

Gustavo Henrique Bianco de Souza
João Carlos Palazzo de Mello
Norberto Peporine Lopes

ORGANIZADORES

Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais



EDITORA UFOP

Gustavo Henrique Bianco de Souza



João Carlos Palazzo de Mello



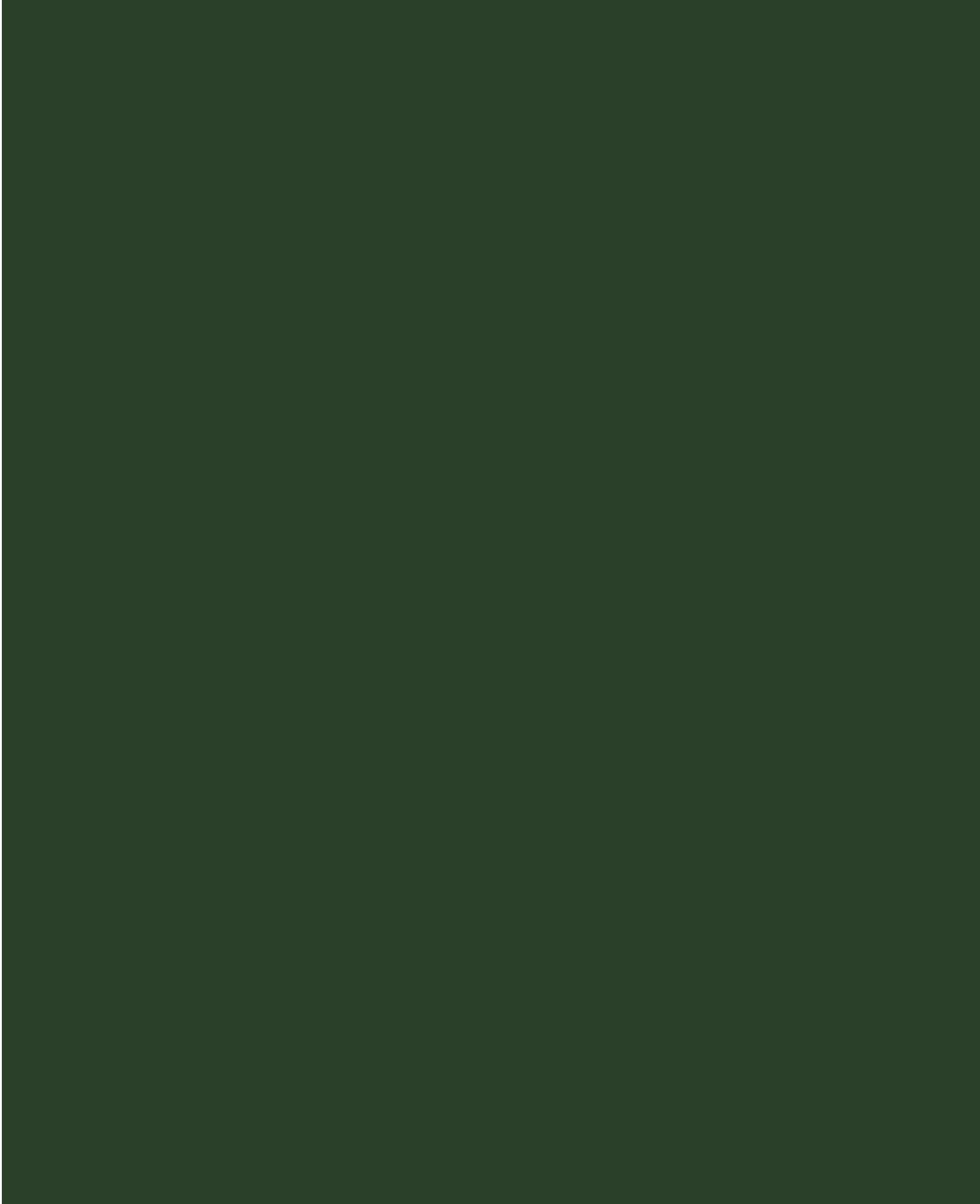
Norberto Peporine Lopes



Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo - USP (2005). Graduado em Farmácia Bioquímica pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (1998), mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo (2001). Iniciou pós-doutoramento na Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, no Instituto de Química (IQ-UNESP), em janeiro de 2006; e, em seguida, no mês de maio do mesmo ano, ingressou como professor-adjunto da disciplina Farmacognosia da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Experiência na área de Farmácia, com ênfase em Produtos Naturais. Atualmente, ocupa a função de presidente do Conselho Editorial da UFOP e de colaborador como avaliador de publicações em periódicos da área de produtos naturais.

Doutor em Ciências Naturais pela Universität Münster, Alemanha (1995). Graduado em Farmácia pela Universidade Estadual de Maringá (1983), mestrado em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul (1989). Atualmente, é professor-associado em Farmacognosia da Universidade Estadual de Maringá (UEM). Orientou 22 dissertações de mestrado, 3 teses de doutorado, além de ter orientado trabalhos de iniciação científica e trabalhos de conclusão de curso em Farmácia. Tem experiência na área de Farmácia, com ênfase em Fitoquímica, atuando principalmente nos seguintes temas: taninos condensados (isolamento e identificação estrutural), atividade antimicrobiana, atividade antiviral, ação cicatrizante, atividade antioxidante de extratos e substâncias isoladas de *Paullinia cupana*, *Stryphnodendron adstringens*, *Stryphnodendron obovatum*, *Stryphnodendron polyphyllum*, *Guazuma ulmifolia*, *Maytenus ilicifolia*, *Croton echinoides*, *Trichilia catigua*, *Caesalpinia peltophoroides*, dentre outras da biodiversidade brasileira. Além dos temas acima, trabalha também em processos de validação de extratos vegetais. Foi coordenador do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UEM, é membro associado da Sociedade Brasileira de Farmacognosia, da Associação Brasileira de Ciências Farmacêuticas e da Gesellschaft für Arzneipflanzenforschung, da Alemanha. Atualmente, é membro suplente no CA-Farmácia do CNPq.

Doutor em Química (Química Orgânica) pela Universidade de São Paulo - USP (1997). Atualmente, é professor-titular da mesma instituição. No exterior, desenvolveu pesquisas em 3 especializações de longa duração nas Universidades de Tübingen (Alemanha), Estado de Washington (Estados Unidos) e Bristol (Inglaterra). No ano de 2000, realizou estágio de pós-doutoramento em espectrometria de massas de produtos naturais na Universidade de Cambridge (Inglaterra). No ano de 2009, iniciou atividade como professor-convidado em Espectrometria de Massas na Universidade de Münster (Alemanha). Publicou 145 artigos, em periódicos especializados e 207 trabalhos em anais de eventos. Participou do desenvolvimento de três produtos tecnológicos. Participou de 77 eventos realizados (Brasil e exterior). Orientou 12 dissertações de mestrado, 6 teses de doutorado, além de ter orientado trabalhos de iniciação científica e trabalhos de conclusão de curso, nas áreas de Química e Farmácia. Recebeu 8 prêmios e/ou homenagens. Atua na área de Química, com ênfase em Química dos Produtos Naturais e Espectrometria de Massas. Em suas atividades profissionais, interagiu com 240 colaboradores em coautorias de trabalhos científicos.



REVISÕES EM PROCESSOS E TÉCNICAS
AVANÇADAS DE ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO
ESTRUTURAL DE ATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS

REVISÕES EM PROCESSOS E TÉCNICAS AVANÇADAS DE ISOLAMENTO E DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DE ATIVOS DE PLANTAS MEDICINAIS

Gustavo Henrique Bianco de Souza
João Carlos Palazzo de Mello
Norberto Peporine Lopes

ORGANIZADORES



EDITORA UFOP

2011



UFOP

Universidade Federal
Rio de Janeiro

Reitor | João Luiz Martins

Vice-Reitor | Antenor Rodrigues Barbosa Junior



EDITORA UFOP

Diretor-Presidente | Gustavo Henrique Bianco de Souza

Assessor Especial | Alvimar Ambrósio

CONSELHO EDITORIAL

Adalgimar Gomes Gonçalves

André Barros Cota

Elza Conceição de Oliveira Sebastião

Fábio Favarsani

Gilbert Cardoso Bouyer

Gilson Ianinni

Gustavo Henrique Bianco de Souza

Carla Mercês da Rocha Jatobá Ferreira

Hildeberto Caldas de Sousa

Leonardo Barbosa Godefroid

Rinaldo Cardoso dos Santos



APOIO



inct-if
INSTITUTO NACIONAL
de CIÊNCIA e TECNOLOGIA
para INOVAÇÃO FARMACÉUTICA





Dedicatória

A todos os
(co)autores que contribuíram
para a efetivação dessa publicação.

Ao INCT_if/CNPq,
Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia,
pelo estímulo e financiamento.

À EDUFOP,
Editora da Universidade
Federal de Ouro Preto.



© EDUFOP

Coordenação Editorial

Gustavo Henrique Bianco de Souza

Projeto Gráfico / Capa

Alvimar Ambrósio

Revisão Técnica

Organizadores e Fátima Lisboa

Editoração Eletrônica

Autores

Fotografia / Capa

De Laia / UFOP

FICHA CATALOGRÁFICA

R454 Revisões em Processos e Técnicas Avançadas de Isolamento e Determinação Estrutural de Ativos de Plantas Medicinais / Gustavo Henrique Bianco de Souza ... [et al.] - Ouro Preto : UFOP, 2011.
252p.: il. color.; graf.; tabs.

Autores: Gustavo Henrique Bianco de Souza, João Carlos Palazzo de Mello e Norberto Peporine Lopes.

1. Farmacognosia. 2. Plantas medicinais. 3. Princípios ativos. 4. Fitotécnica. I. Souza, Gustavo Henrique Bianco. II. Mello, João Carlos Palazzo de. III. Lopes, Norberto Peporine. IV. Título.

ISBN 978-85-288-0084-5

CDU: 615.32:633.88

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Reprodução proibida Art. 184 do Código Penal e Lei 9.610 de fevereiro de 1998.
Todos os direitos reservados à

Editora UFOP

<http://www.ufop.br>

Tel.: 31 3559-1463

Centro de Vivência | Sala 03 | Campus Morro do Cruzeiro
35400.000 | Ouro Preto | MG

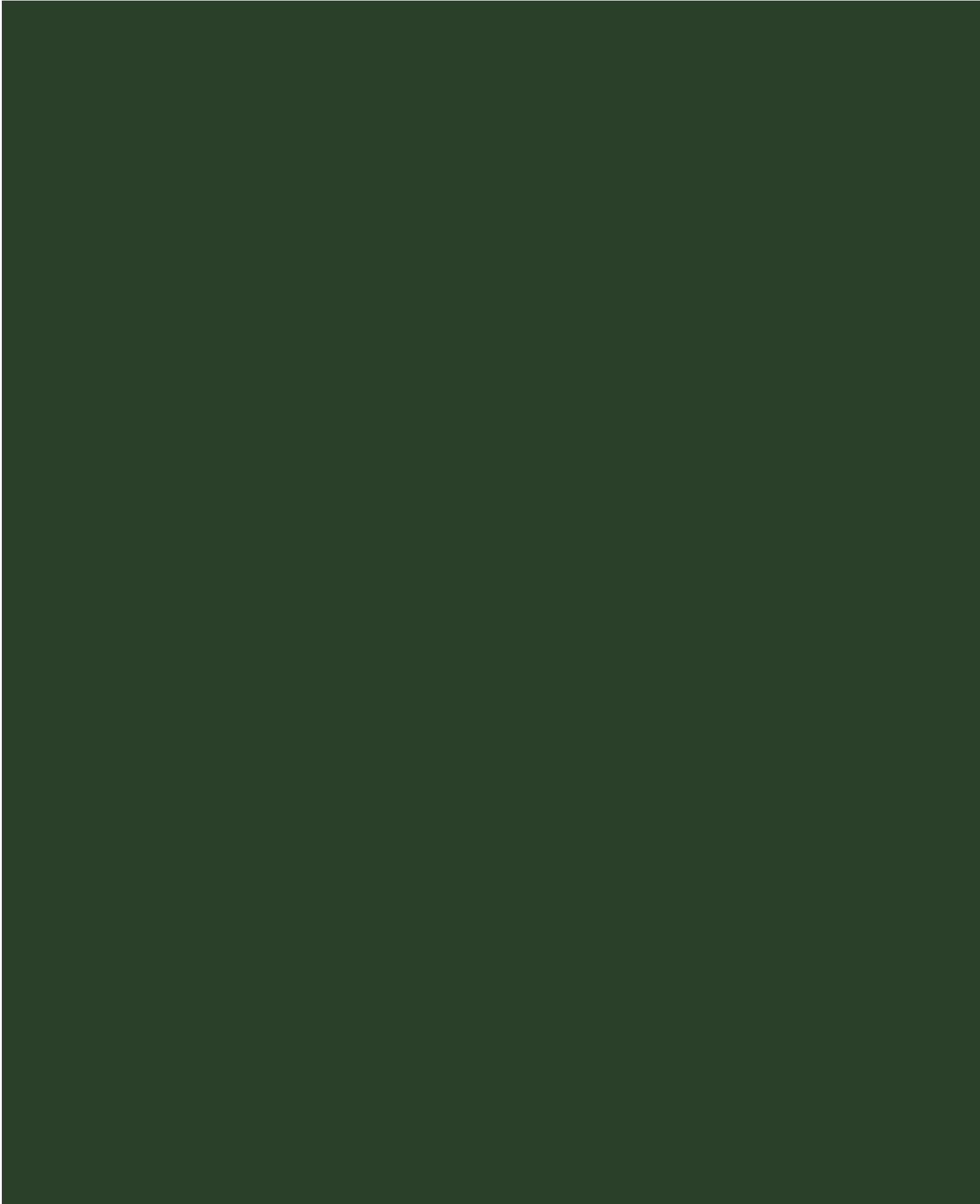
e-mail: editora@ufop.br

Telefax.: 31 3559-1255

Agradecimentos

A todos os
(co)autores que contribuíram para a
efetivação dessa publicação.







Sumário

SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS: TÉCNICAS DE EXTRAÇÕES DAS CLÁSSICAS ÀS AVANÇADAS

19

Daniel Petinatti Pavarini
Denise Brentan da Silva
João Luis Callegari Lopes
Norberto Peporine Lopes



PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

55

Camila Gambini Pereira

MÉTODOS *IN SILICO* PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS: FUNDAMENTOS, METODOLOGIAS E APLICAÇÕES EM PRODUTOS NATURAIS E METABOLÔMICA

73

Fernando Batista da Costa
Marcus Tullius Scotti

119

ANÁLISES DE PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL POR CLAE-RMN

Carlos Alexandre Carollo
Daniel Pecoraro Demarque

139

APLICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

Eduardo de Jesus Oliveira
José Maria Barbosa Filho
Luiz Elídio Gregório





171

FRAGMENTAÇÃO DE ALCALOIDES
ISOQUINOLÍNICOS
POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS VIA
IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*

Adrian Martin Pohlit
Carolina Maria Xaubet Olivera
João Luis Callegari Lopes
Márcio Adriano Andreo
Michael Niehues
Norberto Peporine Lopes

209

APLICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR NA
ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

João Carlos Palazzo de Mello
Lia Akina Ito



SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS: TÉCNICAS DE EXTRAÇÕES DAS CLÁSSICAS ÀS AVANÇADAS

Daniel Petinatti Pavarini
Denise Brentan da Silva
João Luis Callegari Lopes
Norberto Peporine Lopes

INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos etéreos (em latim, *aetheroleum*) ou óleos voláteis, representam uma pequena fração lipofílica da composição química das plantas. Essa fração, geralmente, confere os aromas singulares às mais diversas espécies de plantas, notadamente as denominadas aromáticas. Esses óleos são empregados, rotineiramente, em indústrias farmacêutica, alimentícia e cosmética, bem como na aromaterapia. Além disso, apresentam uma constituição química que pode ser categorizada em dois tipos:



· Presença de uma substância volátil majoritária de teor elevado como, por exemplo, a presença do 1,8-cineol (80%) no óleo essencial de eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill., *Eucalyptus fruticetorum* F. Muell. ex Miq. e *Eucalyptus smithii* F. Muell. ex R.T. Baker segundo a Farmacopeia Europeia) e o anetol (90%) no óleo dos frutos de erva-doce (*Pimpinella anisum* L.) (SIMÕES & SPITZER, 2007). As outras substâncias que constituem esses óleos podem ser encontradas em quantidades muito baixas (traços).

· Misturas complexas de substâncias voláteis, que podem ser compostas desde poucas até centenas de substâncias contendo diversas funções orgânicas como álcoois, aldeídos, cetonas, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, lactonas, acetais, éteres, ésteres e até mesmo substâncias contendo nitrogênio e enxofre.

Os principais esqueletos carbônicos que sustentam essa diversidade de funções são, geralmente, pertencentes a dois grupos:

(a) os terpenoides, que são substâncias formadas por unidades isoprênicas (5 carbonos) e classificados a partir do número dessas unidades que os constituem. Os terpenoides, uma das maiores classes de metabólitos em produtos naturais, possuem cerca de 30.000 estruturas descritas (BREITMAIER, 2006) e podem ser do tipo hemiterpeno, monoterpene, sesquiterpeno, diterpeno, sesterpeno, triterpeno e tetraterpeno, os quais possuem 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 carbonos (CROTEAU *et al.*, 2000), respectivamente. Porém, nos óleos essenciais estão presentes substâncias mais voláteis como os monoterpene e sesquiterpenos.

(b) os derivados aromáticos, que são, principalmente, representados pelos derivados fenilpropanoides. Esses últimos são esqueletos aromáticos biossintetizados a partir da via do ácido chiquímico e possuem uma cadeia alquílica lateral (C₆-C₃) como, por exemplo, o isoeugenol, anetol e estragol (Figura 1).

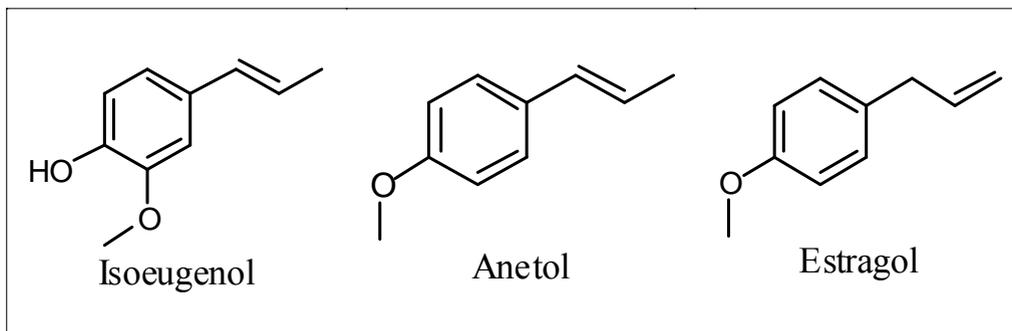


FIGURA 1 | Estruturas químicas de alguns derivados fenilpropanoides

A produção e liberação de substâncias voláteis pelas plantas têm relação com as interações dessas com outros organismos vivos, como também devido à influência de fatores bióticos e abióticos (SCHULTZ, 2002; DUDAREVA *et al.*, 2004). Neste contexto, podemos citar algumas funções ecológicas atribuídas a essas substâncias voláteis tais como: a inibição de germinação (efeito alelopático) assim como ocorre no chaparral californiano entre *Salvia leucophylla* Greene e *Artemisia californica* Less. (HARBORNE, 1993a), atração de polinizadores e proteção. Este último é evidenciado, por exemplo, pelo efeito deterrente do epóxido de cariofileno em formigas (HARBORNE, 1993b).

O estabelecimento do perfil das substâncias voláteis, de forma geral, envolve duas etapas fundamentais; a extração e a análise. A extração pode ser realizada por diversas técnicas como a hidrodestilação, prensagem,

enfleurage, extração com solventes e por fluido super crítico (SIMÕES & SPITZER, 2007). Além dessas técnicas de extrações convencionais, também há outras técnicas mais recentes, designadas de não convencionais e que possuem alta capacidade de concentração, como a microextração em fase sólida (SPME, *Solid Phase Microextraction*), SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*), STE (*Sorptive Tape Extraction*), SPDE (*Solid Phase Dynamic Extraction*) entre outras (BICCHI *et al.*, 2008).

A composição da fração volátil pode ser diferente dependendo do método de extração selecionado, sendo que atualmente há uma tendência na miniaturização das técnicas de preparo da amostra e também a utilização de técnicas que extraíam as substâncias o mais próximo do real perfil químico encontrado no vegetal para, por exemplo, estudos de ecologia química (STASHENKO *et al.*, 2004). Convém ressaltar que neste contexto mundial de crise ambiental e modelo econômico que prima pela constante diminuição de custos e tempo no processo produtivo, ainda tem conduzido às pesquisas de métodos de extração mais eficientes que utilizem pouco ou nenhum solvente orgânico e pouco tempo para a extração (SAHRAOUI *et al.*, 2008).

A análise (segunda etapa) das substâncias voláteis tem sido realizada, principalmente, por meio da técnica de cromatografia gasosa (GC, *Gas Chromatography*) acoplada a detectores como FID (*Flame Ionization Detector*), MS (*Mass Spectrometry*), IR (*Infrared Spectroscopy*) entre outros (BONATO, 2006). Convém destacar também os avanços nessa etapa de análise, pois essas permitem análises cada vez mais rápidas e com alta resolução cromatográfica, o que resulta em alta produtividade e redução dos custos por análise. Como exemplo, tem-se o *Fast-GC*, *Ultra Fast-GC* (BICCHI *et al.*, 2004a) e GC bidimensional (GCxGC) (PEDROSO *et al.*, 2009), nesse último pode ser utilizado uma coluna cromatográfica, em uma das dimensões, para a separação de enantiômeros, o que permite analisar a composição enantiomérica de cada pico cromatográfico (CORDERO *et al.*, 2006; PEDROSO *et al.*, 2009).

PROCEDIMENTOS DE EXTRAÇÃO

O procedimento de extração é determinante na composição química do óleo, o que também reflete em suas características odoríferas. Diante disto, a indústria utiliza esse critério para otimização do processo de extração, como também a obtenção do maior rendimento possível. Por outro lado, houve um grande avanço nas técnicas realizadas em microescalas com alta capacidade de concentração, o que é, demasiadamente, importante para o estabelecimento do perfil químico dos voláteis o mais próximo do emitido pelas espécies vegetais, já que esse se faz necessário para o estudo das relações químico-ecológicas, pois essa fração volátil emitida é considerada um importante biosensor (DUDAREVA *et al.*, 2004).

PROCESSOS CONVENCIONAIS

Os processos de extração de óleos que envolvem a hidrodestilação, *enfleurage*, prensagem e extração com solventes são considerados métodos clássicos, porém, atualmente, foram desenvolvidas algumas modificações nessas metodologias com o intuito de se obter produtos finais com maiores rendimentos e qualidade.

A *enfleurage* ou enfloração é um processo milenar de extração em fase sólida utilizando gordura animal ou vegetal. Em geral, ela é empregada na extração de voláteis de flores que são termicamente instáveis e altamente voláteis. Essa técnica apresenta um baixo rendimento, porém resulta em um produto final de alta qualidade e de aroma peculiar, o que reflete em produtos de alto valor comercial. Por esta razão, ainda é utilizada na extração dos óleos voláteis para a produção de perfumes como, por exemplo, a partir das flores de jasmim (*Jasminum officinale* L. e *Jasminum sambac* Soland. ex Ait.) na França e Itália (HOLMES, 1998), como também de flores de lírio no Brasil.

A extração por pressão (prensagem) ainda é bastante utilizada em indústrias devido ao seu alto rendimento. Entretanto, esta técnica de extração é pouco seletiva e em muitos casos podem produzir óleos com altos teores de substâncias não voláteis, impurezas e lipídios. Essa metodologia de extração é rotineiramente empregada na obtenção de óleos de frutas cítricas (BAKKALI *et al.*, 2008), sendo importante destacar que o Brasil é o maior exportador do óleo de laranja (*Citrus sinensis*(L.) Osbeck), o qual é obtido por essa técnica (BIZZO *et al.*, 2009).

A extração com solventes orgânicos é realizada com solventes de baixa polaridade. Assim, os produtos obtidos possuem desde substâncias voláteis e não voláteis até substâncias lipídicas em sua composição, sendo denominadas de óleos fixos ou concretos. Apesar desse tipo de extração ter alto rendimento, não é a metodologia mais utilizada em escala industrial, pois geram produtos com muitas impurezas e resíduos de solventes, o que é expresso em seus baixos valores comerciais (FERHAT *et al.*, 2007; BIZZO *et al.*, 2009).

Já a extração por arraste a vapor, como a hidrodestilação, é a principal metodologia empregada na obtenção de óleos essenciais, porém ocorre a trivial formação de artefatos, já que essa é realizada em meio aquoso e com elevadas temperaturas, o que pode promover reações de hidrólise, rearranjos, isomerizações e oxidações. Além dessa desvantagem, podem ocorrer perdas de substâncias altamente voláteis, de baixo peso molecular ou daqueles que estão em pequenas quantidades nas matrizes vegetais, como também essa metodologia requer um longo tempo para a extração, o que reflete na produtividade. Consequentemente, esse tempo excessivo conduz em elevados custos para a realização desse tipo de extração em escala industrial, devido ao grande consumo energético. A grande parte desse consumo é baseada em uma matéria-prima não renovável e o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e eficientes de extração contribuirá na sustentabilidade ambiental, o que resulta em estímulos para a realização de pesquisas nesta área visando à busca de técnicas com menor consumo de solvente, tempo e energia.

O aparelho de Clevenger é utilizado no processo de obtenção de óleos por hidrodestilação, mas também já foram propostas algumas modificações nesse tipo especial de vidraria (AKISUE, 1986). Quando comparamos as Farmacopeias Europeia, Britânica e a dos Estados Unidos, é possível verificar que esse modelo é frequentemente modificado, visando melhores condições operacionais. Ressalta-se que estas diferenças são, em sua maioria, devido às características que cada material pode apresentar como, densidade, volatilidade, viscosidade e caráter químico.

Os produtos obtidos a partir da hidrodestilação possuem em suas composições altos teores de monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanoides, os quais são os principais responsáveis pelas características odoríferas dos óleos essenciais. Além do mais, esses óleos podem ser analisados por injeção direta no cromatógrafo a gás, ou seja, não requerem uma etapa prévia de purificação (*clean-up*) (SANTOS *et al.*, 2001;

KHAJEH *et al.*, 2004; BIZZO *et al.*, 2009). Porém, convém destacar que o óleo essencial obtido por esta metodologia é discrepante do real perfil químico encontrado nas espécies vegetais e do emitido por elas. Essa constatação é confirmada na comparação entre os cromatogramas das análises por GC-MS dos óleos essenciais de *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. obtidos por hidrodestilação e por SPME (Figuras 5 e 7).

Em virtude do grande tempo necessário para extração do óleo essencial por hidrodestilação, podem ser realizadas hidrodestilações com o auxílio de micro-ondas, sendo denominado de MAHD (*Microwave-Assisted Hydrodistillation*) (STASHENKO *et al.*, 2004; PRESTI *et al.*, 2005; WANG *et al.*, 2006). Entretanto, mais recentemente a extração por auxílio de micro-ondas vem sendo realizada somente com o material fresco (sem adição de água) com a denominação de MSD (*Microwave Steam Distillation*) para a obtenção da fração volátil (LUCCHESI *et al.*, 2004; FERHAT *et al.*, 2006; SAHRAOUI *et al.*, 2008;). Nos estudos dos voláteis das flores de lavanda (*Lavandula angustifolia* Mill.), foi possível verificar o mesmo rendimento e perfil químico quando se comparou o óleo obtido por arraste a vapor e MSD (SAHRAOUI *et al.*, 2008; FARHAT *et al.*, 2009). Além disso, os custos e o impacto ambiental foram, consideravelmente, reduzidos quando se utilizou a MSD já que o tempo requerido para a extração foi menor. Ainda, segundo neste estudo, tendo como fonte de energia o carvão mineral ou ainda os combustíveis fósseis, de forma geral, a emissão de CO₂ na atmosfera seria 80% menor, enquanto o rejeito de água seria ainda 85% menor quando se utiliza a MSD. Essa maior eficiência no processo de extração é atribuída ao “coeficiente de transferência de massa”, pois esse é, aproximadamente, seis vezes maior na MSD (FARHAT *et al.*, 2009).

Dentre as principais vantagens da extração por MSD, pode-se ressaltar a significativa redução do tempo de extração e a ausência de solventes, inclusive água, o que pode refletir na redução da formação de artefatos (LUCCHESI *et al.*, 2004; FERHAT *et al.*, 2006; DENG *et al.*, 2006). As análises químicas dos óleos essenciais extraídos por hidrodestilação e MSD das cascas da laranja revelaram apenas pequenas alterações nas composições químicas desses óleos, mas não foram observadas diferenças em suas constantes físicas. Entretanto, a análise das cascas, após os processos de extração por de microscopia eletrônica de varredura, revelaram significativas diferenças. Esses resultados demonstraram que ocorre a ruptura de células e glândulas do material vegetal mais rapidamente quando é utilizado o micro-ondas (FERHAT *et al.*, 2006).

Além das técnicas descritas, também há a extração e destilação simultâneas (SDE, *Simultaneous Distillation-Extraction*) que foi introduzida por Likens e Nickerson em 1964 e combina destilação a vapor e extração com um ou mais solventes. Esse tipo de extração possui alta eficiência e reprodutibilidade, a qual é realizada em uma única etapa para a extração da fração volátil, sendo amplamente empregada apesar de ainda haver a possibilidade de formação de produtos de degradação (CHARENTREAU, 2001).

As principais vantagens da SDE consistem na redução do tempo de extração e na utilização de volume reduzido de solventes orgânicos, como também permite a obtenção de um produto final livre de materiais não voláteis (ácidos graxos, clorofila e outros) podendo ser analisado através de injeção direta no cromatógrafo gasoso (JAYATILAKA *et al.*, 1995; CHARENTREAU, 2001; DIÁZ-MAROTO *et al.*, 2005; TEIXEIRA *et al.*, 2007). Esse protótipo tem sido modificado através do tempo visando diversificar as aplicações, as quais chegaram, por exemplo, a serem usadas na indústria de aromas na forma proposta por Godefroot e colaboradores (1981).

Extração por fluido supercrítico

A extração por fluido supercrítico (SFE, *Supercritical Fluid Extraction*) é uma técnica bastante antiga, apesar de ainda ser considerada recente no Brasil devido a sua lenta difusão no país. Essa extração emprega um gás como solvente, porém esse é mantido acima de sua temperatura e pressão críticas, tornando-se um fluido supercrítico que exibe características peculiares, como baixa viscosidade, alta densidade e difusão intermediária entre gases e líquidos que variam com a densidade (MAUL, 1999; MAUL *et al.*, 1996). Logo, os fluidos supercríticos exibem maiores taxas de transferência de massa para a extração a partir de uma matriz, quando comparados com as extrações que empregam solventes orgânicos, conseqüentemente resultam em maiores rendimentos (HERRERO *et al.*, 2010).

Atualmente, a utilização da SFE em escala industrial é extensamente aplicada e teve início na década de 1970, na Alemanha, para a remoção da cafeína do café (ANKLAM & MÜLLER, 1995). Além dessa aplicação comercial, também incluem a remoção da nicotina do tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) na produção de cigarros *light* (KERROLA, 1995), obtenção de carotenos da cenoura (VEJA *et al.*, 1996), óleos essenciais (REVERCHON, 1997), extrações de plantas para a utilização em indústrias farmacêuticas (KERROLA, 1995) e muitas outras (HERRERO *et al.*, 2010).

As indústrias farmacêuticas, além do emprego da SFE para obtenção de extratos, também utilizam esta técnica em diversos procedimentos, como na purificação de excipientes (ASHRAF-KHORASSANI *et al.*, 2005), produção de lipossomas (MEURE *et al.*, 2008), separações enantiosseletivas (KESZEI *et al.*, 1999; IZAKE, 2007), purificação de substâncias a partir do meio reacional e muitas outras (HERRERO *et al.*, 2010).

A presença de substâncias termolábeis nos óleos essenciais chama a atenção para o uso de técnicas que trabalhem a baixas temperaturas, como a SFE, para se evitar a possibilidade de reações que comprometam a integridade química das substâncias como oxidações, hidrólises e esterificações (PEREIRA & MEIRELES, 2007). Neste ponto, convém destacar que no cenário atual de crescente desenvolvimento industrial e econômico, também há a exigência da utilização de processos que minimizem os danos ambientais, o que ressalta a SFE já que essa técnica utiliza gases como solventes e são designados de processos tecnológicos limpos (HUIE, 2002). Porém, um grande problema dessa técnica é a viabilidade econômica, pois os equipamentos ainda possuem altos custos.

Além das baixas temperaturas utilizadas na SFE para extração, também se podem ressaltar muitas outras vantagens dessa técnica, como a reutilização dos solventes já que os fluidos supercríticos voltam ao estado gasoso em condições de pressão normal e temperatura ambiente, o que também resulta na obtenção de produtos de alto valor agregado, pois esses são livres de resíduos tóxicos de solventes orgânicos.

A maioria dos gases utilizados na SFE são inertes e seguros, como o CO₂, um dos gases mais, amplamente, difundidos em SFE, pois esse exibe uma série de características interessantes. Dentre essas está a sua baixa temperatura crítica, grande versatilidade, baixo custo, não é inflamável e possui pressão crítica baixa, o que facilita sua utilização em escala industrial (LANÇAS, 2002).

Além do CO₂, muitos outros gases podem ser utilizados em SFE, como nitrogênio (N₂), metano (CH₄), etano (C₂H₆), óxido nitroso (N₂O), hexafluoreto de enxofre (SF₆) dentre outros. Entretanto, mais de 90% dos procedimentos utilizam o CO₂, devido a suas vantagens analíticas já enumeradas, anteriormente, e por ser altamente seguro, pois não é inflamável (POURMORTAZAVI & HAJIMIRSADEGHI, 2007). O CO₂ possui caráter lipofílico e por esta razão os extratos produzidos a partir desse gás são ricos em substâncias apolares e

apresentam composições químicas similares aos dos óleos essenciais, porém de maior qualidade e com menor quantidade de produtos de degradação (HAN *et al.*, 2009).

Em contrapartida, pode-se facilmente alterar a seletividade dos fluidos supercríticos para se obter produtos enriquecidos com as substâncias de interesse e/ou alterar a polaridade do solvente extrator (fluido supercrítico) para a obtenção de substâncias de média até alta polaridade. Essa seletividade pode ser facilmente modificada pela alteração da temperatura e pressão, assim como sua polaridade que pode ser alterada pela adição de cossolventes como, por exemplo, metanol, etanol e água (ZANCAN *et al.*, 2002; HERRERO *et al.*, 2010).

A prática de adição de modificadores, denominados de cossolventes, é amplamente disseminada para a adequação da polaridade dos solventes extratores frente às substâncias de interesse. Dessa maneira, é possível a extração de alcaloides (LING *et al.*, 2007), metais (KERSCH *et al.*, 2000; POURMORTAZAVI *et al.*, 2004), flavonoides não glicosilados (LIN *et al.*; 1999; PENG *et al.*, 2006) e até mesmo de substâncias glicosiladas (MORAES *et al.*, 1997; SCALIA *et al.*, 1999).

PROCEDIMENTOS PARA MICROEXTRAÇÕES (TÉCNICAS COM ALTA CAPACIDADE DE CONCENTRAÇÃO)

As técnicas mais recentes, que serão descritas neste texto, consistem daquelas com alta capacidade de concentração dos analitos extraídos a partir de uma matriz. Essas técnicas, em sua grande maioria, podem ser utilizadas nas extrações das substâncias de duas maneiras: do *headspace* ou de forma direta. Essa última envolve o contato direto do componente extrator com a matriz que contém os analitos a serem extraídos. Já na extração dos analitos a partir do *headspace*, esses devem ser, necessariamente, substâncias de média a alta volatilidade, pois a técnica de extração vai capturar essas substâncias quando as mesmas estiverem volatilizadas.

Todos os recentes avanços, nessas técnicas de alta capacidade de concentração, a partir do *headspace*, são de extrema relevância nos estudos das substâncias voláteis produzidas pelas plantas. Além dessas não utilizarem solventes, também são capazes de extrair as substâncias, até mesmo as altamente voláteis, utilizando apenas uma pequena quantidade de amostra vegetal e de maneira cada vez mais eficiente e rápida. Portanto, essas características permitem que essas técnicas sejam empregadas na análise da fração volátil emitida pela planta, já que modificações nesses constituintes são importantes no diagnóstico de alterações no metabolismo e ajudam a esclarecer questões relacionadas com a biossíntese e ecologia (THOLL *et al.*, 2006; DUDAREVA *et al.*, 2006).

Essas técnicas de extração, a partir do *headspace*, ainda podem ser divididas em duas categorias: estática e dinâmica. Muitas dessas técnicas já podem ser realizadas de forma simples e automatizadas, o que facilita o emprego delas como técnicas rotineiras para análises de frações voláteis nos laboratórios (VITENBERG, 2003). Os avanços das técnicas dinâmicas foram de suma importância, pois elas podem aumentar a velocidade das extrações, além de serem capazes de extrair as substâncias de forma mais eficiente, principalmente em termos quantitativos, o que pode permitir em muitos casos o uso ainda de menores quantidades de amostras vegetais (BICCHI *et al.*, 2008).

Diante do exposto, apenas será descrita uma revisão de técnicas mais utilizadas na condição de extração das substâncias a partir do *headspace*, pois neste capítulo são abordadas questões apenas relacionadas às substâncias voláteis.

Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME, SPME, *Solid Phase Micro-Extraction*) é uma técnica que utiliza uma fase extratora sólida (polímero ou sólido adsorvente) e permite a realização de extrações em microescala de maneira muito eficiente. Logo, essas extrações em microescala apresentam grandes vantagens, como a não utilização de solventes orgânicos e a rápida velocidade de extração, o que viabilizaria a realização de repetidos experimentos e assim facilita os estudos quantitativos.

Dessa maneira, a SPME é uma técnica baseada na absorção ou adsorção de analitos em uma fibra de sílica fundida revestida por um polímero, a qual existe disponível comercialmente com variados polímeros de diferentes afinidades (VALENTE & AUGUSTO, 2000) (Figura 2). Após a extração dos analitos, a fibra é mantida exposta na câmara de injeção do cromatógrafo gasoso para que ocorra a dessorção térmica dos analitos e carreação desses para a coluna cromatográfica para a devida separação e detecção (Figura 3).

A técnica SPME foi desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores (1990) e desde então a sua utilização vem crescendo cada vez mais. Alguns artigos de revisão sobre essa técnica abordam as teorias, fundamentos e aplicações da SPME, sendo esses excelentes fontes para o estudo sobre esta técnica de extração (LOUGH *et al.*, 1992; VALENTE & AUGUSTO, 2000; VAS & VÉKEY, 2004; HAKKARAINEN, 2007).

O processo da SPME combina o isolamento dos analitos a partir de uma matriz, concentração e introdução dos analitos no cromatógrafo gasoso (ZHANG & PAWLISZYN, 1993). Essa técnica vem sendo amplamente empregada em análises do meio ambiente (48%), alimentos e botânica (33%) e nas áreas clínica e forense (19%) (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2007).

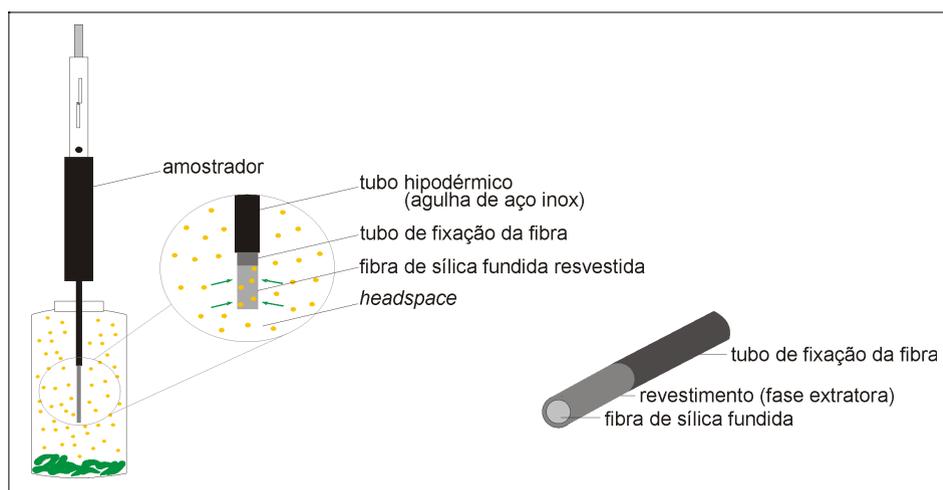


FIGURA 2 | Extração por SPME a partir do *headspace* e detalhe da fibra

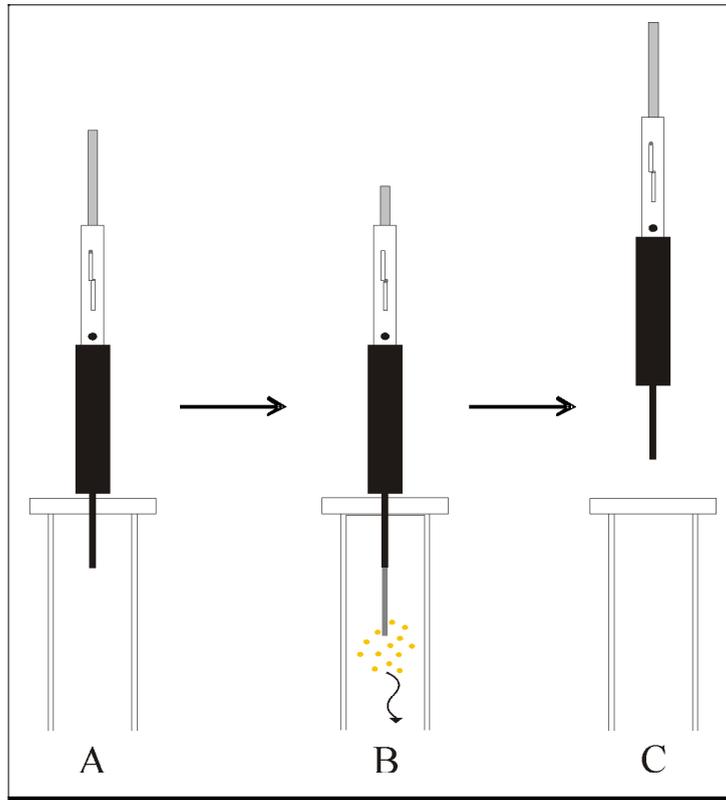


FIGURA 3 | Dessorção térmica da fibra de SPME no cromatógrafo gasoso. A: inserção do amostrador de SPME no injetor aquecido, B: exposição da fibra de SPME para a dessorção das substâncias extraídas, C: remoção do amostrador do injetor.

A SPME é, extensivamente, aplicada no estudo de aromas, ou seja, das substâncias voláteis, já que essa metodologia é simples, rápida, não necessita de solventes, requer apenas uma pequena quantidade de material vegetal, além de minimizar a perda de substâncias altamente voláteis (VAS & VÉKEY, 2004; STASHENKO & MARTÍNEZ, 2007; BICCHI *et al.*, 2008). Como exemplos dessas aplicações, podem-se enumerar as análises dos voláteis de oito espécies vegetais brasileiras por Sartoratto e Augusto (2003) e o estudo dos aspectos cinéticos e termodinâmicos da produção das substâncias voláteis de *Capsicum annum* L. durante o aquecimento (CREMER & EICHNER, 2000).

Em relação a muitos dos procedimentos convencionais de extração, a SPME revela muitas vantagens como a ausência de solventes orgânicos, a necessidade de apenas uma pequena quantidade de material vegetal, a extração de substâncias minoritárias e de alta volatilidade, além do tempo de análise ser menor, mantendo e/ou melhorando a sensibilidade e reprodutibilidade. A SPME também evita a modificação química e produção de artefatos, como também a perda de substâncias altamente voláteis que podem ocorrer nos métodos convencionais de extração dos óleos essenciais (STASHENKO & MARTÍNEZ, 2007).

A fim de exemplificar essas diferenças nos perfis químicos dos voláteis extraídos por uma técnica convencional e a SPME, foram realizadas análises dos voláteis oriundos das partes aéreas e flores de *Bidens sulphurea* (Cav.) Sch. Bip. obtidos por hidrodestilação e SPME (a partir do *headspace*). Esses componentes voláteis foram analisados por GC-MS e identificados através da comparação de seus espectros de massas com os espectros do banco de dados do aparelho cromatográfico e dos índices de retenção calculados a partir da série homóloga de hidrocarbonetos *n*-alcanos (ADAMS, 1995).

Após essas análises, foi possível observar distintas variações nos perfis químicos dos voláteis obtidos pelas duas técnicas, como pode ser verificado nas comparações entre os cromatogramas (Figuras 5 e 7). Uma diferença significativa nessas análises é a presença dos monoterpenos (substâncias relativas aos picos cromatográficos 1 a 5 da Figura 5 e dos picos 2 a 4 e 6 da Figura 7), os quais estavam presentes somente na extração realizada por SPME. Isso se deve ao fato dessas substâncias serem altamente voláteis, além de serem componentes minoritários da fração volátil, o que contribui para a perda dessas substâncias durante o processo de extração do óleo essencial por hidrodestilação.

As substâncias 1 a 5 das análises dos constituintes voláteis das partes aéreas de *B. sulphurea* correspondem aos monoterpenos sabineno, β -pineno, β -mirceno, pseudolimoneno e β -felandreno, respectivamente. Já as substâncias 2-4 e 6 oriundas das análises das flores de *B. sulphurea* correspondem aos monoterpenos (*Z*)- β -ocimeno, (*E*)- β -ocimeno, β -linalol e *allo*-ocimeno (Figura 4).

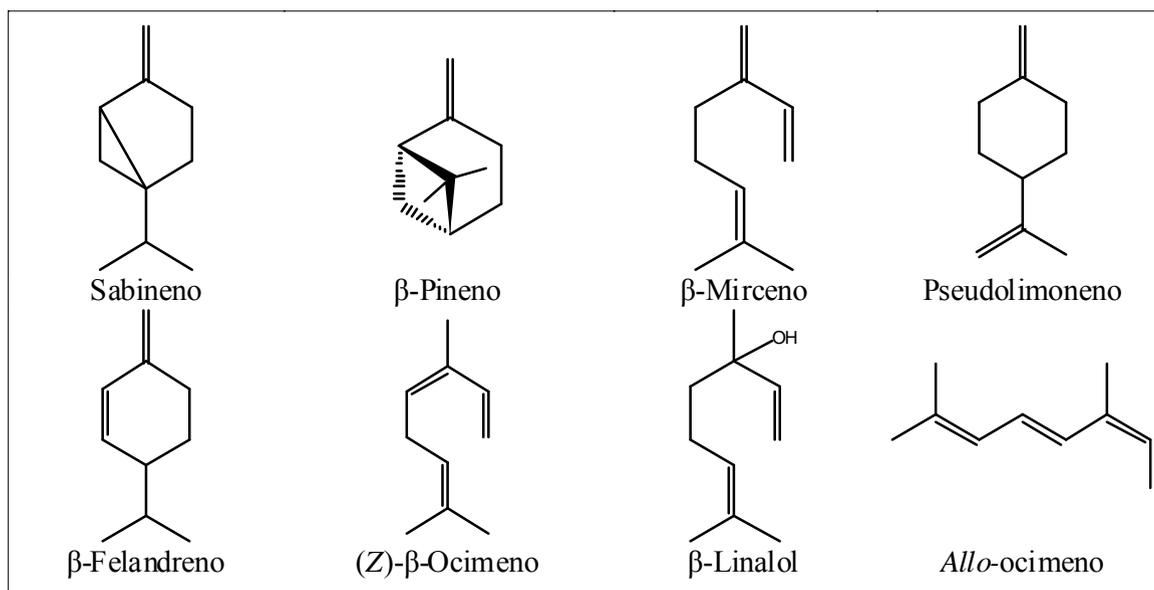


FIGURA 4 | Estruturas dos monoterpenos identificados a partir das partes aéreas e flores de *Bidens sulphurea* por SPME/GC-MS.

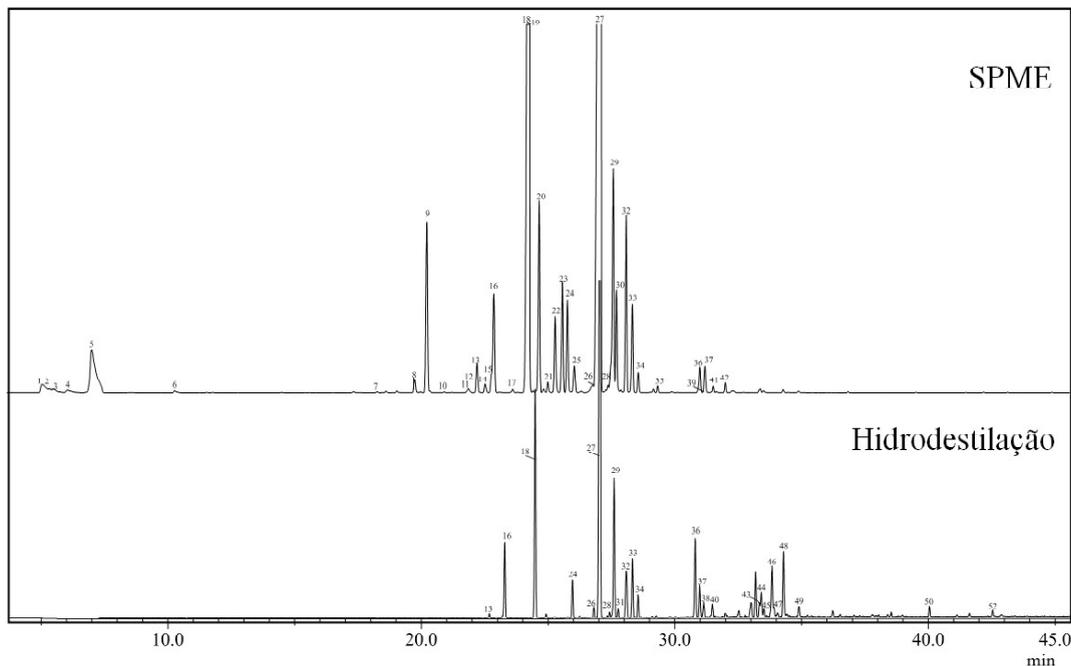


FIGURA 5 | Cromatogramas obtidos nas análises por GC-MS dos componentes voláteis das partes aéreas de *Bidens sulphurea* obtidos por hidrodestilação e SPME (fibra de PDMS – 100 μ) (Condições cromatográficas: *split* 1/20 (250 °C), DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, fluxo 1,41 mL/min, pressão 87,1 kPa, 60-240 °C a 3 °C/min)

O bicicloelemeno (pico 9 da Figura 5 e pico 11 da Figura 7) foi detectado apenas na extração por SPME (Figura 6). Esse sesquiterpeno estava presente em quantidades significativas e não foi detectado se quer na quantidade de traço nos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação. Isso indica uma possível degradação dessa substância, juntamente com a perda de parte dessa por volatilização, já que a técnica de hidrodestilação é demasiadamente agressiva e utiliza altas temperaturas para a realização da extração.

