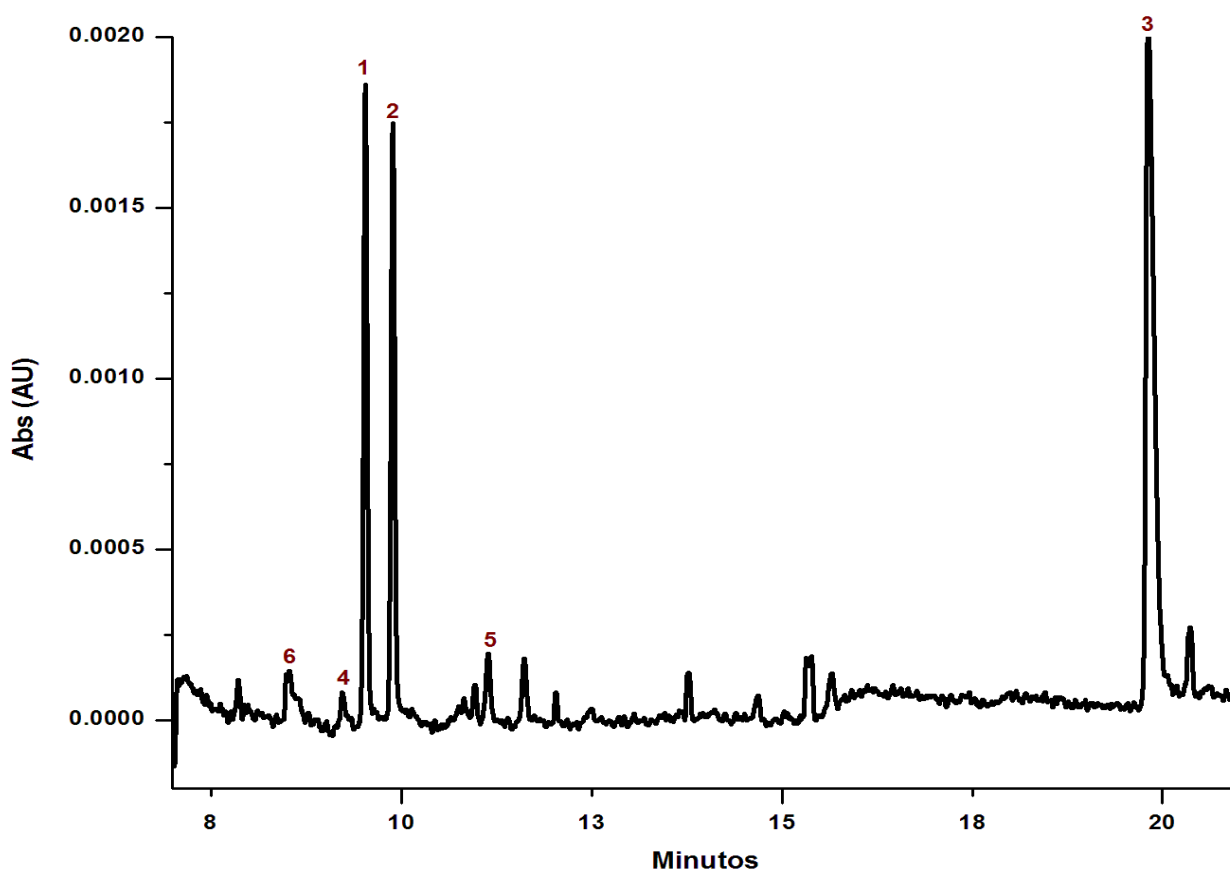


Figura 35 - Eletroferograma do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná). Picos: 1-Cafeína; 2-Catequina; 3-Epicatequina; 4-Procianidina B1; 5-Procianidina B2; 6-Procianidina B4. Condições eletroforéticas: tampão fosfato 40 mmol l⁻¹ com 30 mmol l⁻¹ de SDS (pH 7,0); voltagem: 20 kV a 25 °C; injeção: 5 s (0,5 psi); detecção: 214 nm.

Foi estabelecido como melhor condição de separação: solução tampão fosfato 40 mmol l⁻¹ adicionado de 30 mmol l⁻¹ de SDS em pH 7,0, com voltagem aplicada de 20 kV a 25 °C, tempo de injeção da amostra de 5 s (0,5 psi) e detecção a 214 nm.

Sob esta condição, obteve-se a separação das substâncias cafeína, catequina, epicatequina, PB1, PB2 e PB4 com os tempos de migração de 8,94±0,22, 9,27±0,24, 18,29±0,77, 8,65±0,21, 10,41±0,28, 8,08±0,18, respectivamente.

O método proposto permite separar os principais marcadores químicos do guaraná, cafeína, catequina e epicatequina, com excelente eficiência eletroforética (Tabela 5) devido ao perfil do fluxo eletroosmótico que permite a obtenção de bandas estreitas e picos simétricos fornecendo alta sensibilidade e baixos limites de detecção.

Tabela 5 - Eficiência eletroforética obtida para os marcadores químicos de *Paullinia cupana* utilizando o método proposto

Marcador químico	Eficiência (N)
Cafeína	9,04 10 ⁴
Catequina	9,72 10 ⁴
Epicatequina	7,21 10 ⁴

4.1.7 Determinação do tempo do fluxo eletroosmótico (EOF)

Após a otimização do método, foi realizada a determinação do tempo do fluxo eletroosmótico a partir da injeção de metanol e etanol nas mesmas condições de separação, observando os picos no tempo de 6,508±0,07 min. A partir desta determinação foi possível calcular a mobilidade eletroosmótica (μ_{EOF}) de 3,61 10⁻⁴cm² V⁻¹s⁻¹ e a mobilidade eletroforética para cada composto no meio ().

É possível observar que à medida que o tempo de migração das substâncias aumenta, as velocidades de migração e as mobilidades eletroforéticas diminuem, isso acontece devido a dois motivos: os diferentes equilíbrios de partição destes compostos entre a fase micelar e aquosa, e também devido a densidade de carga negativa dos compostos. Ou seja, compostos com maior interação pela fase micelar ou que apresentem maior densidade de carga negativa, migram com uma velocidade menor apresentando maiores tempos de migração e menores mobilidades eletroforéticas em relação aquelas com maior afinidade pela fase aquosa ou que apresentem menor densidade de carga negativa, que migram rapidamente possuindo menor tempo de migração causado pela maior velocidade e mobilidade eletroforética.

Tabela 6 -Tempo de migração, velocidade e mobilidade eletroforética dos marcadores químicos presentes na amostra EPA de *Paullinia cupana*

Marcador químico	Tempo de migração (min)	Velocidade eletroforética (m s⁻¹)	Mobilidade eletroforética (cm² V⁻¹ s⁻¹)
EOF	6,50	1,24 10 ⁻³	3,61 10 ⁻⁴
PB4	8,08	-0,24 10 ⁻³	-0,70 10 ⁻⁴
PB1	8,65	-0,31 10 ⁻³	-0,89 10 ⁻⁴
Cafeína	8,94	-0,34 10 ⁻³	-0,99 10 ⁻⁴
Catequina	9,27	-0,37 10 ⁻³	-1,07 10 ⁻⁴
PB2	10,41	-0,46 10 ⁻³	-1,35 10 ⁻⁴
Epicatequina	18,25	-0,80 10 ⁻³	-2,32 10 ⁻⁴

5 CONCLUSÃO

No desenvolvimento da metodologia por cromatografia eletrocinética micelar foram avaliados diversos parâmetros que interferem na separação de substâncias. Após otimização destes parâmetros, concluiu-se que o melhor sistema para análise do extrato semipurificado de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (guaraná), foi a solução eletrolítica composta por tampão fosfato 40 mmol l⁻¹ adicionado de 30 mmol l⁻¹ de SDS em pH 7,0, com voltagem aplicada de 20 kV a 25 °C, tempo de injeção da amostra de 5 s (0,5 psi) e detecção a 214 nm. Nessas condições visualizou-se um eletroferograma de boa resolução, com separação eficiente e seletiva, sendo possível a identificação dos picos de cafeína, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e procianidina B4. A partir dessa metodologia desenvolvida neste capítulo, foi realizada a validação da mesma.

CAPÍTULO 4

VALIDAÇÃO DE METODOLOGIA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

1 REVISÃO DE LITERATURA

Após a otimização das condições analíticas, procedeu-se à validação do método desenvolvido por MEKC, com base em protocolos oficiais.

A validação é realizada para garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados. Para tanto, os parâmetros de validação que devem ser avaliados são: especificidade e seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção (DL), limite de quantificação (QL), precisão, exatidão, e robustez de acordo com a RE 899/2003-ANVISA (BRASIL, 2003).