Entretanto, as substâncias majoritárias se mantiveram as mesmas em ambos os processos de extração. Nas partes aéreas (Figura 5) são os sesquiterpenos: β -elemeno (pico 16), β -cariofileno (pico 18), germacreno D (pico 27) e biciclogermacreno (pico 29). Já nas flores (Figura 7) são os sesquiterpenos: β -cariofileno (pico 20), germacreno D (pico 28), biciclogermacreno (pico 30) e (*E,E*)- α -farneseno (pico 32).

Convém ressaltar que algumas substâncias oriundas das partes aéreas e flores de *B. sulphurea*, principalmente aquelas que se encontram em proporções significativas, foram observadas somente quando realizadas as extrações por SPME. Algumas dessas substâncias, oriundas das partes aéreas, são: bicicloelemeno (pico 9), β -gurjuneno (pico 20), *allo*-arodendreno (pico 23) e valenceno (pico 30). A partir das flores são os seguintes constituintes: bicicloelemeno (pico 11), *allo*-arodendreno (pico 24) e valenceno (pico 31).

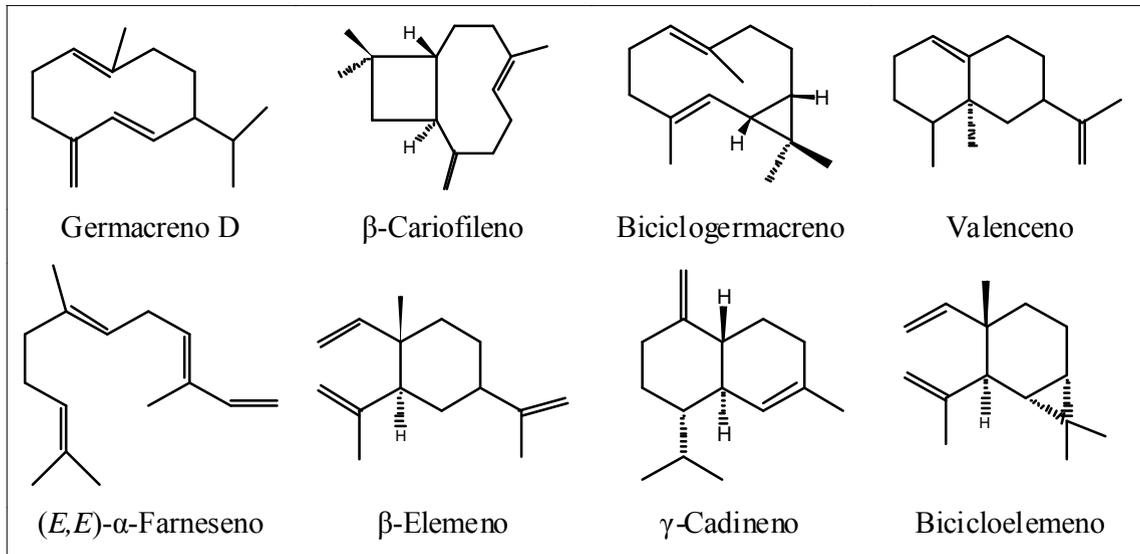


FIGURA 6 | Estruturas de alguns dos sesquiterpenos identificados a partir das partes aéreas e flores de *Bidens sulphurea* por GC-MS.

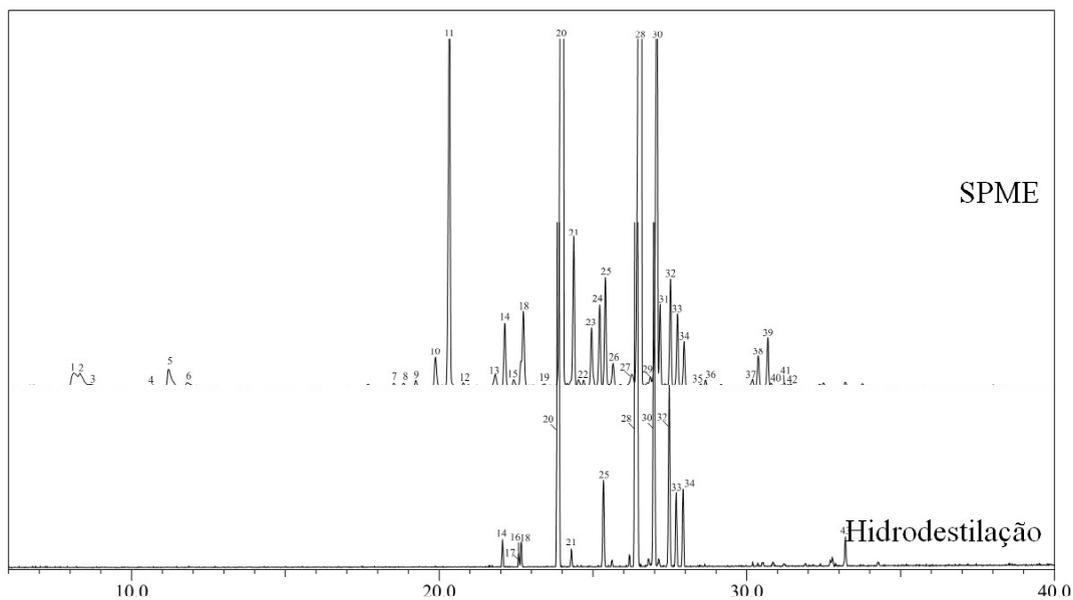


FIGURA 7 | Cromatogramas obtidos nas análises por GC-MS dos componentes voláteis das flores de *Bidens sulphurea* obtidos por hidrodestilação e SPME (fibra de PDMS – 100 μ) (Condições cromatográficas: *split* 1/20 (250 °C), DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, fluxo 1,41 mL/min, pressão 87,1 kPa, 60-240 °C a 3 °C/min)

Além do descrito até agora, também foi possível observar uma maior incidência de sesquiterpenos oxigenados no óleo obtido por hidrodestilação das partes aéreas (substâncias correspondentes aos picos 37 a 52), podendo essas substâncias serem produtos de degradação gerados durante o processo de extração. Essa extração também foi realizada com uma fibra mais polar (Carbowax/Divinilbenzeno, CW/DVB) e com temperaturas mais altas para verificar a extração desses constituintes oxigenados. Porém, essas mesmas substâncias não foram visualizadas, o que é um indício de que muitos dos sesquiterpenos oxigenados identificados no óleo essencial de *B. sulphurea* podem ser artefatos.

O mecanismo de extração da SPME é baseado no fenômeno de absorção ou adsorção dependendo do tipo de material da fibra, sendo esse último, por exemplo, um fenômeno que ocorre em fibras de carboxen (sólido poroso de carvão ativo microparticulado) e o primeiro em fibras de PDMS (polidimetilsiloxano) e PA (poliacrilato). Esse filme (polímero ou sólidos porosos dispersos em matrizes poliméricas), que recobre um bastão de sílica fundida, pode ter diferentes espessuras (7 μm a 100 μm) (VALENTE & AUGUSTO, 2000) (Figura 2), afinidades químicas e polaridades. As fibras disponíveis comercialmente, as quais se encontram sumarizadas na Tabela 1, podem ser utilizadas com amostradores (*holder*) manuais para a realização das extrações ou para sistemas totalmente automatizados com interfaces para o cromatógrafo gasoso ou no caso de substâncias polares acoplados para o cromatógrafo líquido de alta eficiência. Porém, neste capítulo apenas serão abordadas as fibras utilizadas para análises de voláteis em cromatógrafo gasoso.

A otimização dos parâmetros que influenciam nas extrações com a SPME são fundamentais para a análise dos voláteis, pois desta forma é possível realizar análises com superiores reprodutibilidade e sensibilidade, além de um menor tempo de extração. Assim, é de grande relevância a seleção do tipo de recobrimento da fibra, os estudos de cinética para se atingir o equilíbrio, bem como a otimização da dessorção dessas substâncias na câmara de injeção do cromatógrafo.

Os fundamentos que esta técnica se baseia são os princípios de cinética de transferência de massa entre fases e de termodinâmica (descrição do equilíbrio de partição). Portanto, a resistência a transferências de massas devem ser vencidas até que o ponto de equilíbrio seja atingido. Logo, em um sistema trifásico, conforme ilustrado na figura 2, as transferências de massas vão depender do equilíbrio entre as três fases (matriz-*headspace* *headspace*-fibra), como também do coeficiente de difusão dos analitos a serem extraídos e as dimensões das fases utilizadas (VALENTE & AUGUSTO, 2000; VAS & VÉKEY, 2004).

Portanto, o ideal é selecionar o tipo de recobrimento (afinidade), a espessura do filme para os analitos a serem extraídos, como também a temperatura e o tempo de extração, agitação do sistema, pH da amostra, força iônica e o tipo de frasco utilizado, já que todos esses aspectos influenciam a eficiência da extração (VALENTE & AUGUSTO, 2000; VAS & VÉKEY, 2004).

Tabela 1. Tipos de fibras de SPME disponíveis comercialmente para GC

Composição química	Tipo	L_f (μm)	T ($^{\circ}\text{C}$)	Aplicações
PDMS	Apolar	7, 30, 100	280	Voláteis e apolares
PA	Polar	85	320	Semivoláteis e polares (média a alta)
PDMS/DVB	Bipolar	60, 65	270	Voláteis e não voláteis de baixa a alta polaridade
CAR/PDMS	Bipolar	75, 85	320	Voláteis e gases
CW/DVB	Polar	65, 70	265	Voláteis de média a alta polaridade
CW/PEG	Polar	60	330	Voláteis e polares (média a alta)
DVB/PDMS/CAR	Bipolar	50/30	270	Voláteis e substâncias de peso molecular entre 40 e 275
Carbopack-Z	Polar	15	340	Voláteis, gases e substâncias leves

L_f : espessura do recobrimento; T: temperatura máxima recomendada para dessorção térmica; PDMS: polidimetilsiloxano; PA: poliacrilato; CAR: Carboxen; CW: Carbowax; PEG: polietilenoglicol

O tipo de recobrimento da fibra pode alterar de maneira significativa o perfil das substâncias extraídas, já que a constante de distribuição do analito na fibra é um fator importante na transferência de massas entre esses sistemas, o que afeta diretamente a sensibilidade. Assim, substâncias voláteis mais polares são melhores extraídas quando se utilizam fibras mais polares (GÓRECKI *et al.*, 1999, WARDENCKI *et al.*, 2004, 2007) como, por exemplo, foi observado nas análises dos voláteis do café (ROBERTS *et al.*, 2000).

As fibras com recobrimentos de menores espessuras são recomendadas para as análises rápidas e na extração de substâncias que possuem pontos de ebulição altos, pois dessa maneira a extração e dessorção são mais rápidas. Entretanto, convém ressaltar que apesar da redução dos tempos das extrações, a quantidade de material extraído é menor devido a esse menor volume de recobrimento e isso pode acarretar problemas de sensibilidade do método (GÓRECKI *et al.*, 1999; WARDENCKI *et al.*, 2007).

O tipo de frasco (*via*) utilizado também reflete na eficiência da extração, pois o estabelecimento do equilíbrio é atingido mais rapidamente em frascos com reduzidos volumes de *headspace*. Geralmente, utilizam-se frascos vedados e com amostra até a metade de sua capacidade. Esta relação entre a redução do *headspace* e a eficiência na extração foi verificada, por exemplo, no estudo realizado por Yang e Peppard (1994).

Além dos parâmetros já descritos, o aumento da força iônica e do pH da amostra também influenciam a eficiência da extração. No primeiro caso, a adição de sais causa uma redução da solubilidade das substâncias apolares facilitando a passagem dessas para a fase de vapor, assim o tempo de equilíbrio pode ser minimizado

(YANG & PEPPARD, 1994). Esse recurso é muito utilizado nas determinações de resíduos de pesticidas (BOYBOLAND & PAWLISZYN, 1995; HWANG & LEE, 2000), de componentes de aromas (MESTRES *et al.*, 2000; FITZGERALD *et al.*, 2000) e de resíduos de solventes em produtos farmacêuticos (LEGRAND *et al.*, 2003). Já no segundo caso, a alteração do pH pode ser utilizada em casos de misturas contendo substâncias de caráter ácido e básico, pois essas substâncias, dependendo do pH, podem estar na forma iônica e favorecer a volatilização das substâncias não iônicas (BUCHHOLZ & PAWLISZYN, 1994).

Com relação à agitação da amostra, esta é uma prática também muito comum devido a sua simplicidade, principalmente a agitação magnética. Essa prática reduz, consideravelmente, os tempos de extração, pois facilita a difusão dos analitos. Entretanto, é importante ressaltar que a capacidade de extração da fibra não é alterada (VALENTE & AUGUSTO, 2000; WARDENCKI *et al.*, 2007).

Outro fator que influencia, consideravelmente, a eficiência da pré-concentração dos analitos é a temperatura de extração. O aumento da temperatura facilita a difusão dos analitos e sua volatilização o que reflete na minimização do tempo das extrações, mas uma elevação excessiva da temperatura pode conduzir a dessorção precoce dos analitos da fibra. Portanto, a temperatura adequada para a extração dependerá da composição da matriz, do tipo de seus constituintes e do tipo de fase extratora da fibra (ZHANG & PAWLISZYN, 1993; VALENTE & AUGUSTO, 2000; WARDENCKI *et al.*, 2004, 2007).

Outras técnicas para microextrações

Extração sortiva em tubo

Com o intuito de reduzir alguns problemas da SPME, principalmente aqueles relacionados com a sensibilidade, fragilidade e falta de flexibilidade da fibra, foi desenvolvida uma técnica denominada de INCAT (*Inside Needle Capillary Adsorption Trap*) por McComb e colaboradores (1997). Essa técnica consiste de uma agulha capilar revestida internamente por um polímero (fase extratora) e acoplada a uma seringa, a qual foi utilizada na análise de misturas complexas de substâncias oriundas de produtos de derivados de petróleo (SHOJANIA *et al.*, 1999).

Posteriormente, um dispositivo muito semelhante ao descrito acima foi disponibilizado comercialmente pela Chromtech em 2000 (MUSSHOF *et al.*, 2002) sob a denominação de SPDE (*Solid-Phase Dynamic Extraction*). Esse último consiste em uma agulha de aço-inox (5,5 ou 7,5 cm) com um revestimento interno de fase extratora (filme de 50 µm e volume de 4,5 µL) acoplada com uma seringa (2,5 mL), (Figura 8).

Durante o processo de extração, os analitos são retidos no polímero que reveste a parede interna dessa agulha e o ar (*headspace*) é passado por essa agulha através do movimento do êmbolo (RIDGWAY *et al.*, 2006). Após essa extração, as substâncias são termicamente dessorvidas e conduzidas para o interior do cromatógrafo gasoso por um gás carreador para poderem ser separadas e detectadas (Figura 9). Convém destacar, que já há comercialmente disponíveis interfaces entre SPDE e o cromatógrafo gasoso ou o líquido de alta eficiência. Portanto, essas extrações e análises podem ser realizadas de maneira automatizada, o que facilita a sua realização nos laboratórios como uma técnica de rotina, além de sua maior precisão.

Alguns parâmetros devem ser otimizados como a temperatura de extração, o volume aspirado, o número e a velocidade das aspirações, o tipo de fase extratora (revestimento interno da agulha), volume e

a velocidade do gás empregado na dessorção, pois todos esses parâmetros citados influenciam a eficiência das extrações por SPDE (Mccomb *et al.*, 1997; TAN *et al.*, 1999; RIDGWAY *et al.*, 2006; JOCHMANN *et al.*, 2007).

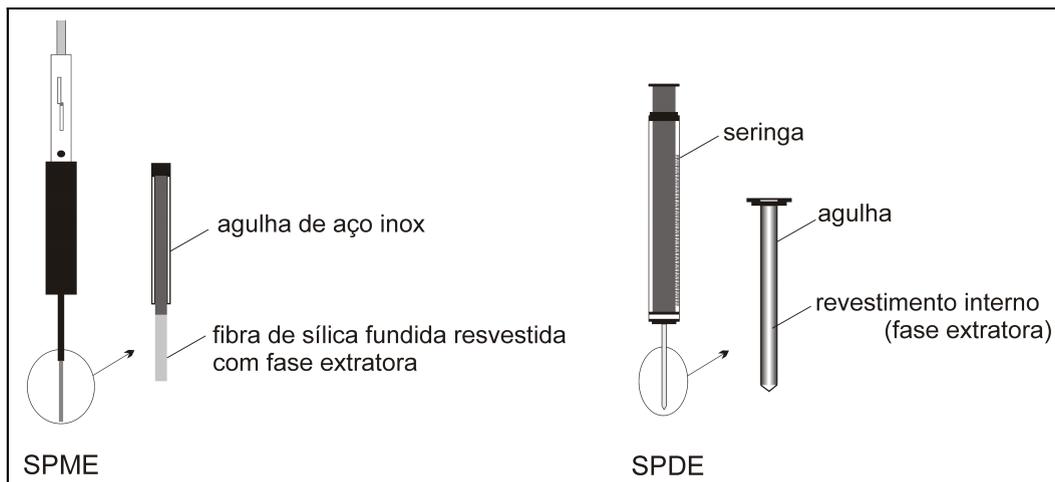


FIGURA 8 | Comparação entre SPME e SPDE

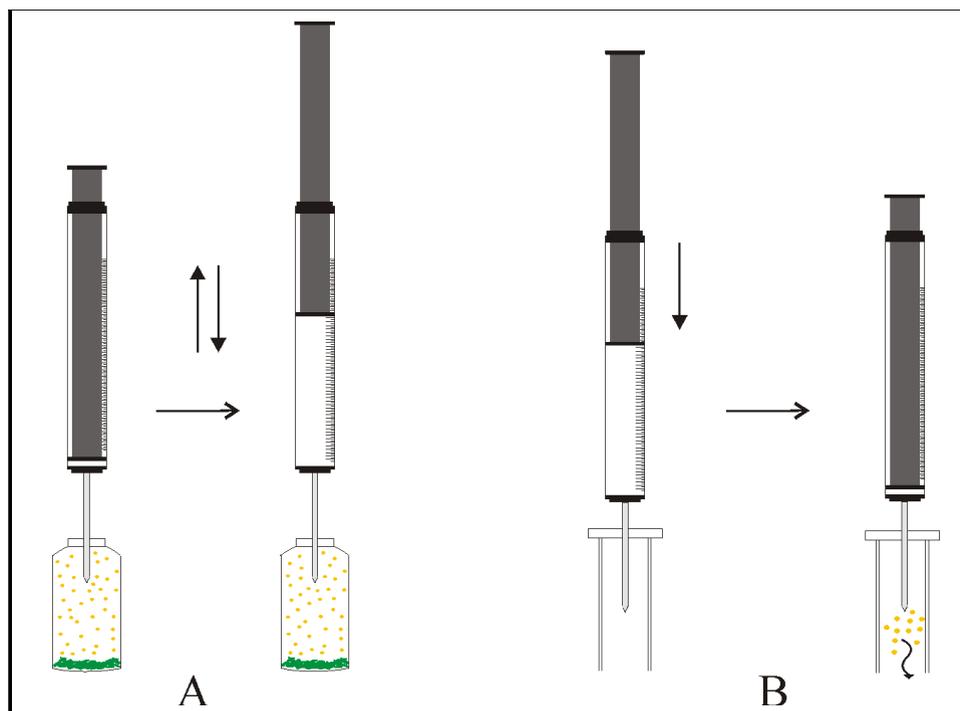


FIGURA 9 | Extração por SPDE (A) e dessorção térmica no injetor do cromatógrafo gasoso (B)

O volume da fase extratora na SPDE é aproximadamente de 4,5 µL, o que é 10 vezes maior quando comparamos com o volume dessa fase comumente utilizada na SPME (0,4 a 0,6 µL). Portanto, uma das principais vantagens da SPDE é sua maior capacidade na concentração dos analitos, o que a torna uma técnica muito eficiente na extração de substâncias que se encontram em pequenas quantidades nas matrizes (RIDGWAY *et al.*, 2006). Além disso, podem-se utilizar quantidades ainda menores de matrizes (amostras vegetais), como também as extrações podem ser realizadas em menos tempo já que a extração é dinâmica. Assim, o ar (*headspace*) que entra em contato com a fase extratora é, continuamente, renovado, o que acelera a extração (SAITO & JINNO, 2003).

A fase extratora (revestimento) pode ter diferentes seletividades dependendo do tipo de material selecionado. Os polímeros disponíveis comercialmente são o PDMS, PDMS/carvão ativado, PDMS/OV 225, PDMS/fenil-metilpolisiloxano, polietilenoglicol (PEG) e DB 1701 (polidimetilsiloxano, 7% de fenil e 7% de cianopropil).

A SPDE vem sendo aplicada em análises nas áreas ambiental, alimentícia e forense. Como exemplos dessas aplicações, se podem enumerar as análises de pesticidas em água (LIPINSKI, 2001), canabinoides e anfetamina em cabelo humano (MUSSHOF *et al.*, 2002, 2003), plantas, banana, café (verde e torrado) e vinhos (BICCHI *et al.*, 2004b).

Outra técnica mais recente é a ITEX (*In-Tube Extraction*), na qual entre a agulha (sem revestimento) e a seringa há uma coluna empacotada com material responsável pela sorção dos analitos como, por exemplo, Tenax. Esse procedimento de extração dinâmica também permite a realização de análises rápidas a partir do *headspace*, além de ser uma técnica com alta sensibilidade (JOCHMANN *et al.*, 2008).

Extração sortiva em barra de agitação

A SBSE (*Stir Bar Sorptive Extraction*) foi desenvolvida por Baltussen e colaboradores (1999), sendo que essa técnica foi inicialmente utilizada para a extração de substâncias de baixa polaridade a partir de soluções aquosas. O dispositivo utilizado para a extração possui três partes; uma parte mais interna que é constituída por uma barra de aço-inox (haste) revestida por uma capa de vidro e na parte mais externa há uma camada de revestimento constituída de um material responsável pela sorção dos analitos (Figura 10). Os dispositivos de SBSE são confeccionados com PDMS (fase extratora), devido suas propriedades adequadas de difusão e estabilidade térmica. A capa de vidro é importante nesse dispositivo já que evita a degradação do PDMS por contato deste com a haste metálica e, atualmente, esses são comercializados pela Gerstel sob a denominação de *Twister*.

Em 2000, essa extração por sorção em barra de agitação magnética foi utilizada por dois grupos de pesquisadores para a extração das substâncias a partir do *headspace* e então a técnica foi denominada de HSSE (*Headspace Sorptive Extraction*). Assim, a barra de extração foi mantida suspensa na fase vapor do frasco contendo a amostra a ser extraída (BICCHI *et al.*, 2000; TIENPONT *et al.*, 2000), (Figura 10).

As extrações por SPME e HSSE são muito similares, porém a HSSE possui uma maior capacidade de concentração dos analitos quando comparado com a SPME e, portanto, se destaca por sua alta sensibilidade. Isso está relacionado com o maior volume de fase extratora na HSSE, a qual varia de 25 a 250 µL dependendo do tamanho da barra (1 a 4 cm). Além disso, é importante destacar as altas taxas de recuperação dessa técnica, mas essa é dependente do volume e da área superficial da fase extratora selecionada, quando comparada com a SPME (BICCHI *et al.*, 2002, 2008).

Assim como nas técnicas já descritas anteriormente, na HSSE também há muitas variáveis que necessitam ser otimizadas e padronizadas para se obter extrações mais eficientes e menores tempos de análise nos estudos que serão conduzidos. Entre essas variáveis, destacam-se os seguintes parâmetros: volume da amostra, tipo de revestimento, dimensões da barra de agitação, tempo de exposição, velocidade de agitação e temperatura de extração (BICCHI *et al.*, 2003, 2005a; OCHIAIA *et al.*, 2003; CHAVES & QUEIROZ, 2008).

Após a extração, os analitos devem ser desorvidos para poderem ser analisados por GC. Assim, a barra é acondicionada em um tubo de vidro e transferida para um sistema de dessorção térmica, o qual é acoplado ao cromatógrafo. Entretanto, para a realização da dessorção térmica é necessário esse sistema de dessorção, o qual há disponível comercialmente dois tipos de sistemas e podem ser totalmente automatizados (KAWAGUCHI *et al.*, 2004). Porém, esses sistemas requerem cromatógrafos a gás equipados com injetores de temperatura programada que possuem o *criotrap*, para a concentração criogênica dos analitos já que o processo de dessorção dos analitos é muito lento quando comparado com o da SPME. Dessa maneira, essa etapa de concentração dos analitos antes de serem transferidos para a coluna cromatográfica é de extrema relevância para uma boa resolução na separação das substâncias (BICCHI *et al.*, 2003; CHAVES & QUEIROZ, 2008).

Como os *Twisters* disponíveis comercialmente possuem a camada externa de PDMS e por essa razão há limitações na extração de substâncias mais polares, muitos pesquisadores desenvolveram outras fases extratoras, principalmente por processos de sol-gel, para tentar contornar este problema na extração com barras de agitação produzidas com PDMS. Nesse sentido, foram confeccionadas e testadas barras de agitação com diferentes seletividades produzidas com, por exemplo, PDMS/PMHS (polimetil-hidrossiloxano) (LIU *et al.*, 2004a), alquil-diol-sílica (LAMBERT *et al.*, 2005), fases molecularmente impressas com polímeros (ZHU *et al.*, 2006), PDMS/poli(pirrol) (MELO *et al.*, 2009) dentre outras.

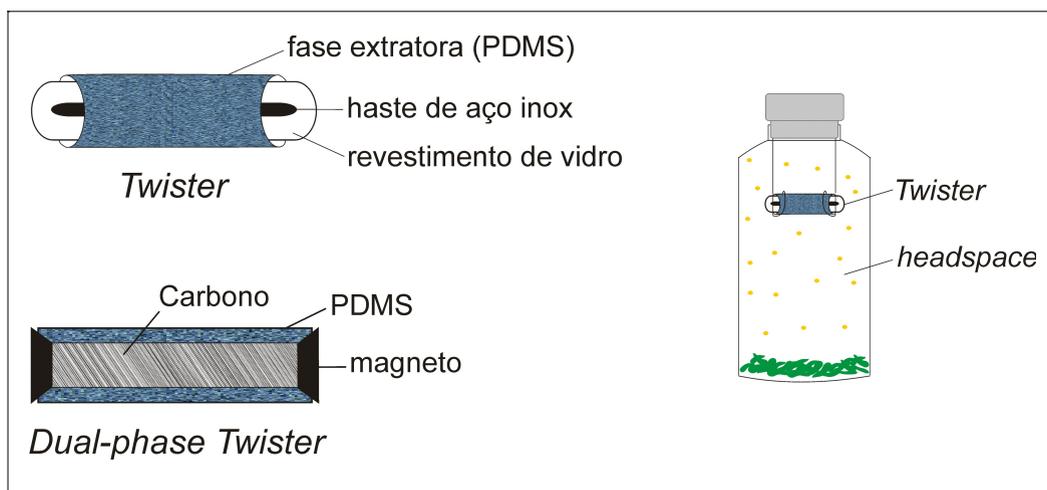


FIGURA 10 | Dispositivos utilizados em extração sortiva em barra de agitação e detalhe da extração a partir do *headspace*

Além dessas variações nas barras de extração, Bicchi e colaboradores (2005b) desenvolveram uma segunda geração do *Twister*, o qual é comercializado pela Gerstel sob a denominação de *Dual-phase Twister*. Portanto, essas barras de extração de segunda geração foram desenvolvidas devido à falta de capacidade do polímero PDMS (apolar) em extrair substâncias de média a alta polaridade e de alta volatilidade. Desse modo, essas barras mantêm a alta capacidade de concentração de analitos a partir de uma matriz, mas ao invés de um material extrator essas barras utilizam dois ou mais materiais para esse fim e assim promovem a extração por combinação de diferentes modos como a adsorção e sorção. Porém, essa técnica ainda precisa ser modificada para a extração de substâncias altamente polares (BICCHI *et al.*, 2005b).

As barras de extração de segunda geração (*Dual-phase Twister*) são constituídas por um tubo de PDMS empacotado com material adsorvente (carbono ativado) e nas extremidades esse tubo é mantido fechado por um material magnético (Figura 10), pois assim esse pode ser magneticamente agitado. Assim, os analitos, primeiramente, são absorvidos na camada de PDMS, em seguida sofrem difusão em direção ao interior do dispositivo de extração e por fim são adsorvidos no material constituinte da camada interior (BICCHI *et al.*, 2005b).

Portanto, as extrações de analitos a partir de uma matriz pelas barras de segunda geração dependem da afinidade desses pelo PDMS, sua capacidade de difusão e afinidade pelo material adsorvente. Dessa maneira, com a modificação dos *Twisters* convencionais foi possível aumentar a capacidade de extração, ou seja, a quantidade de analitos extraídos, como também aumentar, dependendo do material utilizado na fase interior, a extração de substâncias mais polares (BICCHI *et al.*, 2005b).

Um exemplo dessas variações nas extrações com a modificação do material da camada interna foi observado no estudo dos voláteis do café e das folhas de sálvia (*Salvia lavandulifolia* Vahl), no qual foram avaliados tubos de PDMS empacotados com Tenax, bisfenol/copolímero de PDMS (25:75), Carbowax com 5% de Carbowax e β -ciclodextrina (BICCHI *et al.*, 2007a). Além disso, neste estudo também foi avaliado a substituição dos materiais baseados em carbono (camada interna), pois esses apresentam problemas como a produção de artefatos, reatividade, adsorção irreversível e também pode haver a dessorção irregular das substâncias, ou seja, a discriminação das substâncias durante a liberação dessas do dispositivo de extração (ZABARAS & WILLIE, 2002).

A SBSE apresenta diversas vantagens como, por exemplo, a ausência de solventes orgânicos para a extração, alta sensibilidade e sua maior aplicabilidade em análises quantitativas. Dessa maneira, essa técnica é amplamente empregada em análises de fármacos em fluidos biológicos, principalmente através da extração por imersão direta (CHAVES & QUEIROZ, 2008), como também é utilizada nas análises dos componentes voláteis do *headspace* a partir de amostras de espécies vegetais (BICCHI *et al.*, 2000; KRECK *et al.*, 2002), fungos (DEMYTTENAERE *et al.*, 2003, 2004; WIHLBORG *et al.*, 2008) e alimentos (CAVALLI *et al.*, 2003; BICCHI *et al.*, 2005b; SALVADEO *et al.*, 2007).

Técnicas de extração em grande área superficial de fase extratora

A superfície de fase extratora é um dos parâmetros que influenciam de maneira muito significativa na extração das substâncias. Dessa maneira, foram desenvolvidas técnicas com maior área superficial de fase

extratora na tentativa de se desenvolver técnicas mais sensíveis e capazes de extrair substâncias que estejam em níveis de traços nas matrizes.

Neste contexto, Yang e colaboradores (1994) desenvolveram uma técnica denominada de MESI (*Membrane Extraction Sorbent Interface*) e que, posteriormente, foi utilizada para a extração de substâncias voláteis a partir do *headspace* (SEGALA *et al.*, 2000). Essa técnica é simples, não requer a utilização de solventes, bem como tem sensibilidade destacável e também é um processo ininterrupto, pois está diretamente acoplada ao cromatógrafo a gás e evita a perda de analitos.

A MESI é realizada em duas etapas simultâneas que envolvem a extração e concentração das substâncias. Inicialmente, a extração das substâncias voláteis é realizada em uma membrana de PDMS e logo em seguida as substâncias extraídas são arrastadas para o outro lado da membrana por um gás e conduzidos até um *trap* para serem concentradas (YANG *et al.*, 1994). Geralmente, esses sistemas de *traps* são constituídos por Tenax, PDMS, Carboxen ou outros (WANG *et al.*, 2002; LIU & PAWLISZYN, 2005). Após a extração e concentração das substâncias, elas são conduzidas até o cromatógrafo para serem devidamente separadas.

Os analitos na MESI devem ser transportados pela membrana não porosa de PDMS através do mecanismo de difusão/solução. Portanto, os constituintes a serem extraídos devem possuir grandes coeficientes de partição (membrana de PDMS/amostra) e difusão. Essa membrana de PDMS também evita que vapores de água sejam introduzidos no cromatógrafo, porém esta membrana atua como um filtro seletivo (LUO *et al.*, 1997). Apesar dessa desvantagem, Bruheim e colaboradores (2003) observaram extrações mais eficientes e com maiores sensibilidades quando utilizaram membranas de PDMS do que em extrações realizadas por SPME. Por essa razão, alguns pesquisadores utilizaram essa técnica em estudos que visavam monitorar a emissão de voláteis como a partir das folhas de *Eucalyptus dunnii* Maiden (WANG *et al.*, 2002; LIU *et al.*, 2004b), bem como determinar as substâncias orgânicas voláteis presentes no ar (LIU & PAWLISZYN, 2005). Todavia, essa técnica possui diversos parâmetros que necessitam ser otimizados, como as temperaturas do *trape* do módulo que contém a membrana, fluxo do gás, tempo de extração dentre outros (LIU *et al.*, 2004b).

Outra técnica com maior área superficial para a extração é a STE (*Sorptive Tape Extraction*), a qual foi desenvolvida por Sandra e colaboradores em 2006 e fundamenta-se na extração de substâncias apolares em uma fita flexível de PDMS. Inicialmente, a STE foi empregada para a análise da composição do sebo da pele humana antes e após o tratamento com um cosmético. Para tal estudo, foram fixadas fitas de PDMS sobre a pele e após a extração as substâncias foram submetidas à dessorção térmica *on-line* com o cromatógrafo a gás e a dessorção com solvente.

Em seguida, Bicchi e colaboradores (2007b) utilizaram a STE para a extração de substâncias voláteis de matrizes vegetais como *Mentha spicata* L., *Rosmarinus officinalis* L. e maçã (*Malus* Mill.), tanto a partir do *headspace* quanto do contato direto com tais matrizes. Além disso, nesse estudo também foram realizadas as mesmas extrações a partir do *headspace* com HSSE (recobrimento de 20 µL de PDMS) e SPME (fibra com recobrimento de 100 µm de PDMS). Esses dados evidenciam as vantagens da STE como, por exemplo, a rápida velocidade das extrações, maior sensibilidade e reprodutibilidade. Convém destacar que essa técnica também pode ser de grande valia nos estudos da emissão dos voláteis para o estabelecimento dos fatores que possam alterar o perfil químico dos voláteis das plantas.

Microextração em fase líquida (LPME)

Se uma gotícula de solvente extrator fosse (Figura 11) encarregada de extrair, através da afinidade química e do coeficiente de partição, uma pequena quantidade de analitos presentes em uma amostra, teríamos um processo dificultado por questões técnicas como, por exemplo, a recuperação de pequenos volumes. Entretanto essa abordagem, denominada de LPME (*Liquid Phase Micro-extraction*), foi inicialmente empregada por Jeannot e colaboradores (1996). Esses pesquisadores realizaram a extração da 4-metilacetofenona, em amostras de água, através de uma gota de *n*-octano (8 μ L) suspensa na ponta de um bastão de *teflon*, sendo inicialmente denominada por esses autores de SDME (*Single Drop Microextraction*). Após isso, o volume da gota de solvente orgânico (fase extratora) foi reduzido para 1 μ L e este foi mantido suspenso na agulha de uma microsseringa (JEANNOT & CANTWELL, 1997).

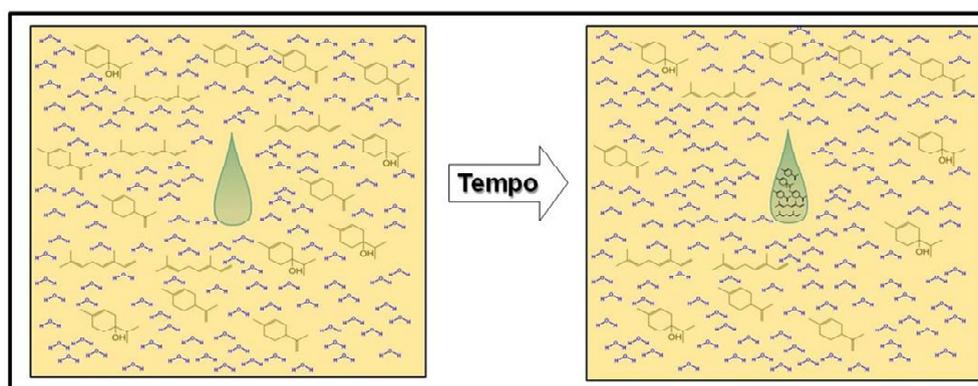


FIGURA 11 | Esquema demonstrando a hipótese de microextração em fase líquida.

Outras técnicas de microextração envolvendo os conceitos da extração da LPME foram desenvolvidas, entretanto foram utilizadas membranas porosas para a imobilização da fase orgânica. Dentre essas técnicas, pode-se citar a SLM (*Supported Liquid Membrane*), MMLLE (*Microporous Membrane Liquid-Liquid Extraction*) (PEDERSEN-BJERGAARD & RASMUSSEN, 1999; SHEN *et al.*, 1998; SANDAHL *et al.*, 2000) ou a extração em fibras ocas revestidas com membranas denominadas de HFLPME (*Hollow Fiber Liquid-Phase Microextraction*) ou simplesmente LPME (SHEN & LEE, 2002).

A LPME é uma técnica simples, de baixo custo e grande versatilidade, já que o tipo de solvente extrator pode ser ajustado de acordo com os analitos que se deseja extrair como, por exemplo, a extração de substâncias que possuem maior polaridade (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Entretanto, o solvente extrator selecionado deve possuir pressão de vapor baixa o suficiente para evitar sua evaporação durante o processo de extração, como também ele deve ser compatível para a injeção no cromatógrafo a gás (XU *et al.*, 2007).

Em 2001, a LPME começou a ser utilizada na extração de substâncias a partir do *headspace*, sendo que nesta primeira abordagem foi realizada a extração do benzeno, tolueno, etilbenzeno e *o*-xileno presentes em uma matriz aquosa (THEIS *et al.*, 2001). Além da extração das substâncias do *headspace* de modo estático, também é possível a extração dinâmica das substâncias utilizando a LPME podendo, nesse caso, até mesmo

serem utilizados solventes que possuam pressões de vapores mais elevadas, já que este tipo de extração é muito rápida, além de haver uma reduzida área dentro da microseringa (SHEN & LEE, 2003; HE & LEE, 1997).

Assim como nas técnicas anteriores descritas, na LPME também existem diversos parâmetros que influenciam, consideravelmente, a eficiência da extração e, portanto, requerem a otimização. Dentre esses parâmetros, pode-se enumerar a temperatura e tempo de extração, pH (amostra), quantidade de amostra, tipo e volume de solvente extrator, agitação e fluxo da movimentação (extrações por modo dinâmico) (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

A LPME, assim como as demais técnicas de microextração abordadas aqui nesse capítulo, também necessita de uma pequena quantidade de amostra para a extração e utiliza um pequeno volume de solvente orgânico, acarretando menores danos ambientais. Além do mais, a LPME pode ser aplicada em estudos quantitativos, bem como a realização de derivatização das substâncias extraídas no próprio solvente extrator (DENG *et al.*, 2005a; LI *et al.*, 2005), a possível combinação com outras técnicas (DENG *et al.*, 2005b; DENG *et al.*, 2006) e automatização (XU *et al.*, 2007).

Essa técnica é amplamente utilizada em análises de voláteis de plantas (BICCHI *et al.*, 2008), como também de alguns alimentos (ZHU *et al.*, 2002; KAYKHAI & RAHMANI, 2007) e bebidas (XIAO *et al.*, 2006). Existem diversos exemplos de estudos dos voláteis de plantas (*headspace*) por LPME na literatura, como aqueles conduzidos com as espécies *Pimpinella anisum* L. (anis ou erva-doce) (BESHARATI-SEIDANI *et al.*, 2005), *Saposhnikovia divaricata* (Turcz.) Schischk. (DENG *et al.*, 2005b), *Curcuma wenyujin* Y.H. Chen & C. Ling (CAO *et al.*, 2006), *Rosmarinus officinalis* L. (SALEHI *et al.*, 2007), *Lavandula angustifolia* Mill. (FAKHARI *et al.*, 2005) e outros.

ANÁLISES DAS SUBSTÂNCIAS VOLÁTEIS

Algumas das técnicas convencionais abordadas aqui neste capítulo continuam sendo empregadas em escala industrial para a extração de óleos essenciais. Apesar de ter ocorrido modificações nos procedimentos extrativos nesse tipo de abordagem, não houve o desenvolvimento de novas metodologias. O que torna esse campo atrativo para as pesquisas, já que, atualmente, se buscam procedimentos com altos rendimentos, bem como a geração de produtos de alta qualidade para aumentar o valor agregado de tais produtos. Além disso, também se almejam metodologias com reduzidos gastos energéticos e de solventes orgânicos.

Entretanto, os avanços nas técnicas de microextração sem dúvida são notáveis e representam um marcante crescimento no estabelecimento dos perfis químicos das substâncias voláteis mais próximos dos reais emitidos e produzidos pelas espécies vegetais. Em adição a isso, também convém destacar a importância dessas técnicas para alguns esclarecimentos proporcionados no campo da ecologia química, como também são técnicas que utilizam mínimos volumes de solventes orgânicos ou nem mesmo os utilizam, requerem pequenas quantidades de amostras vegetais e menores tempos para as extrações. Um exemplo dessas constatações é a possibilidade da análise das substâncias voláteis emitidas *in vivo* das flores de *Petunia hybrida* Vilm. durante seu ciclo para desabrochar (VERDONK *et al.*, 2003). Neste trabalho foram utilizadas

extrações por SPME a partir do *headspace* para traçar as variações na emissão de benzenoides, aldeídos alifáticos, sesquiterpenos e alguns derivados de ácidos graxos (Figura 12).

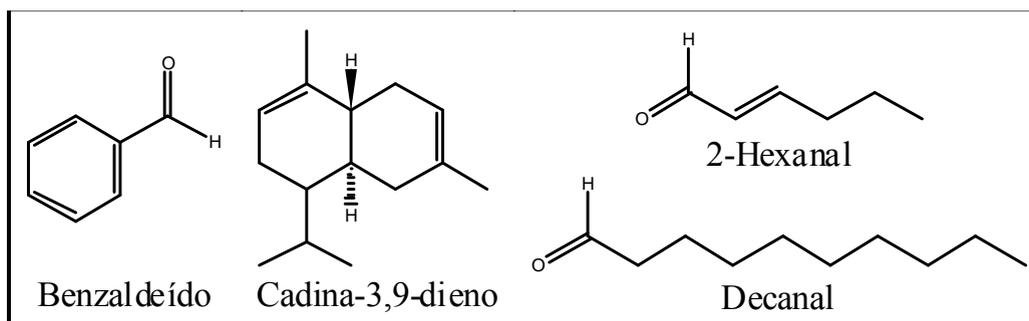


FIGURA 12 | Substâncias voláteis das flores de *Petunia hybrida* detectadas *in vivo* através de SPME.

Os avanços não foram somente nas técnicas de microextração, mas também nas análises por cromatografia gasosa dos componentes extraídos, sendo que esses últimos foram tanto na detecção quanto na separação das substâncias. Entretanto, é importante ressaltar que para uma caracterização autêntica das substâncias presentes no *headspace* ou no óleo essencial, tais substâncias devem ser termicamente estáveis nas condições de aquecimento estabelecidas no método cromatográfico selecionado, caso contrário serão detectados e identificados artefatos.

O acoplamento do espectrômetro de massas ao cromatógrafo a gás ocorreu nos anos 50 e foi sem dúvida fundamental para a caracterização das substâncias presentes nas misturas complexas dos óleos essenciais, pois a partir disso podem ser obtidas informações sobre as estruturas químicas podendo ser empregado em estudos quantitativos e qualitativos de substâncias voláteis e semivoláteis (SNEDDON *et al.*, 2007). Os espectrômetros de massas com fonte de ionização por elétrons (EI, *Electron Ionization*) foram os primeiros a serem acoplados ao cromatógrafo a gás e continuam sendo um dos mais utilizados na caracterização de componentes voláteis, porém já existem outros tipos de fontes de ionização passíveis de acoplamento com o GC (HIRAOKA, 2005).

Uma das principais vantagens da utilização desses aparelhos de GC-MS com fonte de ionização do tipo EI é a disponibilidade comercial de bibliotecas com um grande número de espectros de massas de substâncias, o que facilita na identificação das substâncias por meio da comparação entre os perfis de fragmentação (RAGUNATHAN *et al.*, 1999). Além disso, também podem ser realizados os cálculos dos índices de retenção relativos a cada substância do cromatograma e a comparação com os índices descritos na literatura (ADAMS, 1995). Assim, com os dados de espectrometria de massas aliados aos índices de retenção pode-se propor a caracterização das substâncias de maneira mais segura.

O índice de retenção é calculado a partir de dados dos tempos de retenção de um determinado composto e dos observados para os *n*-alcanos de uma série homóloga. O índice de retenção é o mais difundido e utilizado, porém existem muitas outras séries alternativas para a realização da identificação de substâncias (CASTELLO, 1999), sendo que estas são menos utilizadas e cada uma delas recebe uma

denominação particular como, por exemplo, número de carbono que é calculado a partir de ésteres metílicos de ácidos graxos saturados (WOODFORD & VAN GENT, 1960).

O acoplamento do GC com a técnica de Espectroscopia de Infravermelho (IR, *Infrared Spectroscopy*) surgiu nos anos 60 e próximo a esse desenvolvimento também houve a combinação desse com a MS (LOW & FREEMAN, 1967, 1968). O IR é uma técnica analítica universal, versátil e que pode ser utilizada tanto em estudos qualitativos quanto quantitativos, sendo que com o desenvolvimento da técnica com a transformada de Fourier essa se tornou mais sensível, reprodutível e rápida. A grande relevância da utilização do GC-IR é na diferenciação de isômeros, os quais não podem ser diferenciados por GC-MS (SASAKI & WILKINS, 1999). A técnica IR baseia-se nas vibrações moleculares, logo essa dependerá dos comprimentos das ligações das substâncias analisadas, massas atômicas dos átomos presentes e das interações inter e intramoleculares.

Uma das desvantagens da IR é a sensibilidade, pois apresentam limites de detecção altos quando comparados aos observados com a MS. Porém, também houve certa evolução nos tipos de interface para o IR, no qual foi possível, em alguns casos, obter detecções mais rápidas e com alta sensibilidade (GALLIGNANI & BRUNETTO, 2004). Atualmente, há disponíveis três tipos de interface que são: *light pipe* (LP), *matrix isolation* (MI) e *direct deposition* (DD) (SASAKI & WILKINS, 1999).

A LP, primeiro tipo de interface utilizada, é a mais simples das interfaces e apresenta baixa sensibilidade, o que acarreta problemas com relação aos limites de detecção (aproximadamente de 10 ng). Na LP os espectros de IR são obtidos em fase gasosa em um capilar de vidro de borossilicato com revestimento de ouro nas paredes (AZARRAGA, 1980), sendo que esta cela de detecção tem volume de 100-150 μ L, o que limita a resolução cromatográfica (GISS & WILKINS, 1984).

Na tentativa de sanar o problema da sensibilidade da LP foram desenvolvidos outros dois tipos de interface; a MI e DD (NORTON & GRIFFITHS, 1995). Nessas duas interfaces a obtenção do espectro de IR das substâncias é realizada em fase sólida, sendo que a diferença entre elas é a forma final obtida do sólido. Na MI, a substância em fase gasosa (efluente da coluna cromatográfica) é congelada em uma matriz gasosa, geralmente contendo 2-5% de argônio, com isso há uma redução das interações intermoleculares, o que reflete na obtenção de espectros com bandas mais finas. Já na DD, as substâncias em fase gasosa são congeladas em uma janela transparente de seleneto de zinco (ZnSe) (SASAKI & WILKINS, 1999), a qual foi, posteriormente, recoberta por ouro ou prata para reduzir ainda mais o limite de detecção da DD, sendo que esta recebeu a denominação de DD-SEIRA (*Direct Deposition-Surface Enhanced Infrared Absorption*) (Heaps & Griffiths, 2005). Nas interfaces do tipo MI e DD, os limites de detecção são menores do que na LP, mas a utilização da DD é sem dúvida mais vantajosa, pois os espectros obtidos nessa interface são muito similares com os espectros obtidos em KBr e dessa maneira há grandes bibliotecas de espectros de substâncias para a busca de similaridade e auxílio na identificação dos isômeros (NORTON *et al.*, 1996).