Especificidade e seletividade é a capacidade do método de avaliar uma substância em presença de outras, tais como impurezas, produtos de degradação e componentes da matriz. Pode ser determinada pela comparação dos resultados obtidos de amostras contaminadas com quantidades conhecidas de impurezas ou excipientes e amostras não contaminadas, para demonstrar que o resultado do teste não é afetado por esses materiais (BRASIL, 2003).

Linearidade de um método analítico é a capacidade de fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de um determinado intervalo (BRASIL, 2003). A linearidade do método de quantificação por EC é analisada através da construção de uma curva analítica dos padrões utilizando diferentes concentrações.

Intervalo de um método analítico é a faixa entre os limites de quantificação superior e inferior. Para determinação quantitativa do analito, usa-se uma faixa de 80 a 120% da concentração teórica testada.

Precisão é a avaliação da proximidade das respostas obtidas quando uma série de medidas for realizada para uma mesma amostra, em idênticas condições de teste. É considerada em três níveis: repetibilidade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A repetibilidade deve ser verificada por, no mínimo, nove determinações, ou seja, três concentrações dentro do intervalo estabelecido (baixa, média, alta) em triplicata ou no mínimo seis determinações com 100% da concentração do teste (BRASIL, 2003).

O ensaio de recuperação constitui o método mais utilizado para validação de processos analíticos. A recuperação está relacionada com a exatidão, pois determina a quantidade do fármaco recuperado no processo de preparação da amostra, observando a proximidade dos resultados obtidos pelo método em estudo em relação ao valor verdadeiro (BRASIL, 2003).

O limite de detecção (LD) é determinado pela menor quantidade de fármaco presente em uma amostra que pode ser detectado, porém não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

O limite de quantificação (LQ) é determinado pela menor quantidade de fármaco em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas (BRASIL, 2003).

A robustez de um método analítico mede a susceptibilidade do método de variar os resultados devido a variações dos parâmetros analíticos (BRASIL, 2003).

2 OBJETIVO

Esse capítulo teve como objetivo o desenvolvimento de metodologia analítica do extrato semipurificado EPA de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke por cromatografia eletrocinética micelar segundo critérios estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária RE 899/2003-ANVISA e Internacional Conference on Harmonization (ICH) no que diz respeito à seletividade, linearidade, intervalo, limite de detecção (DL), limite de quantificação (QL), precisão, exatidão e robustez.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Os seguintes itens: MATÉRIA-PRIMA VEGETAL, MATERIAL E EQUIPAMENTOS, PREPARAÇÃO DE EXTRATO e PREPARO DA SOLUÇÃO ENXÁGUE, estão descritos no capítulo 2, em MATERIAL E MÉTODOS (p. 60-63).

O item SOLVENTES E REAGENTES e CONDIÇÕES ELETROFORÉTICAS estão descrito no capítulo 3, em MATERIAL E MÉTODOS (p. 85).

3.1 PREPARO DA SOLUÇÃO ELETROLÍTICA

A solução eletrolítica foi preparada de acordo com o tópico 3.2.2 descrito no capítulo 3 (p. 86). Posteriormente, foi realizada diluição tanto da solução tampão fosfato (200 mmol l^{-1}) quanto da solução de SDS (200 mmol l^{-1}) para se obter uma solução eletrolítica com concentrações de 40 mmol l^{-1} de tampão fosfato e 30 mmol l^{-1} de SDS.

3.2 PREPARO DA SOLUÇÃO AMOSTRA

Para o preparo da amostra pesou-se 5,0 mg de extrato semi-purificada EPA, solubilizou-se em 100 μl de metanol e completou-se o volume para 10,0 ml de água ultrapura, obtendo-se uma solução de amostra na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$. A partir dessa solução foi realizada uma diluição para obtenção de uma solução de amostra na concentração de 100 $\mu\text{g/ml}$. A solução foi filtrada utilizando membrana Millipore de 0,45 μm antes de ser injetada no aparelho de CE.

3.3 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

3.3.1 Especificidade e seletividade

Nesta análise foram avaliados os seguintes parâmetros para cafeína, catequina e epicatequina: 1) Coeficiente de variação do tempo de retenção, 2) Coeficiente de variação da área, 3) Resolução, 4) Eficiência (Pratos Teóricos) e 5) Assimetria. Os valores foram comparados com os critérios estabelecidos pelo ICH (Internacional Conference on Harmonization).

3.3.2 Linearidade

Nesta análise foram escolhidos como padrões externos para validação da metodologia, as substâncias de referências cafeína, catequina e epicatequina. As curvas de calibração foram feitas com seis pontos nas concentrações de 5,0, 10,0, 20,0, 40,0, 80,0 e 160,0 $\mu\text{g/ml}$. Considerou-se o critério mínimo aceitável do coeficiente de correlação (r) igual ou maior do que 0,99 e os testes de correlação linear e análise residual foram realizados pela análise de regressão linear simples.

3.3.3 Limite de detecção (LD)

O limite de detecção foi determinado pelos parâmetros da curva analítica pela fórmula:

$$LD = \frac{DPa \ 3}{IC}$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva

3.3.4 Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação foi determinado pelos parâmetros da curva analítica pela fórmula:

$$LQ = \frac{DPa \ 10}{IC}$$

Onde, DPa = desvio padrão do intercepto com o eixo y;

IC = inclinação da curva

3.3.5 Precisão

Foram avaliados a precisão intra-corrida (repetibilidade) e a precisão inter-corrida (intermediária). A repetibilidade foi analisada por 9 determinações da amostra de 100 µg/ml do extrato semipurificado EPA de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. Para precisão intermediária foram analisadas 9 determinações, em dias diferentes, não sendo admitido coeficiente de variação superior a 5 % em relação ao resultado obtido no teste de repetibilidade.

3.3.6 Exatidão

A exatidão do método foi realizada pela porcentagem de recuperação, após adição de 10, 40 e 80 µg/ml (concentração baixa, média e alta, respectivamente) de soluções dos padrões, em uma amostra de concentração conhecida. A porcentagem de recuperação será calculada pela fórmula:

$$R(\%) = \frac{C \ 100}{C_T}$$

Onde, $R(\%)$ = porcentagem de recuperação

C = concentração média experimental

C_T = concentração teórica

3.3.7 Robustez

Na determinação de robustez do método, avaliou-se a estabilidade do perfil eletroforético à variações na voltagem aplicada. Foram testadas voltagens de 19 e 21 kV. Se

estas mudanças estiverem dentro dos limites de exatidão, precisão e seletividade aceitáveis, então o método possui robustez.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

4.1.1 Especificidade e Seletividade

A especificidade é definida como a habilidade do método em distinguir o analito em presença de outros componentes tais como impurezas, produtos de degradação e componentes de matriz (BRASIL, 2003).

Como a amostra analisada apresenta uma matriz complexa, foram analisados diversos parâmetros apresentados na Tabela 7. Todos os parâmetros estavam de acordo com os critérios estabelecidos pelo ICH (Internacional Conference on Harmonization), caracterizando picos bem separados, simétricos e com alta eficiência, possibilitando a validação da metodologia.

Tabela 7 - Parâmetros dos picos da cafeína, catequina e epicatequina

Picos (n=9)	CV t_R (%)	CV área (%)	Resolução	Prato Teóricos	Assimetria do pico
Cafeína	2,4747	4,4828	2,5478	86806	0,9413
Catequina	2,5645	4,9963	2,6317	84618	0,9272
Epicatequina	4,2356	2,1911	13,3074	68215	1,9521
Referência (ICH)	-----	-----	> 2	> 2000	≤ 2

4.1.2 Linearidade

A linearidade é a capacidade de uma metodologia analítica em demonstrar que os resultados obtidos são diretamente proporcionais à concentração do analito na amostra, dentro de uma faixa de concentrações especificada (BRASIL, 2003).

A estimativa dos coeficientes de uma curva podem ser obtidos através de regressão linear, sendo possível calcular o coeficiente de correlação (r) (RIBANI et al., 2004). Segundo a RE nº. 899/2003, o critério mínimo aceitável para o coeficiente de correlação deve ser maior ou igual a 0,99. O coeficiente de correlação determina uma estimativa da qualidade da curva, sendo que quando r^2 encontra-se próximo de 1,0, menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza do coeficiente de regressão (RIBANI et al., 2004).

Porém, esse critério não é suficiente para garantir a adequação do ajuste linear da curva de calibração. É necessário a realização de uma análise estatística (Teste F) para

verificar o modelo e a falta de ajuste, fornecendo resultados não tendenciosos e com uma variação mínima (PIMENTEL; NETO, 1996).

4.1.2.1 Cafeína

Os valores da curva de calibração para cafeína estão expostos na Tabela 8 e na Figura 36, e observa-se que o coeficiente de correlação (0,9964) encontra-se dentro dos limites preconizados pela RE nº. 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 8 - Concentração de cafeína e suas respectivas áreas na curva de linearidade

Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Área média ($x \pm dp$ [CV%])
5,0	3329,80 $\pm$ 151,30 [4,54]
10,0	7247,90 $\pm$ 213,79 [2,95]
20,0	13637,20 $\pm$ 541,40 [3,97]
40,0	26903,20 $\pm$ 1659,48 [6,17]
80,0	53573,40 $\pm$ 2680,67 [5,00]
160,0	107689,30 $\pm$ 4460,49 [4,14]

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

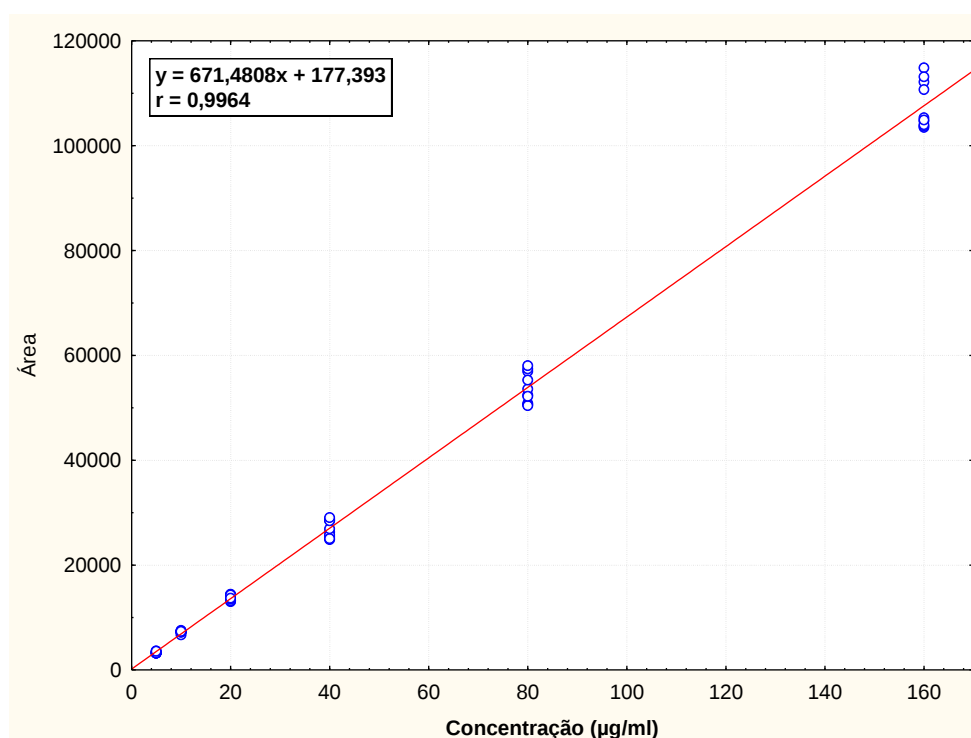


Figura 36 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para cafeína.

Para se verificar o modelo e a falta de ajuste, realizou-se análise estatística pelo teste F (Tabela 9). O valor F do modelo (15963,99) é maior do que o F crítico (4,034) em 95% de

significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto a falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (0,09) é menor que o F crítico (2,557), assim aceita-se a hipótese nula de que não há falta de ajuste no método. Além disso, os resíduos apresentaram distribuição normal e variância homogênea.

Tabela 9 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da cafeína

	SQ	GI	SM	F	F crítico
Modelo	7,9299 10 ¹⁰	1	7,9299 10 ¹⁰	15963,99	4,034
Resíduo	2,8811 10 ⁸	58	4,9674 10 ⁶		
Falta de ajuste	2,0787 10 ⁶	4	5,1969 10 ⁵	0,09	2,557
Erro puro	2,860310 ⁸	54	5,2968 10 ⁶		

SQ = soma quadrática dos resíduos; gL = grau de liberdade; SM = soma média dos quadrados.

A partir dos resultados obtidos, considerou-se que a metodologia desenvolvida para análise de fração semipurificada de *Paullinia cupana* apresenta linearidade para a substância cafeína.

4.1.2.2 Catequina

Os valores da curva de calibração para catequina são apresentados na Tabela 10 e na Figura 37, observa-se que o coeficiente de correlação (0,9979) encontra-se dentro dos limites preconizados pela RE nº. 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 10 - Concentração de catequina e suas respectivas áreas na curva de linearidade

Concentração (µg ml⁻¹)	Área média (x ± dp [CV%])
5,0	5177,43 ± 184,85 [3,57]
10,0	10246,36 ± 408,41 [3,98]
20,0	19492,43 ± 1673,66 [8,58]
40,0	39283,86 ± 1540,94 [3,92]
80,0	76626,93 ± 3243,73 [4,23]
160,0	150199,50 ± 4155,40 [2,76]

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

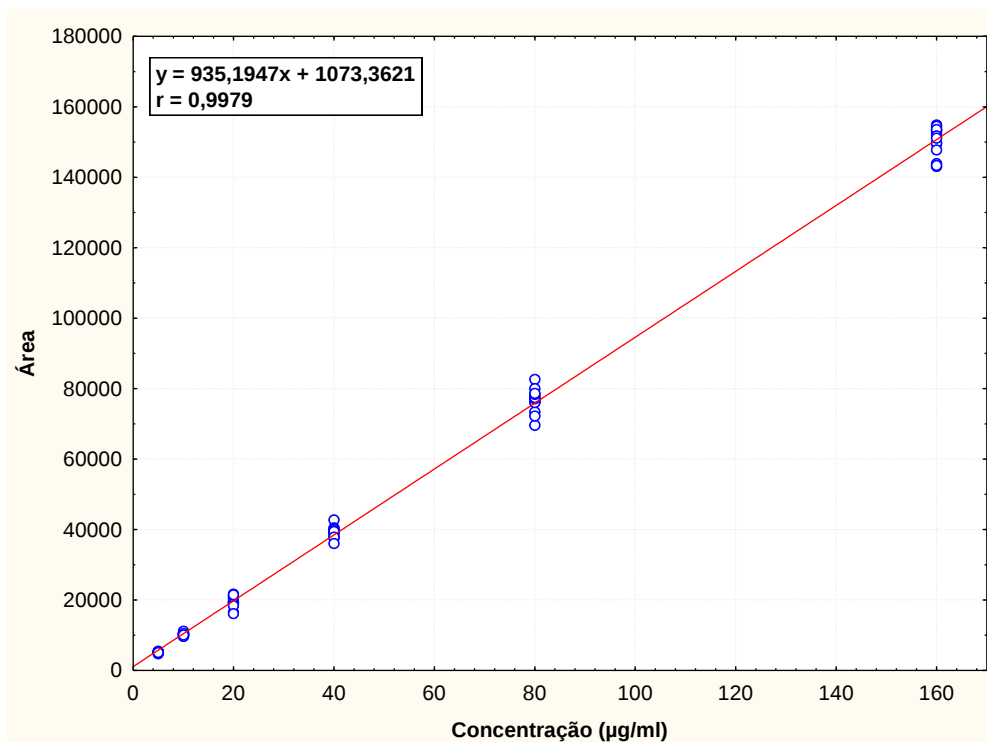


Figura 37 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para catequina.

Para se verificar o modelo e a falta de ajuste, realizou-se análise estatística pelo teste F (Tabela 11). O valor F do modelo (38594,54) é maior do que o F crítico (3,960) em 95% de significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto a falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (1,19) é menor que o F crítico (2,525), assim aceita-se a hipótese nula de que não há falta de ajuste no método. Além disso, os resíduos apresentaram distribuição normal e variância homogênea.

Tabela 11 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da catequina

	SQ	gL	SM	F	F crítico
Modelo	$2,1534 \cdot 10^{11}$	1	$2,1534 \cdot 10^{11}$	38594,54	3,960
Resíduo	$4,5753 \cdot 10^8$	82	$5,5796 \cdot 10^6$		
Falta de ajuste	$2,6379 \cdot 10^7$	4	$6,5948 \cdot 10^6$	1,19	2,525
Erro puro	$4,3115 \cdot 10^8$	78	$5,5276 \cdot 10^6$		

SQ = soma quadrática dos resíduos; gL = grau de liberdade; SM = soma média dos quadrados.

A partir dos resultados obtidos, considerou-se que a metodologia desenvolvida para análise de fração semipurificada de *Paullinia cupana* apresenta linearidade para a substância catequina.

4.1.2.3 Epicatequina

Os valores da curva de calibração para epicatequina são apresentados na Tabela 12 e na Figura 38, observa-se que o coeficiente de correlação (0,9984) encontra-se dentro dos limites preconizados pela RE nº. 899/2003 (BRASIL, 2003).