Portanto, em alguns casos para a identificação inequívoca das substâncias é necessária a utilização de mais de uma técnica de detecção, bem como a comparação dos índices de retenção. Um exemplo disso pode ser observado na análise dos constituintes do óleo essencial de *Salvia sclarea* L. por GC-MS e GC-IR. Em um dos picos o MS identificou a substância como sendo o monoterpene nerol (96% de similaridade) ou o acetato de geranila (91% de similaridade) em segunda opção, porém o espectro de IR confirmou que este pico é acetato de geranila (98% de similaridade) (Figura 13). Nesse mesmo estudo, também foi possível verificar que com a técnica de subtração de espectros de IR é possível a identificação inequívoca das substâncias sem a completa separação das substâncias, no qual o MS identificou o pico apenas como α -terpineol, mas com o IR foi possível

confirmar que os picos, os quais não estavam totalmente separados, correspondiam às substâncias α -terpineol e formiato de geranila (CAI *et al.*, 2006).

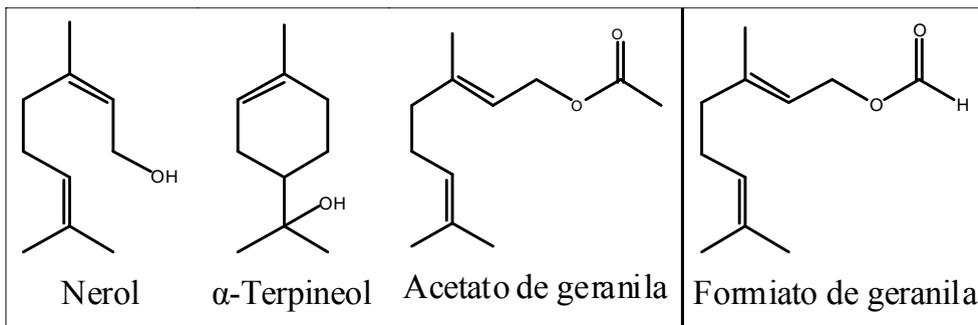


FIGURA 13 | Alguns dos constituintes do óleo essencial de *Salvia sclarea* identificados por GC-MS e GC-IR.

Além dos detectores para GC já citados também existem os seguintes: ionização em chama (FID, *Flame Ionization Detector*), captura de electron (ECD, *Electron Capture Detector*), ionização termiônica (TID, *Thermionic Ionization Detector*), fotoionização (PID, *Photoionization Detector*), olfatométrico (O, *Olfatometry*) e outros. Esse último é de grande importância na indústria de aromas para utilização em diversos campos como alimentos, cosmética e farmacêutica, pois através desse pode-se avaliar a contribuição individual de cada substância no aroma final do óleo essencial e assim desenvolver novas substâncias odoríferas. Em geral, essa técnica é utilizada em paralelo com outra para a identificação e quantificação das substâncias como, por exemplo, o GC-MS (PLUTOWSKA & WARDENCKI, 2008; CURIONIA & BOSSET, 2002).

Além dos avanços na área da detecção, os melhoramentos na área da separação das substâncias voláteis por GC também foram de grande relevância nas caracterizações químicas dos óleos essenciais, pois refletiram, consideravelmente, nos tempos necessários para as análises e nas resoluções das separações cromatográficas. Inicialmente, as colunas utilizadas na GC eram colunas do tipo empacotadas, porém em 1957, com o desenvolvimento de colunas do tipo capilares, houve um aumento significativo na eficiência das separações cromatográficas e reduções nos tempos das análises. Essas colunas capilares possuem um diâmetro interno de 250 a 320 μm (convencional) e revestindo a parede interna do capilar está a fase estacionária que pode ou não estar quimicamente ligada (PEREIRA & NETO, 2000; SEQUINEL *et al.*, 2010).

A partir disso, foram desenvolvidas colunas com fases estacionárias mais seletivas e resistentes termicamente, o que permitiu o desenvolvimento de colunas com diâmetro interno e comprimentos cada vez menores, como as colunas *narrow bore* para cromatografia gasosa ultrarrápida (*Ultra Fast-GC*). Dessa maneira, foi possível aumentar, consideravelmente, as velocidades das análises podendo ser realizadas separações de misturas complexas em menos de 1 minuto (PEREIRA & NETO, 2000; SEQUINEL *et al.*, 2010).

Há diversas definições para classificar os tipos de GC (convencional até ultrarrápida), porém será abordada apenas a classificação elaborada por Magni e colaboradores (2002), pois é uma das que consideram

um maior número de parâmetros para a classificação. Nessa classificação a *Ultra Fast-GC* é definida segundo os parâmetros sumariados na Tabela 2, no qual as velocidades de aquecimento são superiores que 1 °C/s e as colunas possuem apenas de 2 a 10 m de comprimento com diâmetro interno de 0,05 a 0,1 mm. Com isso é possível realizar a separação dos constituintes de uma mistura complexa em menos de 1 min, podendo ser reduzido o tempo de análise cromatográfica em até 40 vezes quando comparado com a cromatografia gasosa convencional (GC) que utiliza colunas de até 30 m de comprimento.

A utilização da *Ultra Fast-GC* como técnica de rotina acarreta em um significativo aumento da produtividade, sendo que essa pode ser empregada tanto em estudos qualitativos quanto quantitativos. Convém destacar que os fornos convencionais de GC não podem ser utilizados na *Ultra Fast-GC*, pois a taxa de aquecimento excessiva dessa modalidade é incompatível com tais fornos e por isso essas colunas são aquecidas por resistência diretamente conectadas as colunas.

Apesar do significativo aumento da produtividade com a *Ultra Fast-GC*, há algumas perdas em termos de resolução cromatográfica nessa modalidade, devido à drástica redução do comprimento e diâmetro interno das colunas, aumento excessivo da taxa de aquecimento e das pressões, logo misturas com alto grau de complexidade podem não ser totalmente resolvidas com a *Ultra Fast-GC*. Entretanto, há diversos exemplos na literatura da utilização da *Ultra Fast-GC* na análise de óleos essenciais obtidos a partir da camomila, hortelã, alecrim e sálvia (BICCHI *et al.*, 2004a).

Tabela 2. Alguns parâmetros que são utilizados para classificar a modalidade de CG segundo Magni e colaboradores (2002)

Modalidade	Coluna cromatográfica		TA (min)	TxA (°C/min)	LP (s)
	comp. (m)	d.i. (mm)			
GC ¹	25-30	0,25-0,32	10-60	1-10	1-10
<i>Fast-GC</i>	5-15	0,10-0,25	≤ 10	15-60	0,5-2,0
<i>Ultra Fast-GC</i>	2-10	0,05-0,10	≥ 1	≥ 60	0,05-0,2

¹: Convencional; comp.: comprimento; d.i.: diâmetro interno; TA: tempo de análise; TxA: taxa de aquecimento; LP: largura do pico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation, USA, 1995.

AKISUE, G. Aparelho extrator de óleo essencial: Modificação do aparelho de Clevenger. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 1, p. 247-252, 1986.

- ANKLAM, E.; MÜLLER, A. Extraction of caffeine and vanillin from drugs by supercritical carbon dioxide. **Pharmazie**, v. 50, p. 364-365, 1995.
- ASHRAF-KHORASSANI, M.; TAYLOR, L. T.; WATERMAN, K. C.; NARAYAN, P.; BRANNEGAN, D. R.; REID, G. L. Purification of pharmaceutical excipients with supercritical fluid extraction. **Pharmaceutical Development and Technology**, v. 10, p. 507-516, 2005.
- AZARRAGA, L. V. Gold coating of glass tubes for gas chromatography/Fourier transform infrared spectroscopy "light-pipe" gas cells. **Applied Spectroscopy**, v. 34, p. 224-225, 1980.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; DAVID, F.; CRAMERS, C. Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples, theory and principles. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 11, p. 737-747, 1999.
- BESHARATI-SEIDANI, A.; JABBARI, A.; YAMINI, Y. Headspace solvent microextraction: a very rapid method for identification of volatile components of Iranian *Pimpinella anisum* seed. **Analytica Chimica Acta**, v. 530, p. 155-161, 2005.
- BICCHI, C.; BRUNELLI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; GALLI, M.; SIRONI, A. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 195-207, 2004a.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P. Headspace sorptive extraction (HSSE) in the headspace analysis of aromatic and medicinal plants. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 23, p. 539-546, 2000.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction to analyse the volatile fraction of food matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 217-226, 2004b.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; SANDRA, P. Impact of phase ratio, polydimethylsiloxane volume and size, and sampling temperature and time on headspace sorptive extraction recovery of some volatile compounds in the essential oil field. **Journal of Chromatography A**, v. 1071, p. 111-118, 2005a.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; DAVID, F.; SANDRA, P. Dual-phase twistors: A new approach to headspace sorptive extraction and stir bar sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, p. 9-16, 2005b.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; SANDRA, P. Sorptive tape extraction in the analysis of the volatile fraction emitted from biological solid matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 137-144, 2007b.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGORBINI, B.; DAVID, F.; SANDRA, P.; RUBIOLO, P. Influence of polydimethylsiloxane outer coating and packing material on analyte recovery in dual-phase headspace sorptive extraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1164, p. 33-39, 2007a.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; LIBERTO, E.; SGORBINI, B.; RUBIOLO, P. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, p. 220-233, 2008.
- BICCHI, C.; CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Impact of water/PDMS phase ratio, volume of PDMS and sampling time on Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE) recovery of some pesticides with different K_{ow} . **Journal of Separation Science**, v. 26, p. 1650-1656, 2003.
- BICCHI, C.; IORI, C.; RUBIOLO, P.; SANDRA, P. Headspace sorptive extraction (HSSE), stir bar sorptive extraction (SBSE) and solid phase microextraction (SPME) applied to the analysis of roasted arabica coffee and coffee

- brew. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 449-459, 2002.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, p. 588-594, 2009.
- BONATO, P. S. Cromatografia gasosa. In: Collins, C. H.; Braga, G. L.; Bonato, P. S. (ed.). **Fundamentos de cromatografia**. Ed. da UNICAMP, Campinas/SP, p. 203-272, 2006.
- BOY-BOLAND, A. A.; PAWLISZYN, J. B. Solid-phase microextraction of nitrogen containing herbicides. **Journal of Chromatography A**, v. 704, p. 163-172, 1995.
- BREITMAIER, E. Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones. Wiley-VCH, Applied Organometallic Chemistry, v. 21, p. 377, 2006.
- BRUHEIM, I.; LIU, X.; PAWLISZYN, J. Thin-film microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 1002-1010, 2003.
- BUCHHOLZ, K. D.; PAWLISZYN, J. Optimization of solid-phase microextraction conditions for determination of phenols. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 160-167, 1994.
- CAI, J.; LIN, P.; ZHU, X.; SU, Q. Comparative analysis of clary sage (*S. sclarea* L.) oil volatiles by GC-FTIR and GC-MS. **Food Chemistry**, v. 99, p. 401-407, 2006.
- CAO, J.; QI, M.; ZHANG, Y.; ZHOU, S.; SHAO, Q.; FU, R. Analysis of volatile compounds in *Curcuma wenyujin* Y.H. Chen et C. Ling by headspace solvent microextraction-gas chromatography-mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 561, p. 88-95, 2006.
- CASTELLO, G. Retention index systems: alternatives to the *n*-alkanes as calibration standards. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 51-64, 1999.
- CAVALLI, J. F.; FERNANDEZ, X.; LIZZANI-CUVELIER, L.; LOISEAU, A. M. Comparison of static headspace, headspace solid phase microextraction, headspace sorptive extraction, and direct thermal desorption techniques on chemical composition of French olive oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 7709-7716, 2003.
- CHARENTREAU, A. Simultaneous distillation-extraction: from birth to maturity-review. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 16, p. 136-148, 2001.
- CHAVES, A. R.; QUEIROZ, M. E. C. Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 1814-1819, 2008.
- CORDERO, C.; RUBIOLO, P.; SGORBINI, B.; GALLI, M.; BICCHI, C. Comprehensive two-dimensional gas chromatography in the analysis of volatile samples of natural origin: A multidisciplinary approach to evaluate the influence of second dimension column coated with mixed stationary phases on system orthogonality. **Journal of Chromatography A**, v. 1132, p. 268-279, 2006.
- CREMER, D. R.; EICHNER, K. Formation of volatile compounds during heating of spice paprika (*Capsicum annum*) powder. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2454-2460, 2000.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.; Grissem, W.; Jones, R. (ed.). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000.
- CURIONIA, P. M. G.; BOSSET, J. O. Key odorants in various cheese types as determined by gas chromatography-olfactometry. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 959-984, 2002.
- DEMYTTENAERE, J. C. R.; MORIÑA, R. M.; KIMPE, N.; SANDRA, P. Use of headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction for the detection of the volatile metabolites produced by toxigenic *Fusarium* species. **Journal of Chromatography A**, v. 1027, p. 147-154, 2004.

- DEMYTTENAERE, J. C. R.; MORIÑA, R. M.; SANDRA, P. Monitoring and fast detection of mycotoxin-producing fungi based on headspace solid-phase microextraction and headspace sorptive extraction of the volatile metabolites. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 127-135, 2003.
- DENG, C.; XU, X.; YAO, N.; LI, N.; ZHANG, X. Rapid determination of essential oil compounds in *Artemisia Selengensis* Turcz by gas chromatography-mass spectrometry with microwavedistillation and simultaneous solid-phase microextraction. **Analytica Chimica Acta**, v. 556, p. 289-294, 2006.
- DENG, C.; YANG, X.; ZHANG, X. Rapid determination of panaxynol in a traditional Chinese medicine of *Saposhnikovia divaricata* by pressurized hot water extraction followed by liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Talanta**, v. 68, p. 6-11, 2005b.
- DENG, C.; YAO, N.; LI, N.; ZHANG, X. Headspace single-drop microextraction with in-drop derivatization for aldehyde analysis. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 2301-2305, 2005a.
- DENG, C.; YAO, N.; WANG, B.; ZHANG, X. Development of microwave-assisted extraction followed by headspace single-drop microextraction for fast determination of paeonol in traditional Chinese medicines. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 15-21, 2006.
- DIÁZ-MAROTO, M. C.; HIDALGO, I. J. D. M.; NCHEZ-PALOMO, E. S.; REZ-COELHO, M. S. P. Volatile components and key odorants of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil extracts obtained by simultaneous distillation-extraction and supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5385-5389, 2005.
- DUDAREVA, N.; NEGRE, F.; NAGEGOWDA, D. A.; ORLOVA, I. Plant volatiles: recent advances and future perspectives. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 25, p. 417-440, 2006.
- DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E.; GERSHENZON, J. Biochemistry of plant volatiles. **Plant Physiology**, v. 135, p. 1893-1902, 2004.
- FAKHARI, A. R.; SALEHI, P.; HEYDARI, R.; EBRAHIMI, S. N.; HADDAD, P. R. Hydrodistillation-headspace solvent microextraction, a new method for analysis of the essential oil components of *Lavandula angustifolia* Mill. **Journal of Chromatography A**, v. 1098, p. 14-18, 2005.
- FARHAT, A.; GINIES, C.; ROMDHANE, M.; CHEMAT, F. Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 5077-5085, 2009.
- FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; CHEMAT, F. Comparison of different isolation methods of essential oil from *Citrus* fruits: cold pressing, hydrodistillation and microwave 'dry' distillation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 494-504, 2007.
- FERHAT, M. A.; MEKLATI, B. Y.; SMADJA, J.; CHEMAT, F. An improved microwave Clevenger apparatus for distillation of essential oils from orange peel. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 121-126, 2006.
- FITZGERALD, G.; JAMES, K. J.; MACNAMARA, K.; STACK, M. A. Characterization of whiskeys using solid-phase microextraction with gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 896, p. 351-359, 2000.
- GALLIGNANI, M.; BRUNETTO, M. R. Infrared detection in flow analysis - developments and trends (review). **Talanta**, v. 64, p. 1127-1146, 2004.
- GISS, G. N.; WILKINS, C. L. Effects of lightpipe dimensions on gas chromatography/Fourier transform infrared sensitivity. **Applied Spectroscopy**, v. 38, p. 17-20, 1984.
- GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE, M. New method for quantitative essential oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 203, p. 325-335, 1981.

- GÓRECKI, T.; YU, X.; PAWLISZYN, J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. **The Analyst**, v. 124, p. 643-649, 1999.
- HAKKARAINEN, M. Developments in multiple headspace extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 229-233, 2007.
- HAN, X.; CHENG, L.; ZHANG, R.; BI, J. Extraction of safflower seed oil by supercritical CO₂. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 370-376, 2009.
- HARBORNE, J. B. Biochemical interactions between higher plants. In: Harborne, J. B. (ed.) Introduction to ecological biochemistry. 4. ed. London, Academic Press, p. 243, 1993a.
- HARBORNE, J. B. Insect feeding preferences. In: Harborne, J. B. Introduction to ecological biochemistry. 4. ed. London, Academic Press, 1993b.
- HE, Y.; LEE, H. K. Liquid-phase microextraction in a single drop of organic solvent by using a conventional microsyringe. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 4634-4640, 1997.
- HEAPS, D. A.; GRIFFITHS, P. R. Reduction of detection limits of the direct deposition GC/FT-IR interface by surface-enhanced infrared absorption. **Analytical Chemistry**, v. 77, p. 5965-5972, 2005.
- HERRERO, M.; MENDIOLA, J. A.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E. Supercritical fluid extraction: Recent advances and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 2495-2511, 2010.
- HIRAOKA, K. Development of new ionization methods for CG/MS and LC/MS interfaces. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, p. 60-78, 2005.
- HOLMES, P. Jasmine: the queen of the night. **International Journal of Aromatherapy**, v. 8, p. 8-12, 1998.
- HUIE, C. W. A review of modern sample-preparation techniques for the extraction and analysis of medicinal plants. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 373, p. 23-30, 2002.
- HWANG, B. H.; LEE, M. R. Solid-phase microextraction for organochlorine pesticide residues analysis in Chinese herbal formulations. **Journal of Chromatography A**, v. 898, p. 245-256, 2000.
- IZAKE, E. L. Chiral discrimination and enantioselective analysis of drugs: An overview. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 96, p. 1659-1676, 2007.
- JAYATILAKA, A.; POOLE, S. K.; POOLE, C. F.; CHICHILA, T. M. P. Simultaneous micro steam distillation/solvent extraction for the isolation of semivolatile flavor compounds from cinnamon and their separation by series coupled-column gas chromatography **Analytica Chimica Acta**, v. 302, p. 147-162, 1995.
- JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Solvent microextraction into a single drop. **Analytical Chemistry**, v. 68, p. 2236-2240, 1996.
- JEANNOT, M. A.; CANTWELL, F. F. Mass transfer characteristics of solvent extraction into a single drop at the tip of a syringe needle. **Analytical Chemistry**, v. 69, p. 235-239, 1997.
- JOCHMANN, M. A.; YUAN, X.; SCHILLING, B.; SCHMIDT, T. C. In-tube extraction for enrichment of volatile organic hydrocarbons from aqueous samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1179, p. 96-105, 2008.
- JOCHMANN, M. A.; YUAN, X.; SCHMIDT, T. C. Determination of volatile organic hydrocarbons in water samples by solid-phase dynamic extraction. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 387, p. 2163-2174, 2007.
- KAWAGUCHI, M.; ISHII, Y.; SAKUI, N.; OKANOUCI, N.; ITO, R.; INOUE, K.; SAITO, K.; NAKAZAWA, H. Stir bar sorptive extraction with *in situ* derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry in the multi-shot mode for determination of estrogens in river water samples. **Journal of Chromatography A**, v. 1049, p. 1-8, 2004.
- KAYKHAI, M.; RAHMANI, M. Headspace liquid phase microextraction for quantitation of hexanal in potato crisps

- by gas chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 573-578, 2007.
- KERROLA, K. Literature review: Isolation of essential oils and flavor compounds by dense carbon dioxide. **Food Reviews International**, v. 11, p. 547-573, 1995.
- KERSCH, C.; ROOSMALEN, M. J. E.; WOERLEE, G. F.; WITKAMP, G. J. Extraction of heavy metals from fly ash and sand with ligands and supercritical carbon dioxide. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 39, p. 4670-4672, 2000.
- KESZEI, S.; SIMÁNDI, B.; SZÉKELY, E.; FOGASSY, E.; SAWINSKY, J.; KEMÉNY, S. Supercritical fluid extraction: a novel method for the resolution of tetramisole. **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 10, p. 1275-1281, 1999.
- KHAJEH, M.; YAMINI, Y.; SEFIDKON, F.; BAHRAMIFAR, N. Comparison of essential oil composition of *Carum copticum* obtained by supercritical carbon dioxide extraction and hydrodistillation methods. **Food Chemistry**, v. 86, p. 587-591, 2004.
- KRECK, M.; SCHARRER, A.; BILKE, S.; MOSANDL, A. Enantioselective analysis of monoterpene compounds in essential oils by stir bar sorptive extraction (SBSE)-enantio-MDGC-MS. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 32-40, 2002.
- LAMBERT, J. P.; MULLETT, W. M.; KWONG, E.; LUBDA, D. Stir bar sorptive extraction based on restricted access material for the direct extraction of caffeine and metabolites in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, v. 1075, p. 43-49, 2005.
- LANÇAS, F. M. Extração com fluido supercrítico: Quo vadis? **Revista Analytica**, v. 2, p. 30-37, 2002.
- LEGRAND, S.; DUGAY, J.; VIAL, J. Use of solid-phase microextraction coupled with gas chromatography for the determination of residual solvents in pharmaceutical products. **Journal of Chromatography A**, v. 999, p. 195-201, 2003.
- LI, N.; DENG, C.; YIN, X.; YAO, N.; SHEN, X.; ZHANG, X. Gas chromatography-mass spectrometric analysis of hexanal and heptanal in human blood by headspace single-drop microextraction with droplet derivatization. **Analytical Biochemistry**, v. 342, p. 318-326, 2005.
- LIKENS, S. T.; NICKERSON, G. B. **ASBC Proc.** 5, 1964.
- LIN, M. C.; TSAI, M. J.; WEN, K. C. Supercritical fluid extraction of flavonoids from *Scutellariae Radix*. **Journal of Chromatography A**, v. 830, p. 387-395, 1999.
- LING, J. Y.; ZHANG, G. Y.; CUI, Z. J.; ZHANG, C. K. Supercritical fluid extraction of quinolizidine alkaloids from *Sophora flavescens* Ait. and purification by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 123-127, 2007.
- LIPINSKI, J. Automated solid phase dynamic extraction - extraction of organics using a wall coated syringe needle. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 369, p. 57-62, 2001.
- LIU, W.; WANG, H.; GUAN, Y. Preparation of stir bars for sorptive extraction using sol-gel technology. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, p. 15-22, 2004a.
- LIU, X.; PAWLISZYN, J. On-site environmental analysis by membrane extraction with a sorbent interface combined with a portable gas chromatograph system. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v. 85, p. 1189-1200, 2005.
- LIU, X.; PAWLISZYN, R.; WANG, L.; PAWLISZYN, J. On-site monitoring of biogenic emissions from *Eucalyptus dunnii* leaves using membrane extraction with sorbent interface combined with a portable gas chromatograph

system. **Analyst**, v. 129, p. 55-62, 2004b.

LOUGH, D. S.; MOLTAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1187-1189, 1992.

LOW, M. J. D.; FREEMAN, S. K. Infrared Interferometry in Flavor Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 16, p. 525-528, 1968.

LOW, M. J. D.; FREEMAN, S. K. Measurements of infrared spectra of gas-liquid chromatography fractions using multiple-scan interference spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 39, p. 194-198, 1967.

LUCCHESI, M. E.; CHEMAT, F.; SMADJA, J. Solvent-free microwave extraction of essential oil from aromatic herbs: comparison with conventional hydro-distillation. **Journal of Chromatography A**, v. 1043, p. 323-327, 2004.

LUO, Y. Z.; ADAMS, M.; PAWLISZYN, J. Aqueous sample direct extraction and analysis by membrane extraction with a sorbent interface. **Analyst**, v. 122, p. 1461-1469, 1997.

MAGNI, P.; FACCHETTI, R.; CAVAGNINO, D.; TRESTIANU, S. Proceedings of 25th International Symposium of Capillary Chromatography, 2002. In: Bicchi, C.; Brunelli, C.; Cordero, C.; Rubiolo, P. Galli, M.; Sironi, A. Direct resistively heated column gas chromatography (Ultrafast module-GC) for high-speed analysis of essential oils of differing complexities. **Journal of Chromatography A**, v. 1024, p. 195-207, 2004.

MAUL, A. A. Fluidos Supercríticos, situação atual e futuro da extração supercrítica. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**. v. 11, p. 42-46, 1999.

MAUL, A. A.; WASICKY, R.; BACCHI, E. M. Extração por fluido supercrítico **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, p. 185-200, 1996.

MCCOMB, M. E.; OLESCHUK, R. D.; GILLER, E.; GESSER, H. D. Microextraction of volatile organic compounds using the inside needle capillary adsorption trap (INCAT) device. **Talanta**, v. 44, p. 2137-2143, 1997.

MELO, L. P.; NOGUEIRA, A. M.; LANÇAS, F. M.; QUEIROZ, M. E. C. Polydimethylsiloxane/polypyrrole stir bar sorptive extraction and liquid chromatography (SBSE/LC-UV) analysis of antidepressants in plasma samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 633, p. 57-64, 2009.

MESTRES, M.; BUSTO, O.; GAUSCH, J. Analysis of organic sulfur compounds in wine aroma. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 569-581, 2000.

MEURE, L. A.; FOSTER, N. R.; DEGHANI, F. Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: A review. **The AAPS Journal**, v. 9, p. 798-809, 2008.

MORAES, M. L. L.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Supercritical fluid extraction of glycosylated flavonoids from *Passiflora* leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 257-260, 1997.

MUSSHOFF, F.; LACHENMEIER, D. W.; KROENER, L.; MADEA, B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of amphetamines and synthetic designer drugs in hair samples. **Journal of Chromatography A**, v. 958, p. 231-238, 2002.

MUSSHOFF, F.; LACHENMEIER, D. W.; KROENER, L.; MADEA, B. Automated headspace solid-phase dynamic extraction for the determination of cannabinoids in hair samples. **Forensic Science International**, v. 133, p. 32-38, 2003.

NORTON, K. L.; GRIFFITHS, P. R. Comparison of direct deposition and flow-cell gas chromatography-Fourier transform infrared spectrometry of barbiturates. **Journal of Chromatography A**, v. 703, p. 383-392, 1995.

NORTON, K. L.; HAEFNER, A. M.; MAKISHIMA, H.; JALSOVSZKY, G.; GRIFFITHS, P. R. Comparison of direct-deposition

supercritical fluid and gas chromatography/Fourier transform infrared spectra to condensed-phase library spectra. **Applied Spectroscopy**, v. 50, p. 1125-1133, 1996.

OCHIAIA, N.; SASAMOTO, K.; DAISHIMA, S.; HEIDEN, A.C.; HOFFMANN, A. Determination of stale-flavor carbonyl compounds in beer by stir bar sorptive extraction with in-situ derivatization and thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 986, p. 101-110, 2003.

OLIVEIRA, A. R. M.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA, F. J. M.; BONATO, P. S. Microextração em fase líquida (LPME): Fundamentos da técnica e aplicações na análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, p. 637-644, 2008.

PAWLISZYN, J.; ARTHUR, C. L. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E. Liquid-Liquid-Liquid Microextraction for Sample Preparation of Biological Fluids Prior to Capillary Electrophoresis. **Analytical Chemistry**, v. 71, p. 2650-2656, 1999.

PEDROSO, M. P.; GODOY, L. A. F.; FIDÉLIS, C. H. V.; FERREIRA, E. C.; POPPI, R. J.; AUGUSTO, F. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC × GC). **Química Nova**, v. 32, p. 421-430, 2009.

PENG, J.; FAN, G.; CHAI, Y.; WU, Y. Efficient new method for extraction and isolation of three flavonoids from *Patrinia villosa* Juss. by supercritical fluid extraction and high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 44-50, 2006.

PEREIRA, A. S.; NETO, F. R. A. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química Nova**, v. 23, p. 370-379, 2000.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Economic analysis of rosemary, fennel and anise essential oils obtained by supercritical fluid extraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 407-413, 2007.

PLUTOWSKA, B.; WARDENCKI, W. Application of gas chromatography-olfactometry (GC-O) in analysis and quality assessment of alcoholic beverages - A review. **Food Chemistry**, v. 107, p. 449-463, 2008.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1163, p. 2-24, 2007.

POURMORTAZAVI, S. M.; HAJIMIRSADEGHI, S. S.; KOHSARI, I.; HOSSEINI, S. G. Orthogonal array design for the optimization of supercritical carbon dioxide extraction of different metals from a solid matrix with cyanex 301 as a ligand. **Journal of Chemical & Engineering Data**, v. 49, p. 1530-1534, 2004.

PRESTI, M. L.; RAGUSA, S.; TROZZI, A.; DUGO, P.; VISINONI, F.; FAZIO, A.; DUGO, G.; MONDELLO, L. A comparison between different techniques for the isolation of rosemary essential oil. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 273-280, 2005.

RAGUNATHAN, N.; KROCK, K. A.; KLAUN, C.; SASAKI, T. A.; WILKINS, C. L. Gas chromatography with spectroscopic detectors. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 349-397, 1999.

REVERCHON, E. Supercritical fluid extraction and fractionation of essential oils and related products. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 10, p. 1-37, 1997.

RIDGWAY, K.; LALLJIE, S. P. D.; SMITH, R. M. Comparison of in-tube sorptive extraction techniques for non-polar volatile organic compounds by gas chromatography with mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1124, p. 181-186, 2006.

ROBERTS, D. D.; POLLIEN, P.; MILO, C. Solid-phase microextraction method development for headspace analysis of volatile flavor compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 2430-2437, 2000.

SAHRAOUI, N.; VIAN, M. A.; BORNARD, I.; BOUTEKEDJIRET, C.; CHEMAT, F. Improved microwave steam distillation apparatus for isolation of essential oils. Comparison with conventional steam distillation. **Journal of**

Chromatography A, v. 1210, p. 229-233, 2008.

SAITO, Y.; JINNO, K. Miniaturized sample preparation combined with liquid phase Separations. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 53-67, 2003.

SALEHI, P.; FAKHARI, A. R.; EBRAHIMI, S. N.; HEYDARI, R. Rapid essential oil screening of *Rosmarinus officinalis* L. by hydrodistillation-headspace solvent microextraction. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 280-285, 2007.

SALVADEO, P.; BOGGIA, R.; EVANGELISTI, F.; ZUNIN, P. Analysis of the volatile fraction of "Pesto Genovese" by headspace sorptive extraction (HSSE). **Food Chemistry**, v. 105, p. 1228-1235, 2007.

SANDAHL, M.; MATHIASSEN, L.; JÖNSSON, J. A. Determination of thiophanate-methyl and its metabolites at trace level in spiked natural water using the supported liquid membrane extraction and the microporous membrane liquid-liquid extraction techniques combined on-line with high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 123-131, 2000.

SANDRA, P.; SISALLI, S.; ADAO, A.; LEBEL, M.; LE FUR, I. Sorptive tape extraction - A novel sampling method for the *in vivo* study of skin, **LC-GC Europe**, v. 19, p. 33, 2006.

SANTOS, P. R. D.; MOREIRA, D. L.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. **Phytochemistry**, v. 58, p. 547-551, 2001.

SARTORATTO, A.; AUGUSTO, F. Application of headspace solid phase microextraction and Gas Chromatography to the screening of volatile compounds from some Brazilian aromatic plants. **Chromatographia**, v. 57, p. 351-356, 2003.

SASAKI, T. A.; WILKINS, C. L. Gas chromatography with Fourier transform infrared and mass spectral detection. **Journal of Chromatography A**, v. 842, p. 341-349, 1999.

SCALIA, S.; GIUFFREDA, L.; PALLADO, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 21, p. 549-558, 1999.

SCHULTZ, J. C. Biochemical ecology: How plants fight dirty. **Nature**, v. 416, p. 267, 2002.

SEGALA, A.; GÓRECKI, T.; MUSSCHE, P.; LIPS, J.; PAWLISZYN, J. Development of membrane extraction with a sorbent interface-micro gas chromatography system for field analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 873, p. 13-27, 2000.

SEQUINEL, R.; HATANAKA, R. R.; GUALTIERI, C. E.; FLUMIGNAN, D. L.; OLIVEIRA, J. E.; FILHO, J. P. Cromatografia gasosa ultrarrápida: uma visão geral sobre parâmetros, instrumentação e aplicações. **Química Nova**, v. 33, p. 2226-2232, 2010.

SHEN, G.; LEE, H. K. Headspace liquid-phase microextraction of chlorobenzenes in soil with gas chromatography-electron capture detection. **Analytical Chemistry**, v. 75, p. 98-103, 2003.

SHEN, G.; LEE, H. K. Hollow fiber-protected liquid-phase microextraction of triazine herbicides. **Analytical Chemistry**, v. 74, p. 648-654, 2002.

SHEN, Y.; JÖNSSON, J. A.; MATHIASSEN, L. On-line microporous membrane liquid-liquid extraction for sample pretreatment combined with capillary gas chromatography applied to local anaesthetics in blood plasma. **Analytical Chemistry**, v. 70, p. 946-953, 1998.

SHOJANIA, S.; MCCOMB, M. E.; OLESCHUK, R. D.; PERREAULT, H.; GESSER, H. D.; CHOW, A. Qualitative analysis of complex mixtures of VOCs using the inside needle capillary adsorption trap. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 77, p. 1716-1727, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.;

MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. UFRGS Ed., 6. ed., Florianópolis/Porto Alegre, p. 467-495, 2007.

SNEDDON, J.; MASURAM, S.; RICHERT, J. C. Gas chromatography-mass spectrometry – Basic principles, instrumentation and selected applications for detection of organic compounds. **Analytical Letters**, v. 40, p. 1003-1012, 2007.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTÍNEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R. Sampling volatile compounds from natural products with headspace/solid-phase micro-extraction. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 235-242, 2007.

TAN, B. C. D.; MARRIOTT, P. J.; LEE, H. K.; MORRISON, P. D. In-tube solid phase micro-extraction-gas chromatography of volatile compounds in aqueous solution. **The Analyst**, v. 124, p. 651-655, 1999.

TEIXEIRA, S.; MENDES, A.; ALVES, A.; SANTOS, L. Simultaneous-distillation-extraction of high-value volatile compounds from *Cistus ladanifer* L. **Analytica Chimica Acta**, v. 584, p. 439-446, 2007.

THEIS, A. L.; WALDACK, A. J.; HANSEN, S. M.; JEANNOT, M. A. Headspace solvent microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 73, p. 5651-5654, 2001.

THOLL, D.; BOLAND, W.; HANSEL, A.; LORETO, F.; RÖSE, U. S. R.; SCHNITZLER, J. P. Practical approaches to plant volatile analysis. **The Plant Journal**, v. 45, p. 540-560, 2006.

TIENPONT, B.; DAVID, F.; BICCHI, C.; SANDRA, P. High capacity headspace sorptive extraction. **Journal of Microcolumn Separations**, v. 12, p. 577-584, 2000.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v. 23, p. 523-530, 2000.

VAS, G.; VÉKEY, K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 233-254, 2004.

VEJA, P. J.; BALABAN, M. O.; SIMS, C. A.; O'KEEFE, S. F.; CORNELL, J. A. Supercritical carbon dioxide extraction efficiency for carotenes from carrots by RSM. **Journal of Food Science**, v. 61, p. 757-759, 1996.

VERDONK, J. C.; RIC DE VOS, C. H.; VERHOEVEN, H. A.; HARING, M. A.; VAN TUNEN, A. J.; SCHUURINK, R. C. Regulation of floral scent production in petunia revealed by targeted metabolomics. **Phytochemistry**, v. 62, p. 997-1008, 2003.

VITENBERG, A. G. Equilibrium model in the description of gas extraction and headspace analysis. **Journal of Analytical Chemistry**, v. 58, p. 2-15, 2003.

WANG, L.; LORD, H.; MOREHEAD, R.; DORMAN, F.; PAWLISZYN, J. Sampling and monitoring of biogenic emissions by eucalyptus leaves using membrane extraction with sorbent interface (MESI). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6281-6286, 2002.

WANG, Z.; DING, L.; LI, T.; ZHOU, X.; WANG, L.; ZHANG, H.; LIU, L.; LI, Y.; LIU, Z.; WANG, H.; ZENG, H.; HE, H. Improved solvent-free microwave extraction of essential oil from dried *Cuminum cyminum* L. and *Zanthoxylum bungeanum* Maxim. **Journal of Chromatography A**, v. 1102, p. 11-17, 2006.

WARDENCKI, W.; CURYLO, J.; NAMIECENIK, J. Trends in solventless sample preparation techniques for environmental analysis. **Journal of Biochemical and Biophysical Methods**, v. 70, p. 275-288, 2007.

WARDENCKI, W.; MICHULEC, M.; CURYLO, J. A review of theoretical and practical aspects of solid-phase microextraction in food analysis. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 39, p. 703-717, 2004.

WIHLBORG, R.; PIPPITT, D.; MARSILI, R. Headspace sorptive extraction and GC-TOFMS for the identification of

- volatile fungal metabolites. **Journal of Microbiological Methods**, v. 75, p. 244-250, 2008.
- WOODFORD, F. P.; VAN GENT, C. M. Gas-liquid chromatography of fatty acid methyl esters: the "carbon-number" as a parameter for comparison of columns. *Journal of Lipid Research*, v. 1, p. 188-190, 1960.
- XIAO, Q.; YU, C.; XING, J.; HU, B. Comparison of headspace and direct single-drop microextraction and headspace solid-phase microextraction for the measurement of volatile sulfur compounds in beer and beverage by gas chromatography with flame photometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1125, p. 133-137, 2006.
- XU, L.; BASHEER, C.; LEE, H. K. Developments in single-drop microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, p. 184-192, 2007.
- YANG, M. J.; HARMS, S.; LUO, Y.; PAWLISZYN, J. Membrane extraction with a sorbent interface for capillary gas chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 66, p. 1339-1346, 1994.
- YANG, X.; PEPPARD, T. Solid-phase microextraction for flavor analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 42, p. 1925-1930, 1994.
- ZABARAS, D.; WILLIE, G. Rearrangement of p-menthane terpenes by Carboxen during HS-SPME. **Journal of Separation Science**, v. 25, p. 685-690, 2002.
- ZANCAN, K. C.; MARQUES, M. O. M.; PETENATE, A. J.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin with CO₂ and co-solvents: a study of the antioxidant action of the extracts. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 24, p. 57-76, 2002.
- ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Headspace solid phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 65, p. 1843-1852, 1993.
- ZHU, L.; EE, K. H.; ZHAO, L.; LEE, H. K. Analysis of phenoxy herbicides in bovine milk by means of liquid-liquid-liquid microextraction with a hollow-fiber membrane. **Journal of Chromatography A**, v. 963, p. 335-343, 2002.
- ZHU, X.; CAI, J.; YANG, J.; SU, Q.; GAO, Y. Films coated with molecular imprinted polymers for the selective stir bar sorption extraction of monocrotophos. **Journal of Chromatography A**, v. 1131, p. 37-44, 2006.

PROCESSOS DE OBTENÇÃO DE EXTRATOS E SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS

Camila Gambini Pereira

1 INTRODUÇÃO

O interesse dos consumidores por uma vida saudável por meio do uso de alimentos enriquecidos e produtos naturais tem crescido mundialmente. Muito tem se falado a respeito dos alimentos funcionais e nutracêuticos. Seja para reduzir o risco a doenças, seja para prevenir a ideia em se consumir esses produtos que está vinculada ao consumo de substâncias benéficas a saúde. Hoje já se sabe que uma alimentação saudável, rica em alimentos funcionais e nutracêuticos, possui um papel fundamental no fortalecimento do sistema imunológico, na promoção da saúde e na prevenção de doenças. De fato, existe uma série de termos utilizados para alimentos e produtos naturais com ação benéfica sobre o organismo. Kwak & Jukes



(2001) fazem uma extensa discussão sobre os diversos termos hoje utilizados e como eles se relacionam. A Figura 1 apresenta a intersecção entre alguns desses termos. Embora não tenham incluído nessa representação, os autores explicam que os nutracêuticos englobariam alimentos ou partes de alimentos que são consumidos para fins específicos e atuam na prevenção do tratamento de doenças. Independente da terminologia utilizada, no que diz respeito à atividade, a ação que um alimento funcional ou nutracêutico exerce sobre o organismo é resultado da existência de uma determinada substância ou grupo de substâncias bioativas presentes nesses produtos. O consumo de frutas/verduras e peixes, aconselhado por muitos nutricionistas, é baseado no fato desses alimentos serem ricos em substâncias funcionais, como vitaminas e ácidos graxos, respectivamente.

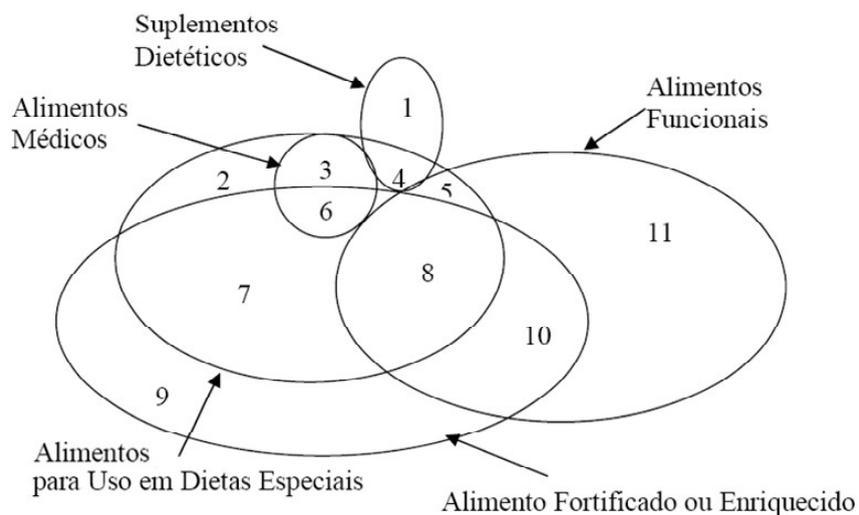


FIGURA 1 | Classificação de alimentos ou suplementos com função bioativa (adaptado de KWAK & JUKES, 2001, com permissão).

Substâncias bioativas são encontradas em diversas matrizes vegetais como raízes, sementes, folhas, caule, flores, frutos. A importância desses produtos está não somente no uso *in natura*, mas também na sua aplicação como base para a formulação de novos produtos alimentícios, cosméticos ou medicinais. O gengibre, por exemplo, pode ser consumido *in natura*, utilizado como chá, ou ainda, devido a sua ação bactericida, atuar como insumo para fabricação de produtos farmacêuticos ou cosméticos. A indústria vem investindo muito nesse setor. Diferentes produtos têm sido criados e apoiados pelo aumento da procura por alimentos saudáveis por parte da população. Suplementos alimentares, alimentos fortificados ou enriquecidos são utilizados para complementar a dieta com a finalidade de se ampliar o consumo de uma determinada substância ativa no organismo.

O que se sabe é que as atividades funcionais encontradas nos produtos naturais advêm das diversas classes de substâncias como óleos essenciais, flavonoides, carotenoides, alcaloides, dentre outros. Em se tratando de alimentos funcionais, especial atenção tem sido dada àqueles constituídos por componentes

antioxidantes, pois atuam na manutenção e prevenção de um organismo saudável. Estudos têm demonstrado que essa ação é decorrente a presença de substâncias fenólicas, consideradas um dos principais grupos antioxidantes naturais. Por outro lado, das diversas classes de substâncias, os alcaloides e os terpenos se destacam por serem as classes químicas com maiores potencialidades de fornecer substâncias com atividade farmacológica. Depois desses, seguem as lignanas, flavonoides, cumarinas, esteroides, dentre outros (DI STASI, 1996).

Devido ao elevado valor que essas substâncias possuem, não somente pela ação, mas por serem pivô de muitas indústrias do setor, investimentos têm sido feito para se adquirir essas substâncias de forma mais criteriosa e produtiva possível. A extração dessas substâncias pode ser realizada por diversos processos de separação. A escolha correta é o ponto de partida para o sucesso na obtenção do produto desejado. Dependendo da substância ou classe de substâncias, matéria-prima utilizada e aplicação final, a escolha do processo pode não ser uma tarefa fácil. Quando se trata de extração, a etapa de fracionamento ou purificação deve ser considerada. Essas etapas adicionais muitas vezes são demoradas e dispendiosas, no entanto tudo vai depender do extrato original obtido e do extrato final ou substância a ser almejada. O Capítulo 17 deste livro, por exemplo, tratará somente sobre os procedimentos de obtenção, análise e aplicação de substâncias voláteis, já o Capítulo 19 versará sobre o emprego de ESI (*Eletron Spray Ionisation*- Ionização por Eletro *spray*) na análise de alcaloides. No entanto, embora haja uma especificidade no que diz respeito ao objeto a ser obtido, detalhes entre os diferentes processos de extração de substâncias a partir de matrizes vegetais podem ser definidos.

O intuito desse capítulo é abordar as diferentes técnicas para a obtenção de extratos e substâncias bioativas em termos de aspectos fundamentais, metodologia operacional, especificidades e principais aplicações. Neste capítulo, focaremos nos processos de extração sólido-líquido, como destilação por arraste a vapor, extração com solvente a baixa pressão, extração com fluidos supercríticos, extração por micro-ondas e extração por ultrassom.

CONSIDERAÇÕES GERAIS DE PROCESSO

O princípio base do processo de extração sólido-líquido é a dissolução preferencial de uma ou mais substâncias de uma matriz sólida (produto natural) em um solvente líquido. A escolha do solvente é baseada nos fatores inerentes ao processo como solubilidade do constituinte no solvente, estabilidade, toxicidade, disponibilidade, viscosidade, reatividade, tensão superficial e custo do solvente. Muitas substâncias bioativas extraídas de produtos naturais são utilizadas como insumo para produção de alimentos. Nesse sentido, cuidados maiores devem ser tomados na escolha do solvente. Para obtenção de substâncias bioativas a FDA (Food and Drug Administration¹) faz recomendações com relação aos diversos solventes aplicados na indústria de alimentos. Para tal, a fundação classifica os diversos solventes em 3 classes: Classe 1: solventes extremamente tóxicos, não aceito no processo; como benzeno, tetracloreto de carbono, 1,2-dicloroetano, 1,1-dicloroetano, 1,1,1-tricloroetano; Classe 2: solventes de considerável toxicidade, seu uso é permitido em casos e condições específicas (limite de concentração variando de 50 a 3880 ppm, dependendo do solvente utilizado), como acetonitrila, clorofórmio, hexano, metanol, tolueno, etilmetilcetona, diclorometano; Classe 3: solventes aceitos, permitindo-se uma pequena porcentagem residual do solvente no produto final, como acetona, etanol, acetato de etila, 1-propanol, 2-propanol, acetato propílico.

Além da escolha do solvente, outros fatores devem ser considerados, como tamanho da partícula, teor de umidade, temperatura empregada no processo, natureza da matéria-prima (localização da coleta, idade e parte da planta utilizada), porosidade do leito e localização do constituinte bioativo na matriz (intracelular, extracelular, compartimentos celulares específicos, entre outros). Esses fatores interferem diretamente no perfil do extrato obtido e rendimento do processo.

PROCESSOS DE EXTRAÇÃO

DESTILAÇÃO POR ARRASTE A VAPOR

Destilação é uma operação unitária utilizada para separar os componentes de uma mistura de líquidos, ou ainda, separar líquidos de sólidos. O processo pode se apresentar em diversas conformações e tipos, sendo os mais comuns: destilação simples, destilação fracionada, destilação extrativa, destilação a vácuo e destilação por arraste a vapor, sendo esse último o mais empregado para obter óleos voláteis.

Destilação por arraste a vapor e hidrodestilação são métodos de extração baseados no poder de volatilização dos constituintes, por esse motivo são aplicados para extração de substâncias voláteis. A diferença básica entre esses dois processos é que na destilação por arraste a vapor, o vapor passa através da matriz e as substâncias voláteis se difundem através da corrente de vapor. Já na hidrodestilação a matéria-prima é imersa na água que evapora juntamente com as substâncias voláteis. No entanto, o contato direto da água quente com a planta por longo período de tempo pode degradar substâncias termossensíveis e ainda promover a hidrólise parcial de algumas substâncias (MATEUS *et al.*, 2006; CERPA *et al.*, 2010).

A destilação por arraste a vapor permite destilar substâncias termicamente sensíveis, imiscíveis com a água, a temperaturas reduzidas. Misturas imiscíveis não se comportam como soluções, e a destilação dessas misturas é feita de forma diferenciada. O princípio da destilação por arraste a vapor baseia-se no fato de que a pressão total de vapor de uma mistura de líquidos imiscíveis é igual à soma da pressão de vapor dos componentes puros individuais (Lei de Dalton). Para dois líquidos imiscíveis A e B:

$$P = P_A^{vap} + P_B^{vap}$$

onde P_A^{vap} e P_B^{vap} são as pressões de vapor dos componentes A e B puros, respectivamente.

Vale ressaltar que, para mistura de substâncias miscíveis, esse comportamento é diferente, pois a pressão total de vapor é a soma das pressões parciais dos componentes, ou seja, para uma mistura ideal, que segue a Lei de Raoult:

$$P = x_A P_A^{vap} + x_B P_B^{vap}$$

onde $x_A P_A^{vap}$ e $x_B P_B^{vap}$ são as pressões parciais dos componentes A e B, respectivamente na mistura.

Na destilação por arraste a vapor, se a água e a fase orgânica são consideradas imiscíveis, pela Lei de Dalton, tem-se que, a constituição de uma fase contendo água líquida, separada da fase orgânica, reduz o ponto de ebulição da mistura, isto é, a mistura apresentará um ponto de bolha em uma temperatura menor do que os pontos de ebulição dos componentes puros individuais. Normalmente, na destilação por arraste a vapor, o processo ocorre à pressão atmosférica. Assim, a separação do componente de ponto de ebulição mais alto ocorrerá a uma temperatura inferior a temperatura de bolha da água (100 °C).

Industrialmente, a destilação por arraste a vapor é mais empregada devido à maior economia e simplicidade, pois é possível trabalhar com grande quantidade de material de uma única batelada. O vapor, gerado por uma caldeira, permeia a matriz vegetal presente no extrator e o material obtido (vapor + substâncias voláteis) se condensa no condensador e, por fim, ocorre a separação em um decantador. O vapor pode ainda ser superaquecido a pressões moderadas. Quando se trata de óleos voláteis, em especial, o vaso decantador é denominado Florentino, a representação do processo é dada pela Figura 2. Em escala laboratorial, a hidrodestilação é o método mais empregado para obtenção de óleos voláteis, apresentando um papel importante como pré-avaliação do processo industrial (GUENTER, 1948, STEFFENS, 2010).

Devido à simplicidade de operação e baixo custo, essas técnicas são muito utilizadas para obtenção de substâncias bioativas voláteis.

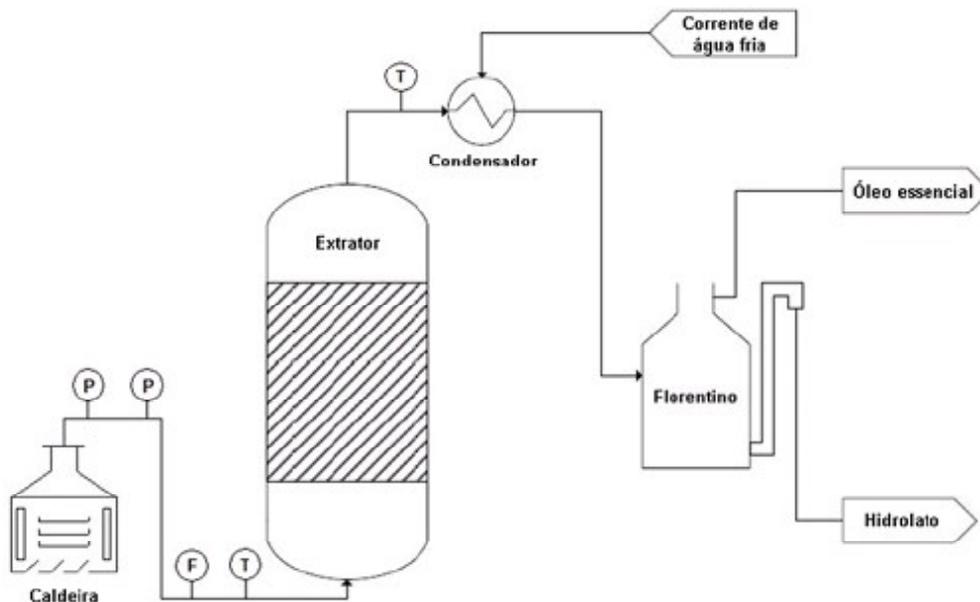


FIGURA 2 | Representação de um destilador por arraste a vapor aplicado a destilação de óleos voláteis (STEFFENS, 2010).

EXTRAÇÃO COM SOLVENTE A BAIXA PRESSÃO

A extração com solvente a baixa pressão é a técnica mais empregada para obtenção de substâncias bioativas de baixa volatilidade de matrizes naturais. Ela se baseia no princípio de solubilização de substâncias pela passagem do solvente líquido pela matriz. Esse processo pode ser realizado a baixas ou elevadas temperaturas.

Normalmente, solventes orgânicos como hexano e etanol são mais utilizados. A água também é empregada em alguns casos, como na extração da cafeína de café e chás. No entanto, a água possui baixa seletividade, ou seja, dissolve muitas outras substâncias além do soluto desejado, tornando muitas vezes necessário realizar etapas posteriores para separação dessas substâncias indesejáveis.

Na indústria, diversos equipamentos com conformações diferentes (horizontais e verticais) são encontrados para a extração com solventes a baixa pressão. O princípio da extração é o mesmo. O solvente flui através da matriz (co-corrente, contracorrente ou corrente-cruzada, conforme Figura 3), solubiliza as substâncias extraíveis, obtendo-se então um extrato rico em substâncias solúveis. O processo pode ser realizado ainda em batelada, ou seja, mantido em contato com o solvente ao longo de certo tempo pré-determinado. Nesse formato, o tempo de extração é um fator decisivo quando para a escolha do processo a ser empregado em uma escala industrial. Em alguns casos, o equipamento comporta agitadores, que promovem a movimentação do fluido e da matriz, permitindo maior contato e maior taxa de transferência de constituintes da matriz vegetal para o solvente.

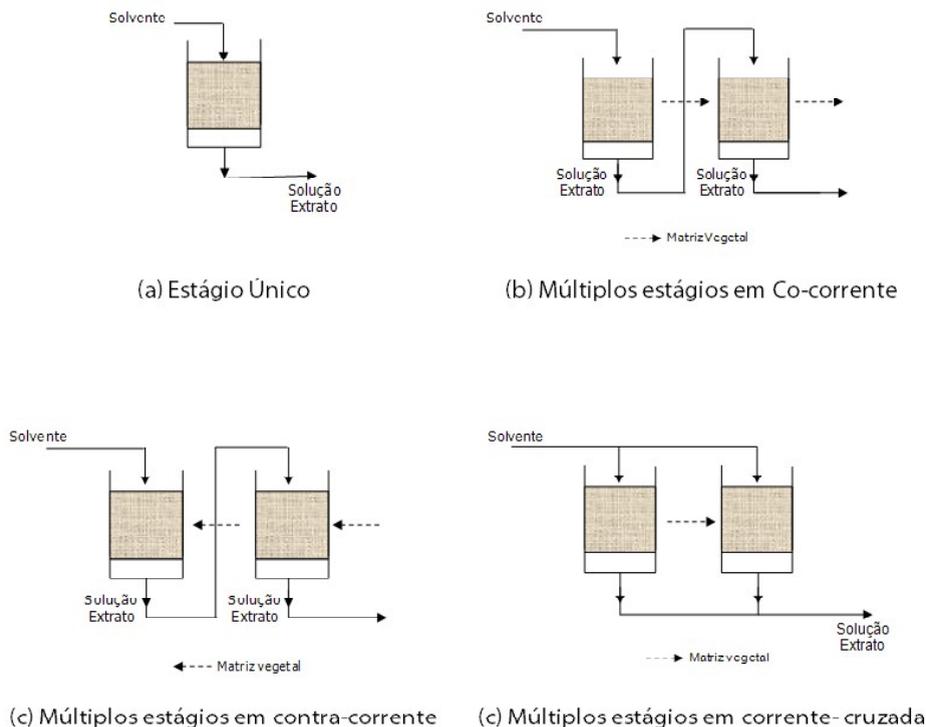


FIGURA 3 | Desenho esquemático dos tipos de passagem de solvente em um processo de extração a baixas pressões.

A aplicação de temperaturas mais elevadas nos processos de extração com solvente orgânico é comum, uma vez que, geralmente, o aumento da temperatura proporciona uma elevação na taxa de extração devido ao aumento da solubilidade do soluto no solvente. No entanto, o uso de temperatura elevada não é recomendável para extrair substâncias termossensíveis, como é o caso dos carotenoides.

Nos processos de extração com solvente a baixa pressão, a escolha do solvente é o ponto principal que define a eficiência do processo. Como citado anteriormente, a seleção deve levar em conta a sua estabilidade, toxicidade, disponibilidade, viscosidade, dentre outros pontos. Assim, a escolha certa do solvente irá determinar a qualidade do extrato obtido. Dependendo da substância desejável, muitas vezes se faz necessário o uso de uma bateria de solventes. Na extração de flavonoides, por exemplo, geralmente utilizam-se solventes com polaridade crescente, partindo do solvente menos polar para o de maior polaridade. Solventes apolares são utilizados, inicialmente, por removerem os óleos, gorduras, esteróis e pigmentos, facilitando a extração dos flavonoides. Em seguida, empregam-se solventes de polaridade intermediária (clorofórmio, diclorometano, acetato de etila ou éter etílico) para extrair agliconas livres pouco polares, como flavonas, flavonóis flavononas, isoflavonas e outras agliconas com alto grau de metilação. Aumentando-se ainda mais a polaridade (metanol, acetona e água) é possível obter as agliconas poli-hidroxiladas, auronas e chalconas. Por último, utiliza-se água quente para retirar os heterosídeos mais polares, tais como flavonodióis, catequinas, poliglicosídeos e os açúcares (SIMÕES *et al.*, 2006). Assim, dependendo da substância, a escolha do ou dos solventes vai requerer maior atenção. A Tabela 1 apresenta as propriedades físicas dos solventes orgânicos mais utilizados na extração de substâncias bioativas, com exemplos de aplicação.

EXTRAÇÃO COM FLUIDOS SUPERCRÍTICOS

O princípio de extração com fluido supercrítico (SFE- *Supercritical Fluid Extraction*) é similar ao da extração com solvente a baixa pressão. A diferença está no uso de um solvente que se encontra no seu estado supercrítico. O ponto crítico, representado na Figura 4 pelas condições críticas P_c , T_c , é a condição máxima na qual se consegue realizar a mudança de fase líquido-vapor de um determinado componente. Acima desse ponto, ou seja, em condições de temperatura e pressão acima do ponto crítico, o fluido encontra-se no estado supercrítico. A passagem para o estado supercrítico pode ser visualizada quando, ao se aumentar a pressão e temperatura do sistema, a interface que separa as fases desaparece (Figura 5).

O fluido nessas condições apresenta propriedades que são similares à de gases (como difusividade) e similares a de líquidos (como densidade), veja Tabela 2. Essa característica faz com que o fluido tenha um comportamento desejável para extração, isto é, altos valores de densidade do fluido supercrítico atribuem ao solvente um elevado poder de solubilização, enquanto baixos valores de viscosidade combinados com altos valores de difusividade promovem um elevado poder de penetração, o que gera altas taxas de transferência de massa.

O uso da tecnologia em processos de extração teve grande repercussão nos anos 80. Desde então, muitos estudos tem sido realizados a fim de mostrar a aplicabilidade dessa tecnologia para obtenção de substâncias bioativas. A indústria tem utilizado essa tecnologia para obter substâncias com alto valor agregado como cafeína, lúpulo, aromas e corantes, ácidos graxos, dentre outras substâncias bioativas (TAYLOR, 1996).

TABELA 1 - Principais características de solventes orgânicos e aquosos utilizados na extração de substâncias bioativas (adaptado de SIMÕES *et al*, 2003).

Solvente	Massa Molecular	Ponto de Ebulição (°C)	Exemplo de Aplicação
<i>n</i> -Hexano	86,17	68,7	Lipídios, ceras, pigmentos furanocumarinas
Tolueno	92,14	110,6	Bases livres de alcaloides, antraquinonas livres, óleos voláteis, glicosídeos cardiotônicos
Diclorometano	84,94	39,9	
Clorofórmio	119,38	61,2	
Acetato de etila	88,11	77,1	Flavonoides, cumarinas
<i>n</i> -Butanol	74,12	117,7	
Etanol	46,09	78,3	Heterosídeos em geral
Metanol	32,04	64,5	
Acetato de etila	72,12	34,5	Agliconas, ceras, saponinas, iridoides e sesquiterpenos
Misturas hidroalcoólicas	-	-	Saponinas Taninos
Água	18,01	100	
Água acidificada	-	-	Alcaloides
Água alcalinizada	-	-	Saponinas

TABELA 2 - Propriedades físicas associadas a diferentes estados físicos (RIZVI *et al*, 1986).

Estado	Densidade 10 ³ (kg/m ³)	Difusividade 10 ⁴ (m ² /s)	Viscosidade (kg/m,s)
Gás			
P= 1 bar, T= 15-30 °C	(0,6-0,2) 10 ⁻³	0,1-0,4	(1-3) 10 ⁻⁵
Supercrítico			
Pc, Tc	0,2-0,5	0,7 10 ⁻³	(1-3) 10 ⁻⁵
4Pc, Tc	0,4-0,9	0,2 10 ⁻³	(3-9) 10 ⁻⁵
Líquido			
P= 1 bar, T= 15-30 °C	0,6-1,6	(0,2-2) 10 ⁻⁵	(0,2-3) 10 ⁻³

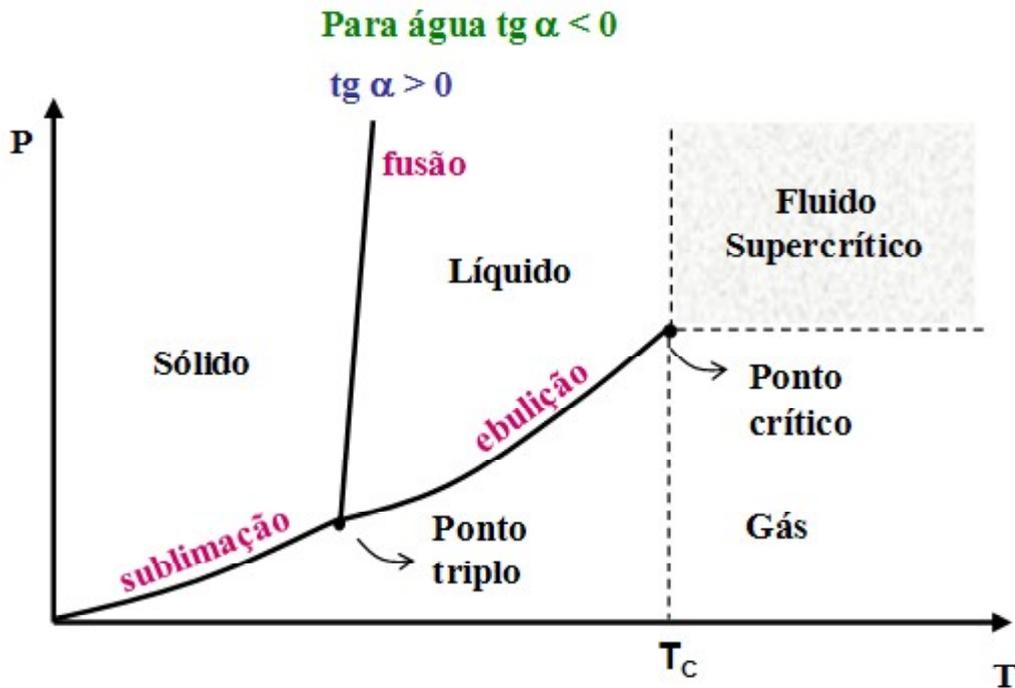
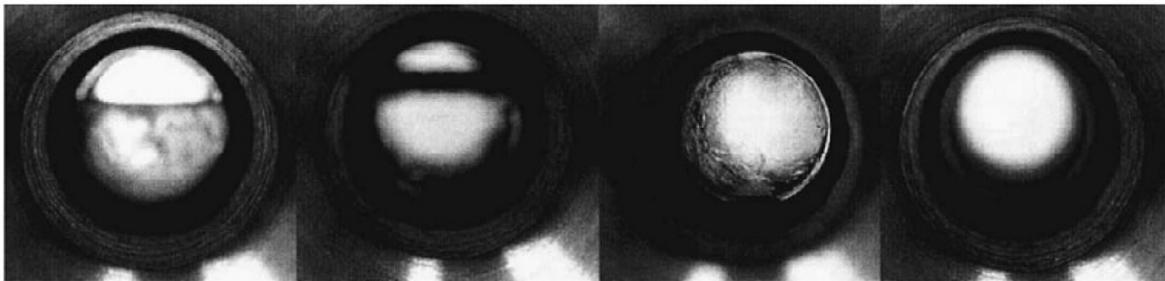


FIGURA 4 | Diagrama de fases pressão *versus* temperatura de uma substância pura.



a) $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 80\text{ bar}$

b) $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 126\text{ bar}$

c) $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 137\text{ bar}$

d) $T = 40\text{ }^\circ\text{C}$, $P = 139\text{ bar}$

FIGURA 5 | Desaparecimento da Interface das fases gás-líquido para o sistema oleato de metila- CO_2 (FANG *et al.*, 2004, com permissão).

A grande vantagem dessa tecnologia advém da facilidade em se alterar o poder de solvatação do solvente por mudanças nas condições operacionais, como temperatura e pressão. Assim, a solubilidade de um componente pode ser melhorada por meio do ajuste das condições operacionais. A Figura 6 apresenta uma representação da solubilidade de um soluto em solvente supercrítico em função da variação da temperatura e pressão. Essa particularidade do solvente no estado supercrítico propicia uma maior seletividade do solvente, além de facilitar a sua retirada do produto ao final do processo.

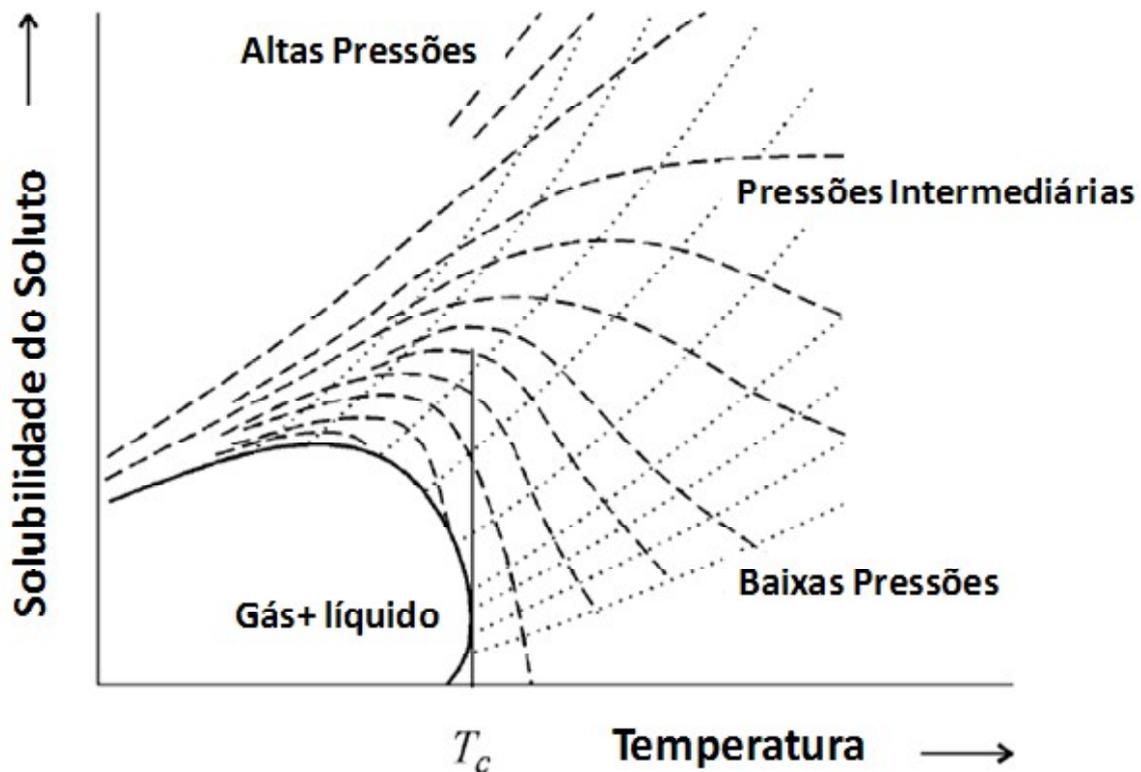


FIGURA 6 | Comportamento da solubilidade de um soluto em função da temperatura e pressão (adaptado de BRUNNER, 2005, com permissão).

O processo consiste na passagem do solvente supercrítico por uma coluna contendo o material vegetal nas condições de temperatura e pressão pré-estabelecidas. O extrato ao sair da coluna de extração passa por um processo de expansão que pode ser realizado em um ou mais separadores (para processos de fracionamento) ou diretamente em condições ambientes. Ao final do processo, o extrato é recuperado a baixas pressões e, nestas condições, o solvente se separa facilmente do extrato, podendo ainda ser reutilizado no processo. Esse procedimento de extração é apresentado na Figura 7.

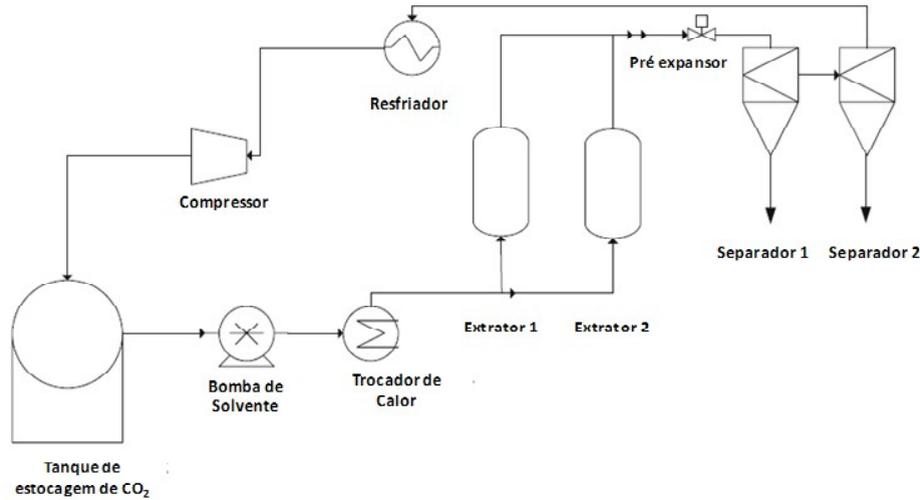


FIGURA 7 | Fluxograma do processo de extração com Fluido Supercrítico (adaptado de PEREIRA & MEIRELES, 2009, com permissão).

Diversos solventes podem ser utilizados como fluido supercrítico. A Tabela 3 apresenta as propriedades críticas de alguns solventes. Dentre esses diversos solventes, o mais empregado é o dióxido de carbono (CO₂) devido a sua atoxicidade, inodoro, não inflamável, alta volatilidade, alta difusividade, baixa viscosidade, apolaridade e custo relativamente baixo.

TABELA 3 - Propriedades críticas de substâncias puras.

Solvente	Temperatura crítica (K)	Pressão crítica (bar)	Volume crítico (cm ³ /mol)
CO ₂	304,1	73,7	94,1
Etileno	282,3	50,4	131,0
Xenon	290,1	58,0	118,0
Eter Dimetílico	400,1	52,7	171,0
Etano	305,3	48,7	145,5
Propano	369,8	42,5	200,0
Amônia	405,4	113,5	72,5
<i>n</i> -Hexano	507,5	30,2	368,0
Metanol	512,6	80,9	118,0
Água	647,1	220,6	55,9

O CO₂ supercrítico é um ótimo solvente para extrair substâncias apolares e de baixa polaridade, no entanto, quando se trata de extrair substâncias mais polares, como flavonoides, seu poder de extração é reduzido. Para contornar esse fato, normalmente faz-se o uso de um cossolvente, ou modificador, que altera a polaridade do solvente supercrítico. Dessa forma, o uso de cossolvente amplia a faixa de aplicação de fluidos supercríticos por permitir o aumento no espectro de substâncias extraídas. Pelo menos 17 cossolventes têm sido utilizados em estudos com fluido supercrítico para obtenção de substâncias a partir de produtos naturais. De todos esses modificadores, o metanol é o solvente polar mais utilizado. Acredita-se que elevada porcentagem de metanol (MeOH) pode romper o vínculo soluto-matriz sólida obtenção de substâncias bioativas. No entanto, quando se trata de obtenção de produtos para fins alimentícios, devido a sua elevada toxicidade, o metanol tem sido descartado. Etanol (EtOH) é outra boa escolha por possuir baixa toxicidade. De um modo geral, em produtos naturais, os solventes mais utilizados como modificadores são: etanol, isopropanol, metanol, água e mistura dessas substâncias (LANG & WAI, 2001).

Sabemos que os produtos naturais são fonte de substâncias bioativas das mais diferentes classes: substâncias voláteis, carotenoides, flavonoides, alcaloides, esteroides, entre outros. A extração das diferentes classes por SFE é possível graças à flexibilidade operacional desse processo. Isso porque mudanças na temperatura e pressão provocam mudanças na densidade do solvente supercrítico, e essa mudança altera seu poder de solvatação, ou seja, é possível extrair substâncias mais leves ou mais pesadas, dependendo da densidade do solvente supercrítico conseguida naquela dada temperatura e pressão. Nesse sentido, é possível extrair substâncias de interesse de diferentes classes, desde substâncias voláteis até lipofílicas, desde que se ajustem as condições ideais de temperatura e pressão no processo de SFE. Substâncias mais voláteis, por exemplo, são extraídas em condições mais amenas, com temperatura variando entre 30 e 50 °C e pressões que variam de 80 a 250 bar (SIMÁNDI *et al.*, 1998; FRANCISCO *et al.*, 2001; RODRIGUES *et al.*, 2003; BRAGA *et al.*, 2005; KOTNIK *et al.*, 2007).

Os carotenoides são outra classe de substâncias de grande importância por sua aplicação em termos de pigmentação (amarelo a vermelho púrpura) e bioatividade (precursor da vitamina A, ação antioxidante, ação sobre o sistema cardiovascular). Normalmente, essas substâncias são extraídas com solvente orgânico. No entanto, devido a sensibilidade à luz e calor e instabilidade, podem facilmente sofrer oxidação ou isomerização. A extração com fluidos supercríticos é normalmente realizada em condições intermediárias, com temperaturas até 40 °C – 50 °C, e pressão até 500 bar.

Substâncias fenólicas, por sua vez, possuem estruturas que podem ser simples ou bem complexas, o que pode facilitar ou não a sua solubilidade no solvente empregado. Nesses casos, é comum o emprego de cossolvente. Substâncias fenólicas têm sido extraídas em condições intermediárias, com pressão entre 200 e 400 bar, e temperaturas que variam de 35 a 60 °C, com uso de etanol como cossolvente (0-25%) (CHIU *et al.*, 2002; GOLI *et al.*, 2005; PEREIRA *et al.*, 2008a; PIANTINO *et al.*, 2008).

Substâncias mais lipofílicas também podem ser extraídas com CO₂ supercrítico, como vitaminas, tocoferóis e tocotrienóis (DE LUCAS *et al.*, 2002; MENDES *et al.*, 2002; GUÇLU-USTUNDAG & TEMELLI, 2004). De um modo geral, observa-se que a solubilidade de uma determinada substância em um fluido supercrítico diminui com o aumento da massa molecular do soluto. Por exemplo, a solubilidade do ácido mirístico

(MM=228,38 g/gmol) em CO₂ supercrítico é maior que as solubilidades dos ácidos palmítico (MM=256,43 g/gmol) e oleico (MM=282,47g/gmol) (GUÇLU-USTUNDAG & TEMELLI, 2000).

Muitas vezes em uma mesma matriz vegetal existe mais de uma substância/classe de substâncias de interesse. Devido à facilidade em se alterar as condições operacionais, é possível ainda obter separadamente as diversas classes de substâncias em um mesmo processo com fluidos supercríticos. Essa peculiaridade é possível ser realizada em um mesmo equipamento, com alteração das condições operacionais ao longo do processo, ou com uso de mais de uma coluna operando em condições distintas. Esse tipo de processo é denominado extração fracionada. A mudança nas condições de temperatura e pressão altera a densidade do solvente supercrítico e assim seu poder de solvatação. Por exemplo, Braga (2005) extraiu óleos voláteis e curcuminoides de *Curcuma longa* L. realizando o processo de extração em duas etapas. Na primeira etapa, o processo ocorreu a 35 °C e 225 bar sem uso de cossolvente, em um segundo momento, utilizou-se uma mistura de etanol+isopropanol (1:1; volume:volume) como cossolventes (50%) a 30 °C, 300 bar. Desde que as substâncias de interesse sejam os curcuminoides, na primeira etapa do processo ocorreu a remoção das substâncias voláteis, permitindo assim que os curcuminoides pudessem ser recuperados com elevada pureza no segundo estágio.

Comparativamente, estudos têm mostrado que a extração com fluidos supercríticos é uma excelente alternativa aos métodos convencionais. Além de ser considerado uma tecnologia limpa, pelo fato de não se verificar resíduo de solvente no extrato final quando se aplica CO₂ supercrítico, o processo de extração com fluidos supercríticos apresenta menor gasto energético quando comparado aos processos convencionais. Além disso, por empregar temperaturas mais amenas, esse processo é indicado para extrair substâncias termolábeis. No entanto, o custo fixo inicial do equipamento é mais elevado, o que inibe a aplicação do processo em empresas de menor porte. Essa tecnologia é recomendada para obtenção de substâncias com elevado valor agregado, indicado para indústrias que processam produtos naturais para obtenção de substâncias bioativas com alto grau de pureza.

Diante disso, pesquisas com uso da tecnologia supercrítica crescem a cada ano e tem reforçado e demonstrado a viabilidade técnica na obtenção dessas substâncias. Martinez (2008), recentemente, discutiu informações importantes sobre a aplicação dessa tecnologia na obtenção de substâncias bioativas e nutracêuticos em seu livro "Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds". Pereira & Meireles (2009) apresentaram uma extensa revisão da literatura, apresentando dados específicos na extração de cada grupo de substâncias (óleos essenciais, substâncias fenólicas, carotenoides, tocoferóis e tocotrienóis), elucidando também aspectos importantes do processo como solubilidade, extração/fracionamento e análise de custo do processo.

Neste cenário, observa-se que essa tecnologia, embora, aparentemente, considerada de "elevado custo", por causa do custo do equipamento e não por causa do processo em si, apresenta reais condições de ser empregada para a obtenção de substâncias sensíveis com bioatividade e de alto valor agregado. O que de fato tem sido comprovado pelo aumento de unidades industriais que fazem uso dessa tecnologia como base do processo: nos últimos 20 anos cerca de 100 colunas de extração de 100 L foram instaladas na Europa, EUA, Japão e países do Sudeste Asiático (BRUNNER, 2005).

EXTRAÇÃO POR MICRO-ONDAS

Um método novo empregado para obtenção de substâncias bioativas é a extração por micro-ondas. Diferente dos processos de extração sólido-líquido (seja a baixa ou a alta pressão), a extração por micro-ondas ocorre devido às modificações nas estruturas celulares induzidas pelo efeito das ondas eletromagnéticas.

As micro-ondas são ondas eletromagnéticas de energia não ionizada com frequência de 0,3 a 300 GHz. O princípio do processo de extração é diferente dos métodos anteriormente citados. Neste, a energia das micro-ondas que incide sobre o material sólido penetra nesse e interage com moléculas polares, gerando calor. O aquecimento interno do material provoca a ruptura da estrutura celular, permitindo a exposição dos constituintes ao solvente. O resultado é o contato maior do solvente com os sólidos e a maior taxa de transferência de massa do material para o solvente.

Neste processo não é indicado utilizar o material totalmente seco. Na verdade, a presença de água no material sólido é essencial para acontecer a extração, pois a absorção da energia é feita, principalmente, pela água que está presente no material sólido.

O uso dessa tecnologia ainda é muito recente, no entanto importantes resultados têm sido demonstrados. A Tabela 4 apresenta alguns casos de aplicação dessa tecnologia para obtenção de substâncias bioativas.

EXTRAÇÃO POR ULTRASSOM

Assim como na extração por micro-ondas, a extração por ultrassom ocorre devido a modificações nas estruturas celulares, no entanto, nesse caso ao invés de ondas eletromagnéticas, aqui se aplica o ultrassom.

As ondas de ultrassom são vibrações mecânicas com frequências maiores de 20 kHz. A diferença entre ultrassom e ondas eletromagnéticas, além da faixa de frequência aplicada, é que a transferência de energia pelas ondas de ultrassom só é possível se houver material para essa se propagar, no entanto, para as ondas eletromagnéticas, a transferência de energia pode ser feita também no vácuo.

O princípio de extração é baseado nos ciclos de compressão e expansão que o material sofre pelo efeito do ultrassom. Os ciclos promovem a formação de bolhas de líquido que, devido ao seu crescimento ao longo dos ciclos, entram em colapso provocando a quebra da parede celular. Como resultado, o solvente permeia mais facilmente no sistema aumentando a taxa de transferência de massa entre o material sólido e o solvente.

Assim como a tecnologia de extração com micro-ondas, esse método ainda é muito recente, no entanto têm-se verificado importantes avanços na obtenção de substâncias com atividades funcionais, como pode ser observado na Tabela 4.

Diante do exposto, temos uma variedade de processos de extração que podem ser utilizados para a obtenção de substâncias bioativas. A escolha do processo vai depender das condições da indústria e/ou do produto final desejado.

TABELA 4 - Exemplos de aplicação de extração por micro-ondas e ultrassom na obtenção de substâncias bioativas.

Processo	Aplicação		Principal característica	Ref
	Espécie vegetal	Classe de Bioativos		
Microondas	<i>Curcuma longa</i> L.	Oleos essenciais	Solvente: água Potência: 200, 400, 700 W tempo= 2-10 min	1
	<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Oleos essenciais	Solvente: água Potência: 200, 400, 700 W tempo= 1-6 min	2
	<i>Camellia sinensis</i> (L.) Kuntze	Polifenóis e cafeína	Solvente: água/etanol(1:1) Potência: 700 W tempo= 4 min	3
	<i>Artemisia annua</i> L.	Artemisinina	Solvente: etanol, triclorometano, ciclohexano, <i>n</i> -hexano, éter de petróleo, Potência : 650W tempo=2-18 min	4
	<i>Vitis vinifera</i> L.	Substâncias fenólicos	Solvente: 90% metanol, Potência : n.i. tempo= 20 min	5
Ultrassom				
	<i>Laurus nobilis</i> L. <i>Rosmarinus officinalis</i> L. <i>Thymus vulgaris</i> L. <i>Origanum majorana</i> L. <i>Polianthes tuberosa</i> L.	Oleos essenciais	Solvente: água <i>f</i> = 20 kHz, tempo= 10 min	6
	<i>Citrus reticulata</i> Blanco	Bioflavonoide	Solvente: metanol, isopropanol, etanol <i>f</i> = 20-60-100 kHz, tempo= 20-160 min	7
	<i>Sophora japonica</i> L.	Rutina	Solvente: água, metanol <i>f</i> = 20 kHz tempo= 30 min	8
	<i>Nothapodytes foetida</i> (Wight) Sleumer	Alcaloides	Solvente: methanol (90%) <i>f</i> = 33 kHz tempo= 15, 30, 60 min	9
	<i>Salvia officinalis</i> L.	polissacarídeos	Solvente: etanol <i>f</i> = 20 kHz tempo: 120 min	10

1- Deng *et al.* (2006), 2- Alfaro *et al.* (2003), 3- Pan *et al.* (2003), 4- Hao *et al.* (2002), 5- Liazid *et al.* (2007), 6- Gutierrez *et al.* (2008), 7- Ma *et al.* (2008), 8- Paniwnyk *et al.* (2001), 9- Fulzele *et al.* (2005), 10- Hromadkova *et al.* (1999).

AGRADECIMENTO

A autora agradece o apoio do INCT_if e do CNPq para o desenvolvimento desse trabalho.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALFARO, M.J., BELANGERA, J.M.R., PADILLA, F.C., PARE, J.R.J. Influence of solvent, matrix dielectric properties, and applied power on the liquid-phase microwave-assisted processes (MAP) extraction of ginger (*Zingiber officinale*). **Food Research International**, v.36, p. 499–504, 2003.
- BRAGA, M.E.M. Obtenção de compostos bioativos de *Curcuma longa* L. e *Lippia alba* M. por tecnologia supercrítica: rendimento global, cinética de extração, composição química e aproveitamento do resíduo amiláceo. 2005. 232p. Tese (Doutorado), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo.
- BRAGA, M.E.M.; EHLERT, P.A.D.; MING, L.C.; MEIRELES, M.A.A. Supercritical fluid extraction from *Lippia alba*: global yields, kinetic data, and extract chemical composition. **Journal of Supercritical Fluids**, v.34, p.149-156, 2005.
- BRUNNER, G. **Gas Extraction: An Introduction to Fundamentals of Supercritical Fluids and The Application to Separation Process**, Steinkopff Darmstadt, New York, Springer, 1994, v.4, 387p.
- BRUNNER, G. Supercritical fluids: technology and application to food processing. **Journal of Food Engineering**, v.67, p.21–33, 2005.
- CERPA, M.G., MATO, R.B., COCERO, M.J.M CERIANI, R., MEIRELLES, A.J.A., PRADO, J.M., LEAL, P.F., TAKEUCHI, T.M., MEIRELES, M.A.A. Steam Distillation Applied to Food Industry. In: Meireles, M.A.A. (Org). **Extracting Bioactive compounds for Food Products**. CRC Press, Taylor Francis, 2009, 2-74.
- CHIU, K.L.; CHENG, Y.C.; CHEN, J.H.; CHANG, C.J.; YANG, P.W. Supercritical fluids extraction of Ginkgo ginkgolides and flavonoids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.24, p.77-87, 2002.
- DE LUCAS, A.; GRACIA, I.; RINCON, J.; GARCIA, M.T. Solubility determination and Model prediction of Olive Husk oil in supercritical carbon dioxide and co-solvents. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v.46, p.5061-5066, 2007.
- DENG, C., JI, N., LI, YINGJIA, J., GENGLI, D., XIANGMIN, Z. Fast determination of curcumol, curdione and germacrone in three species of *Curcuma* rhizomes by microwave-assisted extraction followed by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1117, p.115-120, 2006.
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência- um guia de estudo interdisciplinar**, Ed Unesp, 1996, 230p.
- FANG, T.; GOTO, M., YUN, Z.; DING, X.; HIROSE, T. Phase equilibria for binary systems of methyl oleate–supercritical CO₂ and α -tocopherol–supercritical CO₂. **Journal of Supercritical Fluids**, v.30, p.1–16, 2004.
- FRANCISCO, J.C.; JARVENPAA, E.P.; HUOPALAHTI, R.; SIVIK, B. Comparison of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. Oils from Mozambique as Obtained by Hydrodistillation and Supercritical Carbon Dioxide Extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2339-2342, 2001.
- FULZELE, D.P., SATDIVE, R.K. Comparison of techniques for the extraction of the anti-cancer drug camptothecin from *Nothapodytes foetida*. **Journal of Chromatography A**, v.1063, p.9–13, 2005.
- GOLI, A.H.; BARZEGAR, M.; SAHARI, M.A. Antioxidant activity and total phenolic compounds of pistachio (*Pistachia*

- vera) hull extracts. **Food Chemistry**, v92, p.521-525, 2005.
- GUÇLU-USTUNDA, O.; TEMELLI, F. Correlating the Solubility Behavior of Fatty Acids, Mono-, Di-, and Triglycerides, and Fatty Acid Esters in Supercritical Carbon Dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v.39, p.4756-4766, 2000.
- GUÇLU-USTUNDA, O.; TEMELLI, F. Correlating the solubility behavior of minor lipid components in supercritical carbon dioxide. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.31, n.3, p.235-253, 2004.
- GUÇLU-USTUNDAG, O.; TEMELLI, F.. Correlating the solubility behavior of fatty acids, mono-, di-, and triglycerides, and fatty acid esters in supercritical carbon dioxide. **Industrial and Engineering Chemical Research**, v.39, p. 4756-4766, 2000.
- GUENTER, E. **The essential oils. Vol 1: History - Origin in Plants - Production – Analysis**, D.Van Nostrand Company Inc., 1948, 457p.
- GUTIERREZ, J.M. R., JIMENEZ, J.R., LUQUE DE CASTRO, M.D. Ultrasound-assisted dynamic extraction of valuable compounds from aromatic plants and flowers as compared with steam distillation and superheated liquid extraction. **Talanta**, v.75, p.1369-1375, 2008.
- HAO, J., HAN, W., HUANG, S., XUE, B., DENG, X. Microwave-assisted extraction of artemisinin from *Artemisia annua* L. **Separation and Purification Technology**, v. 28, p.191-196, 2002.
- HROMADKOVA, Z., A. EBRINGEROVÁ, AND P. VALACHOVIC. Comparison of classical and ultrasound-assisted extraction of polysaccharides from *Salvia officinalis* L. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.5, p.163-168, 1999.
- KOTNIK, P.; SKERGET, M.; KNEZ, K. Supercritical fluid extraction of chamomile flower heads: Comparison with conventional extraction, kinetics and scale-up. **The Journal of Supercritical Fluids**, v.43, p.192-198, 2007.
- KWAK, N; JUKES, D.J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. **Food Control**, v12, p. 109-117, 2001.
- LANG, Q.; WAI, C.M. Supercritical Fluid extraction in herbal and natural product studies- practical review. **Talanta**, v.53, p.771-782, 2001.
- LIAZID, A., M. PALMA, J. BRIGUI, BARROSO, C.G. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, v.1140, p. 29-34, 2007.
- MA, Y., YE, X., HAO, Y., XU, G., XU, G., LIU, D. Ultrasound-assisted extraction of hesperidin from Penggan (*Citrus reticulata*) peel. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.15, p.227-232, 2008.
- MARTINEZ, J.L., **Supercritical Fluid Extraction of Nutraceuticals and Bioactive Compounds**, CRC Press, 2008, 402p.
- MATEUS, E. M., LOPES, C., NOGUEIRA, T., LOURENÇO, J.A.A., CURTO, M.J.M.. Pilot Steam Distillation of Rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) from Portugal. **Silva Lusitana**, v 14, p. 203 - 217, 2006.
- MENDES, M.F.; PESSOA, F.L.P.; ULLER, A.M.C. An economic evaluation based on an experimental study of the vitamin E concentration present in deodorizer distillate of soybean oil using supercritical CO₂. **The Journal of Supercritical Fluids**, v23, n3, p.257-265, 2002.
- PAN, X., NIU, G., LIU, H. Microwave-assisted extraction of tea polyphenols and tea caffeine from green tea leaves. **Chemical Engineering and Processing** v.42, p.129-133, 2003.
- PANIWNYK, L., BEAUFOY, E., LORIMER, J.P., MASON, T.J. The extraction of rutin from flower buds of *Sophora japonica*. **Ultrasonics Sonochemistry**, v.8, p.299-301, 2001.
- PEREIRA, C.G., MEIRELES, M.A.A., Supercritical Fluid Extraction of Bioactive Compounds: Fundamentals, Applications and Economic Perspectives. **Food Bioprocess and Technology**, v., n.3, p.340-372, 2009.
- PEREIRA, C.G.; GUALTIERI, I.P.; MEIRELES, M.A.A. Effect of Different Extraction Processes on the Recovery of

Extracts from *Achyrocline satureioides* D.C.: An Evaluation of Antioxidant Activity. **Separation Science and Technology**, v43, p.1549-1563, 2008a.

PIANTINO, C.R.; AQUINO, F.W.B.; FOLLEGATTI-ROMERO, L.A.; CABRAL, F.A. Supercritical CO₂ extraction of phenolic compounds from *Baccharis dracunculifolia*. **The Journal of Supercritical Fluids**, v47, n2, p.209-214, 2008.

QUISPE-CONDORI, S. Determinação de parâmetros de processo nas diferentes etapas do processo de extração supercrítica de produtos naturais: Artemisia annua, Cordia verbenacea, Ocimum selloi e Foeniculum vulgare. 2005. 239p. Tese (Doutorado)- Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade de Campinas, Campinas, São Paulo.

RIZVI, S.S.H.; DANIELS, J.A.; BENADO, A.L.; ZOLLWEG, J.A. Supercritical Fluid Extraction: operating principles and food applications. **Food Technology**, v.40, n.7, p.57-64, 1986.

RODRIGUES, V.M.; ROSA, P.T.V.; MARQUES, M.O.M.; PETENATE, A.J.; MEIRELES M.A.A. Supercritical Extraction of Essential Oil from Aniseed (*Pimpinella anisum* L) Using CO₂: Solubility, Kinetics, and Composition Data. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.1518-1523, 2003.

SIMÁNDI, B.; OSZAGYÁN, M.; LEMBERKOVICS, E.; KÉRY, A.; KASZÁCS, J.; THYRION, F.; MÁTYÁS, T. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. **Food Research International**, v.31, p.723-728, 1998.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; AULER MENTZ, J.C.P.M.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1. ed, Ed.Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999, 821p.

STEFFENS, A.H. **Estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por destilação por arraste a vapor em escala laboratorial e industrial**. 2010, 68p. Dissertação (Mestrado)- Programa de Pós Graduação em Engenharia e Tecnologia de Materiais (Faculdade de Engenharia, Faculdade de Física, Faculdade de Química) Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

TAYLOR, L.T. **Supercritical Fluid Extraction**. John Wiley & Sons Inc., Canada, 1996, 180p.(Footnotes)

¹ U.S. Food and Drug Administration. Guidance for Industry, 2003. <http://www.fda.gov/cder/guidance>

MÉTODOS *IN SILICO* PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS: FUNDAMENTOS, METODOLOGIAS E APLICAÇÕES EM PRODUTOS NATURAIS E METABOLÔMICA

Fernando Batista da Costa
Marcus Tullius Scotti

INTRODUÇÃO

A elucidação estrutural de substâncias é uma atividade muito antiga e tem sua origem registrada no século XVIII, época em que o homem ainda nem possuía o devido conhecimento teórico sobre estrutura molecular. Desde então, as estratégias empregadas por um especialista para elucidar a estrutura de uma substância desconhecida pouco mudaram, pois elas envolvem fundamentos básicos em que são geradas e testadas hipóteses com o intuito de se chegar à solução de um problema. Entretanto, de lá para cá houve um enorme avanço nas etapas aquisição, processamento e manipulação de dados espectrais, incluindo o desenvolvimento de espectrômetros e *softwares*. Recentemente, com a



enorme quantidade de dados gerados, continuamente, que necessitam ser processados aliado à necessidade de otimizar tempo, os computadores se tornaram indispensáveis para auxiliar o homem nas diferentes etapas desse processo. Do simples desenho de uma estrutura química até a sua elucidação estrutural automatizada, passando-se pelo seu armazenamento e busca em bancos de dados, geração de propriedades estruturais, além da visualização e manipulação de espectros, os programas de computador hoje são vitais, seja para a academia ou para as empresas.

No âmbito da elucidação estrutural de substâncias orgânicas, a química de produtos naturais é, sem dúvida, a área da Ciência que mais contribuiu para grandes avanços. Sua contribuição é enorme, chegando a causar impacto até na quantidade e qualidade dos dados espectrais de ressonância magnética nuclear (RMN) que são publicados em periódicos especializados, por exemplo, quando estes são comparados àqueles oriundos de outras áreas, tais como a síntese orgânica ou a química de compostos heterocíclicos (ROBIEN, 2009). A principal explicação que pode ser dada para todo esse avanço é a elevada diversidade e complexidade estrutural das substâncias isoladas de matrizes biológicas como plantas, microrganismos e organismos marinhos. O processo de desreplicação de tais matrizes e a consequente determinação estrutural das substâncias presentes em misturas têm se tornado ainda mais urgentes com o advento dos estudos de metaboloma. Tal fato pode ser justificado pelo próprio objetivo da metabolômica, que não é apenas realizar uma acurada detecção de estruturas químicas em várias matrizes biológicas. Na verdade, o que se almeja é analisar os dados obtidos por meio dos métodos analíticos com intuito de extrair a informação neles contida para, finalmente, se poder efetuar a determinação estrutural e estudar sua variação em sistemas biológicos (DUNN *et al.*, 2005; van der KOOY *et al.*, 2009).

Nesse contexto é que a aplicação de métodos *in silico* para elucidação de substâncias passa a ser importante e ganha enorme espaço, pois pode auxiliar em cada uma das diferentes etapas de todo o processo. Esses métodos envolvem o uso de algoritmos, métodos estatísticos e de Inteligência Artificial (IA) que são desenvolvidos e incorporados em sistemas, aplicativos e programas de computador que auxiliam o usuário a elucidar estruturas químicas (STEFANI *et al.*, 2007). Como consequência, o estudo e a aplicação de métodos estatísticos, quimiométricos e de quimioinformática para essa finalidade estão em ascensão. Cabe ressaltar a evolução da elucidação estrutural de substâncias auxiliada por computador propriamente dita, tradução do termo em inglês *Computer-Aided Structure Elucidation* (CASE), que trata do processo de determinação da estrutura química de uma substância desconhecida com base em seus dados espectroscópicos experimentais e no conhecimento prévio de suas propriedades, empregando-se, exclusivamente, programas de computador (STEINBECK, 2004; ELYASBERG *et al.*, 2010).

O objetivo deste capítulo é, portanto, por meio de exemplos e com uma linguagem acessível, mostrar ao leitor interessado na área de Química de Produtos Naturais e de outras correlatas, tais como da Ecologia Química, Síntese Orgânica e Ciências Farmacêuticas, como as diferentes ferramentas *in silico* podem efetivamente auxiliar na elucidação de substâncias de origem natural. Alguns conceitos, fundamentos básicos e modalidades de elucidação estrutural automatizada serão discutidos, incluindo-se a descrição sobre o funcionamento dos algoritmos mais comuns e a capacidade de alguns programas de computador auxiliarem na elucidação de estruturas de substâncias naturais e em estudos de metaboloma. Na opinião dos autores, esse texto é, portanto, uma das raras contribuições na língua portuguesa para esse setor importante da informação química aplicada a produtos naturais e áreas correlatas.

HISTÓRICO

O primeiro projeto de elucidação estrutural automatizada foi o DENDRAL, baseado no nome *DENDRitic ALgorithm* (LINDSAY *et al.*, 1980). Esse projeto, iniciado a partir de 1965 na Universidade de Standford, EUA, partiu do desenvolvimento de algoritmos para tratamento de dados de espectrômetros de massas. O programa funcionava com a estratégia clássica denominada “planejar-montar-testar” e, durante o projeto, foram sendo adicionados diversos algoritmos e outros dados espectroscópicos, como RMN-¹³C, com o objetivo de aumentar a capacidade de elucidação. Em todos os casos o sistema confrontava os dados do espectro-problema com o banco de dados que contém uma significativa lista de fragmentos compatíveis com o espectro e a fórmula molecular obtidos da espectrometria de massas. A partir dessa etapa, era necessária a intervenção do usuário que deveria informar quais grupos funcionais e/ou subestruturas estavam presentes ou ausentes.