Tabela 12 - Concentração de epicatequina e suas respectivas áreas na curva de linearidade

Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Área média ($x \pm dp$ [CV%])
5,0	10247,30 $\pm$ 652,92 [6,37]
10,0	20880,70 $\pm$ 1185,09 [5,67]
20,0	41123,10 $\pm$ 1834,76 [4,46]
40,0	79609,10 $\pm$ 1964,57 [2,46]
80,0	156840,70 $\pm$ 1734,75 [1,10]
160,0	304784,90 $\pm$ 9087,82 [2,98]

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

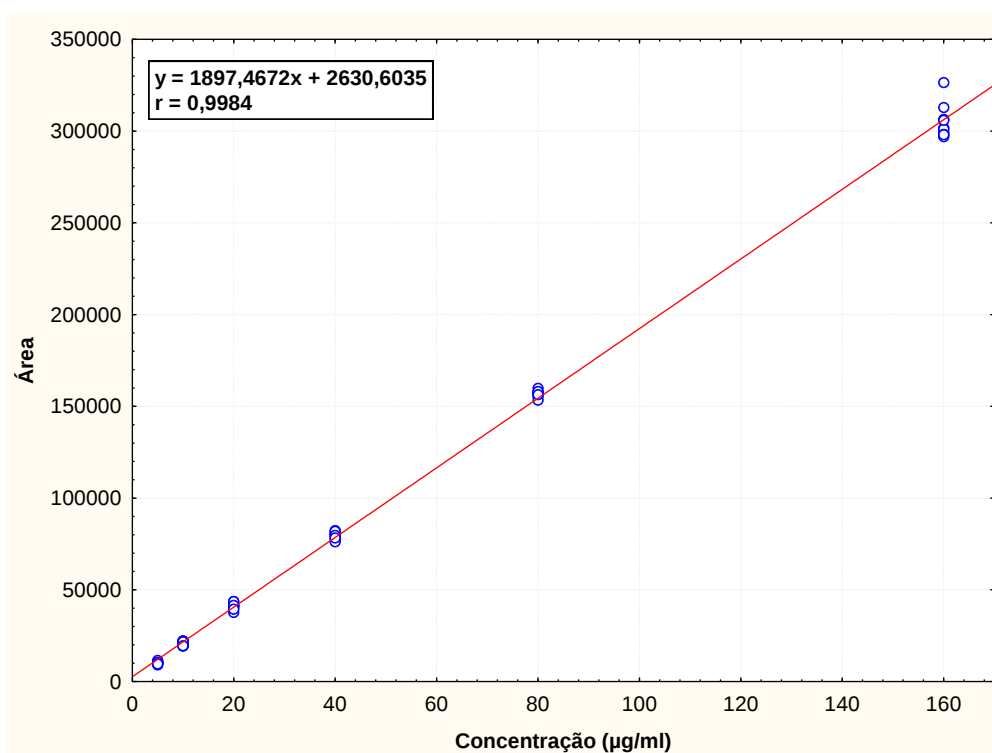


Figura 38 - Representação da curva de linearidade, com coeficiente de correlação (r) e equação da reta para epicatequina.

Para se verificar o modelo e a falta de ajuste, realizou-se análise estatística pelo teste F (Tabela 13). O valor F do modelo (37259,14) é maior do que o F crítico (4,034) em 95% de significância, assim rejeita-se a hipótese nula (não há linearidade) e aceita-se que a curva é linear. Quanto a falta de ajuste, nota-se que ocorre o inverso, o F calculado (2,12) é menor

que o F crítico (2,557), assim aceita-se a hipótese nula de que não há falta de ajuste no método. Além disso, os resíduos apresentaram distribuição normal e variância homogênea.

Tabela 13 - Análise estatística quanto ao modelo e a falta de ajuste na linearidade da epicatequina

	SQ	gL	SM	F	F crítico
Modelo	6,3321 10 ¹¹	1	6,3321 10 ¹¹	37259,14	4,034
Resíduo	9,8570 10 ⁸	58	1,6994 10 ⁷		
Falta de ajuste	1,3381 10 ⁸	4	3,3453 10 ⁷	2,12	2,557
Erro puro	8,5189 10 ⁸	54	1,5775 10 ⁷		

SQ = soma quadrática dos resíduos; gL = grau de liberdade; SM = soma média dos quadrados.

A partir dos resultados obtidos, considerou-se que a metodologia desenvolvida para análise de fração semipurificada de *Paullinia cupana* apresenta linearidade para a substância epicatequina.

4.1.3 Limite de Detecção, Limite de Quantificação e Intervalo

O limite de detecção (LD) é a menor concentração do analito em uma amostra que pode ser detectada e diferenciada do ruído, porém, não necessariamente quantificada. O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração do analito que pode ser determinado com precisão e exatidão. O intervalo é a faixa entre os limites de quantificação inferior e superior de uma metodologia analítica, onde se tem exatidão, precisão e linearidade (BRASIL, 2003).

Os LD e LQ podem ser determinados por 3 métodos: 1) visual, 2) relação sinal-ruído e 3) baseados em parâmetros da curva analítica (RIBANI et al., 2004). Neste trabalho, esses parâmetros foram definidos com base na curva analítica (Tabela 14).

Tabela 14 - Limites de Detecção (LD), Limites de Quantificação (LQ) e Intervalo para os marcadores químicos de *Paullinia cupana*

Marcador	DPa	IC	LD (µg ml ⁻¹)	LQ (µg ml ⁻¹)	Intervalo (µg ml ⁻¹)
Cafeína	142,79	671,48	0,638	2,126	5,0 – 160,0
Catequina	456,69	935,19	1,465	4,883	5,0 – 160,0
Epicatequina	610,50	1897,47	0,965	3,217	5,0 – 160,0

DPa = desvio padrão do intercepto y; IC = inclinação da reta

Os limites de detecção para cafeína, catequina e epicatequina foram 0,638, 1,465 e 0,965, enquanto que os limites de quantificação foram 2,126, 4,883 e 3,217, respectivamente.

O intervalo (5,0 – 160,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$) apresenta concentrações com linearidade, exatidão e precisão.

4.1.4 Precisão

As concentrações estão apresentadas na Tabela 15. A média da concentração obtida para cafeína, catequina e epicatequina, foram de 25,20, 14,29 e 16,69 $\mu\text{g ml}^{-1}$, com coeficiente de variação (CV) igual a 4,77, 4,49 e 2,19%, e desvio padrão de 1,20, 0,64 e 0,37 $\mu\text{g ml}^{-1}$, respectivamente.

Segundo a RE n°. 899, de 23 de maio de 2003, o valor máximo aceitável para o coeficiente de variação é 5%. Portanto, observando os resultados pode-se afirmar que o método apresenta repetibilidade na quantificação dos marcadores químicos em fração semipurificada de *Paullinia cupana*.

A precisão é a avaliação da proximidade dos resultados obtidos em uma série de medidas de uma amostragem múltipla de uma mesma amostra, podendo ser expressa como desvio padrão relativo ou coeficiente de variação (BRASIL, 2003).

A repetibilidade ou a precisão intra-corrida expressa a concordância entre os resultados dentro de um curto período de tempo com o mesmo analista e mesma instrumentação (BRASIL, 2003).

As concentrações obtidas para amostras (n=9) de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fração semipurificada de *Paullinia cupana* analisadas 45 dias após o teste de repetibilidade estão apresentadas na Tabela 15. Pela análise estatística, observa-se que os resultados não demonstram diferença significativa entre os dias para determinação de cafeína ($p=0,43$, $p>0,05$), catequina ($p=0,15$, $p>0,05$) e epicatequina ($p=0,37$, $p>0,05$).

Precisão intermediária ou precisão inter-corridas expressa a concordância entre os resultados do mesmo laboratório, mas obtidos em dias diferentes, com analistas diferentes e/ou equipamentos diferentes (BRASIL, 2003).

Tabela 15 - Concentrações obtidas no teste de precisão com amostras de 100 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de fração semipurificada de *Paullinia cupana* para cafeína, catequina e epicatequina

REPETIBILIDADE			
	Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)
	Cafeína	Catequina	Epicatequina
1	25,76	13,67	16,41
2	24,19	14,00	16,83
3	27,56	13,33	16,69
4	26,18	14,14	16,43
5	25,71	14,80	16,18
6	24,45	14,63	17,22
7	23,82	14,57	16,92
8	24,27	14,04	16,86
9	24,84	15,46	16,92
x $\pm$ dp [CV(%)]	25,20 $\pm$ 1,20 [4,77]	14,29 $\pm$ 0,64 [4,49]	16,69 $\pm$ 0,37 [2,19]
PRECISÃO INTERMEDIÁRIA			
1	26,07	14,29	16,86
2	26,59	14,22	16,73
3	25,59	14,53	17,05
4	27,35	14,81	16,82
5	26,79	14,70	16,90
6	25,73	15,00	17,17
7	24,57	14,61	17,39
8	24,74	13,95	16,45
9	26,79	15,17	16,61
x $\pm$ dp [CV(%)]	26,03 $\pm$ 0,95 [3,67]	14,59 $\pm$ 0,39 [2,66]	16,89 $\pm$ 0,29 [1,69]

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

4.1.5 Exatidão

A exatidão é a proximidade dos resultados apresentados pela metodologia em relação ao valor verdadeiro adicionado. As concentrações obtidas no teste de exatidão para os marcadores químicos cafeína, catequina e epicatequina, estão nas Tabela 16, Tabela 17 e Tabela 18, respectivamente.