A partir dessa experiência, foram gerados outros sistemas como o CONGEN (*CON*nectivity *GEN*erator) e o GENOA (*GEN*eration with *Overlapping Atoms*) (MASINTER *et al.*, 1974; CARHART *et al.*, 1981). Outro *software*, mais recente e avançado que o DENDRAL, mas ainda pioneiro, é o DARC/EPIOS (*Direct Access Radar Channel/Elucidation by Progressive Intersection of Ordered Substructures*) (DUBOIS & SOBEL, 1985). Como era um sistema especialista clássico de determinação estrutural, assim como o DENDRAL, também possuía um banco de dados de fragmentos estruturais. Porém, esses fragmentos eram baseados em um átomo de carbono central ligado aos seus respectivos vizinhos contendo a descrição de deslocamentos químicos, sendo que estas subestruturas, conhecidas como ELCOs (*Environment Limited and Concentric Ordered*) (DUBOIS *et al.*, 1984), eram capazes de descrever diversos ambientes químicos. O DARC/EPIOS necessitava de uma menor intervenção do usuário para a determinação da estrutura-problema por possuir um algoritmo mais eficiente que o do DENDRAL.

O sistema especialista PAIRS (*Program for the Analysis of IR Spectra*), desenvolvido por Woodruff & Smith (1980), era capaz de analisar espectros no infravermelho (IV) de modo semelhante a um espectroscopista. Em 1994, Chalmers e colaboradores usaram uma abordagem automatizada de interpretação da transformada de Fourier para espectros de Raman de polímeros complexos (CLAYBOURHN *et al.*, 1994). O sistema EXPIRS é outro sistema desenvolvido para análise de espectros no IV (ANDREEV *et al.*, 1993), que organiza, hierarquicamente, grupos característicos que são reconhecidos pelos picos detectados. Plamen *et al.* (2000) desenvolveram um sistema computacional que realiza buscas em bancos de dados espectrais, classificando espectros no IV com a ajuda de análise linear discriminante, redes neurais artificiais e o método dos *k-vizinhos mais próximos* (*k-Nearest Neighbors* – kNN).

Um programa que era baseado em um banco de dados de RMN-¹³C de estruturas completas foi desenvolvido por Munk *et al.* (1996). Nesse programa, o usuário informa os dados experimentais de RMN-¹³C e o número mínimo de sinais e de soluções que devem apresentar. Com as informações fornecidas pelo usuário, o sistema especialista faz uma busca dos dados no banco, filtrando aqueles compatíveis, os quais, com o número mínimo de sinais requeridos, são novamente filtrados, excluindo as estruturas duplicadas.

Outros programas foram desenvolvidos, tais como o ASSEMBLE, SESAMI e HOUDINI (SHELLEY & MUNK, 1982; MADISON *et al.*, 1998; KORYTKO *et al.*, 2003). O ASSEMBLE se diferenciou dos demais por não possuir um banco de dados e por não trabalhar com dados espectrométricos, sendo então pouco útil, pois, inicialmente, apenas gerava todos os isômeros possíveis a partir da fórmula molecular, tendo um aumento exponencial de estruturas possíveis e alto custo computacional com o aumento do número de átomos. Portanto, a ele foram adicionadas opções de fragmentos que o usuário indicava como sendo possíveis de haver na estrutura ou que deveriam estar ausentes (SHELLEY & MUNK, 1982). O SESAMI, (*Systematic Elucidation of Structure Applying*

Machine Intelligence) (Madison *et al.*, 1998; Korytko *et al.*, 2003), também do mesmo grupo de pesquisa, possui um gerador que trabalha primeiro procurando todos os centros quirais possíveis na molécula, em conjunto com as restrições impostas pelo usuário. Seu algoritmo é baseado em tabelas que correlacionam estruturas com características de um espectro. Atualmente, esse sistema é denominado de HOUDINI, o qual também utiliza dados de RMN bidimensionais (2D) (KORYTKO *et al.*, 2003).

Todos os programas CASE descritos até aqui são capazes de gerar estruturas químicas através da montagem de átomos e/ou fragmentos de moléculas. Porém, outra estratégia é baseada na geração de estruturas através da remoção de ligações de uma hiperestrutura que, inicialmente, contém todas as possíveis ligações entre todos os átomos e fragmentos moleculares necessários. *Softwares* baseados nesse conceito são o COCOA (*Constrained COmbination of ACFs*, onde ACFs são *Atom-Centered Fragments*) (BANGOV, 1990) e o GEN (BOHANEK & ZUPAN, 1991).

Como foi descrito anteriormente, mais recentemente foi desenvolvido o sistema HOUDINI a partir do SESAMI, os quais utilizam dados de RMN mono e bidimensionais juntamente com a fórmula molecular da estrutura desconhecida (MADISON & MUNK, 2003). Assim como o COCOA e o GEN, o HOUDINI envolve primeiro a criação de uma hiperestrutura com todas as ligações possíveis entre seus átomos e, a partir deste ponto, as ligações excedentes são removidas de acordo com as valências atômicas e correlações bidimensionais, restando poucas estruturas compatíveis com os dados experimentais.

O sistema CSEARCH (*Carbon NMR, Spectral Database, Environment, Sophisticated Algorithms, Reliable Results, Clever Implementation, Highly Interactive*), desenvolvido por Kalchhauser & Robien (1985), é baseado no sistema de procura desenvolvido pelo grupo de Munk (SHELLEY & MUNK, 1982), porém com a adição de algumas melhorias, como por exemplo o código HOSE (*Hierarchical Ordered Spherical Description of Environment*, BREMSER, 1978), o qual será descrito com maiores detalhes na seção Metodologias, Técnicas Computacionais e Algoritmos. O programa realiza a predição de deslocamentos químicos de RMN-¹³C e buscas por grupos funcionais e similaridade de espectros, sendo também capaz de quebrar as estruturas encontradas em fragmentos de até três átomos, combinando-os depois a outras estruturas. O CSEARCH será abordado em detalhes na seção denominada Banco de Dados.

O sistema CHEMICS (*Combined Handling of Elucidation Methods for Interpretable Chemical Structures*) (KUDO & SASAKI, 1976; SASAKI & KUDO, 1985), desenvolvido por um grupo de pesquisadores japoneses, também utiliza algoritmos semelhantes aos usados pelo DENDRAL e DARC/EPIOS e é capaz de tratar dados de RMN bidimensionais para descartar fragmentos inválidos durante a geração estrutural. O ACCESS é outro sistema desenvolvido que combina um gerador estrutural com a busca de biblioteca de espectros (BREMSER & FACHINGER, 1985).

É possível observar com esses exemplos que o desenvolvimento de programas para auxílio na elucidação estrutural de substâncias não é uma atividade recente e atualmente existem várias modalidades, desde os simples simuladores aos sistemas CASE completos envolvendo geradores estruturais, o que será abordado nas seções seguintes.

FUNDAMENTOS BÁSICOS E ESTRATÉGIAS DA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS EMPREGANDO MÉTODOS *IN SILICO*

FUNDAMENTOS BÁSICOS DA REPRESENTAÇÃO DE ESTRUTURAS QUÍMICAS NO COMPUTADOR

Antes de discutir sobre as estratégias e modalidades de elucidação estrutural de substâncias orgânicas através de métodos *in silico* e os programas disponíveis, é importante considerar a representação de estruturas químicas no computador. Tomando-se como exemplo a predição de propriedades moleculares através de algoritmos de aprendizado, pode-se afirmar que uma boa predição começa com a boa qualidade da estrutura química que é apresentada a um dado programa. Surge então uma pergunta básica: como apresentar uma estrutura química a um computador de modo que ele consiga interpretá-la? Em outras palavras, como o computador consegue “enxergar”, por exemplo, a efedrina, substância natural isolada de espécies vegetais do gênero *Ephedra*L.? Embora a estrutura química seja a linguagem natural dos químicos, o mesmo não se aplica aos computadores, os quais trabalham com uma outra linguagem, a dos *bits* e *bytes* (Figura 1). Portanto, foi necessário o homem desenvolver modelos para que as estruturas químicas pudessem ser representadas e entendidas pelos programas de computador.



FIGURA 1 | Computadores não conseguem imaginar como é a molécula da efedrina sem que ela lhes seja devidamente representada.

No passado, foram iniciados os primeiros estudos para representar a informação química, inicialmente em textos de livros e mais tarde em periódicos. Em outras palavras, através dos tempos foi necessário

desenvolver métodos adequados para que uma dada substância química fosse, adequadamente, representada e entendida, primeiro no papel e depois na forma eletrônica. No caso das substâncias orgânicas, inicialmente elas receberam nomes para caracterizá-las. Em seguida, foram atribuídas fórmulas e nomes sistemáticos, chegando-se então às representações mais complexas envolvendo átomos, ligações químicas, geometria e estereoquímica (ENGEL, 2003). Com o aumento vertiginoso da quantidade de dados disponíveis em química e a massificação do uso de computadores, em especial nas últimas duas décadas, surgiram vários programas para desenhar, editar, visualizar e compartilhar estruturas químicas em duas ou três dimensões (2D e 3D), bem como possibilitar seu armazenamento e consulta em bancos de dados. Porém, como essa informação é processada? Qual sua influência na qualidade da predição de propriedades, por exemplo, os deslocamentos químicos de RMN?

Hoje em dia, é bastante comum desenhar e armazenar estruturas de substâncias orgânicas em programas de computador, os chamados editores de moléculas, sejam eles proprietários, gratuitos (*freeware*), de código aberto (*open source*) e de acesso livre ou público (*open access*), estejam eles instalados em um único computador (*standalone*), disponíveis em rede, *online* em páginas da internet ou como *applets*. O modo gráfico à disposição do usuário (interface gráfica do usuário – *Graphical User Interface* ou GUI) para desenhar estruturas, com poucas exceções, é basicamente o mesmo na maioria dos programas. Entretanto, para armazená-las, os proprietários possuem os seus próprios formatos: por exemplo, o ChemDraw da empresa *CambridgeSoft* possui o formato *.cdx*, o ChemSketch da *ACD/Labs* possui o formato *ISIS sketch Extension.sk2* e o sucessor do ISIS/Draw, o Symyx Draw da *Accelrys/Symyx*, possui o formato *.skc*, todos eles capazes de armazenar estruturas 2D. No caso de estruturas 3D, o HyperChem da *Hypercube Inc.* opera com o formato *.hin* e o Spartan da *Wavefunction, Inc.* com o *.spartan*, porém as estruturas 3D também podem ser armazenadas em formato *.pdb* (*Protein Data Bank*), o qual pode ser lido por quase todos os programas adequados a essa finalidade.

Não serão discutidos aqui os detalhes sobre os diferentes formatos de cada programa, com exceção de dois deles, que já não são mais proprietários: o formato *.mol* da MDL e o *.smi* (SMILES) da *Daylight*. Esses formatos são muito importantes, porque podem ser lidos e compartilhados pela grande maioria dos editores de estruturas e também pelos programas mais avançados de informação química. Funcionam como uma espécie de “moeda de troca” para informação de estruturas químicas e são o formato de escolha dos programas *open access* e *freeware*, englobando os de edição de espectros e de elucidação estrutural. Além disso, utilizando-se programas específicos, a partir desses formatos podem ser obtidas coordenadas em 3D e realizadas rotinas de modelagem com as estruturas.

O formato Mol da MDL, ou arquivo Mol (*Molfile*), é um dos poucos que é amplamente aceito pela comunidade mundial para o armazenamento e troca de informações de estruturas químicas e reações. Foi descrito nos anos 1980 por Dalby e colaboradores que trabalhavam na empresa *Molecular Design Limited* (MDL), tendo sido inicialmente criado para os próprios programas desenvolvidos pela MDL (DALBY *et al.*, 1992). Entretanto, tornou-se o padrão de várias outras empresas, inclusive para o armazenamento e troca de propriedades moleculares. Um arquivo Mol descreve uma única estrutura molecular e é composto por fragmentos ou blocos. Outro formato bastante similar, denominado arquivo SD (*SDfile*), pode descrever várias estruturas em um único arquivo, sendo o mais conveniente para manipular um conjunto delas, especialmente para a transferência de informação entre bancos de dados ou desses para ferramentas de análise de dados. Um arquivo Mol tem como origem uma tabela de conexão, que por sua vez origina-se da teoria dos grafos e matrizes, que são notações matemáticas muito estudadas para a representação de estruturas químicas (ENGEL, 2003). A tabela de conexão tem sido a principal forma de representar estruturas químicas desde os anos

1980. Basicamente, envolve uma lista (ou bloco) de átomos e outra contendo suas ligações químicas. Essas listas ou blocos estão, adequadamente, dispostos em um arquivo que os converte em uma estrutura química na GUI dos editores moleculares. Ao se abrir um arquivo Mol em um editor de textos comum, podem ser visualizados valores numéricos e símbolos atômicos em uma arquitetura subdividida em quatro blocos. Os dois maiores – o bloco de átomos, na parte superior, e o de ligações, na parte inferior – compõem a base de uma tabela de conexão, como é mostrado na figura 2, referente ao arquivo Mol da estrutura 2D da efedrina.

```

ACD/Lab#04140912452D

12 12 0 0 1 0 0 0 0 0 1 V2000
17.7779 -4.6630 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
17.7768 -5.4904 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
18.4916 -5.9033 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
19.2080 -5.4899 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
19.2052 -4.6594 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
18.4898 -4.2503 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
19.9169 -4.2422 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
20.6294 -4.6547 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
21.3419 -4.2381 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
19.9127 -3.4172 0.0000 O 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
20.6252 -5.4797 0.0000 N 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
21.3377 -5.8922 0.0000 C 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0

6 1 1 0 0 0 0
1 2 2 0 0 0 0
5 7 1 0 0 0 0
3 4 2 0 0 0 0
7 8 1 0 0 0 0
8 9 1 0 0 0 0
4 5 1 0 0 0 0
7 10 1 1 0 0 0
2 3 1 0 0 0 0
8 11 1 6 0 0 0

M END

```

FIGURA 2 | Arquivo Mol da estrutura 2D da efedrina aberto com um editor de textos.

O SMILES da *Daylight* foi criado por David Weininger em 1986, para o processamento de dados químicos (ENGEL, 2003). Na verdade, o SMILES é uma “notação química” em linha usada para representar estruturas e reações e que gera arquivos em formato .smiles ou .smi. Seu nome vem de *Simplified Molecular Input Line Entry Specification*, o que revela sua principal característica, ou seja, uma representação molecular simplificada e compacta, além de ser flexível, fácil de compreender e de caráter universal, independente do *software* e da arquitetura de *hardware* utilizados. A representação estrutural no SMILES é dada por um conjunto de regras que reúnem uma combinação de símbolos atômicos e sinais que indicam valências, ramificações, anéis, aromaticidade, geometria molecular e até estereoquímica. Esse arquivo também pode ser aberto com um editor de textos comum. A estrutura da efedrina é representada por meio da seguinte notação SMILES:



Portanto, para a representação de estruturas pode-se utilizar os formatos Mol e SMILES. Eles estão disseminados tanto na comunidade acadêmica como nas empresas que trabalham com informação química e obviamente nos programas destinados a auxiliar na elucidação estrutural. Pode-se resumir a representação estrutural em computador tomando-se como exemplo a substância efedrina. Ela pode ser representada por uma estrutura desenhada em um editor que a armazena em um arquivo 2D, o qual contém informações sobre sua constituição que podem estar embutidas tanto no formato .mol como .smiles. Essa estrutura 2D pode ser convertida para uma 3D e sua nova representação irá conter informações sobre sua topologia e geometria, sendo então possível visualizá-la, por exemplo, em formato .pdb, em um outro programa apropriado. A visualização de estruturas em 3D é importante, porque por meio dela é possível analisar em detalhes a disposição espacial de seus átomos e sua estereoquímica. O modelo de representação e visualização da efedrina discutido é mostrado na figura 3, onde está esquematizada a forma universal de entrada/saída de informação química em um computador. A estrutura 2D é desenhada em um editor gráfico de moléculas e, automaticamente, convertida em uma das possíveis representações estruturais (ou formato compreendido apenas pelo programa utilizado), podendo ser armazenada, por exemplo, em formato .mol ou .smi. Por fim, as coordenadas 3D dessa estrutura podem ser obtidas por meio de um programa apropriado e armazenadas em um formato específico, como por exemplo, o .pdb, e então ela pode ser visualizada em um outro programa adequado para essa finalidade. Esse processo todo de entrada/saída é totalmente reversível. Logo, a visualização de uma estrutura em um programa nada mais é do que a conversão das notações em figuras através de uma GUI e estrutura interna apropriada.

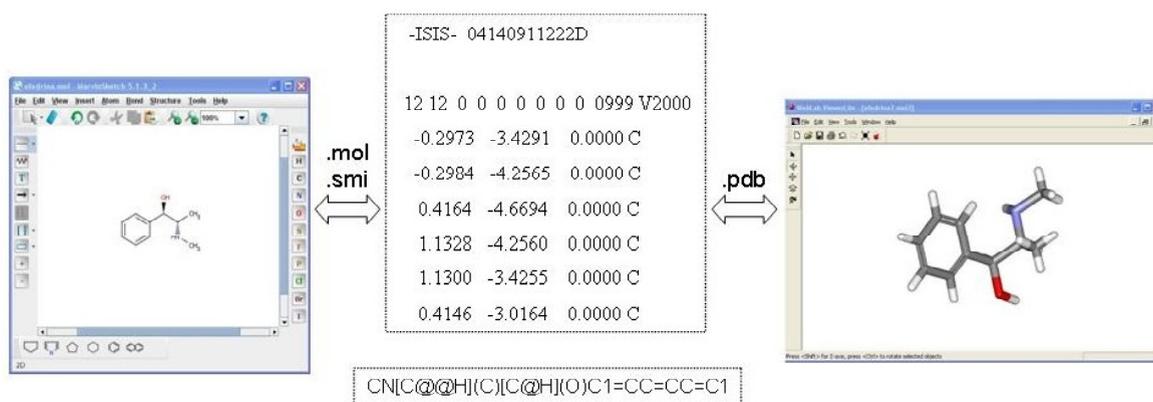


FIGURA 3 | Representações e visualização da estrutura da efedrina em 2D e 3D.

DESENHANDO CORRETAMENTE ESTRUTURAS QUÍMICAS

Deve ficar claro que não basta apenas entender sobre os programas, formatos de arquivos e representação química de estruturas se elas não forem desenhadas corretamente. É sabido que a qualidade das informações químicas é influenciada pelo modo como as estruturas são desenhadas nos editores moleculares. Por exemplo, deve-se tomar bastante cuidado com a correta representação de ligações duplas em isômeros *Z* e *E*, orientação espacial de átomos na fusão de anéis em policiclos, a orientação espacial dos substituintes de um dado átomo de carbono sp^3 , entre outros. A qualidade das informações químicas como consequência da forma de desenhar torna-se ainda mais drástica quando uma dada estrutura possui um ou mais centros quirais e sua estereoquímica relativa necessita ser representada para se realizar, por exemplo, predições de deslocamentos químicos de RMN, uma das modalidades mais empregadas na atualidade. Nesses casos, a atribuição da correta estereoquímica relativa passa a ser obrigatória. Estruturas sem nenhuma atribuição de estereoquímica ou geometria também correm o risco de terem as predições de seus deslocamentos químicos prejudicadas, podendo levar a sérios erros de interpretação de espectros.

A explicação para todos esses cuidados é que a grande maioria dos algoritmos presentes nos *softwares* para predição de deslocamentos químicos de RMN e simulação de espectros possui uma arquitetura tal que leva em consideração informações sobre a geometria molecular e a estereoquímica, o que será abordado nas seções seguintes. Conclui-se então que um bom programa desenvolvido, para realizar predições de deslocamentos químicos de RMN de forma acurada, deve possuir um algoritmo que seja capaz de utilizar tais informações. Porém, ao final, entrar com os dados corretos cabe apenas ao usuário, que além de dominar um determinado programa de computador, deverá obrigatoriamente ter conhecimento das regras básicas de representação estrutural, o que por sua vez é resultado de seus conhecimentos de Química Orgânica.

ESTRATÉGIAS PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS: O HOMEM E A MÁQUINA

Como foi mencionado na introdução, há muito tempo o homem adquiriu experiência em elucidação estrutural e o *modus operandi* seguido por ele não evoluiu muito desde então, ao contrário das técnicas espectroscópicas e equipamentos utilizados no processo.

Após o isolamento e a purificação de uma substância desconhecida, ou após a sua síntese, a próxima etapa é a determinação ou elucidação de sua estrutura química, a qual é realizada seguindo-se basicamente três passos. Inicialmente, é obtido um conjunto de espectros e, a partir de seus respectivos dados, os quais são analisados por um especialista, ou seja, um ser humano, são propostos fragmentos compatíveis. Em seguida, os fragmentos propostos são analisados, alguns são descartados e outros combinados, e então estruturas hipotéticas são geradas. Por fim, as estruturas geradas são testadas (validadas) com intuito de se chegar a uma única que seja compatível com os dados espectrais (ELYASHBERG *et al.*, 2008).

A estratégia descrita no parágrafo anterior é realizada pela maioria dos especialistas em elucidação estrutural a partir dos dados espectrais. Os dados analisados são oriundos de um conjunto inicial de espectros, como infravermelho (IV), ultravioleta (UV), RMN e espectrometria de massas (EM). Em relação à RMN, dados de RMN- 1H , RMN- ^{13}C e DEPT (*Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer*) geralmente são utilizados no início do processo de elucidação. Assim, propostas envolvendo grupos funcionais, fragmentos estruturais, conectividade entre átomos, isomeria e estereoquímica relativa são obtidas e, exaustivamente, analisadas,

sempre com auxílio de informações da literatura. Quando se chega a uma proposta final e é constatado que a estrutura proposta já é conhecida, sua validação é feita através dos dados da literatura. Entretanto, quando o grau de complexidade da estrutura a ser elucidada é muito elevado, ou a mesma ainda não foi descrita na literatura, é necessária a obtenção de espectros bidimensionais e a realização de técnicas especiais (ELYASHBERG *et al.*, 2008). Como exemplos, podem ser citados o NOE (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect), espectroscopia bidimensional homo e heteronuclear tais como ^1H - ^1H COSY (**C**ORrelated **S**pectroscop**Y**), HMQC (**H**eteronuclear **M**ultiple **Q**uantum **C**oherence), HSQC (**H**eteronuclear **S**ingle **Q**uantum **C**oherence) e HMBC (**H**eteronuclear **M**ultiple **B**ond **C**orrelation), além de NOESY (**N**uclear **O**verhauser **E**ffect **S**pectroscop**Y**), TOCSY (**T**otal **C**orrelation **S**pectroscop**Y**), J-RES (**J-RES**olved **S**pectroscop**Y**), dentre outros. Em alguns casos, o raio-X da substância também passa a ser importante (STEFANI & DA COSTA, 2007).

Embora pareça simples, essa estratégia é composta de várias etapas que tornam todo o processo moroso e complexo, demandando muito esforço e necessitando da ajuda de um ou mais especialistas, havendo ainda outras limitações. Essa estratégia realizada pelo humano é tecnicamente chamada de “heurística”, termo que implica a capacidade de solucionar um problema com base em regras empíricas estabelecidas pela experiência própria. No caso da elucidação estrutural de produtos naturais, o método heurístico ainda pode envolver outras etapas, como por exemplo, análise quimiotaxonômica, avaliação da origem biossintética de moléculas, uso de bibliotecas de substâncias e de bancos de dados espectrais. Pode-se concluir que o sucesso da elucidação estrutural de um produto natural complexo muitas vezes depende quase, exclusivamente, da experiência da pessoa envolvida. Entretanto, é sabido que muitas vezes o ser humano pode se cansar, errar e ser tendencioso. Daí a importância de se empregar métodos *in silico*, sendo que em muitos deles as estratégias empregadas são basicamente as mesmas do especialista, porém demandando muito menos tempo e realizando análises exaustivas e bem mais complexas, tudo isto sem incorporar alguns vícios do ser humano (STEFANI & DA COSTA, 2007).

Com relação à elucidação estrutural auxiliada por computador, o programa ideal seria aquele que, a partir dos dados experimentais, fosse capaz de fornecer em poucos segundos a estrutura química da substância em questão sem nenhuma ou com a mínima interferência do especialista. Entretanto, ainda está longe de haver programas com esta capacidade, embora quase todos eles se baseiem no mesmo modo de pensar do especialista.

Na verdade, no âmbito da elucidação estrutural automatizada existem diferentes categorias de programas que se baseiam na estratégia clássica denominada por alguns autores de “planejar-gerar-testar” (ou “planejar-montar-testar”, como mencionado no início da seção denominada Histórico), à exemplo dos três passos utilizados pelo humano que foram mencionados no início desta seção (ELYASHBERG *et al.*, 2008). Na etapa de *planejamento*, os dados experimentais da substância-problema são confrontados com dados de uma biblioteca ou de um banco de dados que possuem inúmeras estruturas, subestruturas e fragmentos estruturais aliados aos seus respectivos dados espectrais, sendo geradas novas subestruturas e fragmentos, compreendendo, portanto, um processo similar à busca na literatura pelo humano. Na *geração* (ou montagem) de estruturas, estruturas químicas hipotéticas são geradas com base na fórmula molecular e nas subestruturas e fragmentos obtidos na etapa anterior, com o objetivo de se chegar a uma estrutura condizente com os dados experimentais e, portanto, trata-se da etapa limitante do processo e que envolve os métodos computacionais mais difíceis de serem desenvolvidos. Na terceira e última etapa, a de *teste* ou *validação*, as estruturas geradas na etapa anterior são verificadas para se avaliar se são compatíveis ou não com os dados experimentais da substância-problema e se elas são válidas; aqui, são utilizadas diversas metodologias para

predição de dados e simuladores de espectros (STEFANI *et al.*, 2007; STEFANI & DA COSTA, 2007; ELYASHBERG *et al.*, 2008).

Apenas os sistemas completos de elucidação estrutural automatizada, denominados “programas CASE” ou “sistemas especialistas”, executam as três etapas descritas no parágrafo anterior, sendo capazes de analisar dados de IV, EM e RMN mono e bidimensional (ELYASHBERG *et al.*, 2010). Entretanto, existem poucos sistemas especialistas disponíveis. A grande maioria dos programas é desenvolvida, especificamente, para executar cada uma das três etapas, em especial para a de validação, momento em que já existem propostas concretas para a estrutura a ser elucidada. Assim, cabe ao usuário complementar toda a análise e ainda usar sua sagacidade para chegar à solução final.

Conforme discutido nos parágrafos anteriores, as diferentes categorias de programas disponíveis, atualmente, executam as diferentes etapas da elucidação estrutural com base na estratégia “planejar-gerar-testar”, a exemplo do que é empregado pelo humano para solucionar os problemas da vida real, denominado heurística. Além disso, deve ser lembrado que mesmo com suas limitações os programas não são tendenciosos e não possuem idéias preconcebidas acerca da elucidação de estruturas químicas, uma vez que a eles foram incorporadas técnicas e metodologias computacionais, de IA ou ferramentas de aprendizado de máquina (*machine learning tools*), além de algoritmos altamente eficazes para realizar diferentes tarefas e trabalhar com informações químicas, o que será abordado nas seções a seguir.

SISTEMAS ESPECIALISTAS

Um sistema especialista é uma forma de sistema baseado no conhecimento, sendo especialmente projetado para emular a especialização humana em algum domínio específico. Esses sistemas são programas computacionais derivados da pesquisa envolvendo IA. O objetivo da IA é entender a inteligência construindo programas com “comportamento” inteligente, estando preocupada com os conceitos e métodos de inferência simbólica ou raciocínio por um computador e como o conhecimento é usado para fazer deduções que são representadas no interior da máquina (JACKSON, 1999).

Os sistemas especialistas operam com regras que são avaliadas para se prever um resultado para uma determinada entrada. Para gerar essas regras, é necessário um conhecimento *a priori* sobre a correlação entre os dados de saída e a consulta. Essa correlação pode ser obtida a partir de métodos indutivos de aprendizado analisando-se os dados experimentais. O termo “sistema especialista” é geralmente reservado para programas que se baseiam no conhecimento usado por especialistas humanos em contraste ao conhecimento obtido por intermédio de livros didáticos ou não especialistas.

Sistemas baseados em conhecimento são definidos como um sistema computacional que tem o conhecimento no domínio da solução do problema. Os sistemas especialistas se baseiam tanto na experiência como no conhecimento. Essa é a razão por que a solução de problemas não pode ser obtida a partir de simples algoritmos. A experiência relacionada a um tipo específico de conhecimento é criada a partir de uma complexa interação de regras e decisões. Muito frequentemente os termos sistema especialista (*Expert System* - ES) e sistemas baseados em conhecimento (*Knowledge-Based Systems* - KBS) são utilizados como sinônimos e representam uma vasta área de aplicação de IA (LUGER & STUBBLEFIELD, 1989).

No âmbito da elucidação estrutural, apesar de haver diversas possibilidades, emprego de diferentes algoritmos, ferramentas e aplicações orientadas a espectros de vários tipos, o que há de comum nessas aplicações é que elas simulam o raciocínio, ou seja, de que modo um espectroscopista realiza a identificação de uma estrutura a partir da informação espectral. Esse processo inclui detectar os fragmentos estruturais de compostos desconhecidos compilando uma fórmula estrutural a partir desses, em seguida realizar a verificação determinando a correlação entre esses fragmentos e os dados experimentais do espectro, tendo ainda como suporte informações adicionais de natureza química, físico-química e espectral. Os sistemas especialistas possuem componentes que executam essas tarefas baseando-se em diferentes métodos matemáticos. A base da elucidação estrutural, utilizando os sistemas especialistas, é, contudo, presumir quais estruturas ou fragmentos similares correspondem a espectros ou subespectros similares. Tal abordagem é fortemente afetada pela qualidade do banco de dados disponível, os quais são sua base (JACKSON, 1999).

Muitos sistemas especialistas são baseados na abordagem de frequências características. Gribov & Orville-Thomas (1988) fizeram diversas considerações sobre as bandas características em um espectro no IV. Gribov & Elyashberg (1979) sugeriram diferentes técnicas matemáticas nas quais regras e decisões são expressas de forma explícita. Elyashberg *et al.* (1998) salientaram que a modelagem discreta de sistemas lógicos de estrutura/espectro é uma ferramenta valiosa no estudo de complicados objetos de natureza discreta. Zupan (1989) demonstrou que a relação entre a estrutura molecular e o correspondente espectro no IV poderia ser representada condicionalmente por um modelo discreto finito. Essas relações podem ser formuladas como regras condicionais na base de conhecimento de sistemas especialistas. Sistemas baseados nessa lógica podem ser encontrados em várias publicações (FUNATSU *et al.*, 1989; LUINGE, 1990; WYTHOFF *et al.*, 1991; WARR, 1993).

Os sistemas especialistas são designados para ajudar um especialista em sua análise e não para substituí-lo. Os problemas sofisticados raramente podem ser resolvidos sem a experiência de um especialista humano e muito dessa experiência não pode ser substituída por um sistema de regras lógicas. Um sistema especialista serve como um amplificador poderoso de intelecto humano. Os sistemas existentes mostram que são relativamente efetivos neste aspecto. Por exemplo, as abordagens que utilizam redes neurais artificiais autoassociativas são suplementos extremamente úteis para os sistemas especialistas. A combinação de regras com redes neurais pode ser uma etapa mais similar aos métodos de decisão humana simulada pelos sistemas especialistas, o que será discutido na próxima seção.

METODOLOGIAS, TÉCNICAS COMPUTACIONAIS E ALGORITMOS

Nesta seção serão abordados alguns aspectos sobre a arquitetura interna e o funcionamento das ferramentas empregadas na elucidação estrutural automatizada. Um dos principais estímulos para o usuário conhecer como um determinado programa funciona é ele poder saber de antemão se tal programa será ou não adequado aos seus propósitos, ou melhor, se o programa será ou não capaz de resolver seu problema adequadamente.

As metodologias, técnicas computacionais e algoritmos mais comuns são baseados em mecânica quântica, regras de incremento ou de aditividade, métodos baseados em fragmentos, código HOSE, IA e técnicas de aprendizado de máquina. Esses estão presentes nas ferramentas para elucidação estrutural automatizada disponíveis atualmente, as quais, em sua grande maioria, foram desenvolvidas com base na

estratégia “planejar-gerar-testar” discutida nas seções anteriores. Na etapa de planejamento estão inclusos os *bancos de dados*, na etapa de geração estão os *geradores de estruturas*, e na etapa de teste ou validação está a maioria dos programas disponíveis na atualidade, que são aqueles capazes de realizar *predições* de propriedades espectroscópicas e, a partir delas, as *simulações* de espectros, o que será detalhado nos próximos parágrafos. Já os programas CASE e os sistemas especialistas podem incluir todas essas etapas.

Nos *bancos de dados* estão inseridas as principais ferramentas de busca por estruturas, subestruturas ou fragmentos estruturais com seus respectivos dados espectrais (UV, IV e RMN), ou ainda ferramentas de busca por espectros e subespectros. Muito esforço tem sido despendido no sentido de desenvolver métodos de busca cada vez mais eficazes, envolvendo técnicas de quimioinformática (KOCHEV *et al.*, 2003). Com o uso dessas técnicas, as informações estruturais (ou espectrais) podem ser armazenadas em bancos de dados e, posteriormente, procuradas e acessadas de modo apropriado. Por exemplo, a busca por similaridade se revelou como uma técnica extremamente útil para casos de programas CASE e sistemas especialistas, uma vez que moléculas similares possuem propriedades físico-químicas similares. Entretanto, outros aspectos devem ser observados no desenvolvimento dessas ferramentas, tais como rapidez, capacidade de buscas completas e sem redundância, sejam por fórmula ou peso molecular, por nomes, dentre outros. Um dos maiores bancos de dados espectroscópicos disponíveis atualmente é o SpecInfo, que possui dados de RMN, IV e EM, além de várias informações complementares; já o CSEARCH e o NMRShiftDB possuem apenas dados de RMN, o que será discutido na seção intitulada Bancos de Dados. Muitos bancos de dados são utilizados não apenas para armazenar espectros ou subestruturas, mas também para realizar *predições*.

A geração de estruturas é realizada por *geradores de estruturas* que operam através de dois métodos: determinístico ou estocástico. Nesses métodos, normalmente, os átomos e as ligações químicas das estruturas são tratadas matematicamente como um conjunto de vértices e arestas, tendo como base a teoria dos grafos (ENGEL, 2003). No método determinístico, um algoritmo matemático especial gera e testa todas as combinações possíveis de estruturas a partir de um dado conjunto de fragmentos e de dados espectrais, juntamente com restrições impostas. Nesse método, há também a etapa de montagem e de redução de estruturas através de metodologias exaustivas (STEINBECK, 2004). No método estocástico, são geradas estruturas aleatoriamente de acordo com um determinado conjunto de dados espectrais e combinações possíveis. Todas as estruturas geradas são quimicamente corretas e compatíveis com os dados fornecidos, porém nem todas as estruturas possíveis são geradas (STEFANI *et al.*, 2007).

Como mencionado no início desta seção, é na etapa de teste ou validação que é encontrada a grande maioria dos programas disponíveis na atualidade, ou seja, aqueles que realizam *predições* de propriedades. Para realizar essas *predições*, os métodos *ab initio*, semiempíricos e de IA são os mais comuns.

As metodologias baseadas em métodos *ab initio*, fundamentados na mecânica quântica, tem se restringido a RMN ou IV (também são utilizadas em RAMAN e técnicas espectroscópicas de fotoionização) e os programas que as contêm são capazes de realizar *predições* de frequências vibracionais, deslocamentos químicos e assim simular espectros. Porém, ao contrário das demais metodologias, antes da *predição* a estrutura em questão deve ter sua geometria otimizada, empregando-se algoritmos apropriados, para que se obtenha um ponto de mínimo na superfície de energia potencial. Os métodos mais utilizados para tal tem como base a teoria do funcional de densidade (*Density Functional Theory* – DFT) e aqueles associados a equações de Hartree-Fock-Roothaan (STEINBECK, 2003). Após a otimização de geometria são realizados os cálculos de *predições* para a grandeza de interesse. Apesar de ser uma ferramenta poderosa, devido a algumas limitações, tais como a necessidade de um maior tempo de computação, disponibilidade de computadores mais potentes, cálculos realizados no vácuo (embora, exista a oportunidade de se empregar

modelos para a solvatação e fenômenos correlacionados), essas metodologias ainda estão disponíveis em poucos programas. Porém, hoje em dia, alguns desses cálculos podem ser realizados em poucas horas em PCs comuns, o que será discutido na seção Métodos *in Silico* para Elucidação Estrutural de Substâncias: Aplicações em Produtos Naturais e Metabolômica.

Na atualidade a predição de propriedades e as *simulações* de espectros envolvendo IA e técnicas de aprendizado de máquina têm recebido mais atenção pela comunidade de produtos naturais (DA COSTA *et al.*, 2004) e este tema será abordado de maneira mais detalhada no decorrer deste capítulo. No contexto da elucidação estrutural, a predição de propriedades envolve, por exemplo, estimar deslocamentos químicos de RMN ou número de ondas do IV, ou ainda simular espectros com base nas propriedades calculadas, tendo como base a correlação entre estrutura química e propriedade espectroscópica. No caso de RMN-¹H, também é possível realizar a predição de constantes de acoplamento. Logo, é importante saber como as predições são realizadas.

Nas predições, geralmente, o problema em questão baseia-se em modelagem e envolve investigar a relação entre uma dada estrutura química (objeto) e uma propriedade, envolvendo um sistema de pares entrada/saída. Como o computador não consegue realizar essa tarefa de modo direto, pode-se utilizar como artifício ferramentas de estatística e aprendizagem por máquina (GASTEIGER, 2006; KUHN *et al.*, 2008), como mostra a figura 4. Esta situação é exatamente a mesma dos estudos sobre QSAR (*Quantitative Structure-Activity Relationship*), com única diferença de que em elucidação a propriedade estrutural em questão é uma dada propriedade espectral e não biológica.

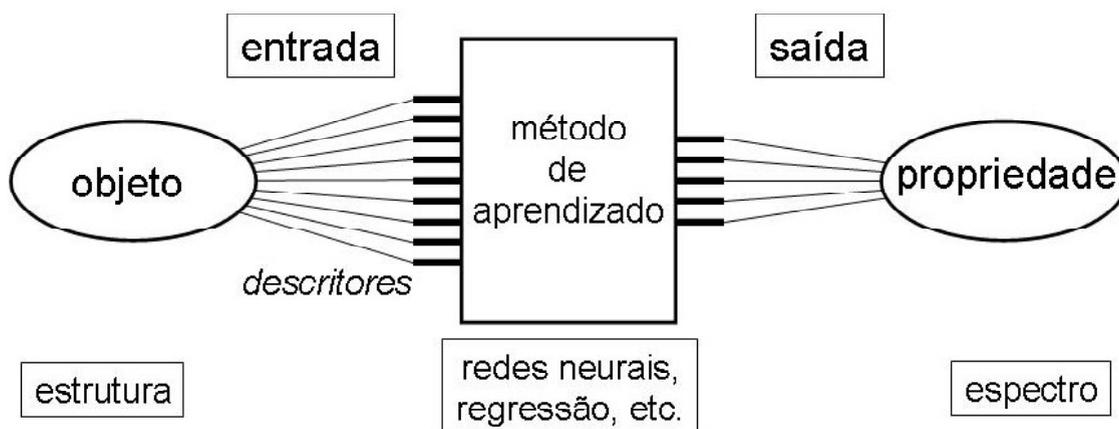


FIGURA 4 | Representação esquemática de um caso típico de modelo computacional para predição de uma propriedade espectral, utilizando técnicas de aprendizado de máquina (adaptado de GASTEIGER, 2006).

Como técnicas de aprendizado de máquina podem ser usadas redes neurais artificiais, algoritmos genéticos, regressão por máquina de vetores de suporte (*Support Vector Machines – SVM regression*), árvores de decisão (*decision trees*), floresta randômica (*random forest*) e kNN, dentre outras (Figura 4). Essas técnicas

compreendem um ramo da IA (ver seção Sistemas Especialistas) e envolvem o uso de algoritmos poderosos que são capazes de aprender – algoritmos de aprendizagem – a partir de exemplos (dados de treino) para depois tomarem decisões inteligentes (resposta). Atualmente uma vasta quantidade de material publicado a respeito de cada uma dessas técnicas está disponível (ZUPAN & GASTEIGER, 1999; KUHN *et al.*, 2008). Entretanto, além de selecionar uma boa técnica de aprendizado para desenvolver uma boa ferramenta que realize predições, os “descritores” para as estruturas químicas devem ser cuidadosamente selecionados, o que será descrito brevemente a seguir.

Em um caso típico de predição que explora a relação entre estrutura química e propriedades (Figura 4) são utilizadas variáveis apropriadas, denominadas descritores. Logo, inicialmente a estrutura é representada (ou codificada) através de um conjunto de descritores estruturais, ou seja, representações numéricas que descrevem suas propriedades (STEINBECK, 2003). A partir de estruturas químicas 2D e utilizando-se por exemplo arquivos Mol, SD ou SMILES (ver seção Fundamentos Básicos da Representação de Estruturas Químicas no Computador), os descritores são calculados e incorporados a esses arquivos empregando-se um *software* apropriado. Os descritores também podem ser incorporados a estruturas 3D.

Em RMN, por exemplo, os descritores mais utilizados são derivados de propriedades atômicas, de ligações ou de propriedades moleculares, sendo também incluídos os que descrevem topologia e geometria moleculares (STEINBECK, 2003; BINEV & AIRES-DE-SOUSA, 2004). Os descritores estruturais são calculados por intermédio de programas apropriados e depois submetidos aos algoritmos de aprendizagem, como as redes neurais artificiais, compondo, portanto, a etapa de entrada de dados (Figura 4). Como mencionado anteriormente, os algoritmos de aprendizagem são capazes de “aprender” com o exemplo fornecido e realizar predições, retornando então os dados de saída, ou seja, o resultado de cada predição, como o deslocamento químico de um dado átomo (Figura 4). No desenvolvimento de um modelo, a qualidade de cada predição para cada objeto (estrutura) é avaliada por métodos estatísticos e comparação com os dados experimentais (erro médio, validação cruzada, coeficiente de regressão, dentre outros), compondo a etapa de treino do problema da predição. Ao final, existe a etapa de teste ou validação do modelo, momento em que sua qualidade é verificada (KUHN *et al.*, 2008).

Na etapa de validação do modelo, objetos externos, ou seja, aqueles que não participaram da etapa de treino, são apresentados ao modelo e os resultados das predições são analisados estatisticamente mais uma vez. Um modelo bem treinado é aquele capaz de apresentar bons resultados ao realizar novas predições, ou seja, ele mostra que “aprendeu” a partir de exemplos. É justamente neste tipo de situação que estão incluídos os programas de computador desenvolvidos para a predição de deslocamentos químicos que têm embutidos em sua estrutura algoritmos capazes de utilizar informações da geometria e estereoquímica das estruturas, como foi comentado no final da seção Fundamentos Básicos da Representação de Estruturas Químicas no Computador. Estes programas possuem, portanto, descritores estruturais que envolvem informações 3D e estereoquímica. Após aprender como funcionam os algoritmos de aprendizagem e como são realizadas as predições, é interessante ter conhecimento de como alguns deles são empregados em elucidação estrutural.

Um importante ramo da IA é a “heurística”, uma das primeiras técnicas desenvolvidas para predição que consiste em um conjunto de regras de tomada de decisão. Algumas regras são inseridas pelo especialista durante o projeto do sistema, enquanto outras são inferidas pelo sistema à medida que novos casos são apresentados. Todas as regras são sistematicamente armazenadas em um banco de dados. Assim, quando aparece um problema semelhante, o sistema é capaz de “julgar” qual é o melhor caminho para sua solução (STEFANI *et al.*, 2007). O ser humano também é capaz de realizar heurística na elucidação estrutural, conforme

foi mencionado na seção denominada Estratégias para Elucidação Estrutural de Substâncias: o Homem e a Máquina, bem como vários *softwares* antivírus existentes que detectam códigos suspeitos.

Outra técnica de predição bastante comum em IA são as redes neurais artificiais, que compreendem técnicas computacionais inspiradas em neurônios biológicos animais. As redes neurais possuem algoritmos com a capacidade de simular o funcionamento do cérebro humano através do aprendizado por exemplos, ou seja, adquirem conhecimento pela experiência. São modelos treináveis com a capacidade de armazenar e processar informações. O tipo mais comum de redes neurais encontradas em programas para predição de propriedades, como deslocamentos químicos de RMN, é a que possui o algoritmo de retropropagação dos sinais de erros (*back propagation of errors*), um método de aprendizado supervisionado (ZUPAN & GASTEIGER, 1999). Sua arquitetura inclui vários neurônios dispostos em camadas: uma camada de entrada (*input*), onde os dados (por exemplo, os descritores estruturais) são inseridos, as camadas intermediárias onde é realizado o processamento, e a camada de saída (*output*), por meio da qual é retornado o valor da predição de uma dada propriedade (Figura 5). O funcionamento de uma rede neural se resume aos estímulos que são dados aos neurônios de entrada, os quais se propagam para os intermediários até se obter uma resposta na camada de saída, de forma análoga aos neurônios biológicos. As redes neurais têm sido bastante empregadas em diferentes áreas da química (ZUPAN & GASTEIGER, 1999), pois por meio delas é possível trabalhar com relações complexas e não lineares entre estruturas químicas e suas propriedades, como no caso da RMN.

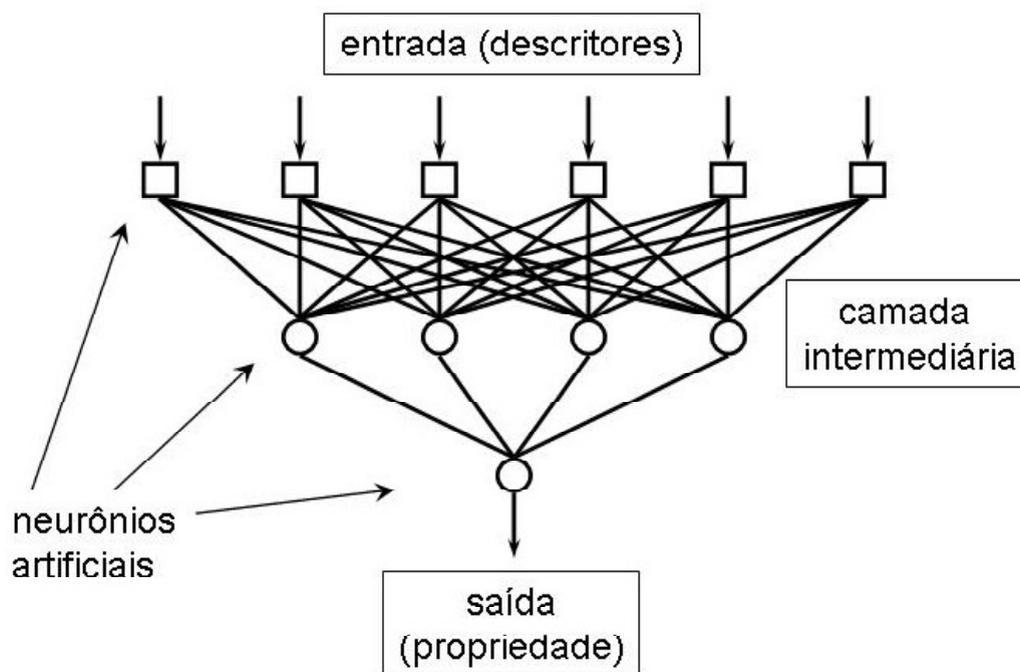


FIGURA 5 | Arquitetura de uma rede neural artificial com algoritmo de retropropagação para a predição de propriedades.

A predição de propriedades espectrais ainda envolve outros métodos, como o código HOSE, as regras de incremento (ou regras de aditividade) e os métodos baseados em fragmentos. O código HOSE é um método bem estabelecido que foi descrito por Bremser em 1978 e é muito utilizado em programas para predição de deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C . Como não inclui nenhuma informação em 3D, ele não é recomendado para predições de RMN- ^1H . A análise pelo código HOSE inicia-se no átomo cujo deslocamento deve ser calculado, o chamado átomo central, e avança uma ligação (ou uma esfera) adiante para localizar, em um banco de dados, o ambiente esférico desse átomo a uma ligação. Se esse ambiente é encontrado, o código avança mais uma esfera e repete o processo e assim sucessivamente, como ilustrado para a estrutura na figura 6. Ao final, com base nos ambientes encontrados nas n esferas equivalentes a n ligações, a predição do átomo central é realizada. Para realizar predições confiáveis, um programa deve possuir um código HOSE para descrever as vizinhanças de pelo menos três esferas de um dado átomo central e, portanto, seu banco de dados deve possuir várias classes de estruturas químicas armazenadas (Steinbeck, 2003).