De acordo com a RE nº. 899/2003, o índice de recuperação aceitável para matriz complexa pode variar entre 85 e 115% (BRASIL, 2003). Os resultados apresentados mostram que a recuperação dos marcadores químicos de *Paullinia cupana* (cafeína, catequina e epicatequina) obtida nas três concentrações utilizadas foi aceitável, logo, pode-se afirmar que há exatidão no método.

Tabela 16 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de *Paullinia cupana* na análise de cafeína

	Concentração esperada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g ml}^{-1}$) $\bar{x} \pm \text{dp}$ [CV(%)]	Recuperação (%)
Concentração baixa	10,00	10,59 $\pm$ 0,27 [2,54]	105,9
Concentração média	40,00	38,00 $\pm$ 0,66 [1,73]	95,0
Concentração alta	80,00	75,02 $\pm$ 1,32 [1,76]	93,8

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Tabela 17 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de *Paullinia cupana* na análise de catequina

	Concentração esperada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g ml}^{-1}$) $\bar{x} \pm \text{dp}$ [CV(%)]	Recuperação (%)
Concentração baixa	10,00	9,23 $\pm$ 0,14 [1,48]	92,3
Concentração média	40,00	40,79 $\pm$ 1,08 [2,66]	102,0
Concentração alta	80,00	80,86 $\pm$ 0,61 [0,75]	101,1

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

Tabela 18 - Médias das concentrações obtidas no teste de exatidão e seus respectivos percentuais de recuperação da fração semipurificada de *Paullinia cupana* na análise de epicatequina

	Concentração esperada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração obtida ($\mu\text{g ml}^{-1}$) $\bar{x} \pm \text{dp}$ [CV(%)]	Recuperação (%)
Concentração baixa	10,00	$8,99 \pm 0,41$ [4,54]	89,9
Concentração média	40,00	$38,38 \pm 1,70$ [4,43]	95,9
Concentração alta	80,00	$77,81 \pm 2,83$ [3,63]	97,3

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação

4.1.6 Robustez

A robustez de uma metodologia é a capacidade desta em resistir a pequenas variações analíticas, sem perder a exatidão e a precisão. Com este parâmetro é possível controlar e prevenir alguns erros no método durante o procedimento, já que se tem a susceptibilidade da metodologia (BRASIL, 2003; RIBANI et al., 2008).

Nesta análise, uma amostra foi analisada nas mesmas condições utilizadas na metodologia e com pequenas variações na voltagem (19 e 21 kV), observando-se a influência da mesma na concentração e no tempo de migração dos marcadores químicos cafeína, catequina e epicatequina.

De acordo com as Tabela 19 e Tabela 20, observa-se que nas duas variações de voltagem testadas houve pelo menos um ponto significativamente diferente ($p < 0,05$) das condições da metodologia desenvolvida. Isso demonstra que o método não é robusto.

Tabela 19 - Concentrações dos marcadores químicos de *Paullinia cupana* na análise da robustez

Voltagem	Concentração ($\mu\text{g ml}^{-1}$)		
	$\bar{x} \pm \text{dp} [\text{CV}(\%)]$		
	Cafeína	Catequina	Epicatequina
19	20,51 $\pm$ 0,61 [2,96]	17,97 $\pm$ 0,27 [1,51]*	45,83 $\pm$ 1,31 [2,86]
20	19,17 $\pm$ 0,75 [3,93]	16,70 $\pm$ 0,52 [3,14]	44,23 $\pm$ 1,38 [3,13]
21	19,15 $\pm$ 0,38 [2,01]	16,61 $\pm$ 0,36 [2,16]	39,31 $\pm$ 0,22 [0,58]*

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; * = significativamente diferente

Tabela 20 - Tempos de migração dos marcadores químicos de *Paullinia cupana* na análise da robustez

Voltagem	Tempo de migração (min)		
	$\bar{x} \pm \text{dp} [\text{CV}(\%)]$		
	Cafeína	Catequina	Epicatequina
19	9,33 $\pm$ 0,22 [2,42]	9,69 $\pm$ 0,24 [2,53]	19,05 $\pm$ 0,80 [4,19]
20	9,00 $\pm$ 0,28 [3,18]	9,34 $\pm$ 0,30 [3,22]	18,44 $\pm$ 0,50 [2,74]
21	8,48 $\pm$ 0,11 [1,36]*	8,80 $\pm$ 0,12 [1,39]*	17,19 $\pm$ 0,37 [2,16]*

X = média; dp = desvio padrão; CV = coeficiente de variação; * = significativamente diferente

5 CONCLUSÃO

O estudo de plantas é necessário para se garantir qualidade, segurança e efetividade na utilização terapêutica, que vem crescendo diariamente. Neste trabalho, propôs-se o desenvolvimento de uma metodologia rápida e exata, empregando a eletroforese capilar na separação, identificação e quantificação de substâncias de referência de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke.

Duas técnicas de separação em eletroforese capilar foram empregadas, a eletroforese capilar de zona (CZE) e a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC).

Na eletroforese capilar de zona (CZE) foi desenvolvida uma metodologia com as condições eletroforéticas: tampão borato 50 mmol L⁻¹ em pH 8,5 adicionado de 1,0 mmol L⁻¹ de β -ciclodextrina, voltagem aplicada de 20 kV, detecção em 214 nm, injeção da amostra por 3 s a 0,3 psi, temperatura do capilar em 25 °C. Nestas condições obteve-se um eletroferograma em 7 min, com a separação dos picos de cafeína, *ent*-catequina, catequina, epicatequina, alcançando a enantioseparação dos isômeros da catequina. Porém, a presença de caudas nos picos da cafeína, catequina e epicatequina impossibilitaram o uso deste para validação do método.

Na cromatografia eletrocinética micelar (MEKC), foi desenvolvida uma metodologia com as seguintes condições eletroforéticas: tampão fosfato 40 mmol L⁻¹ em pH 7,0 adicionado de 30 mmol L⁻¹ de SDS, com voltagem aplicada de 20 kV, detecção a 214 nm, tempo de injeção da amostra de 5 s (0,5 psi) e temperatura do capilar em 25 °C. Por esta metodologia obteve-se um eletroferograma em 20 min com a presença dos picos de cafeína, catequina, epicatequina, procianidina B1, procianidina B2 e procianidina B4.

A validação da metodologia empregando a cromatografia eletrocinética micelar (MEKC) mostrou que o método é seletivo, linear e preciso, atendendo às exigências das aplicações analíticas e assegurando confiabilidade nos resultados, apresentando-se confiável no intervalo de quantificação de 5,0 a 160 $\mu\text{g ml}^{-1}$ para cafeína, catequina e epicatequina. No entanto, o método não apresentou robustez quando avaliado com pequenas variações na voltagem.

REFERÊNCIAS

- ALTRIA, K.D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, n.1/2, p. 443-463, 1999.
- ANDRADE, L. Estudo da metodologia de análise da droga vegetal guaraná. 1996. 106 f. Dissertação (Mestrado)—Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, 1996.
- ANDRADE, L.; SCHENKEL, E.P.; BERGOLD, A.M. Estudo da metodologia de análise de cafeína em sementes de guaraná (*Paullinia cupana*). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, n. 1/2, p. 7-9, 1999.
- ANDRADE, P.B.; OLIVEIRA, B.M.; SEABRA, R.M.; FERREIRA, M.A.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C. Analysis of phenolic compounds in Spanish Albariño and Portuguese Alvarinho and Loureiro wines by capillary zone electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Electrophoresis**, v. 22, n. 8, p. 1568-1472, 2001.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; KANESHIMA, E.N.; GABRIEL, M.; AUDI, E.A.; MARQUES, L.C.; MELLO, J.C.P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, 2010.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI, E.; UHEMURA, L.M.; MELLO, J.C.P. Controle de qualidade de amostras de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 383-386, 2004.
- ANTONELLI-USHIROBIRA, T.M.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; PALAZZO DE MELLO, J.C. Chemical and microbiological study of extract from seeds of guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v. 26, n. 1, p. 5-9, 2007.
- AURICCHIO, M.T.; BATISTIC, M.A.; HOPPEN, V.R. Introdução da técnica espectrofotométrica na detecção da cafeína em guaraná. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 47, n. 1/2, p. 39-44, 1987.
- BAKER, D. R. Capillary Electrophoresis: Techniques in Analytical Chemistry. **John Wiler & Sons, Inc.**, 1ª ed., 1995.
- BARBOSA, G.D.A.F.; MELLO, J.C.P. Avaliação clínica do extrato de guaraná no controle da placa bacteriana dentária. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 26, n. 4, p. 28-30, 2004.

BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL PEZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 1, p. 32–36, 2005.

BAUMANN, T.W.; SCHULTHESS, B.H.; HÄNNI, K. Guaraná (*Paullinia cupana*) rewards seed dispersers without intoxicating them by caffeine. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1063-1070, 1995.

BRASIL. **ANVISA/MS**. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em <www.anvisa.org.br>. Acesso em 30 de abril 2007.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente**. Plantas para o futuro. Disponível em <<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=111>> acesso em 08 dez 2009.

BUERKI, S.; FOREST, F.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; CALLMANDER, M.W.; NYLANDER, J.A.A.; HARRINGTON, M.; SANMARTÍN, I.; KUPFER, P.; ALVAREZ, N. Plastic and nuclear DNA markers reveal intricate relationships at subfamilial and tribal levels in the soapberry family (Sapindaceae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 51, n. 2, p. 238-258, 2009.

BYDLOWSKI, S.P.; YUNKER, R.L.; SUBBIAH, M.T.R. A novel property of an aqueous guarana extract (*Paullinia cupana*): inhibition of platelet aggregation *in vitro* and *in vivo*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, n. 3, p. 535-538, 1988.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; ALBUQUERQUE, F.A.A.; LEAL, L.K.A.; RAO, V.S.N. Acute effects of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) on mouse behaviour in forced swimming and open field tests. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 441-443, 2005.

CAMPOS, A.R.; BARROS, A.I.S.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S.N. Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) offers protection against gastric lesions induced by ethanol and indomethacin in rats. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1199-1202, 2003.

CAO, J.; CHEN, J.; YI, L.; LI, P.; QI, L-W. Comparison of oil-in-water and water-in-oil microemulsion electrokinetic chromatography as methods for the analysis of eight phenolic acids and five diterpenoids. **Electrophoresis**, v. 29, n. 11, p. 2310-2320, 2008.

CARLSON, M.; THOMPSON, R.D. Liquid chromatographic determination of methylxantines and catechins in herbal preparations containing guarana. **Journal of the Association of Official Analytical Chemists**, Arlington, v. 81, n. 4, p. 691-701, 1998.

CARVALHO, J.C.T.; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E.P. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 20, p. 433-449.

CASTLEMAN, M. The healing herbs. Pensilvania: Rodale Press, 1991. p. 125-129, 348-350.

CHANKVETADZE, B. Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors. **Journal of Chromatography A**, v. 792, n. 1/2, p. 269-295, 1997.

CHEUNG, H-Y.; ZHANG, Q-F. Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in *Prunella vulgaris* L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers. **Journal of Chromatography A**, v. 1213, n. 2, p. 231-238, 2008.

CORRÊA, M.P. Dicionário das plantas úteis do Brasil. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.3, p. 545-555.

DEEB, S.E.; HASEMANN, P.; WATZIG, H. Strategies in method development to quantify enantiomeric impurities using CE. **Electrophoresis**, v. 29, n. 17, p. 3552-3562, 2008.

DUKE, J.A. Handbook of medicinal herbs. Florida: CRC, 1985. p. 131, 349, 521, 562.

EDWARDS, H.G.M.; FARWELL, D.W.; OLIVEIRA, L.F.C.; ALIA, J.M.; LE HYARIC, M.; ALMEIDA, M.V. FT-Raman spectroscopic studies of guaraná and some extracts. **Analytica Chimica Acta**, v. 532, n. 2, p. 177-186, 2005.

ELISABETSKY, E. Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 32, n.1-3, p.235-239, 1991.

ESPÍNOLA, E.B.; DIAS, R.F.; MATTEI, R.; CARLINI, E.A. Pharmacological activity of Guarana (*Paullinia cupana* Mart.) in laboratory animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 3, p. 223-229, 1997.

FANALI, S. Chiral separations by CE employing CDs. **Electrophoresis**, v. 30, p. 5203-5210, 2009.

FARMACOPÉIA Brasileira. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 2010.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2003.

FILLET, M.; HUBERT, P.; CROMMEN, J. Method development strategies for the enantioseparation of drugs by capillary electrophoresis using cyclodextrins as chiral additives. **Electrophoresis**, v. 19, n. 16/17, p. 2834-2840, 1998.

FONSECA, C.A.S.; LEAL, J.; COSTA, S.S.; LEITÃO, A.C. Genotoxic and mutagenic effects of guaraná (*Paullinia cupana*) in prokaryotic organisms. **Mutation Research**, v. 321, n. 3, p. 165-173, 1994.

FONSECA, F.N.; TAVARES, M.F.M.; HORVÁTH, C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, n.1/2, p. 390-399, 2007.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; HEIDOR, R.; SILVA, T.D.; ATROCH, A.; MORENO, F.S.; DAGLI, M.L.Z. Protective effects of guaraná (*Paullinia cupana* Mart. var. *sorbilis*) against DEN-induced DNA damage on mouse liver. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, n. 6, p. 862-867, 2006.

FUKUMASU, H.; AVANZO, J.L.; NAGAMINE, M.K.; BARBUTO, J.A.; RAO, K.V.; DAGLI, M.L.Z. *Paullinia cupana* Mart var. *sorbilis*, guaraná, reduces cell proliferation and increases apoptosis of B16/F10 melanoma lung metastases in mice. Brazilian **Journal of Medical and Biological Research**, v. 41, n. 4, p. 305-310, 2008.

GAHM, K-H.; CHANG, L. W.; ARMSTRONG, D.W. Chiral separation of monoterpenes using mixtures of sulfated β -cyclodextrins and α -cyclodextrin as chiral additives in the reversed-polarity capillary electrophoresis mode. **Journal of Chromatography A**, v. 759, n. 1/2, p. 149-155, 1997.

GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.A. Acute effects of the *Paullinia cupana*, "Guaraná" on the cognition of normal volunteers. **São Paulo Medical Journal**, v. 112, n. 3, p. 607-611, 1994.

GALDURÓZ, J.C.F.; CARLINI, E.A. The effects of long-term administration of guarana on the cognition of normal, elderly volunteers. **São Paulo Medical Journal/RPM**, v. 114, n. 1, p. 1073-1078, 1996.

GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; LANTERI, S.; OLMO, S.; RAGAIN, A.; CAVRINI, V. Differentiation of green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content. **Electrophoresis**, v. 30, n. 16, p. 2922-2930, 2009.

GRIEVE, M.A. Modern herbal. New York: Hafner, 1967. p. 381.

HARBORNE, J.B. Phytochemical Methods: a guide to modern techniques of plant analysis. London, Weinheim, New York, Tokyo, Melbourne, Madras: Chapman & Hall. 3. ed. 1998.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-215, 1996.

HASLAM, E. Practical Polyphenolics: from structure to molecular recognition and physiological action. Cambridge: Cambridge University Press. 1. ed. 1998. p. 10-83 (24-31), 178-225 (180, 193-194).

HATTORI, M.; KUSUMOTO, I.; NAMBA, T.; ISHIGAMI, T.; HARA, Y. Effect of tea polyphenols of glucan synthesis by glucosyltransferase from *Streptococcus mutans*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin (Tokyo)**, v. 38, n. 3, p. 717-720, 1990.

HENMAN, A.R. Guaraná (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*): ecological and social perspectives on an economic plant of the central amazon basin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 6, n. 3, p. 311-338, 1982.

IBGE. Produção Agrícola Municipal. 2008. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pesquisas/pam/default.asp>>. Acesso em: 08 dez 2009.

International Conference on Harmonization (ICH) of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Topic Q2 (R1): Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology, Geneva, 2005.

ISSAQ, H.J. Capillary electrophoresis of natural products II. **Electrophoresis**, v. 20, n. 15/16, p. 3190-3202, 1999.

ISSAQ, H.J. Capillary electrophoresis of natural products. **Electrophoresis**, v. 18, n. 12/13, p. 2438-2452, 1997.

JOLY, A.B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. 13. ed. São Paulo: **Companhia Editora Nacional**, 2002, p. 428-430.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; ROBERTSON, B.; REAY, J.; BREWSTER-MAUND, C.; LUEDEMANN, J.; MAGGINI, S.; RUF, M.; ZANGARA, A.; SCHOLEY, A.B. Improved cognitive performance and mental fatigue following a multi-vitamin and mineral supplement with added guaraná (*Paullinia cupana*). **Appetite**, v. 50, n. 2/3, p. 506-513, 2008.