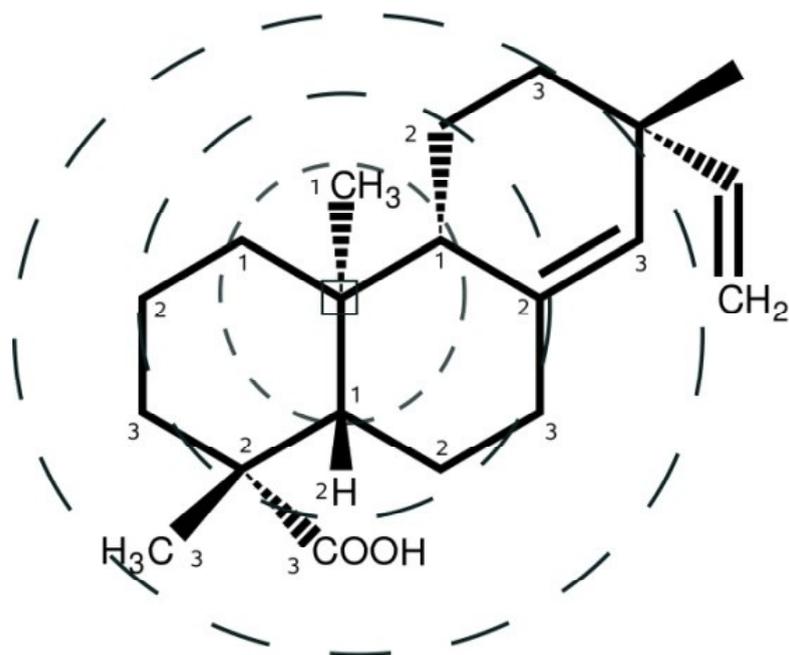


FIGURA 6 | Exemplo do funcionamento de um código HOSE de três esferas em uma estrutura química. O átomo central está envolto por um quadrado (STEFANI & DA COSTA, 2006).

As regras de incremento, também chamadas de regras de aditividade (*additivity rules*), foram criadas para serem embutidas manualmente e compreendem uma das mais antigas metodologias aplicadas na predição de deslocamentos químicos de RMN. Atualmente, os incrementos são baseados em equações matemáticas expressas em algoritmos que descrevem as contribuições de grupos substituintes em cada átomo de um dado esqueleto, como por exemplo, o que é encontrado nas tabelas clássicas de RMN- ^{13}C que

mostram os efeitos de substituintes em uma molécula de benzeno. Ao longo dos anos, essas regras foram sofrendo alterações e hoje possuem elevado nível de sofisticação, sendo possível realizar previsões de deslocamentos químicos com alto grau de precisão, em especial para RMN-¹³C, quando contribuições de efeitos podem ser calculadas para substituintes distantes até quatro ligações. Em algumas implementações mais modernas, uma estrutura é decomposta em vários subesqueletos e cada um deles se torna a base de previsões baseadas em incremento. Atualmente, já existem mais de 4.000 parâmetros para RMN (STEINBECK, 2003).

Os métodos baseados em fragmentos compreendem algoritmos especiais de previsão derivados de bancos de dados contendo estruturas químicas associadas aos seus deslocamentos químicos de RMN-¹³C. Para cada átomo de carbono de cada estrutura do banco de dados são gerados fragmentos centrados em átomos com um número determinado de camadas concêntricas de um código HOSE. Esses fragmentos e seus deslocamentos químicos correspondentes são armazenados em uma lista especial para os algoritmos de previsão. Para realizar a previsão dos deslocamentos químicos de ¹³C de uma dada estrutura, inicialmente o programa seleciona todos os seus possíveis fragmentos, realiza uma busca por fragmentos análogos no banco de dados e depois atribui aos átomos de carbono a serem estimados os deslocamentos retirados dos fragmentos de referência. Caso um fragmento não seja encontrado no banco de dados, o programa faz uma interpolação utilizando o fragmento estrutural mais similar disponível. Os resultados desse procedimento são muito bons, desde que o banco de dados seja grande e diverso o suficiente. Apesar do alto nível de acuidade nas previsões, esse método tem uma desvantagem quando os fragmentos não possuem informações sobre a estereoquímica (ELYASHBERG *et al.*, 2008).

Sumarizando o que foi discutido nesta seção, os programas para previsão de deslocamentos químicos de RMN podem possuir algoritmos baseados em IA (heurística, redes neurais), código HOSE, regras de incremento e métodos baseados em fragmentos, em particular aqueles que trabalham com RMN-¹³C. Os programas que trabalham com RMN-¹H devem possuir algoritmos mais elaborados pelo fato de haver efeitos espaciais que influenciam o deslocamento químico dos átomos de hidrogênio. Portanto, o desenvolvimento de programas para previsão de deslocamentos químicos de ¹H é mais difícil (AIRES-DE-SOUSA *et al.*, 2002; BINEV & AIRES-DE-SOUSA, 2004).

MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E MÉTODOS *IN SILICO* PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As principais técnicas espectroscópicas utilizadas no laboratório para a elucidação estrutural de substâncias naturais são UV, IV, EM e RMN, e, geralmente, os dados espectrais obtidos são analisados em conjunto. No âmbito da elucidação estrutural automatizada essas técnicas também são importantes e, com base nelas, vários programas foram desenvolvidos. Tais programas, desenvolvidos para todas as etapas de elucidação estrutural automatizada, possuem em sua estrutura interna as metodologias e algoritmos descritos na seção anterior, ou mesmo combinações desses, originando ferramentas poderosas que propiciam auxílio inestimável aos seus usuários. Nesta seção serão discutidas as técnicas de IV, EM e RMN no contexto da elucidação estrutural automatizada, revelando-se as principais potencialidades de cada uma.

Nesse contexto, é importante ter em mente que os *bancos de dados* são capazes de armazenar quaisquer tipos de dados espectrais, espectros ou subespectros, podendo ser facilmente acessados por meio

de ferramentas de busca adequadas. Os *geradores de estruturas* operam com dados fornecidos pelo usuário, como por exemplo a fórmula ou massa molecular, ou ainda dados de IV e deslocamentos químicos de RMN, além de DEPT e dados de espectros bidimensionais. Entretanto, atualmente a grande maioria das ferramentas disponíveis opera com *predição* de propriedades e *simulação* de espectros, sendo mais difundidas para aplicações em produtos naturais e metabólica, o que também será discutido a seguir.

INFRAVERMELHO

A espectroscopia no IV é uma técnica analítica muito poderosa largamente usada e com uma vasta aplicabilidade, tendo maior papel na identificação e elucidação estrutural de substâncias orgânicas, bem como em análises quantitativas. Os espectros no IV contêm informações que refletem propriedades de toda a molécula, descrevendo quais os fragmentos que a constituem e como esses estão arrançados.

A predição e interpretação direta de espectros no IV com métodos *ab initio* de química quântica consomem relativamente muito tempo e, portanto, estão limitadas a moléculas relativamente pequenas. Métodos semiempíricos são mais rápidos, porém necessitam de escalonamento dos resultados para obter correspondência satisfatória com os dados experimentais. Alternativas como os sistemas que modelam a correlação entre as estruturas e os dados de espectroscopia no IV, baseados no conhecimento derivado de dados experimentais são, portanto, necessários para transpor essas dificuldades.

Como explicado anteriormente, uma substância é identificada pela comparação de seu espectro com um espectro de um banco de dados. Quando a identificação não é concluída, devido à constituição da estrutura da substância ainda não ser conhecida e nenhum espectro de referência estar disponível, um especialista tem que extrair características estruturais dessa substância a partir de seu espectro. Essa informação é combinada com aquelas obtidas de outros métodos espectroscópicos para permitir a elucidação da amostra.

Esse processo tem uma grande desvantagem, pois consome muito tempo e conseqüentemente é custoso, não apenas pelo próprio trabalho de elucidação, mas, principalmente, pela larga quantidade de experiência que o especialista tem que acumular para se tornar apto a codificar as características estruturais do espectro. A automação desse trabalho para aplicações rotineiras é, portanto, de grande importância.

O padrão característico de um espectro IV, particularmente na região entre 1.500 e 1.000 cm^{-1} , pode ser usado para a identificação confiável de uma estrutura. Portanto, é fácil a automação da interpretação no IV e, para tal, existem diversas técnicas que podem ser utilizadas.

As correlações entre estruturas e espectros podem ser descritas por regras. Essas regras são derivadas pela investigação cuidadosa de padrões espectrais e características estruturais que os geram. Vários esforços foram realizados para desenvolver sistemas de regras para interpretar automaticamente dados espectroscópicos (RICARD *et al.*, 1993). Essas podem ser inclusivas ou exclusivas, ou seja, a presença de um pico indica a existência de um determinado fragmento e a ausência do pico, conseqüentemente, indica a ausência do fragmento. Esse método trabalha com os picos, portanto é altamente dependente do algoritmo de seleção de picos aplicado ao espectro. Entretanto, a predição automática de características estruturais baseada apenas nas posições dos picos não é muito confiável.

Outra forma de relacionar estruturas químicas a espectros é utilizando redes neurais artificiais (ZUPAN & GASTEIGER, 1991, 1999), nas quais as conexões dos neurônios são determinadas pelos pesos. Durante o treinamento a rede neural aprende indutivamente sobre a correlação entre a estrutura molecular e os dados

de saída (espectro no IV). Essa relação não é expressa por uma equação, mas pelos valores dos pesos e a respectiva arquitetura da rede neural.

ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica analítica para a investigação de uma dada molécula ou misturas complexas e que tem se desenvolvido de maneira bastante dinâmica nos últimos anos. Na área de produtos naturais ela é bastante empregada, pois é de primordial importância obter a massa molecular de uma substância para confirmar sua estrutura em combinação com dados provenientes de outras técnicas espectroscópicas. No âmbito da metabolômica de plantas, o emprego de EM acoplada a técnicas de separação, tais como cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia gasosa (CG), que originou as técnicas acopladas (ou hifenadas) CLAE-EM e CG-EM, tem sido bastante explorado para auxiliar no processo de desreplicação de matrizes biológicas, tais como plantas, microrganismos e organismos marinhos. Por meio dessa abordagem, as substâncias de uma mistura são tentativamente identificadas com base na busca em bibliotecas ou na interpretação de fragmentações conhecidas.

No âmbito dos métodos *in silico* de elucidação estrutural envolvendo EM deve ser destacado o pioneirismo do DENDRAL (ver seção Histórico), uma das primeiras tentativas de se criar um programa para elucidação estrutural baseado em IA. Neste programa, o uso da EM era feito com base em padrões de fragmentação para se tentar deduzir estruturas químicas ou com base na predição de fragmentos estruturais de isômeros. Até hoje os sistemas de elucidação estrutural automatizada que possuem módulos de EM são baseados na metodologia usada no DENDRAL. Além disso, a grande maioria das regras de interpretação de fragmentações presentes nos sistemas atuais foi desenvolvida para dados gerados por ionização através de ionização por elétrons, quase todas elas desenvolvida nas décadas de 1970 e 1980, incluindo o uso de bibliotecas com dados de fragmentação. Portanto, necessita-se desenvolver novos algoritmos, pois atualmente o fator limitante é a enorme diversidade molecular e de fragmentos gerados para substâncias com estruturas similares (KIND & FIEHN, 2010).

Uma grande vantagem de se utilizar dados de EM em programas de elucidação estrutural de produtos naturais é o fato dos aparelhos de alta resolução fornecerem uma acurada relação massa carga (m/z) de uma dada substância desconhecida para que, a partir dessa, os programas possam gerar suas possíveis fórmulas moleculares e, conseqüentemente, propor subestruturas (ELYASHBERG *et al.*, 2010). Existem também programas capazes de auxiliar a determinação da fórmula molecular ou composição elementar, incluindo a detecção de adutos formados com hidrogênio ou álcalis em técnicas de ionização, tais como ionização química, por *electrospray*, desorção por *laser*, assistida por matriz, e ionização química a pressão atmosférica, além da determinação de estados de carga e padrão isotópico em *electrospray*. Para o cálculo de composição elementar, existem programas que operam com regras de heurística, muitos deles desenvolvidos pelas empresas que fabricam seus próprios equipamentos. Apesar dos enormes avanços das técnicas e equipamentos para EM, bem como o desenvolvimento de novos programas e aplicativos, ainda não existe nenhuma ferramenta capaz de prever a probabilidade de formação de um determinado aduto com base na estrutura química de uma dada substância (KIND & FIEHN, 2010).

Atualmente muito esforço tem sido despendido em estudos de bibliotecas de dados e vários algoritmos de busca têm sido desenvolvidos. O objetivo da busca nessas bibliotecas é encontrar a estrutura correta da substância desejada ou obter informações parciais a partir de substâncias similares. Geralmente é realizada

uma busca por espectros armazenados na biblioteca com base em um dado de um espectro obtido experimentalmente. Entretanto, deve ser enfatizado que existe o problema da dependência do tipo de técnica e dos espectrômetros utilizados, daí o surgimento de várias bibliotecas comerciais desenvolvidas para determinados instrumentos e condições experimentais (KIND & FIEHN, 2010). É por esse motivo que muitos usuários elaboraram suas próprias bibliotecas ou se baseiam em padrões de fragmentação de uma série de substâncias análogas, publicados na literatura. Outro problema de determinadas técnicas de EM, quando comparada a outras técnicas espectroscópicas, tais como IV ou RMN, está relacionado à baixa reprodutibilidade de seus dados espectrais quando obtidos em diferentes instrumentos em dadas condições de análise (VERPOORTE *et al.*, 2005), o que reflete na qualidade das ferramentas *in silico* derivadas desses instrumentos.

Em suma, o desenvolvimento de métodos *in silico* para elucidação estrutural de produtos naturais baseada em EM ainda é limitado e atualmente existem poucos programas que realmente oferecem soluções confiáveis. Além das bibliotecas de dados espectrais, o que se encontra são apenas alguns programas de computador que podem ser utilizados sozinhos ou associados a sistemas de elucidação estrutural automatizada, os quais são capazes de interpretar fragmentações pré-estabelecidas. Ainda não existem algoritmos desenvolvidos o suficiente para prever fragmentos e abundâncias a partir de uma estrutura a ser fragmentada através de diferentes modos de ionização. Logo, o desenvolvimento de métodos *in silico* para elucidação estrutural de substâncias baseado em EM ainda é um campo totalmente aberto para pesquisas, cujo estudo deve ser estimulado.

RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR

A RMN é a técnica espectroscópica mais poderosa para determinação e elucidação estrutural. Seus vários métodos disponíveis oferecem diferentes informações sobre a estrutura molecular. Por exemplo, fornece o estado de hibridização de núcleos, o número e a natureza de seus vizinhos, as informações sobre acoplamento entre núcleos vicinais, a quantas ligações, um dado par de núcleos está acoplado e até como pares de núcleos interagem no espaço.

Em comparação com as duas técnicas abordadas anteriormente, a RMN é aquela para qual o maior número e diversidade de *softwares*, sistemas e ferramentas foram desenvolvidos desde os primeiros estudos sobre elucidação estrutural automatizada. Uma vantagem inestimável da RMN frente às demais técnicas espectrométricas, em especial a EM, é que o deslocamento químico de um átomo independe do tipo de equipamento e da potência do campo utilizados. Como consequência, essa propriedade pode ser modelada e regras e algoritmos de predição podem ser desenvolvidos, em especial para RMN-¹³C, em que não é envolvida a multiplicidade de sinais, como no caso da RMN-¹H, a qual ainda inclui as constantes de acoplamento. Assim, um conjunto de deslocamentos químicos pode ser estimado a partir de uma dada estrutura química. Em outra abordagem, como nos programas CASE e sistemas especialistas, apenas a análise dos dados experimentais de RMN de uma dada substância pode fornecer sua estrutura. Logo, a RMN é uma técnica poderosa na elucidação estrutural automatizada.

Atualmente, existem ferramentas *in silico* para elucidação estrutural baseadas em RMN que empregam principalmente dados de espectros unidimensionais, porém o uso de dados bidimensionais tem crescido bastante. Dentre essas ferramentas, existem aquelas que podem ser utilizadas sozinhas ou as que estão presentes em sistemas CASE e sistemas especialistas. Dentre as que podem ser operadas sozinhas, há os

editores de espectros e as enormes bibliotecas de dados espectrais com poderosas ferramentas de busca. Tais bibliotecas, ou bancos de dados, por si só poderiam ser capazes de realizar rotinas de elucidação estrutural, uma vez que são capazes de fornecer dados de estruturas, subestruturas, espectros e subespectros. Mas há casos onde a capacidade de fornecer dados estruturais pode não resolver o problema de elucidação de uma dada estrutura e, portanto, outras ferramentas devem estar disponíveis, como aquelas capazes de realizar predições de deslocamentos químicos (STEINBECK, 2003, 2004; ELYASHBERG, 2010).

As ferramentas que são capazes de realizar predições de deslocamentos químicos e a simulação de espectros de RMN são muito importantes no processo de elucidação estrutural. Estes são capazes de gerar predições em um tempo bastante reduzido, na ordem de segundos, inclusive para conjuntos de várias estruturas armazenadas em arquivos SD. Uma ferramenta confiável é extremamente importante na etapa de validação estrutural, quando já existem propostas para a estrutura de uma dada substância (DA COSTA *et al.*, 2004). Além disso, essa ferramenta passa a ser útil para se obter dados para substâncias que ainda não foram descritas na literatura ou para aquelas cujos dados experimentais de RMN ainda não foram obtidos. Essa possibilidade também pode propiciar o surgimento de novas ferramentas para auxiliar no processo de desreplicação de matrizes biológicas, como no âmbito da metabolômica, por exemplo, para a subtração de espectros de RMN. Nesse processo, inicialmente, os sinais de espectros de misturas de substâncias obtidos experimentalmente são comparados a sinais de espectros simulados de várias substâncias; em seguida, os sinais dos espectros simulados são subtraídos daqueles da mistura. No caso de coincidência entre o conjunto de sinais dos espectros simulados com os experimentais, pode-se chegar à determinação estrutural de substâncias presentes em misturas complexas sem que estas sejam isoladas, num caso típico de desreplicação via RMN. Na predição de deslocamentos químicos de RMN é utilizada atualmente uma enorme diversidade de algoritmos, desde os heurísticos àqueles que são baseados em IA, como as redes neurais artificiais, além de outros especiais como as regras de incremento, métodos baseados em fragmentos e código HOSE. Entretanto, deve ser lembrado que esses algoritmos dependem da qualidade dos dados experimentais para derivarem suas predições.

Como consequência desta enorme importância da RMN na elucidação estrutural de substâncias, atualmente uma enorme gama de ferramentas, sistemas e programas estão disponíveis aos usuários para auxiliar na elucidação estrutural de produtos naturais.

FERRAMENTAS, SISTEMAS E PROGRAMAS PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL *IN SILICO*

Nesta seção são descritas várias ferramentas empregadas na elucidação estrutural de substâncias por meio de métodos *in silico* que, atualmente, estão disponíveis aos usuários. Foram selecionadas ferramentas com diferentes funções, tais como bancos de dados, programas para predição de propriedades, simulação, processamento e visualização de espectros. São discutidos e avaliados apenas os programas acessíveis aos usuários para realizar rotinas de elucidação estrutural, excluindo-se aqueles de cunho meramente acadêmico ou restritos a um pequeno grupo de pesquisadores.

Uma observação importante a se fazer é que quase todas as ferramentas descritas nesta seção são *freeware*, *open source* ou estão disponíveis *on-line* na internet. Os programas proprietários aqui descritos, no momento da redação do texto possuíam licença válida ou estavam no período de avaliação gratuita. Os

autores não estimulam o uso de quaisquer *software* sem a sua devida licença, pois além de ser crime e lesar financeira e intelectualmente seus desenvolvedores e distribuidores, trata-se de uma atitude bastante antiética.

Antes de empregar métodos *in silico* para elucidação estrutural, é sempre importante saber de antemão sobre algumas funcionalidades e características importantes dos programas. Por exemplo, no caso de predições de RMN-¹H, uma das recomendações principais é avaliar se um dado programa é capaz de distinguir átomos de hidrogênio de grupos metileno (-CH₂-) de sistemas rígidos ou átomos diastereotópicos. Também é interessante saber se eles são capazes de realizar predições de constantes de acoplamento. No caso de predições de RMN-¹³C, recomenda-se verificar se o programa considera estereoquímica e geometria molecular, parâmetros dependentes de conformação e de configuração, se diferencia grupamentos metila em posição *cis* e *trans*, presença de substituintes nas posições axial e equatorial de ciclo-hexanos, ou se considera de forma diferenciada duas metilas ligadas a um átomo de carbono de sistema rígido. Outro aspecto muito importante é verificar quais solventes deuterados estão disponíveis para predições de RMN, por exemplo, deuteroclorofórmio (CDCl₃) ou outros como deuteroetanol ou dimetilsulfóxido deuterado. Salienta-se que a grande maioria dos programas foi desenvolvida para realizar predições, considerando as substâncias solubilizadas em CDCl₃ e que são raros os que tratam do deslocamento gerado por solventes polares nos sinais de determinados núcleos. No caso de EM, deve-se pesquisar se o programa realiza predições para uma determinada técnica específica ou é generalista.

Resumindo, para saber se um dado programa será adequado às necessidades, a regra básica e mais sensata antes de utilizá-lo é investigar e conhecer melhor sobre sua estrutura interna, como por exemplo, seu banco de dados e os algoritmos implementados. Uma vez selecionado o programa, recomenda-se ler atentamente as informações contidas em seu manual e realizar diversos testes empregando substâncias conhecidas. Se o programa é muito caro, antes de efetuar sua compra recomenda-se solicitar um período de avaliação.

Para se comparar e conseqüentemente avaliar a qualidade das predições são utilizados métodos estatísticos, seja no caso de predições para diferentes estruturas químicas realizadas com um único programa ou predições para uma mesma estrutura realizadas com diferentes programas. No caso de RMN, os métodos estatísticos mais comuns são o erro médio absoluto (EMA) e o erro padrão (EP), conforme as seguintes equações:

$$EMA = \frac{\sum |\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{pred}}|}{n} \text{ e } EP = \sqrt{\frac{\sum (\delta_{\text{exp}} - \delta_{\text{pred}})^2}{n}},$$

onde d_{exp} é o deslocamento químico obtido experimentalmente para um dado núcleo e d_{pred} é o deslocamento químico obtido por predição para o mesmo núcleo (KUHN *et al.*, 2008).

Ao utilizar métodos estatísticos como o EMA ou EP, pode-se facilmente avaliar os pontos mais fortes e mais fracos de um dado programa, como por exemplo a sua capacidade em prever deslocamentos químicos para átomos do tipo sp³, sp² de ligações duplas, sp² de anéis aromáticos, carbonos quirais, constantes de acoplamento e assim por diante.

BANCOS DE DADOS

96

Nesta seção serão apresentados bancos de dados desenvolvidos genuinamente para armazenar espectros e demais informações associadas. Não serão discutidos os grandes bancos de dados de estruturas que associam estruturas químicas a propriedades moleculares, atividades biológicas e informação química, tais como o NCI/CADD (<http://cactus.nci.nih.gov>), o ChemSpider (<http://www.chemspider.com>), o PubChem (<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) e outros similares, os quais são mais apropriados para estudos das áreas de química medicinal e quimioinformática do que elucidação estrutural.

SpecInfo

Desenvolvido pela BASF e adquirido pela empresa alemã *Chemical Concepts GmbH*, o SpecInfo é um dos maiores bancos de dados espectroscópicos existentes, com cerca de 740.000 espectros digitais de mais de 200.000 estruturas associadas. Esse banco possui dados de RMN, IV e EM dentre outras informações complementares, tais como condições experimentais, constantes de acoplamento e informações bibliográficas. Também possui um editor de estruturas, realiza busca de espectros e de subestruturas por similaridade e também realiza predições de RMN, dentre várias outras funcionalidades. As predições de RMN-¹³C são por código HOSE e métodos baseados em fragmentos. Atualmente a versão *online* do SpecInfo pela internet já está na versão 4.0 (<http://specinfo.wiley.com/specsurf/welcome.html>) e é acessada pelo SpecSurf (*applet* Java) de dentro de um navegador e em qualquer sistema operacional. O SpecInfo também é acessado através da página da internet da editora Wiley-VCH (<http://www.wiley-vch.de>), que é quem o comercializa, e está associado aos dados do CAS (*Chemical Abstract Service*).

NMRShiftDB

Trata-se de um banco de dados de acesso livre (*open access*) e de código aberto (*open source*) disponível na internet (<http://www.nmrshiftdb.org>) que armazena dados de RMN. Foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores de institutos e universidades alemães, liderados por Christoph Steinbeck. Os usuários também podem contribuir, enviando deslocamentos químicos de RMN de moléculas pequenas e as atribuições submetidas são constantemente verificadas por curadores, ou seja, especialistas que realizam o processo de checagem. Por meio de seus algoritmos especiais, o banco permite que o usuário faça buscas por espectros ou deslocamentos químicos, ou obtenha predições de espectros (¹H e ¹³C). Os dados são retornados em porcentagem de similaridade. Ao todo existem 38.746 estruturas e 43.905 espectros (dados de novembro de 2010). Para realizar buscas, cabe ao usuário acessar o *site*, selecionar o botão "*search*" e, nos campos apropriados, entrar com os dados de uma dada substância. É possível entrar com vários tipos de dados, tais como deslocamentos químicos ou espectros de RMN (formato JCAMP), estrutura química (vários formatos de arquivo), nome químico ou peso molecular. Também é possível desenhar a estrutura utilizando o editor JChemPaint, um *applet* integrado à página. Em seguida, o usuário pode selecionar as modalidades de busca, como por espectros ou subespectros. Caso o banco já possua os dados da substância em questão, esses são

automaticamente retornados, juntamente, com sua estrutura química, espectro e deslocamentos químicos. Do contrário, é realizada uma busca e as estruturas associadas aos espectros são retornadas juntamente com a porcentagem de similaridade (Figura 7). Existe ainda a opção de realizar previsões de espectros, o que será abordado adiante na seção intitulada Programas, Geradores e Sistemas Especialistas.

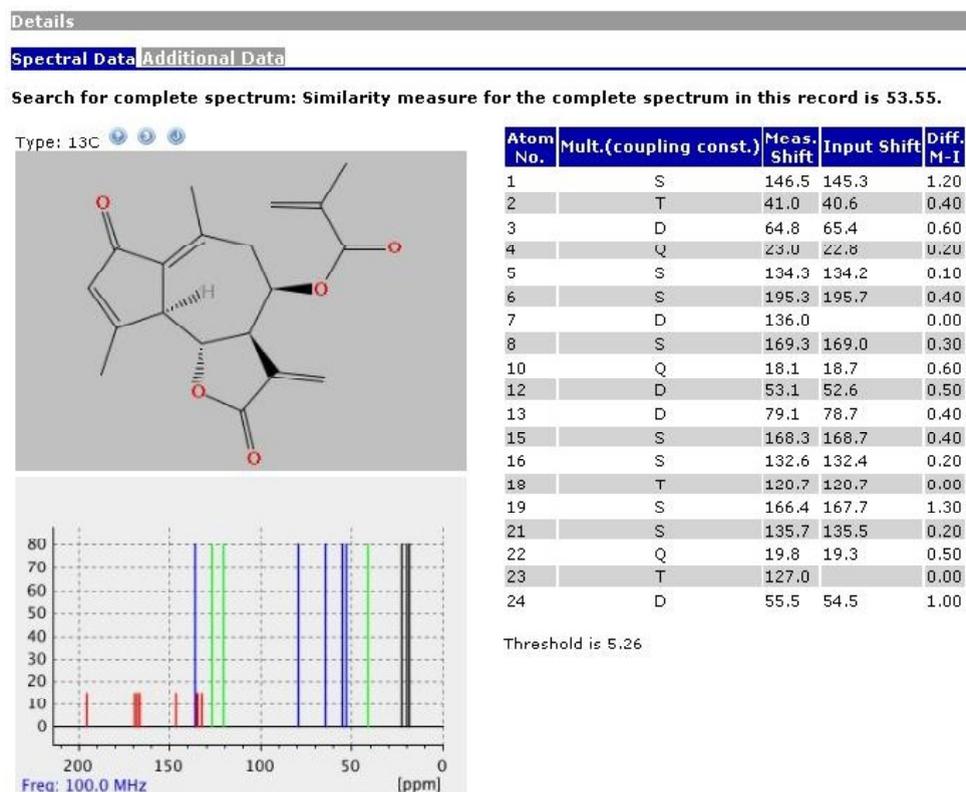


FIGURA 7 | Tela do resultado de busca de espectros de RMN- ^{13}C do NMRShiftDB a partir de uma estrutura química.

CSEARCH

O CSEARCH é um banco de dados com deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C que surgiu como um projeto acadêmico do pesquisador Wolfgang Robien, da Universidade de Viena (http://homepage.univie.ac.at/wolfgang.robien/csearch_main.html). Recentemente o CSEARCH passou a ser comercializado no pacote Know-It-All da empresa *Bio-Rade* também pode ser encontrado no módulo NMR Predict Desktop da empresa *Mnova*, os quais serão discutidos a seguir. Os algoritmos envolvidos nas previsões envolvem uma associação entre um banco de dados, código HOSE, redes neurais e outros modelos computacionais. Caso o usuário

deseje realizar predições gratuitas, basta ler as condições, contatar o pesquisador por *e-mail* e submeter as estruturas em formato Mol.

KnowItAll

Trata-se de um banco de dados espectrais proprietário da empresa estadunidense *Bio-Rad Laboratories* (<http://www.knowitall.com>), a qual possui representação no Brasil (www.bio-rad.com) e convênio com algumas universidades para seu uso gratuito. Possui cerca de 1,3 milhões de estruturas e espectros no IV e de RMN. Atualmente, também podem ser acessados *online* através do navegador KnowItAll AnyWare. As buscas podem ser feitas por espectro (formato JCAMP), por estrutura (arquivos Mol, SMILES, entre outros), nome CAS, fórmula molecular, propriedade química, dentre outros (Figura 8). Após a busca ser realizada, uma série de estruturas é retornada juntamente com diversas informações, incluindo referências bibliográficas. É possível visualizar o espectro simulado e seus deslocamentos químicos em uma tabela.

License | Search | Mixture Analysis | Downloads

KnowItAll[®] AnyWare[™]
Spectral Searching Made Easy[™]

Search (1)

Find records that contain...

IR Raman ¹H NMR ¹³C NMR XNMR MS UV-Vis

Any Spectra Any Structures Any Peaks

Search all helds

Compound Name

Molecular Formula

Molecular Weight between and g/mol

Melting Point between and C

Boiling Point between and C

CAS Registry No. Exact Match

Peak Search +/-

None Spectrum Structure

Upload File SMILES/InChI String

F:\FCFRP\papers\know\CASE InChI\NMR\structure\ent\kaurenic acid [Browse]

Sub-Structure Search

Remove from search | Edit

Reset Search

FIGURA 8 | Tela do resultado de busca de espectros do KnowItAll AnyWare a partir de uma estrutura química.

NIST

O NIST (<http://www.sisweb.com/software/ms/nist.htm>) é uma enorme biblioteca comercial de dados de EM, em especial por ionização eletrônica, incluindo também dados de CG e massa/massa (EM/EM). A versão de 2008, denominada de *NIST08*, é fruto de cerca de duas décadas de trabalho. Possui *softwares* para

busca de dados de EM que são capazes de realizar vários tipos de tarefas, tais como visualização, análise e comparação de espectros, bem como integração com vários formatos proprietários de diferentes empresas. O usuário também pode interpretar espectros e construir sua própria biblioteca de dados de EM. Em sua página da internet, além de haver várias informações detalhadas sobre como operar as diferentes ferramentas, o usuário ainda pode pesquisar se os dados espectrais de determinada substância estão presentes na biblioteca, sendo que as buscas podem ser realizadas por meio do nome, número CAS ou fórmula da substância de interesse. Atualmente, existe o NIST MS, uma versão gratuita do NIST 08 que é capaz de gerar informações de subestruturas através de um algoritmo de k-NN que procura por espectros de massas em um enorme banco de dados.

PROCESSAMENTO E ANÁLISE DE ESPECTROS

Há alguns anos as empresas que desenvolviam espectrômetros disponibilizavam suas próprias ferramentas para acessar, visualizar e processar espectros, como EM, IV e RMN. Como, geralmente, as licenças desses programas eram muito caras, o usuário ficava limitado ao uso do computador instalado aos equipamentos. Essa situação começou a mudar quando surgiram os primeiros editores de espectros gratuitos, alguns dos quais posteriormente passaram a ser comercializados, porém com os preços de suas licenças bem mais acessíveis em comparação com aqueles anteriores. Essas ferramentas foram desenvolvidas basicamente para o sistema operacional *Windows* da *Microsoft*, havendo uma menor quantidade de material disponível para os sistemas *Linux* e *Mac OS X* da *Apple*.

A grande maioria, senão todos os programas, além daqueles para visualização de espectros na internet (*applets*), trabalham com arquivos em formato JCAMP-DX. O formato JCAMP (*Joint Committee on Atomic and Molecular Physical Data*), que armazena arquivos com a extensão .dx, é aberto e padrão internacional. Foi inicialmente desenvolvido por pesquisadores da Universidade das Índias Ocidentais da Jamaica para a troca de arquivos de espectros no IV de diferentes equipamentos. Atualmente, seu desenvolvimento e suporte estão sob os cuidados de um comitê especial da IUPAC (<http://www.jcamp-dx.org>). O JCAMP está sendo utilizado até para a troca de arquivos de dados cromatográficos e de EM em técnicas hifenadas. Suporta arquivos de EM, IV e RMN.

Para visualizar e editar espectros no IV existem algumas ferramentas disponíveis, gratuitas ou comerciais, como o aplicativo *online* JSpecView (<http://jspecview.sourceforge.net>) e o módulo do Essential FTIR (<http://www.essentialftir.com>), porém elas não serão discutidas aqui.

Os programas mais populares atualmente para visualizar, processar e analisar espectros de RMN são o *SpinWorks* e o *ACD/NMR Processor*, ambos gratuitos, além do *Mnova NMR*, comercial. Esses programas oferecem a possibilidade de abrir arquivos "fid" mono e bidimensionais obtidos por espectrômetros de diversos fabricantes de equipamentos, realizar transformada de Fourier, visualizar espectros, calibrar espectros com sinais de solventes deutérios, corrigir a fase e a linha de base, realizar expansões, integrar sinais e medir constantes de acoplamento de RMN-¹H, dentre várias outras funções. Além disso, os espectros editados podem ser armazenados em formato JCAMP-DX e exportados como figura para editores de textos, apresentadores e outros programas, inclusive para *applets* da internet.

ACD/NMR Processor

Até meados de 2010 a licença deste programa proprietário da empresa canadense *ACD/Labs* (<http://www.acdlabs.com>) era paga, sendo que passou a ser oferecido gratuitamente a acadêmicos, bastando baixar o arquivo de sua página da internet. O programa possui todas as funcionalidades comuns para esse tipo de editor que foram descritas no parágrafo anterior. Oferece ainda a possibilidade de associar uma estrutura química ao espectro para realizar a atribuição de sinais de seus átomos e também gerar relatórios que podem ser armazenados, dentre outras funções. A interface é bem moderna e os *menuss* são intuitivos, o que facilita o usuário abrir e editar rapidamente um espectro (Figura 9).

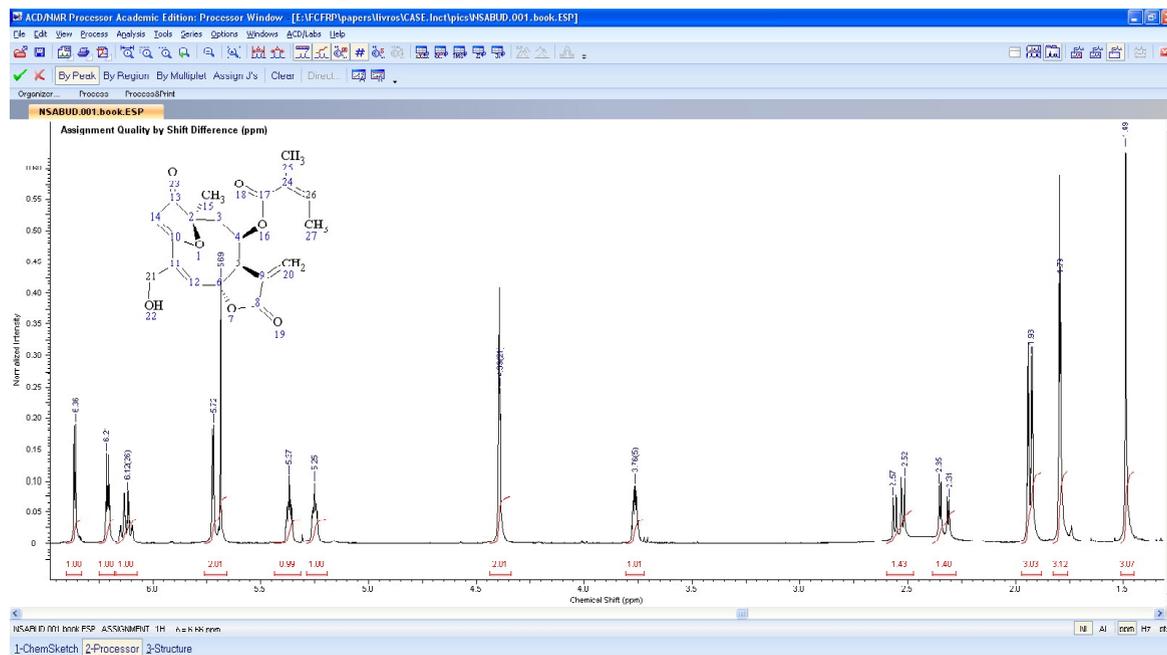


FIGURA 9 | ACD/NMR Processor operando com um espectro de RMN-¹H de uma substância.

Mnova NMR

Desenvolvido pela empresa espanhola *MestreLab Research* (<http://mestrelab.com>), esta ferramenta multiplataforma evoluiu a partir do MestReC, anteriormente distribuído de forma gratuita pela Universidade de Santiago de Compostela. Hoje é comercializado como Mnova NMR e sua versão *Standard/Lite* está disponível no ChemDraw Ultra 12.0 Suite da empresa *CambridgeSoft*. Possui várias suítes e *plugins* que podem ser instalados a um preço adicional, como o módulo para realizar previsões de RMN (NMRPredict Desktop). A empresa criou diferentes versões para serem instaladas nos sistemas operacionais *Windows*, *Linux* e *Mac OS X*. Também possui as mesmas funcionalidades comuns para esse tipo de editor as quais foram descritas anteriormente nesta seção, além da possibilidade de associar uma estrutura química ao espectro para realizar a atribuição de sinais de seus átomos, comparar diferentes espectros superpostos em série, remover sinais de artefatos, de impurezas e de solventes, bem como realizar a desconvolução e resolução de multipletos sobrepostos.

PROGRAMAS, GERADORES E SISTEMAS ESPECIALISTAS

Nesta seção são discutidas algumas das ferramentas mais populares que estão disponíveis ao usuário, em especial aquelas para trabalhar com dados de RMN.

ACD/Predictor, -/Elucidator,- /MS Fragmenter, -/MS Processor e -/MS Manager

Estes programas proprietários são comercializados pela empresa *ACD/Labs*. O ACD/Predictor realiza previsões de deslocamentos químicos e simula espectros de RMN com diferentes núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F e ^{31}P). As estruturas podem ser desenhadas com o editor gratuito ACD/ChemSketch ou importadas por meio de uma enorme variedade de formatos. Possui um banco de dados com mais de 420.000 estruturas, cerca de 1,7 milhões de fragmentos e subspectros, e mais de 4,3 milhões de deslocamentos químicos, constituindo um dos maiores bancos de dados comercialmente disponíveis. O *software* possui uma tabela de fragmentos estruturais associados a seus respectivos deslocamentos químicos, o que o torna bastante eficaz. As previsões são baseadas em redes neurais, código HOSE, regras de incremento e métodos baseados em fragmentos, levando em consideração a estereoquímica, hidrogênios diastereotópicos e até tautômeros. Oferece uma variedade de opções de solventes deuterados para realizar previsões de RMN- ^1H e ^{13}C . É um dos poucos *softwares* capazes de realizar previsões de espectros 2D (^1H - ^{13}C e ^1H - ^{15}N em COSY, HSQC, HSQC-DEPT, HMQC, HMBC, entre outros) e com a possibilidade do usuário treinar previsões com seu próprio conjunto de dados experimentais. Realiza previsões de constantes de acoplamento de RMN- ^1H e, em uma mesma tela, compara os espectros, experimental e simulado, de uma dada estrutura, uma vez que o programa também é capaz de processar espectros de RMN.

O ACD/Elucidator é um dos mais completos pacotes na atualidade para realizar rotinas completas de elucidação estrutural de substâncias desconhecidas a partir de seus dados espectrais, sendo um genuíno sistema especialista. Possui em sua interface o mesmo banco de dados do ACD/Predictor. Processa os mais variados tipos de arquivos de espectros no UV, IV, RMN e EM, incluindo os bidimensionais. Realiza todas as etapas de elucidação estrutural descritas na seção Metodologias, Técnicas Computacionais e Algoritmos, como a busca por estruturas e fragmentos em bancos de dados, geração de estruturas com base em dados espectrais (IV, RMN) e previsões de deslocamentos químicos de RMN. Recentemente, os pesquisadores envolvidos no projeto de desenvolvimento desse sistema realizaram grandes melhoras no produto e inúmeros detalhes experimentais foram descritos e comentados (ELYASHBERG *et al.*, 2010).

Além desses programas e de outros relacionados a RMN, a empresa também comercializa três aplicativos que operam com espectros de massas: o MS Fragmenter, o MS Processor e o MS Manager. O primeiro realiza previsões de fragmentos de massa a partir de uma dada estrutura química e da técnica de ionização selecionada. Seu algoritmo é baseado em regras clássicas de fragmentação, como em reações químicas, e que são consideradas clássicas conforme discutido na seção Espectrometria de Massas. O segundo programa, além de processar espectros de vários fabricantes de espectrômetros, também atribui fragmentos estruturais a picos, relaciona fragmentos estruturais a espectros e possui um algoritmo denominado CODA (*Component Detection Algorithm*) para atenuar o ruído de espectros. Já o terceiro serve para processar, interpretar e armazenar espectros de quaisquer espectrômetros, além de possibilitar a elaboração de bancos de dados para consultas posteriores.

NMRPredict Desktop e MNova MS

O módulo de predição destes programas são *plugins* que podem ser adquiridos a um preço adicional e incorporados ao processador MNova NMR discutido anteriormente. Na realidade o módulo NMRPredict Desktop é um programa desenvolvido e também comercializado pela empresa britânica *ModGraph Consultants Ltd.* (<http://www.modgraph.co.uk>) que comercializa o ModGraph. O algoritmo de predição de RMN ^{13}C do NMR Predict Desktop – e também do ModGraph – é o mesmo do CSEARCH, que em sua estrutura utiliza uma associação entre código HOSE e redes neurais, conforme discutido nas seções Metodologias, Técnicas Computacionais e Algoritmos e Bancos de Dados. Já o algoritmo para predições de RMN- ^1H incorpora os esforços de outros pesquisadores que desenvolveram metodologias diferentes, tais como a parametrização de grupos funcionais e cálculos de campos de força.

O NMRPredict Desktop possui uma GUI moderna e intuitiva. Através dele é possível importar estruturas no formato Mol, realizar predições de deslocamentos químicos e simular espectros de RMN com diferentes núcleos (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{31}P , ^{17}O e ^{29}Si), levando em conta a estereoquímica e hidrogênios diastereotópicos. Também realiza predições de constantes de acoplamento de RMN- ^1H e, em uma mesma tela, compara espectros experimentais com os simulados de uma dada estrutura química (Figura 10). Oferece uma variedade de opções de solventes deuterados para realizar predições de RMN- ^1H . Também é possível visualizar e exportar para editores de texto uma tabela com os dados das predições efetuadas.

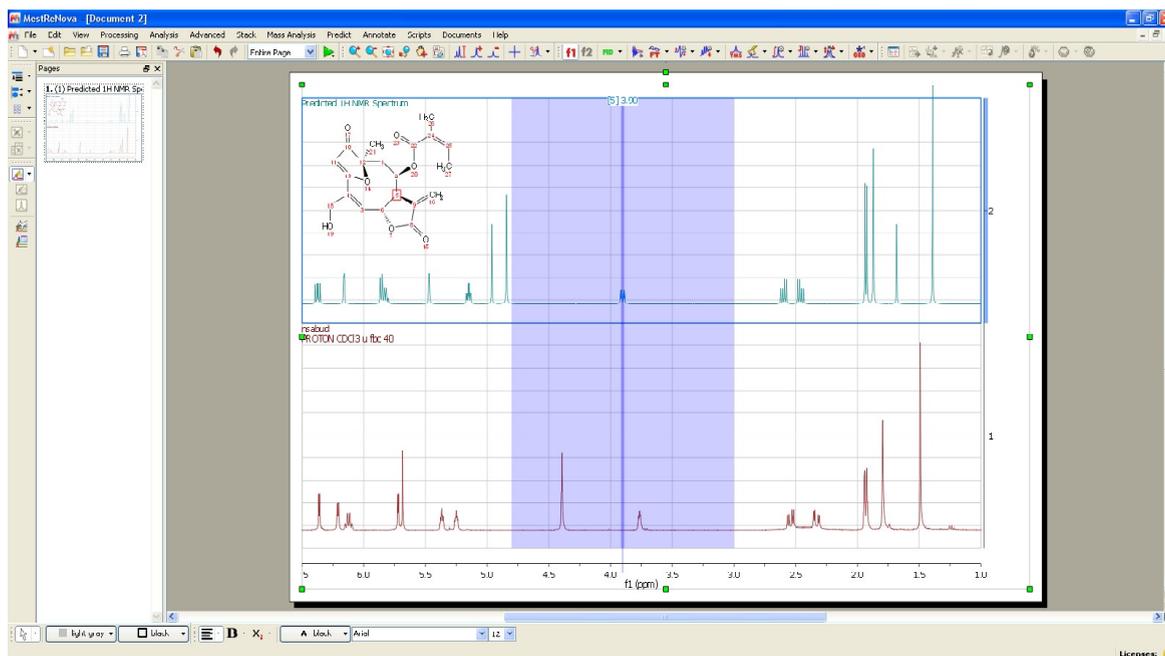


FIGURA 10 | A simulação do espectro de uma estrutura química (espectro superior) e a comparação com seu espectro experimental (espectro inferior) realizadas pelo NMRPredict Desktop da *Mnova*.

HyperChem Professional 8.0

Este programa, desenvolvido pela empresa estadunidense *Hypercube, Inc.* (<http://www.hyper.com>), possui diferentes versões e é bastante diferente dos editores de estruturas comuns que foram discutidos anteriormente. Ele oferece uma gama imensa de possibilidades para realizar trabalhos mais elaborados com as estruturas químicas. Dentre elas, pode-se citar os estudos de química quântica e de mecânica molecular, tais como a otimização de estruturas, análise de dinâmica molecular, modelagem molecular em geral e demais funcionalidades como alguns cálculos de parâmetros físico-químicos, por exemplo energia de HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*). Uma das possibilidades é a de se realizar previsões de deslocamentos químicos de RMN (Figura 12).

Para o cálculo, utiliza-se o módulo "Invoke NMR" em "Compute". Esse módulo também pode ser obtido separadamente pela página <http://www.hallogram.com/science/hypernmr/index.html>. Nesse, os espectros de NMR podem ser obtidos em duas etapas sequenciais. Inicialmente, são calculados o campo magnético e as constantes de acoplamento dos *spins* entre os núcleos para qualquer núcleo selecionado do sistema molecular, usando uma descrição de mecânica quântica da estrutura eletrônica. Na segunda etapa, calcula-se as frequências e as intensidades do espectro de RMN entre os resultados da etapa anterior. Além disso, o módulo permite uma variedade de opções para visualizar os resultados de cada uma das duas etapas. O programa realiza a minimização de energia para otimizar a geometria em 3D da estrutura para posteriormente se obter os valores de RMN. Dependendo do tamanho e da complexidade da estrutura, esse processo pode ser extremamente custoso se for levado em consideração o tempo gasto com o computador, o que pode vir a ser uma desvantagem. Este *software*, assim como os demais, abre os arquivos codificados das estruturas em vários formatos: .hin do próprio *software*, .skc do Symyx Draw, .mol da MDL, .mol2 da Tripos e .pdb, dentre outros.

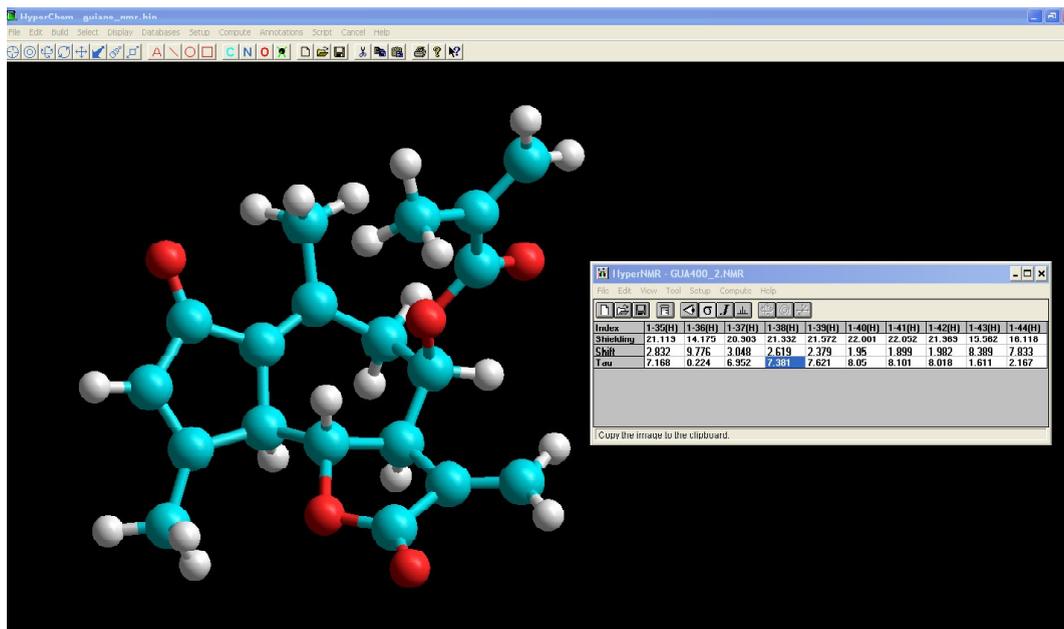


FIGURA 12 | HyperChem Professional 8.0 e o módulo *Invoke NMR* que calcula as previsões de deslocamentos químicos de RMN de uma estrutura química.