KENNEDY, D.O.; HASKELL, C.F.; WESNES, K.A.; SCHOLEY, A.B. Improved cognitive performance in human volunteers following administration of guarana (*Paullinia cupana*) extract: comparison and interaction with *Panax ginseng*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 79, n. 3, p. 401-411, 2004.

KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European Food Research and Technology**, v. 225, n. 3/4, p. 569-577, 2007.

KVASNICKA, F. Application of CE in hydrodynamically closed systems for analysis of bioactive compounds in food. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3581-3589, 2007.

LECHTENBERG, M.; QUANDT, B.; NAHRSTEDT, A. Quantitative determination of curcuminoids in *Curcuma* rhizomes and rapid differentiation of *Curcuma domestica* Val. and *Curcuma xanthorrhiza* Roxb. by capillary electrophoresis. **Phytochemical Analysis**, v. 15, n. 3, p. 152-158, 2004.

LEE, B.L.; ONG, C.N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by highperformance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v.881, n. 1/2, p. 439-447, 2000.

LI, P.; LI, S.P.; WANG, Y.T. Optimization of CZE for analysis of phytochemical bioactive compounds. **Electrophoresis**, v. 27, n. 23, p. 4808-4819, 2006.

LIMA, W.P.; CARNEVALI, L.C.; EDER, R.; ROSA, L.F.B.P.; BACCHI, E.M.; SEELAENDER, M.C.L. Lipid metabolism in trained rats: Effect of guarana (*Paullinia cupana* Mart.) supplementation. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 6, p. 1019-1028, 2005.

MACHADO, O. Contribuição ao estudo das plantas medicinais do Brasil – o guaraná. **Rodriguésia**, v. 9, n. 20, p. 89-110, 1946.

MAJHENIC, L.; SKERGET, M.; KNEZ, Z. Antioxidant and antimicrobial activity of guarana seed extracts. **Food Chemistry**, v. 104, n. 3, p. 1258-1268, 2007.

MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Plant molluscicides. **Phytochemistry**, v. 24, n. 4, p. 639-652, 1985.

MARX, F. Analysis of guaraná seeds. II. Studies on the composition of the tannin fraction. **Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung und Forschung**, v. 190, n. 5, p. 429-431, 1990.

MARX, F.; MAIA, J.G. Analysis of guarana (*Paullinia cupana* var. *sorbilis*). III. Identification and determination of guarana beverages by HPLC analysis of caffeine and theophylline. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 285-286, 1990.

MATTEI, R.; DIAS, R.F.; ESPÍNOLA, E.B.; CARLINI, E.A.; BARROS, S.B.M. Guaraná (*Paullinia cupana*): toxic behavioral effects in laboratory animals and antioxidant activity in vitro. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 60, n. 2, p. 111-116, 1998.

MENEZES, JÚNIOR, J.B.F. Do exame microscópico do guaraná em bromatologia. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 2, n. 1, p. 45-68, 1942.

NIERENSTEIN, M. Catechutannins: *Paullinia cupana*. **Journal of the Chemical Society**, Perkin Transactions I, p. 23-28, 1922.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Classification of oligomeric hydrolysable tannins and specificity of their occurrence in plants. **Phytochemistry**, v. 32, n.3, p. 507-521, 1993.

OKUDA, T.; YOSHIDA, T.; HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants. **Planta Medica**, v. 55, n. 2, p. 117-122, 1989.

OOSHIMA, T.; MINAMI, T.; AONO, W.; IZUMITANI, A.; SOBUE, S.; FUJIWARA, T.; KAWABATA, S.; HAMADA, S. Oolong tea polyphenols inhibit experimental dental caries in SPF rats infected with mutans streptococci. **Caries Research**, v. 27, n. 2, p. 124-129, 1993.

OTOBONE, F.J.; SANCHES, A.C.; NAGAE, R.L.; MARTINS, J.V.C.; OBICI, S.; MELLO, J.C.P.; AUDI, E. A. Effect of crude extract and its semi purified constituents from guaraná seeds (*Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.)) Lucke on cognitive performance in morris water maze in rats. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n. 5, p. 723-728, 2005.

OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C.; AUDI, E.A. Avaliação do extrato bruto e semipurificado do guaraná em testes comportamentais. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 10., 2001, Ponta Grossa. Anais. Ponta Grossa: UEPG, p. 68, 2001.

PAGLIARUSSI, R.S.; FREITAS, L.A.P.; BASTOS, J.K. A quantitative method for the analysis of xanthine alkaloids in *Paullinia cupana* (guarana) by capillary column gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 25, n. 5/6, p. 371-374, 2002.

PAN, J.; ZHANG, S.; YAN, L.; TAI, J.; XIAO, Q.; ZOU, K.; ZHOU, Y.; WU, J. Separation of flavanone enantiomers and flavanone glucoside diastereomers from *Balanophora involucrata* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, n. 1, p. 117-129, 2008.

PAPPAS, T. J.; GAYTON-ELY, M.; HOLLAND, L. A. Recent advances in micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, n.4/5, p. 719-734, 2005.

PELOZO, M.I.G.; CARDOSO, M.L.C.; MELLO, J.C.P. Spectrophotometric Determination of Tannins and Caffeine in Preparations from *Paullinia cupana* var. *sorbilis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 3, p. 447-451, 2008.

PIMENTEL, M.F.; NETO, B.B. Calibração: uma revisão para químicos analíticos. *Química Nova*, v. 19, p. 268-277, 1996.

PREINERSTORFER, B.; LAMMERHOFER, M.; LINDNER, W.; Advances in enantioselective separations using electromigration capillary techniques. **Electrophoresis**, v. 30, n. 1, p. 100-132, 2009.

RATES, S.M.K. Metilxantinas. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 34, p. 885-901.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.

REDDY, M.M.; SURESH, V.; JAYASHANKER, G.; RAO, B.S.; SARIN, R.K. Application of capillary zone electrophoresis in the separation and determination of the principal opium alkaloids. **Electrophoresis**, v. 24, n. 9, p. 1437-1441, 2003.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v.27, p. 771-780, 2004.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E. Farmacognosia e Farmacobiotechnologia. São Paulo: Editorial Premier. 1. ed. 1997. p.149-162, 207.

SANCHES, A.C.C.; NAGAE, R.L.; AUDI, E.A. Avaliação da atividade antidepressiva do extrato de sementes do guaraná (*Paullinia cupana*) em ratos. In: CONGRESSO DE FARMÁCIA E ANÁLISES CLÍNICAS DE MARINGÁ, 3., 1999, Maringá. Resumos. Maringá: UEM, 1999.

SANTA MARIA, A.; LOPEZ, A.; DIAZ, M.M.; MUÑOZ-MINGARRO, D.; POZUELO, J.M. Evaluation of the toxicity of guarana with in vitro bioassays. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 39, n. 3, p. 164-167, 1998.

SANTORO, M.I.R.M., AURORA-PRADO, M.S.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E.R.M. Eletroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 97-110, 2000.

SANTOS, S.C.; MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed., Porto Alegre: Ed. da UFRGS; Florianópolis: Ed. da UFSC, 2004, cap. 24, p. 517-544.

SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 12, p. 3875-3883, 1991.

SCHMITT-KOPPLIN, P.; FROMMBERGER, M. Capillary electrophoresis – mass spectrometry: 15 years of developments and applications. **Electrophoresis**, v. 24, n. 22/23, p. 3837-3867, 2003.

SCHULTZ, A.R. Introdução ao estudo da Botânica Sistemática. 3. ed. Porto Alegre: Globo, 1968, v. 2, p. 179.

SILVA, J.A., COLTRO, W.K.T., CARRILLO, E., TAVARES, M.F.M. Terminologia para as técnicas analíticas de eletromigração em capilares. **Química Nova**, v. 30, n.3, p. 740-744, 2007.

SOMBRA, L.L.; GOMEZ, M.R.; OLSINA, R.; MARTINEZ, L.D.; SILVA, M.F. Comparative study between capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography in 'guarana' based phytopharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 36, n. 5, p. 989-994, 2005.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda., 2005, p. 437-441.

SUFRAMA. Potencialidades regionais: estudo de viabilidade econômica – Guaraná. Manaus, 2003.

SUNTORNUSUK, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 27, n. 5, p. 679-698, 2002.

SUNTORNUSUK, L. Recent advances of capillary electrophoresis in pharmaceutical analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 398, n. 1, p. 29-52, 2010.

TAGLIARO, F.; MANETTO, G.; CRIVELLENTI, F.; SMITH, F.P. A brief introduction to capillary electrophoresis. **Forensic Science International**, v. 92, n. 2/3, p. 75-88, 1998.