Spartan '08

Desenvolvido pela empresa estadunidense *Wavefunction, Inc.* (<http://www.wavefun.com>), sua estrutura e funções são bastante similares às do HyperChem Professional, descrito anteriormente. Essa versão calcula os deslocamentos químicos de carbono e de próton a partir de modelos Hartree-Fock e DFT. Assim como HyperChem, o tempo computacional do Spartan '08 também pode ser alto dependendo do tamanho e complexidade da estrutura. Entretanto, realiza estudos minuciosos com as estruturas químicas em 3D. Como exemplos, podem-se citar cálculos de energia, equilíbrio de geometria, geometria do estado de transição, análise conformacional, espectros no IV e de UV-visível, dentre outros. Esse programa também reconhece diversos formatos de arquivos como o .spartan, .mol, .pdb e .mol2.

Além do espectro obtido graficamente (Figura 13), pode-se obter os valores de deslocamentos químicos, tabelados dentro do arquivo da molécula no formato .spartan, os quais podem ser copiados e transferidos para uma tabela.

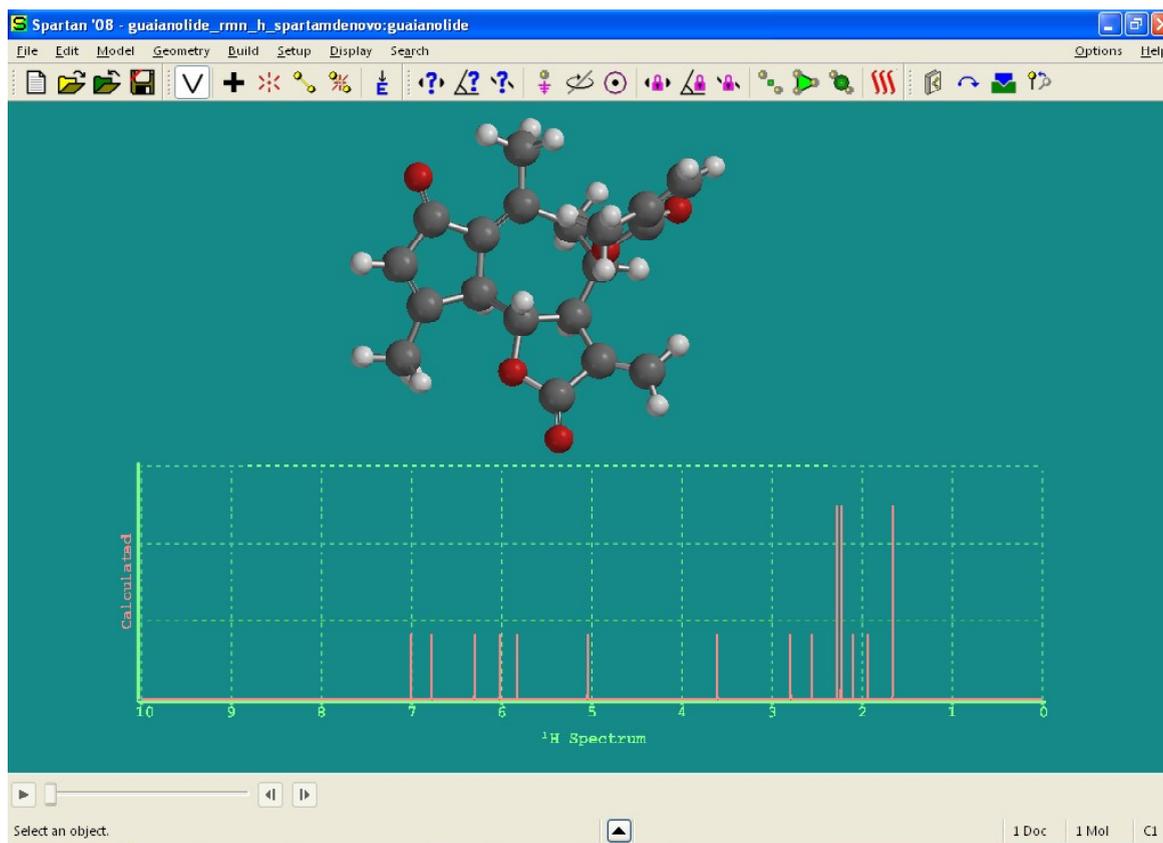


FIGURA 13 | Tela do Spartan '08 e predições de deslocamentos químicos de RMN obtidas por cálculos *ab initio* a partir de uma estrutura química.

SPINUS-WEB

Esta ferramenta proprietária *online* e de acesso livre na internet (<http://www.dq.fct.unl.pt/spinus>) realiza previsões de deslocamentos químicos, simula espectros de RMN-¹H e estima constantes de acoplamento. Foi desenvolvida sob a liderança do pesquisador português João Aires de Sousa, da Universidade Nova de Lisboa, e implementada em linguagem *Java*, sendo versátil, fácil de operar e bastante confiável (BINEV & AIRES-DE-SOUSA, 2004).

O usuário pode desenhar a estrutura no editor Marvin Applet (Figura 14) ou importá-la em vários formatos. Em seguida, basta pressionar o botão “Predict full proton NMR spectra” para obter os resultados (Figura 15). Os cálculos das previsões são baseados em redes neurais e realizados com as estruturas 3D cujas coordenadas são previamente geradas no servidor por intermédio de um programa específico, o CORINA, da empresa alemã *Molecular-Networks* (<http://www.molecular-networks.com>). Apesar do algoritmo ser relativamente simples e do programa ser de acesso livre, o SPINUS-WEB é uma poderosa ferramenta para realizar previsões que considera a estereoquímica, prótons –CH₂– diasterotópicos e rígidos de anéis. As instruções para utilizar essa ferramenta bem como dados adicionais estão disponíveis em sua própria página da internet.

Como resultados, além das previsões, o usuário também obtém as estruturas em 2D e 3D, que são visualizadas e editadas com o *plug-in* MDL Chime (hoje da *Accelrys-Symyx*), o qual deve estar previamente instalado no navegador. São obtidas também duas tabelas, uma com os deslocamentos químicos e outra com as constantes de acoplamento em Hz, além do espectro simulado (Figura 15). Tanto as tabelas como o espectro podem ser importados e armazenados como arquivos de texto (.txt) e JCAMP-DX (.dx), respectivamente.

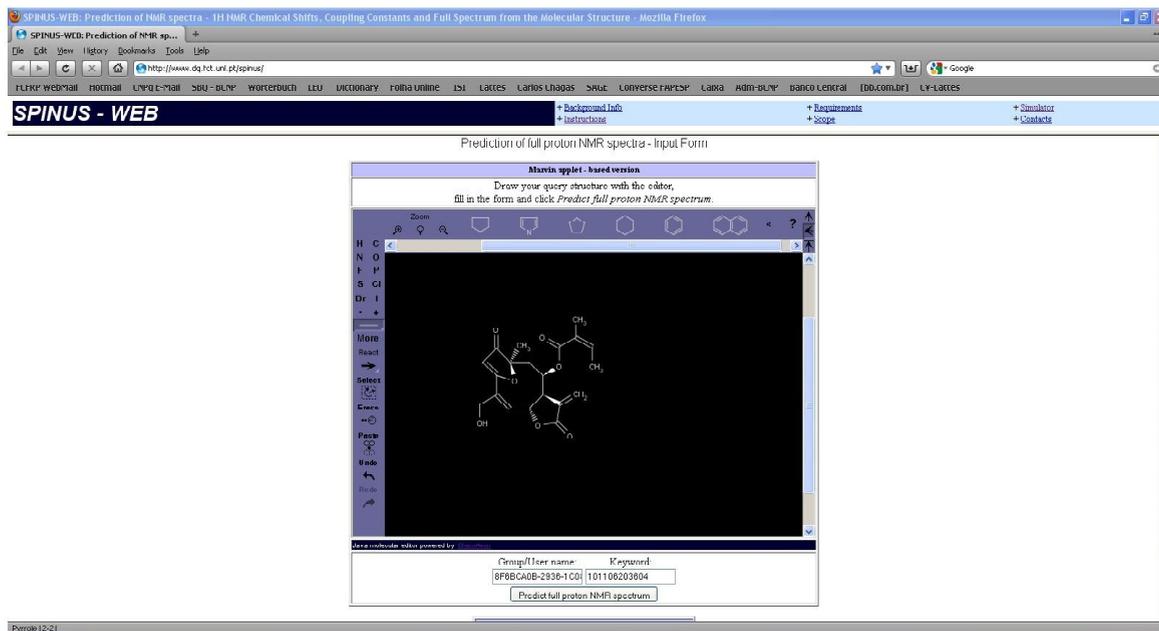


FIGURA 14 | Tela inicial do SPINUS-WEB com o *Marvin applet* para desenhar ou importar, em diferentes formatos, a estrutura química cujas previsões serão realizadas.

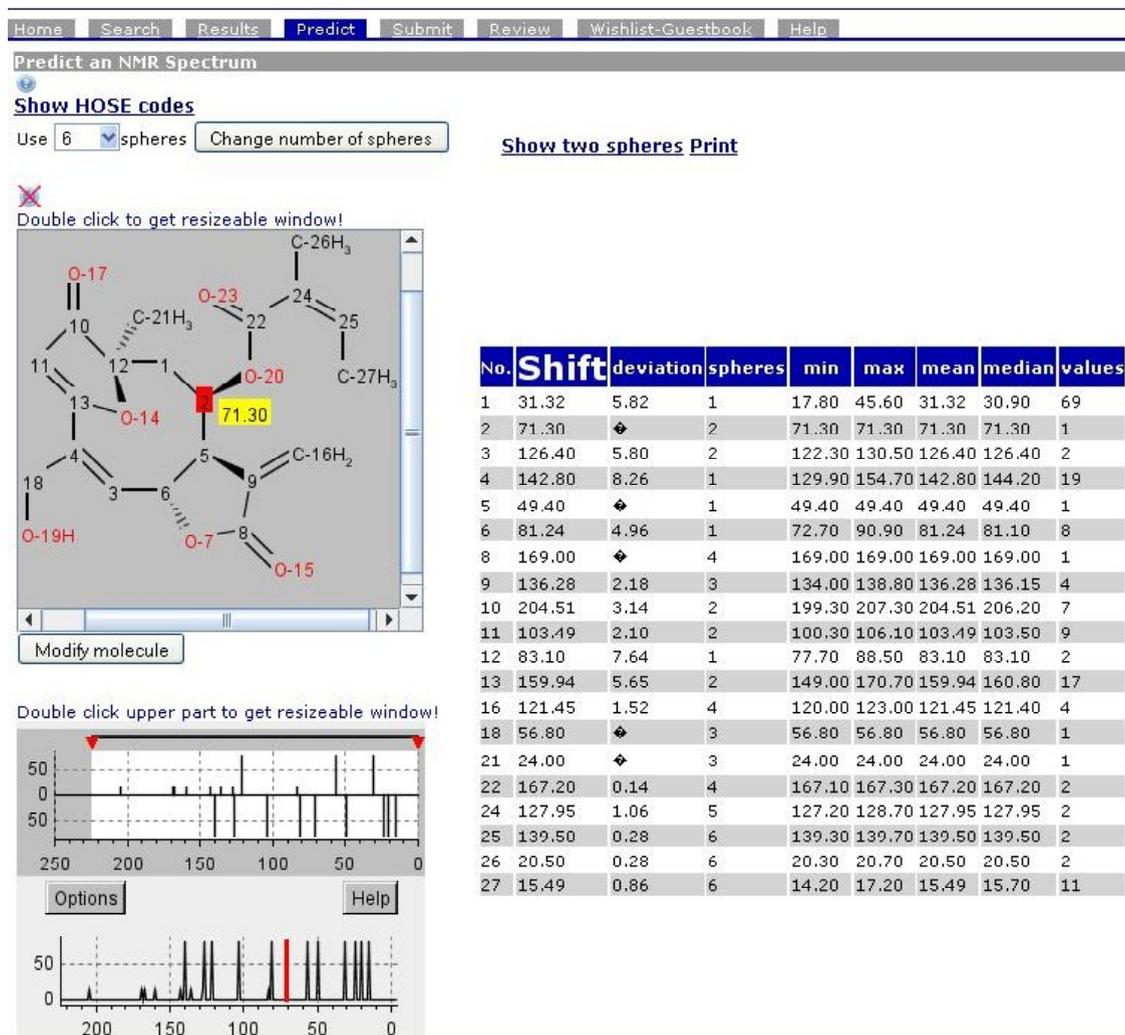


FIGURA 16 | Resultado da predição de deslocamentos químicos de RMN-¹³C de uma estrutura química realizada com o NMRShiftDB, apresentando a estrutura (à esquerda, ao topo), o espectro simulado (à esquerda, embaixo) e a tabela com os deslocamentos (à direita).

SISTEMAT

O sistema especialista SISTEMAT foi desenvolvido por um grupo de pesquisadores brasileiros para a elucidação estrutural de produtos naturais e utiliza, especialmente, dados de RMN ¹³C. Entre os resultados fornecidos pelo sistema, os fragmentos estruturais e o provável esqueleto da estrutura são frequentemente apresentados com elevados índices de acerto. O sistema é executado em plataforma *Windows* ou *DOS*, ambos da *Microsoft*. Foi concebido originalmente em linguagem FORTRAN e a seguir em PASCAL para melhorar a interface com o usuário.

O banco de dados do SISTEMAT é extremamente compacto, onde 3.000 estruturas químicas ocupam um espaço menor de 1,0 MB. O sistema é formado por diversos módulos, dentre eles o DATASIS, que executa a inserção de dados no banco; SISBOTA e SISTAX, que realizam a análise e extração de dados botânicos; REGRAS e SISCONST, que são responsáveis pela busca de dados espectrométricos (GASTMANS *et al.*, 1990). O SISCONST trabalha com dados de RMN ^{13}C e utiliza-os para procurar por subestruturas compatíveis com o espectro problema.

MÉTODOS *IN SILICO* PARA ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS: APLICAÇÕES EM PRODUTOS NATURAIS E METABOLÔMICA

Nesta seção serão descritas aplicações de métodos *in silico* para elucidação estrutural de substâncias na área de produtos naturais e metabólômica envolvendo estudos de caso.

Na área de produtos naturais, a aplicação de métodos *in silico* como ferramenta para a elucidação estrutural de substâncias tem crescido bastante e os métodos empregados tem evoluído. Há alguns anos, passou a ser comum realizar modelagem molecular por meio do cálculo de campos de força e estudos conformacionais com algumas estruturas. Os resultados desses estudos de dinâmica e mecânica molecular eram aliados a dados experimentais de RMN, como por exemplo NOE e constantes de acoplamento, no sentido de auxiliar na determinação da estereoquímica relativa e estabelecer a conformação de algumas estruturas (SPRING *et al.*, 2001). Relativamente simples, essa prática tem sido realizada até os dias de hoje e trazido bons resultados, sendo que para tal existem vários programas e pacotes disponíveis, como o próprio Hyperchem (seção Programas, Geradores e Sistemas Especialistas). Existem, atualmente, trabalhos similares de mecânica quântica envolvendo cálculos teóricos de deslocamentos químicos e constantes de acoplamento (CONTRERAS *et al.*, 2009), enquanto que na EM ela tem auxiliado no estudo dos processos químicos envolvidos em fragmentações (VESSECCHI *et al.*, 2008).

Recentemente, o interesse dos químicos de produtos naturais por bancos de dados espectrais e programas para realizar predições e simulações de espectros tem aumentado, estimulando a academia e as companhias do setor a suprirem tais necessidades. Atualmente, a oferta de ferramentas para auxílio à elucidação estrutural por meio de métodos *in silico* tem sido considerável e tanto a comunidade científica como o setor empresarial que realizam rotinas de elucidação de estruturas passaram a aceitá-las com mais naturalidade. O grande gargalo ainda continua sendo a carência de bons geradores de estruturas, os quais, a partir de dados espectrais, fornecem propostas convincentes de estruturas ou subestruturas, ou mesmo sistemas CASE generalistas, funcionais e totalmente automáticos. Embora várias publicações acadêmicas a respeito deste tema tenham surgido, os produtos ainda não podem ser publicamente testados e tampouco comercializados (STEINBECK, 2004; ELYASHBERG *et al.*, 2010). Deve ser lembrado que um químico de produtos naturais não está encarregado de desenvolver algoritmos ou aplicativos para elucidação estrutural, mas sim gerar e fornecer dados e suporte para que essas ferramentas possam ser cada vez mais aprimoradas.

Na área de metabólômica de plantas a situação é diferente, pois as ferramentas realmente necessárias são as mais difíceis de serem desenvolvidas, havendo muito poucas disponíveis. O grande desafio nos estudos de metabólômica é trabalhar com matrizes biológicas contendo misturas complexas de metabólitos. Logo, as ferramentas *in silico* para auxílio à desrepliação e elucidação estrutural nestes estudos devem considerar esse fato.

A análise metabolômica propriamente dita ainda é inviável, pois seu objetivo é detectar e quantificar todos os metabólitos em um organismo. Segundo alguns autores (VERPOORTE *et al.*, 2005), os estudos de metabolômica podem ser classificados basicamente em três grupos: aqueles que utilizam métodos cromatográficos (CLAE e CG), os que são baseados em peso molecular (EM) e os que se valem de características físicas (RMN), cada qual com suas vantagens e limitações. Os objetivos desses estudos podem ser variados, por exemplo com foco na identificação de uma determinada classe de substâncias em um organismo (*metabolic profilig*), ou análise da impressão digital de metabólitos em um organismo sem se preocupar com sua identificação (*metabolic fingerprinting*). A combinação de diferentes métodos, como as técnicas hífenadas CLAE-EM e CG-EM, também é bastante empregada, ao passo que a CLAE-RMN ainda é pouco usada (VERPOORTE *et al.*, 2005; VAN DER KOOY, 2009). Tais características dos estudos de metaboloma fazem com que o desenvolvimento de métodos *in silico* para elucidação estrutural seja realmente um grande desafio.

Nesse contexto, com relação a EM, atualmente tem-se tentado associar ferramentas de predição de fragmentações de estruturas a bancos de dados, mas como foi descrito na seção denominada Espectrometria de Massas, ainda há pouco material confiável disponível, sendo que ao usuário restam praticamente os bancos de dados, os quais são bastante utilizados em metabolômica.

No caso de RMN, conforme discutido na seção Ressonância Magnética Nuclear, tem havido interesse em desenvolver ferramentas capazes de realizar a subtração de espectros simulados daqueles obtidos experimentalmente de misturas, o que é muito importante em estudos de metaboloma. Por exemplo, substâncias comuns como ácidos orgânicos do ciclo de Krebs, aminoácidos e carboidratos já são facilmente identificados em matrizes biológicas com base em seus deslocamentos químicos. Uma outra abordagem interessante seria, a partir dos sinais de RMN de uma mistura, gerar estruturas compatíveis e obter seus respectivos espectros simulados para em seguida subtraí-los sucessivamente do espectro da mistura. Entretanto, ferramentas com essa finalidade ainda não estão disponíveis. Os maiores problemas quando se utiliza RMN-¹H para a identificação de substâncias são a sobreposição de sinais e os seus multipletos, o que congestiona demais os espectros. Nesses casos, inicialmente os dados espectrais são extraídos e analisados por métodos quimiométricos ou de estatística multivariada, tais como Análise dos Componentes Principais (PCA) ou regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS), com intuito de reconhecer padrões e encontrar sinais discriminantes para alguns marcadores e, portanto, poder comparar grupos de amostras com base em seus constituintes. Embora os sinais de RMN-¹³C sejam cruciais para a determinação estrutural, fornecendo o esqueleto básico das estruturas, o problema passa a ser baixa sensibilidade e os longos tempos de relaxação. Assim, no caso de RMN em metabolômica, o uso de experimentos bidimensionais como COSY, TOCSY, J-RES, HSQC e HMBC são bastante importantes (VAN DER KOOY, 2009). Entretanto, mesmo com todo esse aparato, ainda há limitações.

Em suma, atualmente o que mais há em oferta para estudos de metaboloma são as ferramentas *in silico* que dão suporte à desreplicação e análise de dados, tais como bancos de dados e *softwares* para manipular dados, realizar o processo de desconvolução e análises estatísticas, quimiométricas ou outras técnicas de modelagem. Uma área que necessita evoluir mais e que pode ser uma grande aliada dos métodos de desreplicação é a predição de tempos de retenção cromatográficos para CLAE e CG, realizada por meio de estudos de QSRR (*Quantitative Structure-Retention Relationship*). Utilizando descritores estruturais diversificados e métodos de predição com base em IA (ver item intitulado Metodologias, Técnicas Computacionais e Algoritmos e Figura 4), a QSRR tem funcionado bem para a geração de modelos de predição de tempos de retenção de estruturas análogas e congênicas, porém ainda tem deixado a desejar no caso de predição para estruturas diversas. Modelos de QSRR são importantes e podem auxiliar na desreplicação, por exemplo, ao gerar tempos de retenção de estruturas oriundas de bancos de dados virtuais ou das que são propostas a partir de dados experimentais de EM ou RMN. Assim, os tempos de retenção experimentais provenientes de CLAE-EM e os calculados por QSRR podem ser comparados e as estruturas cujos tempos estiverem muito fora de uma janela preestabelecida podem ser descartadas. Um outro aspecto

que deixa a desejar na área de QSRR é que a maioria dos trabalhos são acadêmicos e os dados não são disponibilizados para validação em sistemas de acesso livre ou comerciais (KIND & FIEHN, 2010).

Como o emprego de ferramentas *in silico* para elucidação estrutural de substâncias em estudos de metabolômica ainda carece de evolução, nesta seção optou-se por demonstrar, por intermédio de estudos de caso, uma das etapas da elucidação estrutural que atualmente tem sido mais difundida na comunidade de produtos naturais: a predição de dados espectrais.

Foram selecionadas duas estruturas para revelar o potencial de predição de alguns programas comentados anteriormente (seção Programas, Geradores e Sistemas Especialistas) e os resultados obtidos são apresentados a seguir. Nesse estudo de caso, a intenção é revelar ao leitor a capacidade de cada programa em executar as predições, bem como demonstrar como pode ser realizada uma avaliação de resultados. De forma alguma os autores estão preocupados em apontar qual é o melhor ou pior programa pois, para tal, outros tipos de análises deveriam ser realizadas e uma gama enorme de deslocamentos químicos deveria ser estimado.

Para realizar as predições, foi selecionada a estrutura de uma lactona sesquiterpênica do tipo guaianolido e a de um diterpeno do tipo pimarano, as quais possuem elevado grau de complexidade estrutural, contendo centros quirais, hidrogênios diasterotópicos $-CH_2-$, fusão de anéis e núcleos com diferentes graus de hibridização (Figura 17), além de terem seus dados de RMN publicados na literatura. Estas duas estruturas pertencem a classes de metabólitos secundários que são encontradas em plantas medicinais e que possuem importantes atividades farmacológicas, sendo o guaianolido um anti-inflamatório (SCHORR *et al.*, 2002) e o pimarano antiespasmódico (AMBRÓSIO *et al.*, 2005), antimicrobiano (PORTO *et al.*, 2009) e tripanocida (AMBRÓSIO *et al.*, 2008). Para a lactona sesquiterpênica foram avaliados os resultados da predição de deslocamentos químicos de RMN- 1H (SCHORR *et al.*, 2002) e para o ácido *ent*-pimaradienóico foram avaliados os resultados da predição de deslocamentos químicos de RMN- ^{13}C (MATSUO *et al.*, 1976). A seleção das predições de RMN- 1H e ^{13}C para essas duas estruturas foi feita com finalidade didática pois, neste estudo de caso, cada uma das duas modalidades de RMN é mais adequada e, portanto, mais informativa, para cada uma das estruturas em questão.

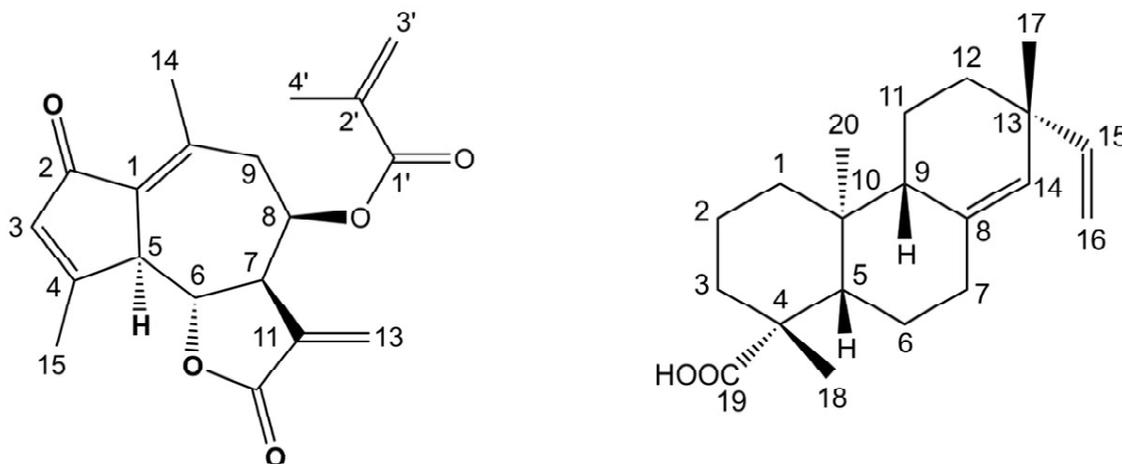


FIGURA 17 | Estruturas químicas da lactona sesquiterpênica do tipo guaianolido (à esquerda) e do diterpeno ácido *ent*-pimaradienóico (à direita).

Os resultados das predições de RMN para ambas as estruturas, utilizando programas de computador, foram comparados aos respectivos deslocamentos químicos experimentais através do erro médio absoluto (EMA) descrito anteriormente (seção Ferramentas, Sistemas e Programas para Elucidação Estrutural *in Silico*). Como ferramentas para as predições de RMN-¹H foram utilizados o SPINUS-WEB e os módulos de predição do ChemDraw, MNova, HyperChem Professional 8.0 e Spartan '08. Para as predições de RMN-¹³C foram utilizados os módulos de predição do NMRShiftDB, ChemDraw, MNova, HyperChem Professional 8.0 e Spartan '08.

Os deslocamentos químicos experimentais, publicados na literatura e aqueles obtidos nas predições de RMN-¹H, estão inseridos na Tabela 1, enquanto que os de RMN-¹³C encontram-se na Tabela 2. Na última linha de cada tabela estão os respectivos EMA calculados.

Com base nas análises realizadas neste estudo de caso, o programa SPINUS-WEB foi o que obteve melhor desempenho para predições de RMN-¹H (Tabela 1), enquanto o NMRPredict Desktop da *MNova* foi o melhor para predições de RMN-¹³C (Tabela 2). Nas duas tabelas pode-se observar ainda, para qual, tipo de núcleo de cada estrutura foram obtidas as melhores predições realizadas por cada ferramenta. O que pode ser analisado a partir dos resultados é que, em geral, os métodos, utilizando cálculos quânticos, obtiveram erros maiores do que os outros métodos, principalmente nos dados de RMN-¹³C para os núcleos com hibridização sp².

Os métodos quânticos levam em conta a rotação e a vibração das moléculas que são calculados a partir da geometria e têm influência direta nos dados de RMN, como também as forças intermoleculares e o efeito do solvente. Todos esses fatores devem ser considerados além do método *ab initio* escolhido, sendo ainda fatores limitantes a memória da máquina e o tempo computacional. Nesse estudo, o método *ab initio* empregado foi o Hartree-Fock com a base 6-31G* para o HyperChem e o Spartan, utilizando-se um microcomputador com processador *Intel Core 2 Duo* com 1,86 GHz e 2,0 GB de memória RAM. Foram gastas, aproximadamente, cinco horas para realizar o cálculo de cada estrutura. No programa HyperNMR foi utilizado o método semiempírico TNDO/2 (*Typed Neglect of Differential Overlap*) para os cálculos das propriedades eletrônicas. Esses métodos estão sendo constantemente pesquisados e modificados para melhor predizerem propriedades moleculares, incluindo os valores de RMN, utilizando um menor custo computacional.

Um ponto importante a ser destacado nas predições de deslocamentos químicos de RMN-¹H do guaianolido (Tabela 1) é que em todas elas os dois pares de hidrogênio metilênicos geminais H13a/H13b e H3'a/H3'b foram diferenciados, assim como hidrogênios diasterotópicos H9a/H9b. Nesses três pares de hidrogênios, o destaque é que seus valores experimentais em alto e baixo campos tiveram seus valores correspondentes preditos na mesma ordem. Os hidrogênios das duas metilas alílicas H14 e H15, com deslocamentos químicos experimentais idênticos, tiveram predições bastante razoáveis. A atribuição do H8 é sempre problemática em lactonas sesquiterpênicas e, nesse estudo de caso, apenas o SPINUS-WEB teve um bom desempenho. O par H5/H7 nesse tipo de guaianolido possui deslocamentos químicos bem próximos e os resultados foram melhores para o SPINUS-WEB e o ChemDraw. Chama atenção o fato de que, embora a maioria das predições tenham sido satisfatórias, o erro médio absoluto calculado para o SPINUS-WEB ($\bar{A} = 0,14$ ppm) foi cerca de duas a três vezes menor do que os erros do ChemDraw ($\bar{A} = 0,36$ ppm), MNova ($\bar{A} = 0,43$ ppm) e Spartan ($\bar{A} = 0,48$ ppm), e mais de cinco vezes menor que o do HyperChem ($\bar{A} = 0,77$ ppm).

TABELA 1 - Deslocamentos químicos de RMN-¹H experimentais^a e calculados para o guaianolido e as diferenças (Δ) entre os dados experimentais e os calculados (valores em ppm).

H	Exp	Mno	Cdr	Spi	Spa	Hyp	Δ_{Mno}	Δ_{Cdr}	Δ_{Spi}	Δ_{Spa}	Δ_{Hyp}
3	6,23	5,85	6,12	6,07	6,30	7,72	0,38	0,11	0,16	0,07	1,49
5	3,54	3,84	3,44	3,64	2,80	3,7	0,30	0,10	0,10	0,74	0,16
6	4,09	5,45	4,05	4,35	3,61	5,04	1,36	0,04	0,26	0,48	0,95
7	3,15	3,68	3,34	3,04	2,11	2,57	0,53	0,19	0,11	1,04	0,58
8	5,75	5,26	4,02	5,92	5,05	4,49	0,49	1,73	0,17	0,70	1,26
9 α	2,74	2,38	2,08	2,29	1,94	1,41	0,36	0,66	0,45	0,80	1,33
9 β	2,86	2,64	2,33	2,62	2,56	2,08	0,22	0,53	0,24	0,30	0,78
13a	5,55	5,47	5,58	5,65	5,83	6,55	0,08	0,03	0,10	0,28	1,00
13b	6,24	6,16	6,15	6,33	6,78	6,69	0,08	0,09	0,09	0,54	0,45
14	2,35	1,96	1,71	2,25	2,24	1,41	0,39	0,64	0,10	0,11	0,94
15	2,35	1,96	1,71	2,23	2,28	2,70	0,39	0,64	0,12	0,07	0,35
3'a	5,07	6,48	6,15	6,06	7,01	5,37	0,51	0,18	0,09	1,04	0,59
3'b	5,57	6,40	5,58	5,56	6,03	5,25	0,83	0,01	0,01	0,46	0,32
4'	1,86	2,01	1,93	1,87	1,94	1,30	0,15	0,07	0,01	0,08	0,56
EMA ^b	-	-	-	-	-	-	0,43	0,36	0,14	0,48	0,77

^adados experimentais = Exp (SCHORR *et al.*, 2002); Mno = NMR Predict Desktop da *Mnova*; Cdr = ChemNMR do ChemDraw; Spi = SPINUS-WEB; Spa = Spartan '08; Hyp = HyperChem Professional 8.0; ^bEMA = erro médio absoluto em ppm.

As predições para deslocamentos químicos de RMN-¹³C, de modo geral, também foram boas, destacando-se o MNova e o NMRShiftDB com os menores valores para o EMA, seguido de perto pelo ChemDraw. Cada um desses três programas apresentou pelo menos um valor de erro elevado para um núcleo: o MNova para o C5 ($\Delta = 5,0$ ppm), o NMRShiftDB para o C7 ($\Delta = 8,6$ ppm) e o ChemDraw para as metilas C18 e C20 ($\Delta = 8,4$ e $7,2$ ppm, respectivamente). Os valores de erro próximos a $\pm 10,0$ ppm são considerados elevados para predições de RMN-¹³C e aqueles próximos a $\pm 1,0$ ppm são considerados excelentes. Segundo esse critério, 60% dos deslocamentos preditos pelo MNova e NMRShiftDB ficaram entre $\pm 1,0$ ppm, enquanto que o ChemDraw ficou com 45%. Conforme mencionado anteriormente, a causa dos valores de erros mais elevados do Spartan e do HyperChem foi devido às predições pouco satisfatórias para os núcleos com hibridização sp^2 .

TABELA 2 - Deslocamentos químicos de RMN-¹³C experimentais^a e calculados para o diterpeno e as diferenças (Δ) entre os dados experimentais e os calculados (valores em ppm).

H	Exp	Mno	Cdr	Spi	Spa	Hyp	Δ_{Mno}	Δ_{Cdr}	Δ_{Spi}	Δ_{Spa}	Δ_{Hyp}
3	6,23	5,85	6,12	6,07	6,30	7,72	0,38	0,11	0,16	0,07	1,49
5	3,54	3,84	3,44	3,64	2,80	3,7	0,30	0,10	0,10	0,74	0,16
6	4,09	5,45	4,05	4,35	3,61	5,04	1,36	0,04	0,26	0,48	0,95
7	3,15	3,68	3,34	3,04	2,11	2,57	0,53	0,19	0,11	1,04	0,58
8	5,75	5,26	4,02	5,92	5,05	4,49	0,49	1,73	0,17	0,70	1,26
9 α	2,74	2,38	2,08	2,29	1,94	1,41	0,36	0,66	0,45	0,80	1,33
9 β	2,86	2,64	2,33	2,62	2,56	2,08	0,22	0,53	0,24	0,30	0,78
13a	5,55	5,47	5,58	5,65	5,83	6,55	0,08	0,03	0,10	0,28	1,00
13b	6,24	6,16	6,15	6,33	6,78	6,69	0,08	0,09	0,09	0,54	0,45
14	2,35	1,96	1,71	2,25	2,24	1,41	0,39	0,64	0,10	0,11	0,94
15	2,35	1,96	1,71	2,23	2,28	2,70	0,39	0,64	0,12	0,07	0,35
3'a	5,97	6,48	6,15	6,06	7,01	5,37	0,51	0,18	0,09	1,04	0,59
3'b	5,57	6,40	5,58	5,56	6,03	5,25	0,83	0,01	0,01	0,46	0,32
4'	1,86	2,01	1,93	1,87	1,94	1,30	0,15	0,07	0,01	0,08	0,56
EMA ^b	-	-	-	-	-	-	0,43	0,36	0,14	0,48	0,77

^adados experimentais = Exp (MATSUO *et al.*, 1976); Mno = NMR Predict Desktop da *Mnova*; Cdr = ChemNMR do ChemDraw; Nmr = NMRShiftDB; Spa = Spartan '08; Hyp = HyperChem Professional 8.0; ^bEMA = erro médio absoluto em ppm.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os recentes avanços tecnológicos da área de informática possibilitaram o desenvolvimento de computadores mais potentes que processam experimentos mais rapidamente, além de bancos de dados espectrais cada vez maiores, o desenvolvimento de algoritmos mais poderosos e uma maior acuidade nos resultados. Essa combinação de fatores tem possibilitado que a área da elucidação estrutural, auxiliada por computador, se desenvolva consideravelmente tanto na academia como nas empresas e que novas ferramentas estejam constantemente disponíveis aos usuários.

Atualmente, é bastante fácil o acesso a algum programa computacional ou aplicativo que possa auxiliar o usuário no processo de elucidação estrutural, seja ele de código aberto ou proprietário, alguns muitas vezes disponíveis *on line* na internet. Destaca-se alta velocidade de obtenção de resultados e ao aumento de sua acuidade. Entretanto, ainda não existe um programa que possa ser empregado com sucesso em todos os casos, pois cada um deles possui suas vantagens e desvantagens, havendo sempre a necessidade da interferência do usuário, que deve estar apto a identificar qual deles é mais apropriado para resolver seu problema.

O resultado dessa situação é que a área de produtos naturais tem sido altamente beneficiada, em especial no que concerne a edição de espectros, qualidade de bancos de dados, predição de propriedades e

simulação de espectros. Já a pesquisa em metabolômica ainda enfrenta alguns desafios, em especial com relação à análise e integração de dados. Em ambos os setores os gargalos são a carência de bons geradores estruturais e a necessidade do desenvolvimento de novas ferramentas para realizar predições para EM.

Um grande desafio para os próximos anos é uma maior interação entre o profissional da área de produtos naturais e os desenvolvedores de *softwares* para que, a partir do conhecimento atual e do estado da arte em suas respectivas áreas, se propicie o desenvolvimento de sistemas cada vez mais rápidos e eficientes – e de preferência com pouca interferência do usuário – para a elucidação estrutural de substâncias de origem natural cada vez mais complexas, além de encarar-se de vez as misturas presentes em matrizes biológicas.

8 AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem a CAPES, CNPq e INCT_if. F.B. Costa agradece a FAPESP e a Fundação Alexander Von Humboldt (Alemanha).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AIRES-DE-SOUSA, J.; HEMMER, M.C.; GASTEIGER, J. Prediction of ¹H NMR chemical shifts using neural networks. **Analytical Chemistry**, v.74, p.80-90, 2002.
- AMBRÓSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; DA COSTA, F.B.; DE OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v.79, p.925-933, 2006.
- AMBRÓSIO, S.R.; ARAKAWA, N.S.; ESPERANDIM, V.R.; ALBUQUERQUE, S.; DA COSTA, F.B. Trypanocidal activity of pimarane diterpenes from (Asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, p.1413-1415, 2008.
- ANDREEV, G.N.; ARGIROV, O.K; PENCHEV, P.N. Expert system for the interpretation of infrared spectra.** *Analytica Chimica Acta*, v.284, p.131-136, 1993.
- BANGOV, I.P. Computer-assisted structure generation from a gross formula. 3. Alleviation of the combinatorial problem. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.34, p.277-284, 1990.
- BINEV, Y.; AIRES-DE-SOUSA, J. Structure-based predictions of ¹H NMR chemical shifts using feed-forward neural networks. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.44, p.940-945, 2004.
- BOHANEK, S.; ZUPAN, J. Structure generation of constitutional isomers from structural fragments. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.31, p.531-540, 1991.
- BREMSER, W. HOSE - a novel substructure code. **Analytica Chimica Acta**, v.103, p.355-365, 1978.
- BREMSER, W.; FACHINGER, W. Multidimensional spectroscopy.** *Magnetic Resonance in Chemistry*, v.23, p.1056-1071, 1985.
- CARHART, R.E.; SMITH, D.H.; GRAY, N.A.B.; NOURSE, J.G.; DJERASSI, C. Applications of artificial intelligence for chemical inference. 37. GENOA: a computer program for structure elucidation utilizing overlapping and alternative substructures. **Journal of Organic Chemistry**, v.46, p.1708-1718, 1981.
- CLAYBOURN, M.; LUINGE, H.J.; CHALMER, J.M. Automated interpretation of Fourier transform Raman spectra of complex polymers using an expert system. **Journal of Raman Spectroscopy**, v.25, p.115-122, 1994.

- CONTRERAS, R.H.; PROVASI, P.F.; SANTOS, F.P.; TORMENA, C.F. Stereochemical dependence of NMR spin-spin coupling constants. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v.47, p.113-120, 2009.
- DA COSTA, F.B.; BINEV, Y.; GASTEIGER, J.; AIRES-DE-SOUSA, J. Structure-based predictions of ¹H NMR chemical shifts of sesquiterpene lactones using neural networks. **Tetrahedron Letters**, v.45, p.6931-6935, 2004.
- DALBY, A.; NOURSE, J.G.; HOUNSHELL, W.D.; GUSHURST, A.K.I.; GRIER, D.L.; LELAND, B.A.; LAUFER, J. Description of several chemical structure file formats used by computer programs developed at Molecular Design Limited. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.32, p.244-255, 1992.
- DUBOIS, J.E.; CARABEDIAN, M.; DAGANE, I. Computer-aided elucidation of structures by carbon-13 nuclear magnetic resonance. The DARC-EPIOS method: characterization of ordered substructures by correlating the chemical shifts of their bonded carbon atom. **Analytica Chimica Acta**, v.158, p.217-233, 1984.
- DUBOIS, J.E.; SOBEL, Y. DARC system for documentation and artificial intelligence in chemistry. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.25, p.326-333, 1985.
- DUNN, W.B.; BAILEY, N.J.C.; JOHNSON, H.E. Measuring the metabolome: current analytical technologies. **The Analyst**, v.130, p.606-625, 2005.
- ELYASHBERG, M.E. Infrared spectra interpretation by the characteristic frequency approach. In: SCHLEYER, P.V.R.; ALLINGER, N.L.; CLARK, T.; GASTEIGER, J.; ELYASHBERG, M.E.; WILLIAMS, A.J.; MARTIN, G.E. Computer-assisted structure verification and elucidation tools in NMR-based structure elucidation. **Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy**, v.53, p.1-104, 2008.
- ELYASHBERG, M.; WILLIAMS, A.J.; BLINOV, K. Structural revisions of natural products by computer-assisted structure elucidation (CASE) systems. **Natural Products Report**, v.27, p.1296-1328, 2010.
- ENGEL, T. Representation of chemical compounds. In: GASTEIGER, J.; ENGEL, T. (Eds.). **Cheminformatics: A Textbook**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p.17-168.
- FUNATSU, K.; SUSUTA, Y.; SASAKI, S. Application of infrared data analysis based on symbolic logic in automated structure elucidation by chemics. **Analytica Chimica Acta**, v.220, p.155-169, 1989.
- GASTEIGER, J. The central role of chemoinformatics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v.82, p.200-209, 2006.
- GASTMANS J.P.; FURLAN, M.; LOPES, M.N.; BORGES, J.H.G.; EMERENCIANO, V.P. A inteligência artificial aplicada à química de produtos naturais. O programa SISTEMAT. Parte II – Organização do programa e aplicativos. **Química Nova**, v.13, p.75-80, 1990.
- GRIBOV, L.A.; ELYASHBERG, M.E. Computer-aided identification of organic molecules by their molecular spectra. **CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v.8, p.111- 220, 1979.
- GRIBOV, L.A.; ORVILLE-THOMAS, W.J. **Theory and methods of calculation of molecular spectra**. Chichester: Wiley, 1988, 220p.
- JACKSON, P. **Introduction to expert systems**. Harlow: Addison-Wesley, 1999, 560p.
- KALCHHAUSER, H.; ROBIEN, W. CSEARCH- a computer-program for identification of organic-compounds and fully automated assignment of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra.** *Journal of Chemical Information and Computer Sciences*, v.25, p-103-108, 1985.
- KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical Reviews**, p. 1-38, 2010.
- KOCHEV, N.; MONEV, V.; BANGOV, I. Searching chemical structures. In: GASTEIGER, J.; ENGEL, T. (Eds.). **Cheminformatics: A Textbook**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p.291-318.
- KOLLMAN, P.; SCHAEFER-III, H.F.; SCHREINER, P.R. (Eds.), **The Encyclopedia of Computational Chemistry**.

- Chichester: John Wiley and Sons, 1998, p. 1299-1306.
- KORYTKO, A.; SCHULZ, K.-P.; MADISON, M.S.; MUNK, M.E. HOUDINI: a new approach to computer-based structure generation. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.32, p.1434-1446, 2003.
- KUDO, Y.; SASAKI, S. Principle for exhaustive enumeration of unique structures consistent with structural information. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.16, p.43-49, 1976.
- KUHN, S.; EGERT, B.; NEUMANN S.; STEINBECK, C. Building blocks for automated elucidation of metabolites: machine learning methods for NMR prediction. **BMC Bioinformatics**, v. 9, p.400-418, 2008.
- LINDSAY, R.; BUCHANAN, B.G.; FEIGENBAUM, E.A.; LEDBERG, J. **Applications of artificial intelligence in organic chemistry: the Dendral project**. New York, McGraw-Hill, 1980, 194p.
- LUGER, G.F.; STUBBLEFIELD, W.A. **Artificial intelligence and the design of expert systems**. San Francisco: Benjamin-Cummings Publishing Company, Inc., 1989, 660p.
- LUINGE, H.J. Automated interpretation of vibrational spectra. **Vibrational Spectroscopy**, v.1, p3-18, 1990.
- MADISON, M.S.; SCHULZ, K.P.; KORYTKO, A.; MUNK, M.E. SESAMI: an integrated desktop structure elucidation tool. **Internet Journal of Chemistry**, v.1, cp1-u22, 1998.
- MASINTER, L.M.; SRIDHARAN, N.S.; LEDEBERG, J.; SMITH, D.H. Applications of artificial intelligence for chemical inference. 12. Exhaustive generation of cyclic and acyclic isomers. **Journal of the American Chemical Society**, v.96, p.7702-7714, 1974.
- MATSUO, A.; UTO, S.; NAKAYAMA, M.; HAYASHI, S.; YAMASAKI, K.; KASAI, R.; TANAKA, O. (-)-Therमारol, a new *ent*-pimarane-class diterpene diol from *Jungermania therमारum* (liverwort). **Tetrahedron Letters**, v.17, p.2451-2454, 1976.
- MUNK, M.E.; MADISON, S.; ROBB, W. The neural network as a tool for multispectral interpretation. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.36, p.231-238, 1996.
- PLAMEN, N.; PENCHEVT, P.N.; KOTCHEVG, N.T.; ANDREEV, G.N. Infrared spectra interpretation by means of computer. **Travaux Scientifiques d'Universite de Plouduu**, v.29, p.21-26, 2000.
- PORTO, T.S.; FURTADO, N.A.J.C.; HELENO, V.C.G.; MARTINS, C.H.G.; DA COSTA, F.B.; SEVERIANO, M.E.; SILVA, A.N.; VENEZIANI, R.C.S.; AMBRÓSIO, S.R. Antimicrobial ent-pimarane diterpenes from *Viguiera arenaria* against Gram-positive bacteria. *Fitoterapia*, v. 80, p.432-436, 2009.**
- RICARD, D.; CACHET, C.; CABROL-BASS, D.; FORREST, T.P. Neural network approach to structural feature recognition from infrared spectra. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.33, p.202-210, 1993.
- ROBIEN, W. Do high-quality ¹³C-NMR spectral data really come from journals with high impact factors? **Trends in Analytical Chemistry**, v.28, p.914-922, 2009.
- SASAKI, S.; KUDO, Y. Structure elucidation system using structural information from multisources: CHEMICS. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.25, p.252-257, 1985.
- SCHORR, K.; GARCÍA-PIÑERES A.J.; SIEDLE, B.; MERFORT, I.; DA COSTA, F.B. Guaianolides from *Viguiera gardneri* inhibit the transcription factor NF- κ B. **Phytochemistry**, v.60, p.733-740, 2002.
- SHELLEY, C.A.; MUNK, M.E. Computer prediction of substructures from carbon-13 nuclear magnetic resonance spectra. **Analytical Chemistry**, v.54, p.516-521, 1982.
- SPRING, O.; ZIPPER, R.; REEB, S.; VOGLER, B.; DA COSTA, F.B. Sesquiterpene lactones and a myoinositol from glandular trichomes of *Viguiera quinqueremis* (Asteraceae; Heliantheae). **Phytochemistry**, v.57, p.267-272, 2001.
- STEFANI, R.; DA COSTA, F.B. Computer-aided structure elucidation of organic compounds. In: TAFT, C.A.; SILVA,

- C.H.T.P. (Org.). **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics**. Kerala: Research Signpost, 2007, p.101-124.
- STEFANI, R.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; DA COSTA, F.B. Elucidação estrutural de substâncias orgânicas utilizando computador: evoluções recentes. **Química Nova**, v.30, p.1347-1356, 2007.
- STEINBECK, C. Correlations between chemical structures and NMR data. In: GASTEIGER, J. **Handbook of Chemoinformatics: From Data To Knowledge**. Weinheim: Wiley-VCH, 2003, p.1368-1377.
- STEINBECK, C.; KRAUSE, S.; KUHN, S. NMRShiftDB - constructing a free chemical information system with open-source components. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v. 43, p.1733-1739, 2003.
- STEINBECK, C. Recent developments in automated structure elucidation of natural products. **Natural Product Reports**, v.21, p.512-518, 2004.
- VAN DER KOOY, F.; MALTESE, F.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K.; VERPOORTE, R. Quality control of herbal material and phytopharmaceuticals with MS and NMR based metabolic fingerprinting. **Planta Medica**, v.75, p.763-775, 2009.
- VERPOORTE, R.; CHOI, Y.H.; KIM, H.K. Ethnopharmacology and systems biology: a perfect holistic match. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p.53-56, 2005.
- VESSECCI, R.; GALEMBECK, S.E.; LOPES, N.P.; NASCIMENTO, P.G.B.D.; CROTTI, A.E.M. Aplicação da química quântica computacional no estudo de processos químicos envolvidos em espectrometria de massas. **Química Nova**, v.31, p.840-853, 2008.
- WARR, W. Computer-assisted structure elucidation. Part II: indirect database approaches and established systems. **Analytical Chemistry**, v.65, p.1087A-1095A, 1993.
- WOODRUFF, H.B.; SMITH, G.M. Computer program for the analysis of infrared spectra. **Analytical Chemistry**, v.52, p.2321-2327, 1980.
- WYTHOFF, B.; HONG-KUI, X.; LEVINES, S.P.; TOMELLIN, S.A. Computer-assisted infrared identification of vapor-phase mixture components. **Journal of Chemical Information and Computational Sciences**, v.31, p.392-399, 1991.
- ZUPAN, J. **Algorithms for chemists**. New York: John Wiley and Sons, 1989, 306p.
- ZUPAN, J.; GASTEIGER, J. Neural networks: a new tool for solving chemical problems, or just a passing phase? **Analytica Chimica Acta**, v.248, p.1-30, 1991.
- ZUPAN, J.; GASTEIGER, J. **Neural networks in chemistry and drug design**. Weinheim: Wiley-VCH, 1999, 400p.