TAVARES, M.F.M. Eletroforese capilar: conceitos básicos. **Química Nova**, v. 19, n. 2, p. 173-181, 1996.

TAVARES, M.F.M. Mecanismos de separação em eletroforese capilar. **Química Nova**, v. 20, n.5, p. 493- 511, 1997.

UNGER, M. Capillary electrophoresis of natural products: current applications and recent advances. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 735-745, 2009.

USHIROBIRA, T.M.A. Estudo químico, avaliação microbiológica e toxicológica pré-clínica (aguda e subcrônica) de extratos de sementes de *Paullinia cupana* H.B.K. var. *sorbilis* (Mart.) Ducke (Guaraná). 2003. 198 f. Dissertação (Mestrado)–Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, UEM, Maringá, 2003.

USHIROBIRA, T.M.A.; YAMAGUTI, E.; UEMURA, L.M.; AUDI, E.A.; MELLO, J.C.P. de. Avaliação físico-química de sementes de guaraná secas por diferentes métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 15-20, 2004.

VALLS, J.; MILLÁN, S.; MARTÍ, M. P.; BORRÁS, E.; AROLA, L. Advanced separation methods of food anthocyanins, isoflavones and flavanols. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 43, p. 7143-7172, 2009.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, vol.28, n.3, p. 519-528, 2005.

WANG, S-P.; FU, M-D.; WANG, M-H. Separation mechanism and determination of flavanones with capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 306-312, 2007.

WECKERLE, C.S.; STUTZ, M.A.; BAUMANN, T.W. Purine alkaloids in *Paullinia*. **Phytochemistry**, v. 64, n. 3, p. 735-742, 2003.

www.tropicos.org

YAMAGUTI-SASAKI, E.; ITO, L.A.; CANTELI, V.C.D.; USHIROBIRA, T.M.A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V.; MELLO, J.C.P. Antioxidant capacity and *in vitro* prevention of dental plaque formation by extracts and condensed tannins of *Paullinia cupana*. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1950-1963, 2007.

YU, L.; XU, Y.; FENG, H.; LI, S.F.Y. Separation and determination of toxic pyrrolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal medicines by micellar electrokinetic chromatography with organic modifier. **Electrophoresis**, v. 26, n. 17, p. 3397-3404, 2005.

YUAN, B.; ZHENG, C.; TENG, H.; YOU, T. Simultaneous determination of atropine, anisodamine, and scopolamine in plant extract by nonaqueous capillary electrophoresis coupled with electrochemiluminescence and electrochemistry dual detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 1, p. 171-174, 2010.

ZEMANN, A. J.; SCHNELL, E.; VOLGGER, D.; BONN, G. K. Contactless conductivity detection for capillary electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 3, p. 563-567, 1998.

ANEXOS

AUTORIZAÇÃO – FIGURA 12

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Lia Akina Ito ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Lia Akina Ito
Customer address	Rua Natal, 410 Maringá - Paraná, other 87023-140
License number	2627760508565
License date	Mar 14, 2011
Licensed content publisher	Elsevier
Licensed content publication	Journal of Chromatography A
Licensed content title	Enhanced analysis of triterpenes, flavonoids and phenolic compounds in <i>Prunella vulgaris</i> L. by capillary zone electrophoresis with the addition of running buffer modifiers
Licensed content author	Hon-Yeung Cheung, Qing-Feng Zhang
Licensed content date	12 December 2008
Licensed content volume number	1213
Licensed content issue number	2
Number of pages	8
Start Page	231
End Page	238
Type of Use	reuse in a book/textbook
Requestor type	author of new work
Intended publisher of new work	Other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	Print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Title of the book	Farmacognosia coletânea científica
Publisher of the book	Editora da Universidade Federal de Ouro Preto
Author of the book	João Carlos Palazzo de Mello et al.
Expected publication date	Jun 2011
Estimated size of the book (number of pages)	330
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.0 USD

AUTORIZAÇÃO – FIGURA 15

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

This is a License Agreement between Lia Akina Ito ("You") and Elsevier ("Elsevier") provided by Copyright Clearance Center ("CCC"). The license consists of your order details, the terms and conditions provided by Elsevier, and the payment terms and conditions.

Supplier	Elsevier Limited The Boulevard, Langford Lane Kidlington, Oxford, OX5 1GB, UK
Registered Company Number	1982084
Customer name	Lia Akina Ito
Customer address	Rua Natal, 410 Maringá - Paraná, other 87023-140
License number	2627761334106
License date	Mar 14, 2011
Licensed content Publisher	Elsevier
Licensed content publication	Journal of Chromatography A
Licensed content title	Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of <i>Chamomilla recutita</i>
Licensed content author	Fabiana N. Fonseca, Marina F.M. Tavares, Csaba Horváth
Licensed content date	22 June 2007
Licensed content volume number	1154
Licensed content issue number	1-2
Number of pages	10
Start Page	390
End Page	399
Type of Use	reuse in a book/textbook
Requestor type	author of new work
Intended publisher of new work	Other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	Print
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes
Number of languages	1
Languages	Portuguese
Order reference number	
Title of the book	Farmacognosia coletânea científica
Publisher of the book	Editora da Universidade Federal de Ouro Preto
Author of the book	João Carlos Palazzo de Mello et al.
Expected publication date	Jun 2011
Estimated size of the book (number of pages)	330
Elsevier VAT number	GB 494 6272 12
Permissions price	0.00 USD
VAT/Local Sales Tax	0.0 USD / 0.0 GBP
Total	0.00 USD

AUTORIZAÇÃO – FIGURAS 9, 10, 11, 13 E 14

From: Lia Ito [mailto:lia_akina@hotmail.com]

Sent: Monday, March 14, 2011 4:26 PM

To: Permissions - US

Subject: NON-RIGHTSLINK

REQUEST FORM

NAME: Lia Akina Ito

Universidade Estadual de Maringá

Department of Pharmacy

Address: Avenida Colombo, 5790

City: Maringá

State: Paraná

Post code: 87020-900

Country: Brazil

Fone: +55 (44) 32635539

email: lia_akina@hotmail.com

I would like to reprint figures from Journal **ELECTROPHORESIS**

1. Volume 30, Issue 16, pages 2922-2930, August 2009 - Figure 1 (page 2925)

2. Volume 24, Issue 9, pages 1437-1441, May 2003 - Figure 2 (page 1440)

3. Volume 30, Issue 2, pages 349-356, January 2009 - Figure 5c (page 354)

4. Volume 29, Issue 11, pages 2310-2320, June 2008 - Figure 8 (page 2317)

5. Volume 22, Issue 8, pages 1568-1572, May 2001 - Figure 1 (page 1570) and figure 2 (page 1571)

Publisher: Editora da Universidade Federal de Ouro Preto

Title of the work: Farmacognosia coletânea científica

Projected publication date: June 2011

Format of the work: print

Dear Customer,

Thank you for your email.

We hereby grant permission for the requested use expected that due credit is given to the original source.

If material appears within our work with credit to another source, authorisation from that source must be obtained.

Credit must include the following components:

- Books: Author(s)/ Editor(s) Name(s): Title of the Book. Page(s). Publication year. Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

- Journals: Author(s) Name(s): Title of the Article. Name of the Journal. Publication year. Volume. Page(s). Copyright Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Reproduced with permission.

With kind regards

Heike Weller

Heike Weller

Copyright & Licensing Manager

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Boschstr. 12

69469 Weinheim

Germany

Phone: +49 (0) 62 01- 606 - 585

Fax: +49 (0) 62 01 - 606 - 332

Email: rights@wiley-vch.de

Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA

Location of the Company: Weinheim

Chairman of the Supervisory Board: Stephen Michael Smith Trade Register: Mannheim, HRB 432833 General

Partner: John Wiley & Sons GmbH, Location: Weinheim Trade Register Mannheim, HRB 432296 Managing

Directors : Christopher J. Dicks, Bijan Ghawami, William Pesce



DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins **Lia Akina Ito e João Carlos Palazzo de Mello** são autores do capítulo **“Aplicação da Eletroforese Capilar na Análise de Produtos Naturais”** do livro intitulado **“Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais”**, editado pela Editora da Universidade Federal de Ouro Preto (EDUFOP), Ouro Preto, MG, 1ª edição, ISBN: 978-85-288-0084-5, 186 páginas. O livro é organizado por Gustavo Henrique Bianco de Souza, João Carlos Palazzo de Mello e Norberto Peporine Lopes, sob os auspícios do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia para Inovação Farmacêutica (INCT_if) - Rede de Produtos Naturais Bioativos. O livro encontra-se em fase final de editoração e deverá ser lançado até final de outubro de 2011.

Maringá, 26 de setembro de 2011.


Gustavo Henrique Bianco de Souza


João Carlos Palazzo de Mello

Norberto Peporine Lopes