ANÁLISES DE PRODUTOS DE ORIGEM NATURAL POR CLAE-RMN

Carlos Alexandre Carollo
Daniel Pecoraro Demarque

INTRODUÇÃO

Ao se trabalhar com extratos vegetais, uma fonte promissora de novas moléculas bioativas, o grande objetivo é a separação e identificação de seus constituintes (WOLFENDER *et al.*, 1997). O interesse nestes extratos se baseia na diversidade e variabilidade estrutural de seus componentes, contudo estas características tornam as amostras complexas e de difícil elucidação (EXARCHOU *et al.*, 2005). Visando diminuir essas limitações, o avanço da pesquisa na área de produtos naturais está intimamente ligado com o desenvolvimento de técnicas aprimoradas de separação, análise e identificação destas moléculas (PHILLIPSON, 2003).



Diversas técnicas já estão consolidadas e são amplamente utilizadas no processo de caracterização de extratos vegetais (CROTTI *et al.*, 2008). Inúmeras publicações podem ser encontradas na literatura a respeito das técnicas tradicionais de fracionamento dos extratos, em que os constituintes são separados e isolados e, posteriormente, caracterizados por técnicas espectroscópicas e espectrométricas (EXARCHOU *et al.*, 2003).

Dentro desse cenário, a utilização de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ganha cada vez mais espaço e aplicação, visto que garante a separação eficiente dos componentes do extrato e possibilita sua determinação quantitativa. Deve-se levar em consideração, no entanto, que o monitoramento da separação pelos métodos usuais como ultravioleta, fluorescência e espectrometria de massas não dispõe informações suficientes a respeito da estrutura química dos componentes da mistura (WOLFENDER *et al.*, 1997; WOLFENDER *et al.*, 2001).

Dentre as técnicas espectroscópicas que possibilitam a elucidação estrutural completa de moléculas, a ressonância magnética nuclear (RMN) é a mais importante, principalmente para identificação de substâncias desconhecidas (HOLZGRABE *et al.*, 1998; HICKS, 2001; HARVEY, 2007), por fornecer um grande número de informações estruturais, tais como diferenças entre substâncias com mesma massa ou fórmula molecular, deslocamentos químicos característicos, multiplicidade (a interação entre os núcleos vizinhos) e integrais, além de ser uma técnica não destrutiva (CORCORAN *et al.*, 2003). A análise clássica por RMN exige prévia separação de seus componentes, normalmente realizada pela demorada e nem sempre efetiva técnica de coluna cromatográfica clássica (CCC) (LAMBERT *et al.*, 2005), sendo as frações puras, posteriormente secas, solubilizadas em solvente deuterado, para assim serem submetidas à análise (ALBERT, 2002; STAERK *et al.*, 2009).

Uma saída interessante para esse problema é a utilização de técnicas “hifenizadas”, isto é, a combinação de técnicas de análise, que podem ser a perfeita associação no estudo de misturas complexas provenientes de produtos naturais (WILSON *et al.*, 2003). A cromatografia líquida, acoplada com ressonância magnética nuclear, vem ganhando destaque, principalmente a partir das últimas duas décadas (EXARCHOU *et al.*, 2005). As primeiras tentativas foram realizadas na década de 1970, as quais contribuíram muito para o desenvolvimento da técnica (KEIFER, 2003), uma vez que a baixa sensibilidade e altos custos desses experimentos iniciais despertaram para a necessidade de melhorias na construção dos campos magnéticos, sondas e na interface de solventes entre CLAE e RMN. Com os recentes avanços, a técnica já vem sendo utilizada como uma importante ferramenta na pesquisa de produtos naturais (BOBZIN *et al.*, 2000; WOLFENDER *et al.*, 2000; DALLUGE *et al.*, 2001; QUEIROZ *et al.*, 2002; CORCORAN *et al.*, 2003; MILIAUSKAS *et al.*, 2005; SANDVOSS *et al.*, 2005; SCHNEIDER *et al.*, 2005; GAO *et al.*, 2010), produtos farmacêuticos em geral (PENG *et al.*, 1999; MUTLIB *et al.*, 2000; FENG *et al.*, 2001; BORLAK *et al.*, 2003; GODEJOHANN *et al.*, 2004; PAULI *et al.*, 2005; PAN *et al.*, 2006; WU *et al.*, 2007; KESTING *et al.*, 2010; PROVERA *et al.*, 2010), alimentos (CHRISTOPHORIDOU *et al.*, 2005; SUGIMOTO *et al.*, 2006) e em diversas outras áreas de pesquisa (PUSECKER *et al.*, 1999; DUARTE *et al.*, 2005; HILLER *et al.*, 2005; WEBB, 2005; BLECHTA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2006; BLECHTA *et al.*, 2007; PREISS *et al.*, 2007; SKOGERSON *et al.*, 2009).

A combinação de CLAE-RMN representa uma importante economia de tempo na análise de extratos brutos (IWASA *et al.*, 2008), descoberta de novas substâncias (SANDVOSS *et al.*, 2001; HARVEY, 2007; DAI *et*

al., 2009) e no processo de desreplicação (ALALI *et al.*, 2008), em que substâncias indesejáveis ou sem interesse podem ser identificadas rapidamente, não perdendo, assim, esforços inúteis com seu isolamento (BRINGMANN *et al.*, 1999; BOBZIN *et al.*, 2000).

As diversas inovações que tentam consolidar as duas técnicas estão principalmente ligadas à resolução de problemas de acoplamento, dadas as particularidades e incompatibilidades que as técnicas de CLAE e RMN apresentam. Inicialmente, discute-se a respeito das dificuldades de acoplamento e as saídas que foram encontradas para o sucesso da técnica de CLAE-RMN e, posteriormente, sua aplicabilidade em produtos naturais.

INTERFACE ENTRE CLAE-RMN: O SOLVENTE

Um dos maiores problemas no acoplamento das técnicas de CLAE e RMN consiste nas diferenças com relação ao solvente que as duas técnicas demandam. Para uma separação eficiente dos picos e obtenção de quantidades significativas de substâncias, a CLAE precisa de quantidades consideráveis de solvente, o que dificulta a análise por RMN, dada a baixa sensibilidade da técnica. Para RMN há a necessidade de utilização de solventes deuterados, inviabilizando sua utilização durante toda a análise em CLAE-RMN pelo alto custo. Ainda assim, o desenvolvimento de colunas de fase reversa para uma melhor separação em CLAE demanda, normalmente, uma grande quantidade de água, a qual aparecerá no espectro de RMN como uma banda larga, encobrindo outros sinais. Outro fator é que esse sinal estará, conseqüentemente, em proporção muito maior que a amostra (ELIPE, 2003b).

Deve-se considerar ainda que, a maioria das análises cromatográficas realizadas para separação de substâncias em CLAE utilizam gradientes de solventes, o que é outro fator limitante para a otimização do campo magnético em RMN (ELIPE, 2007).

Para tentar contornar todos esses problemas, foram desenvolvidas diversas técnicas de supressão de sinal de solvente na tentativa de aprimorar a compatibilidade entre CLAE-RMN, dentre elas: pré-saturação, irradiação múltipla com pulsos suaves e WET pré-saturação (WET, do inglês, water suppression enhanced through T effects) (ALBERT, 2002). Na pré-saturação, ou NOESY pré-saturação (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy), o equipamento é calibrado para não operar na frequência do sinal do solvente. Na irradiação múltipla com pulsos suaves, o princípio é o mesmo da NOESY pré-saturação, porém visa suprimir sinais múltiplos do solvente (multipletos, por exemplo). A WET pré-saturação usa quatro pulsos seletivos de comprimentos variáveis. A cada pulso há uma defasagem no gradiente de campo, variando a ponta do ângulo do pulso, otimizando a técnica (ALBERT, 1997; 2002).

Dentre estas técnicas, a mais usada em CLAE-RMN é a WET pré-saturação, pois é capaz de suprimir todos os sinais do solvente com o mínimo de distorção na linha de base. A pré-saturação NOESY reduz o sinal do solvente com efetividade, porém, como é utilizada constantemente mais de um solvente, essa técnica é inviável dentro da área de produtos naturais. A pré-saturação WET, apesar de eficaz, inviabiliza, assim como as outras duas técnicas, a utilização de gradientes de solventes, pois a mudança da constante dielétrica, provocada pela mudança de proporção de solventes, causa alterações no campo magnético (ALBERT, 2002; WILSON *et al.*, 2003; ELIPE, 2007).

A opção por trabalhar com métodos de supressão de sinal do solvente depende de características do extrato e de que maneira proceder com o solvente para uma separação efetiva dos picos. Deve-se considerar, ainda, que mesmo suprimindo o sinal do solvente eficientemente, existe ainda a possibilidade do sinal da amostra cair justamente no ponto onde o sinal foi suprimido, havendo uma perda de informações (ALBERT, 2002; ELIPE, 2007).

SENSIBILIDADE DA TÉCNICA DE CLAE-RMN

A baixa sensibilidade da técnica de RMN, na ordem de microgramas, associada à necessidade de quantidade de solvente relativamente grande, criam outra barreira no sucesso do acoplamento de CLAE-RMN. Reduzir o fluxo do CLAE abaixo de 1 mL/min pode comprometer a efetividade da separação entre os picos (WILSON *et al.*, 2003; ELIPE, 2007). Torna-se evidente, portanto, a necessidade de utilização de campos magnéticos de alta magnitude (500 Hz ou mais). Diversos pesquisadores otimizaram suas análises na tentativa de aumentar a sensibilidade da técnica (WOLFENDER *et al.*, 2001).

EXTRAÇÃO EM FASE-SÓLIDA PARA ANÁLISE EM RMN

Como abordado anteriormente, um dos problemas mais limitantes no desenvolvimento da técnica CLAE-RMN é a necessidade de maior quantidade de solvente para a eficiente separação dos picos e a utilização de mais de um solvente durante a análise. Para tentar contorná-los, houve o desenvolvimento de técnicas aplicadas na interface entre CLAE e RMN com um princípio de operação relativamente simples: concentração da amostra. Baseado nisso, a extração em fase sólida (SPE, do inglês - Solid Phase Extraction) em combinação ou não com sondas criogênicas em RMN ou separação por capilaridade em CLAE, pode ser uma alternativa universal e rápida para solucionar esse problema. O processo é, basicamente, conectar uma passagem do fluxo advindo de CLAE em cartuchos descartáveis de SPE, os quais concentram a amostra e, conseqüentemente, aumentam a sensibilidade da RMN (MILIAUSKAS *et al.*, 2005; MILIAUSKAS *et al.*, 2006; ELIPE, 2007).

O sistema operacional de CLAE-SPE-RMN além de ser muito mais sensível que o convencional, é rápido, reprodutível, seletivo para as amostras de interesse e elimina a necessidade de utilização de solventes deuterados em CLAE (ALEXANDER *et al.*, 2006). O sistema elimina ainda, os efeitos de perturbação do campo magnético provocados pelo emprego de gradientes de solventes. Os picos que são separados pelo sistema de CLAE são interceptados ao entrar na detecção de UV, onde, por meio de um braço robótico, são diluídos em uma pós-coluna com água, a qual é conectada diretamente com cartuchos de SPE. Nos cartuchos, existe uma fase sólida formada geralmente de sílica de fase reversa, em que a substância de interesse terá maior afinidade do que pela água. A partir daí, é seco com nitrogênio, solubilizado com solvente deuterado e transferido para a sonda de RMN (WILSON *et al.*, 2006). A reutilização do mesmo cartucho de SPE, durante múltiplas injeções da mesma amostra, possibilita obter uma quantidade maior das frações e a aquisição de

espectro de carbono 13 (^{13}C), dada a menor sensibilidade na sua detecção por sua baixa concentração natural na natureza, em torno de 1,1% (EXARCHOU *et al.*, 2003; SIMPSON *et al.*, 2004; EXARCHOU *et al.*, 2005).

As inúmeras possibilidades de aplicações que o desenvolvimento da CLAE-SPE-RMN implicam, podem ser ilustradas por diversos trabalhos publicados no meio científico, comprovando a eficiência da técnica (CLARKSON *et al.*, 2005; LAMBERT *et al.*, 2005; SEGER *et al.*, 2005; WILSON *et al.*, 2006; WILSON *et al.*, 2007; KOSKELA *et al.*, 2009; MOTTI *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2009; CASTRO *et al.*, 2010; GAO *et al.*, 2010; MAZUMDER *et al.*, 2010). Godejohann *et al.* (2004), ao comparar a eficácia das técnicas de CLAE-RMN e CLAE-SPE-RMN ao estudar metabólitos do paracetamol, encontraram uma sensibilidade dessa última, pelo menos duas vezes maior, em relação à técnica clássica. Pukalskas *et al.* (2005) ao analisar extratos complexos de plantas, relatam a possibilidade de diferenciação de substâncias intimamente parecidos (mesma massa molecular) pela técnica de CLAE-SPE-RMN.

OUTROS AVANÇOS NO AUMENTO DA SENSIBILIDADE DA TÉCNICA

A utilização de sonda criogênica (termo vindo do inglês – cryo-probe) foi utilizada pela primeira vez por Spraul *et al.* (2003) para a determinação de metabólitos de acetaminofeno em urina. Esta metodologia visa a diminuição da temperatura das bobinas e pré-amplificadores eletrônicos à temperaturas criogênicas, isto é, temperaturas muito abaixo de 0°C, mantendo a amostra em temperatura ambiente. Dessa forma, elimina o ruído térmico associado aos estágios iniciais de detecção, o que aumenta a sensibilidade e o limite de detecção em quatro vezes – reduzindo o tempo de experimento em dezesseis vezes (FLYNN *et al.*, 2000; ELIPE, 2003a; SPRAUL *et al.*, 2003; EXARCHOU *et al.*, 2005; CLOAREC *et al.*, 2007; ELIPE, 2007).

Outra maneira de contornar o problema da baixa sensibilidade é o desenvolvimento de uma técnica que consiga tornar equivalente a quantidade de solvente utilizada para separação em CLAE dentro do limite utilizado pelo RMN. Esse objetivo pode ter êxito por meio da miniaturização das bobinas de radiofrequência (RF), utilizando-se microbobinas, e pela separação em CLAE em colunas capilares. As microbobinas conseguem promover uma detecção que corresponde ao pico de eluição do CLAE em colunas capilares (em torno de 1,5 μL). Assim, reduzindo o limite de detecção, torna-se possível a análise de substâncias de alto peso molecular e substâncias minoritárias em extratos vegetais (KRUCKER *et al.*, 2004; EXARCHOU *et al.*, 2005). A miniaturização em conjunto do sistema de CLAE, torna a técnica ainda mais robusta, viabilizando a utilização de solvente deuterado durante toda análise. Técnicas que utilizam capilares são úteis especialmente em casos em que a amostra necessita de um limite de detecção na ordem de nanogramas. Deve ser, no entanto, solúvel em um volume de aproximadamente 5 μL do solvente deuterado ou menos, o que nem sempre é possível (HENTSCHEL *et al.*, 2005; LEWIS *et al.*, 2005; WEBB, 2005).

Mais recentemente, o desenvolvimento de várias bobinas ligadas em paralelo pode ser aplicável para a aquisição de dados de RMN de várias amostras ao mesmo tempo (MACNAMARA *et al.*, 1999). CLAE-RMN capilar também pode ser usada com outras técnicas capilares, como eletroforese capilar e outros (GRIFFITHS *et al.*, 1998; OLSON *et al.*, 1998; PUSECKER *et al.*, 1999; SCHEWITZ *et al.*, 1999; RUSSELL *et al.*, 2000; LACEY *et al.*, 2001; JAYAWICKRAMA *et al.*, 2003; RAPP *et al.*, 2003; JAYAWICKRAMA *et al.*, 2004; KRUCKER *et al.*, 2004; OLSON *et al.*, 2004; LIN *et al.*, 2008; KOSKELA *et al.*, 2009; MOLINSKI, 2010; TANG *et al.*, 2010; YAMAUCHI *et al.*, 2010).

SISTEMAS OPERACIONAIS DE CLAE-RMN

O tipo de sistema operacional utilizado para uma análise em CLAE-RMN depende muito da amostra que se está trabalhando e quais dados são necessários para sua completa elucidação estrutural.

Os tipos de operação são classificados de acordo com o *status* da amostra durante a análise (BRAUMANN *et al.*, 2002). São, basicamente, quatro sistemas em que CLAE-RMN operam: fluxo contínuo, fluxo interrompido, *time-slice* e recolhimento de *loop* (ELIPE, 2003a). Essas condições em que a amostra é analisada (em fluxo/estática) estão intimamente relacionadas com a forma que a amostra é conduzida à RMN, o que necessita também, de sistemas de detecção de RMN diferenciados. Esses sistemas funcionam normalmente automatizados e com controle computadorizado (on-line) (ELIPE, 2003a; 2007).

FLUXO CONTÍNUO

Nesse tipo de análise, a detecção das frações que estão sendo separadas ocorre no RMN concomitante com a separação de outras frações em CLAE. Ou seja, o sistema de detecção funciona continuamente com separação de frações da amostra e análise por RMN, assim como em CLAE-DAD, não necessitando, portanto, de sistema adicional de monitoramento em CLAE (UV ou DAD) (BRAUMANN *et al.*, 2002; EXARCHOU *et al.*, 2005; ELIPE, 2007).

Esse sistema operacional possui a desvantagem de uma necessidade maior de amostra (WASIM *et al.*, 2005b). Assim, por exemplo, em um fluxo de 1 mL/min, o pico demora 3,6 segundos para passar pelo RMN, o que reduz a estabilidade da bobina de detecção, limitando a aquisição de espectros 1D apenas (ELIPE, 2007). Uma maneira de tentar contornar o problema é reduzir extremamente o fluxo – abaixo de 0,1 mL/min, em que um número maior de substâncias podem ser separadas e detectadas e há melhoria na relação sinal/ruído. Porém a análise pode levar até 24 h ou mais para ser realizada (GRIFFITHS, 1997; WILSON, 2000; QUEIROZ *et al.*, 2002; ELIPE, 2003a; EXARCHOU *et al.*, 2003; ELIPE, 2007).

O modo de fluxo contínuo permite uma triagem com ^1H , limitado aos sinais das substâncias majoritárias. Assim, esse modo pode servir para uma análise inicial dos constituintes majoritários de uma mistura complexa. A aquisição de ^{13}C fica também impossibilitada pela proporção sinal-ruído aumentada (EXARCHOU *et al.*, 2005; WASIM *et al.*, 2005a; KOSKELA *et al.*, 2009).

Deve-se levar em consideração, ainda, a proporção de solventes utilizados para a separação em CLAE (SPRAUL, 2008). Uma mistura, por exemplo, de acetonitrila (50%) e D_2O (50%) tem um campo químico de 1150 Hz, alterando para 1300 Hz se a proporção de acetonitrila mudar para 60% (BRAUMANN *et al.*, 2002).

FLUXO INTERROMPIDO

Nesse sistema, a fração (ou pico) é analisada sob condições estáticas, isto é, após a fração ser detectada em CLAE, interrompe-se a análise e encaminha-se a fração para RMN. Após essas serem realizadas, o fluxo em CLAE é retomado e o processo repete-se sucessivas vezes (Figura 1). As principais vantagens desse sistema são a sensibilidade aumentada, não necessitando de uma quantidade maior de amostra como em fluxo contínuo, e a possibilidade de obtenção de espectros 1D e 2D dentre outros experimentos de RMN, uma vez que a corrida da amostra está interrompida na CLAE. Possibilita, ainda, a supressão precisa do sinal do solvente

e eliminação das interferências que o fluxo com gradientes de solvente causam no campo magnético (BRAUMANN *et al.*, 2002; ELIPE, 2007).

Wolfender *et al.* (WOLFENDER *et al.*, 1997; WOLFENDER *et al.*, 2001), ao compararem os métodos de fluxo contínuo e fluxo interrompido, encontram uma relação sinal-ruído em torno de cinco vezes menor para essa última técnica. Elipe *et al.* (ELIPE, 2003a) utilizaram a técnica para a identificação de metabólitos obtidos da urina ou bile de cães, demonstrando a aplicabilidade mesmo quando se trabalha com metabólitos instáveis.

Inúmeros tipos de amostras e análises podem ser realizadas com esse tipo de sistema (PETRITIS *et al.*, 2002; NOVAK *et al.*, 2004; WU *et al.*, 2007; PROVERA *et al.*, 2010). Porém, a principal desvantagem consiste na possibilidade de diminuição da resolução, uma vez que a amostra fica parada na coluna enquanto está sendo feita a análise por RMN. O pico com uma fração em alta concentração, precedido de pico com baixa concentração, pode sofrer efeitos residuais, interferindo na análise (*memory effects*). Há também a necessidade de um detector à parte entre CLAE e RMN (Spraul, 2008). Deve-se lembrar, ainda, que o tempo de saída da fração do CLAE até a chegada na RMN deve ser calibrado (WILSON *et al.*, 2003).

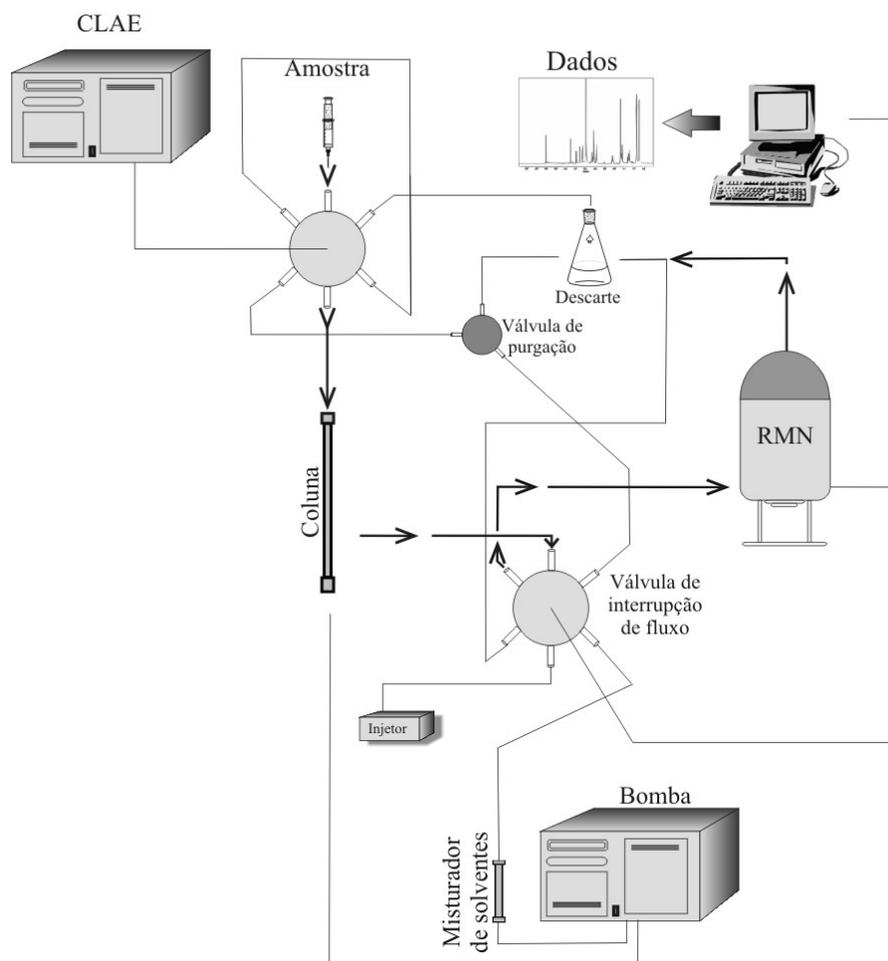


FIGURA 01 | Sistema CLAE-RMN operando em Fluxo Interrompido

TIME-SLICE

Esse método é principalmente utilizado quando não há uma separação efetiva dos picos. É baseado em uma série de interrupções durante a saída de um pico de interesse, funcionando semelhante ao modo de fluxo interrompido, porém a intenção principal desse modo de operação é desrepicar todo o extrato e identificar todos os constituintes, até mesmo os que, devido semelhanças estruturais, não se separaram satisfatoriamente (WOLFENDER *et al.*, 2001).

ARMAZENAMENTO EM LOOP

Esse modo de operação é um intermediário entre os modos de fluxo contínuo e o de fluxo interrompido, uma vez que opera em fluxo contínuo em CLAE durante toda a corrida. As frações são separadas e armazenadas em *Loops* para uma posterior análise em RMN. Esse sistema é controlado por *software*, exigindo um detector à parte ao RMN (normalmente UV/DAD). Após o término da corrida, as frações armazenadas podem ser conduzidas – na ordem que se desejar – ao RMN, o que possibilita as vantagens de análise do sistema de fluxo interrompido: experimentos de 1D e 2D. Para efetiva operação desse sistema, o analito deve ser estável durante o tempo de espera para análise por RMN (BRAUMANN *et al.*, 2002; JAYAWICKRAMA *et al.*, 2003; EXARCHOU *et al.*, 2005; ELIPE, 2007).

Por não haver a necessidade de sucessivas interrupções durante a análise, esse sistema não sofre com problemas na resolução da separação em CLAE. Devido, ainda, a independência da análise de CLAE e RMN, há a possibilidade de preparação da amostra enquanto o RMN pode ser utilizado para outros fins. Há a possibilidade, inclusive de se manter os aparelhos em salas ou laboratórios diferentes (BRAUMANN *et al.*, 2002).

HIFENIZAÇÃO MÚLTIPLA: ACOPLAMENTO DE ESPECTRÔMETRO DE MASSAS E RMN

A hifenização múltipla, *hyphenation*, do inglês, união das palavras *hyper* com *hyphenation*, é o acoplamento de múltiplas técnicas para elucidação estrutural de substâncias (WILSON *et al.*, 2003). Para CLAE-RMN, a união mais comum é com espectrômetro de massas (EM): CLAE-EM/RMN ou CLAE-EM/EM/RMN. Nesse sistema, a amostra é separada pelo cromatógrafo e posteriormente conduzida a um *splitter*, que divide as frações entre o EM e a RMN (a barra entre EM e RMN indica um fluxo paralelo) (WILSON *et al.*, 2003; ELIPE, 2007).

O modo mais comum de utilizar a hifenização múltipla é o modo em paralelo, que possibilita obter informações de EM e RMN a respeito do pico de interesse. O acoplamento de CLAE-EM está bastante desenvolvido, porém apresenta limitações quanto às informações que podem fornecer a respeito de uma amostra de origem natural. Peso molecular, fragmentação e fórmulas moleculares são dados que o EM pode fornecer, porém são insuficientes para elucidação de estruturas desconhecidas. Moléculas de mesmo peso molecular (isóbaras) e estereoisômeros não podem ser diferenciadas, o que limita análises de extratos vegetais (CORCORAN *et al.*, 2003). O RMN, mesmo quando não acoplado com EM, pode resolver esses problemas, não fornecendo, no entanto, informações à respeito do peso molecular. Deve-se considerar, ainda, que grupos como hidroxilas e aminas normalmente não são observados pela técnica de RMN, pois o deutério desloca o hidrogênio desses grupos, deixando-os invisíveis ao aparelho. Grupos nitrados e conjugados de sulfato não

contêm hidrogênios, porém podem ser facilmente detectados por EM (WILSON, 2000; CORCORAN *et al.*, 2003). As análises feitas pelas técnicas, separadamente, nem sempre garantem de qual pico a substância se refere, causando ambiguidade e dificultando a elucidação estrutural. A utilização de um sistema *on-line* pode garantir que as análises que estão sendo feitas por EM e RMN se tratam da mesma molécula, além de evitar a degradação que certas moléculas sofrem quando separadas do extrato (ELIPE, 2007).

A utilização de solventes deuterados durante toda a análise de CLAE-EM/RMN pode resultar em diferenças no peso molecular dos fragmentos obtidos pelo EM, uma vez que o deutério pesa o dobro do hidrogênio. Isto pode deixar dúvidas ao se proceder a elucidação estrutural de uma molécula. As técnicas de supressão do sinal do solvente ou SPE são preferidas para esse tipo de hifenização (Figura 2) (ELIPE, 2007).

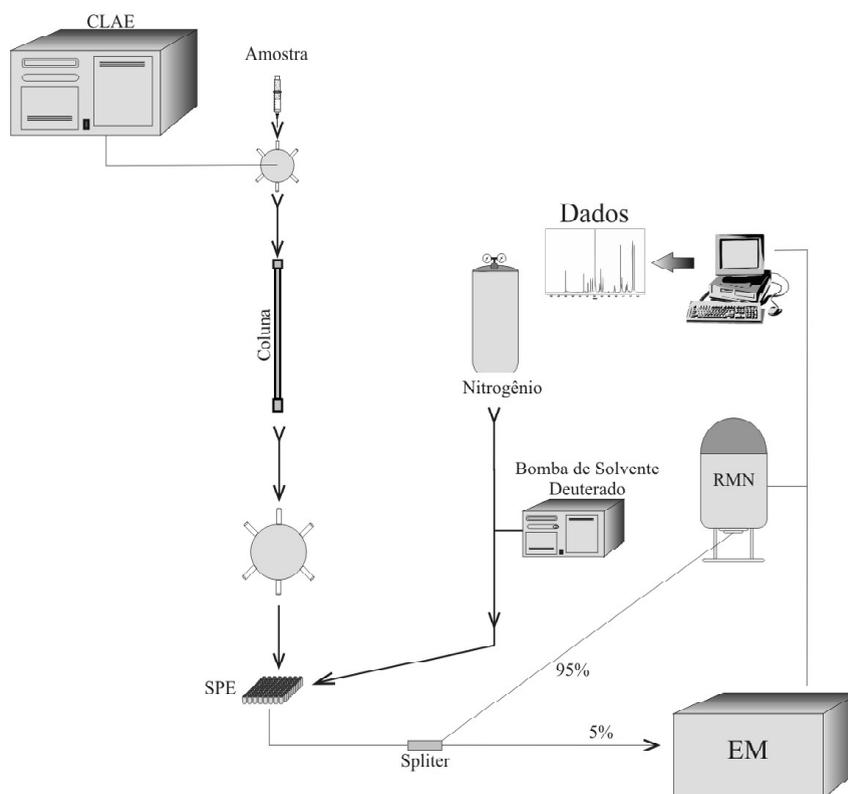


FIGURA 2 | Esquema de um sistema de cromatografia líquida acoplado a um espectrômetro de massas e ressonância magnética nuclear, utilizando um sistema de SPE.

O sistema de operação CLAE-EM/RMN necessita de um *splitter* para dividir o fluxo de amostra do CLAE para os sistemas de EM e RMN. Essa divisão não afeta, porém, a sensibilidade da técnica de RMN, uma vez que esta não é igualitária. Isso porque a técnica de EM é muito mais sensível que a RMN, sendo desviado, geralmente, em torno de 5% do fluxo para EM e 95% para RMN (ELIPE, 2007).

O sistema CLAE-EM/RMN pode ser montado com os sistemas anteriormente citados (ELIPE, 2007). No modo de fluxo contínuo, o *splitter* divide o fluxo para EM e RMN (5:95), e as análises são obtidas em ambos os equipamentos para um mesmo pico. Caso a análise por RMN necessite de maiores informações a respeito do pico de interesse, o modo de fluxo interrompido pode ser útil, possibilitando análises complementares que demandam um maior tempo, como COSY, NOESY, HSQC e HMBC. Nesse caso, é necessária quantidade de amostra maior que 100 µg, o que pode ser obtido com a utilização de cartuchos de SPE com múltiplas injeções. O modo *time-slice* é útil em casos que os picos estão sobrepostos e se deseja obter o perfil metabólico completo de um determinado extrato (WOLFENDER *et al.*, 2001; ELIPE, 2007).

O modo de operação de armazenamento em *loop* também é interessante, pois experimentos de EM podem ser obtidos com o conteúdo do *loop*, enquanto RMN adquire outros dados. Dessa forma, os sistemas operam separadamente com o conteúdo do mesmo *loop*, cada um no seu tempo de análise. Todas essas operações podem ser manuais, semiautomáticas ou totalmente automatizadas (CORCORAN *et al.*, 2003).

APLICAÇÃO DE CLAE-RMN EM ANÁLISES DE PRODUTOS NATURAIS

Os produtos de origem natural possuem como característica marcante sua complexidade estrutural e elevado número de metabólitos, o que os torna um foco de interesse na busca de novos protótipos e, ao mesmo tempo, força o incremento das técnicas analíticas já existentes. Entre as ferramentas, atualmente disponíveis, a utilização de CLAE-RMN possui o maior campo para desenvolvimento, visto a potencialidade demonstrada pelas técnicas individualmente, podendo se tornar, em um futuro breve, a ferramenta de escolha na identificação de novas substâncias de origem natural. A seguir serão apresentados alguns casos interessantes da utilização de técnicas hífenadas de CLAE-RMN, em conjunto com técnicas mais consolidadas encontradas na literatura, que permitirão demonstrar a aplicação de alguns dos conceitos apresentados anteriormente.

Dentre as possibilidades de exploração da técnica na análise de novos extratos, a utilização da desreplicação permite um direcionamento e otimização na identificação de novas substâncias, evitando o tedioso trabalho de isolamento e purificação de substâncias conhecidas (HOSTETTMANN *et al.*, 2001). Este novo campo de análises vem sendo mais intensamente explorado no campo acadêmico com destaque para o grupo de pesquisa liderado por Hostettmann e Wolfender que publicaram diversas revisões sobre a aplicação de CLAE-RMN em análises fitoquímicas (WOLFENDER *et al.*, 2005; 2006; LAMBERT *et al.*, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2009).

Um exemplo do uso de CLAE-RMN na análise de produtos naturais é a identificação dos principais alcaloides de *Erythroxylum vacciniifolium* Mart.. Neste trabalho, além da utilização dessa técnica, os autores utilizam outros procedimentos, contribuindo para uma caracterização mais segura dos metabólitos. Uma análise preliminar dos extratos, combinando CLAE-UV-DAD e CLAE-EM, foi realizada e pode-se observar uma série de substâncias com espectros de UV semelhantes e que apresentavam fragmentos de baixo peso molecular característicos, sugerindo um esqueleto comum entre as substâncias. Em seguida, foram feitas

análises em fluxo contínuo e interrompido em CLAE-RMN, o que permitiu a identificação de 24 alcaloides tropânicos, exemplificados pela catuabina D (Figura 3) (ZANOLARI *et al.*, 2003; WOLFENDER *et al.*, 2005).

Sumarah *et al.* (SUMARAH *et al.*, 2008) analisaram a presença de derivados policetídeos em 250 fungos endofíticos isolados de *Picea glauca* (Moench) Voss através de CLAE-EM e CLAE-RMN, comparando os dados espectroscópicos obtidos a partir dos derivados metilados isolados e a análise do extrato original através de técnica de fluxo interrompido, permitindo a identificação de 10 substâncias, sendo duas inéditas, representadas pelo 1-carboxil-metil-éster-2,8-diidroxi-3-metil-9-oxoxanteno (**2**) (Figura 3).

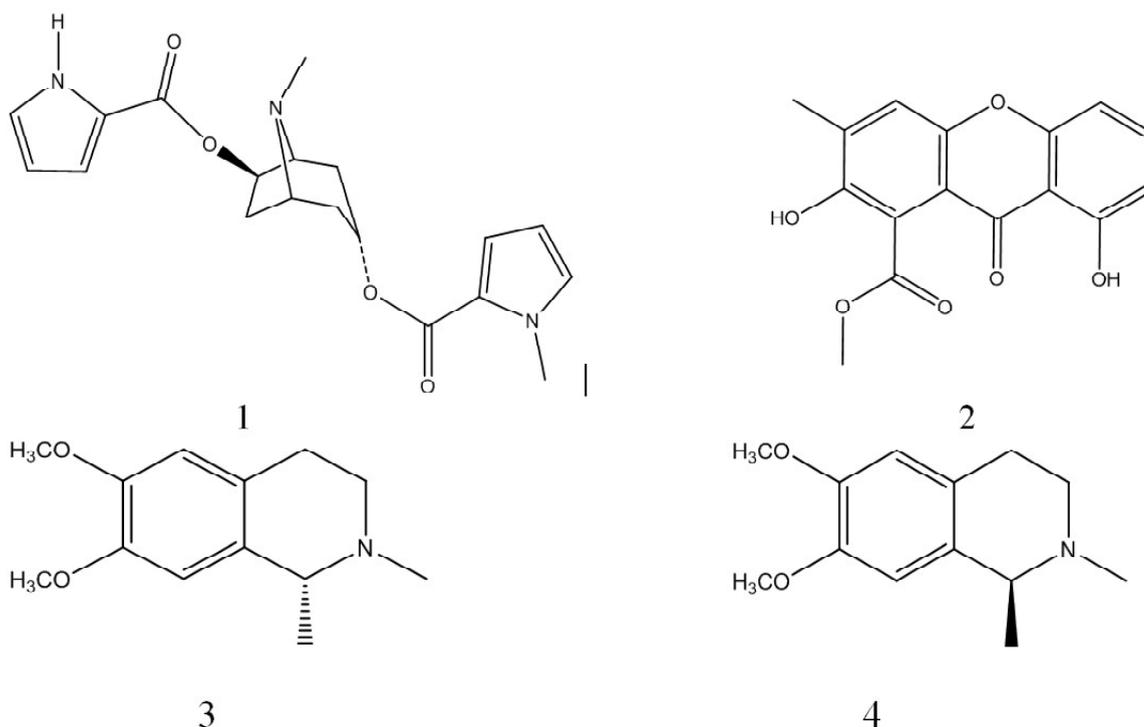


FIGURA 3 | Estrutura química de metabólitos secundários identificados por técnicas hífenadas utilizando RMN. Catuabina D (**1**); 1-carboxil-metil-éster-2,8-diidroxi-3-metil-9-oxoxanteno (**2**); *R*-e *S*-carnegina (**3 e 4**).

Recentemente, a combinação de dicroísmo circular (DC), RMN e EM, descrita por Iwasa *et al.* (IWASA *et al.*, 2008), se mostrou útil na identificação e determinação da configuração absoluta dos alcaloides de *Nandina domestica* Thunb. sem a necessidade de isolamento e purificação das substâncias, permitindo determinar o *R*-e *S*-carnegina (**3 e 4**) (Figura 3).

Uma abordagem interessante realizada por Dai *et al.* (DAI *et al.*, 2009) levou à identificação de 12 derivados flavônicos a partir de um extrato padronizado de *Gossypium herbaceum* L., conhecido como AB-8-2, após incompleta separação dos constituintes por cromatografia flash (25 frações) e análises integradas de CLAE-EM e CLAE-RMN, analisando as frações contendo os metabólitos em diferentes concentrações, o que torna possível a identificação de sinais-chaves no espectro de RMN de ^1H para identificação de substituintes no esqueleto flavônico e completa caracterização da estrutura.

Outros exemplos também são encontrados na literatura, abordando as técnicas de CLAE-EM/RMN aplicados a caracterização de produtos naturais de origem marinha (DIAS *et al.*, 2009); desenvolvimento de novas drogas (PULLEN *et al.*, 1995; LINDON *et al.*, 2000) e no estudo do metabolismo de drogas essas técnicas vem sendo amplamente aplicadas (KAMEL *et al.*, 2006; MA *et al.*, 2006; WALKER *et al.*, 2008; NEDDERMAN *et al.*, 2010).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O grande avanço desta área torna cada vez menos proibitiva a utilização de sistemas hifenados com capacidade de gerar grandes quantidades de informações estruturais na área de produtos naturais. Novas técnicas e equipamentos aumentam a compatibilidade entre a interface do CLAE e RMN, assim cada vez mais se espera que essa técnica se difunda e se torne uma grande aliada na identificação de substâncias de origem natural, diminuindo o tempo de análise e as chances de insucesso na descoberta de novos protótipos.

A possibilidade de identificação de substâncias sem a necessidade de purificação abre uma nova era no desenvolvimento de novos produtos a partir de derivados naturais, permitindo a construção de bibliotecas com o perfil dos metabólitos, a análise de um número maior de espécies em um tempo reduzido e, outro ganho importante: a possibilidade de desreplicação, aproveitando a grande quantidade de informações disponíveis na literatura.

Assim, cada vez mais, essas metodologias se tornam uma ferramenta de escolha na análise de produtos naturais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALI, F. Q.; GHARAIBEH, A.; GHAWANMEH, A.; TAWAHA, K.; OBERLIES, N. H. Colchicinoids from *Colchicum crocifolium* Boiss.: a Case Study in Dereplication Strategies for (–)-Colchicine and Related Analogues using LC-MS and LC-PDA Tech. **Phytochem. Anal.**, v. 19, p. 385–394, 2008.

ALBERT, K. Supercritical fluid chromatography-proton nuclear magnetic resonance spectroscopy coupling. **J. Chromatogr. A**, v. 785, p. 65-83, 1997.

_____. **On-Line LC-NMR and Related Techniques**. John Wiley & Sons Ltd, 2002.

ALEXANDER, A. J.; XU, F.; BERNARD, C. The design of a multi-dimensional LC-SPE-NMR system (LC2-SPE-NMR) for complex mixture analysis. **Magn. Reson. Chem.**, v. 44, p. 1–6, 2006.

BLECHTA, V.; KURFÜRST, M.; SYKORA, J.; SCHRAML, J. High-performance liquid chromatography with nuclear magnetic resonance detection applied to organosilicon polymers Part 2: Comparison with other methods. **J.**

Chromatogr. A, v. 1145, p. 175–182, 2007.

BLECHTA, V.; SYKORA, J.; HETFLEJS, J.; SABATA, S.; SCHRAML, J. ^{29}Si NMR in LC–NMR analysis of silicones. **Magn. Reson. Chem.**, v. 44, p. 7–10, 2006.

BOBZIN, S. C.; YANG, S.; KASTEN, T. P. LC-NMR: a new Tool to Expedite the Dereplication and Identification of Natural Products. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 25, p. 342–345, 2000.

BORLAK, J.; WALLE, M.; ELEND, M.; THUM, T.; PREISS, A.; LEVSEN, K. Verapamil: identification of novel metabolites in cultures of primary human hepatocytes and human urine by LC-MSn and LC-NMR. **Xenobiotica**, v. 33, n. 6, p. 655–676, 2003.

BRAUMANN, U.; SPRAUL, M. LC-NMR: Automation. In: ALBERT, K. (Ed.). **On-Line LC-NMR and Related Techniques**: John Wiley & Sons, LTDA, v.1, 2002. cap. 2,

BRINGMANN, G.; RÜCKERT, M.; MESSER, K.; SCHUPP, O.; LOUIS, A. M. Acetogenic isoquinoline alkaloids 1 CXXI. Use of on-line high-performance liquid chromatography– nuclear magnetic resonance spectrometry coupling in phytochemical screening studies: rapid identification of metabolites in *Dioncophyllum thollonii*. **J. Chromatogr. A**, v. 837, p. 267–272, 1999.

CASTRO, A.; MOCO, S.; COLL, J.; VERVOORT, J. LC-MS-SPE-NMR for the Isolation and Characterization of neo-Clerodane Diterpenoids from *Teucrium luteum* subsp. *flavovirens*. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 962–965, 2010.

CHRISTOPHORIDOU, S.; DAIS, P.; TSENG, L.-H.; SPRAUL, M. Separation and Identification of Phenolic Compounds in Olive Oil by Coupling High-Performance Liquid Chromatography with Postcolumn Solid-Phase Extraction to Nuclear magnetic Resonance Spectroscopy (LC-SPE-NMR). **J. Agric. Food Chem.**, v. 53, p. 4667–4679, 2005.

CLARKSON, C.; STAERK, D.; HANSEN, S. H.; JAROSZEWSKI, J. W. Hyphenation of solid-phase extraction with liquid chromatography and nuclear magnetic resonance: Application of HPLC-DAD-SPE-NMR to identification of constituents of *Kanahia laniflora*. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 11, p. 3547–3553, 2005.

CLOAREC, O.; CAMPBELL, A.; TSENG, L.-H.; BRAUMANN, U.; SPRAUL, M.; SCARFE, G.; WEAVER, R.; NICHOLSON, J. K. Virtual Chromatographic Resolution Enhancement in Cryoflow LC-NMR Experiments via Statistical Total Correlation Spectroscopy. **Anal. Chem.**, v. 79, p. 3304–3311, 2007.

CORCORAN, O.; SPRAUL, M. LC–NMR–MS in drug discovery. **DDT**, v. 8, n. 14, p. 624–631, 2003.

CROTTI, A. E. M.; CAROLLO, C. A.; GOBBO-NETO, L.; SANTOS, M. D.; J., G. P.; LOPES, N. P. LC-hyphenated techniques: uses in the structural elucidation of low- and high-molecular weight compounds. In: TAFT, C. A. (Ed.). **Modern Biotechnology in Medicinal Chemistry and Industry**. Kerala: Research Signpost, 2008. p.99-142.

DAI, D.; HE, J.; SUN, R.; ZHANG, R.; AISA, H. A.; ABLIZ, Z. Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography–mass spectrometry combined with an incompleated separation strategy for identifying the natural products in crude extract. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, n. 2, p. 221–228, 2009.

_____. Nuclear magnetic resonance and liquid chromatography–mass spectrometry combined with an incompleated separation strategy for identifying the natural products in crude extract. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 221–228, 2009.

DIAS, D. A.; URBAN, S. Application of HPLC-NMR for the Rapid Chemical Profiling of a Southern Australian

- Sponge, *Dactylosporgia* sp. **Journal of Separation Science**, v. 32, n. 4, p. 542-548, 2009.
- DUARTE, I. F.; GOODFELLOW, B. J.; GIL, A. M. Characterization of Mango Juice by High-Resolution NMR, Hyphenated NMR, and Diffusion-Ordered Spectroscopy. **Spectroscopy Letters**, v. 38, p. 319-342, 2005.
- ELIPE, M. V. S. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 497, p. 1-25, 2003a.
- _____. Advantages and disadvantages of nuclear magnetic resonance spectroscopy as a hyphenated technique. **Analytica Chimica Acta**, v. 497, n. 1-2, p. 1-25, 2003b.
- _____. **HPLC for Pharmaceutical Students**. 1. John Wiley & Sons, Inc., 2007.
- EXARCHOU, V.; GODEJOHANN, M.; BEEK, T. A. V.; GEROTHANASSIS, I. P.; VERVOORT, J. LC-UV-Solid-Phase Extraction-NMR-MS Combined with a Cryogenic Flow Probe and Its Application to the Identification of Compounds Present in Greek Oregano. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 6288-6294, 2003.
- EXARCHOU, V.; KRUCKER, M.; BEEK, T. A. V.; VERVOORT, J.; GEROTHANASSIS, I. P.; ALBERT, K. LC-NMR coupling technology: recent advancements and applications in natural products analysis. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 681-687, 2005.
- FENG, W.; LIU, H.; CHEN, G.; MALCHOW, R.; BENNETT, F.; LIN, E.; PRAMANIK, B.; CHAN, T.-M. Structural characterization of the oxidative degradation products of an antifungal agent SCH 56592 by LC-NMR and LC-MS. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 25, p. 545-557, 2001.
- FLYNN, P. F.; MATTIELLO, D. L.; HILL, H. D. W.; WAND, A. J. Optimal Use of Cryogenic Probe Technology in NMR Studies of Proteins. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 122, p. 4823-4824, 2000.
- GAO, H.; ZEHL, M.; KAEHLIG, H.; SCHNEIDER, P.; STUPPNER, H.; BANULS, L. M. Y.; KISS, R.; KOPP, B. Rapid Structural Identification of Cytotoxic Bufadienolide Sulfates in Toad Venom from *Bufo melanostictus* by LC-DAD-MSn and LC-SPE-NMR. **J. Nat. Prod.**, v. 73, p. 603-608, 2010.
- GODEJOHANN, M.; TSENG, L.-H.; BRAUMANN, U.; FUCHSER, J.; SPRAUL, M. Characterization of a paracetamol metabolite using on-line LC-SPE-NMR-MS and a cryogenic NMR probe. **J. Chromatogr. A**, v. 1058, p. 191-196, 2004.
- GRIFFITHS, L. Optimization of Liquid Chromatography-NMR Spectroscopy. **Magn. Reson. Chem.**, v. 35, p. 257-261, 1997.
- GRIFFITHS, L.; HORTON, R. Optimization of LC-NMR III—Increased Signal-to-Noise Ratio Through Column Trapping. **Magn. Reson. Chem.**, v. 36, p. 104-109, 1998.
- HARVEY, A. L. Natural products as a screening resource. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 11, p. 480-484, 2007.
- HENTSCHEL, P.; KRUCKER, M.; GRYNBAUM, M. D.; PUTZBACH, K.; BISCHOFF, R.; ALBERT, K. Determination of regulatory phosphorylation sites in nanogram amounts of a synthetic fragment of ZAP-70 using microprobe NMR and on-line coupled capillary HPLC-NMR. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 747-754, 2005.
- HICKS, R. P. Recent Advances in NMR: Expanding its Role in Rational Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 8, p. 627-650, 2001.
- HILLER, W.; BRÜLL, A.; ARGYROPOULOS, D.; HOFFMANN, E.; PASCH, H. HPLC-NMR of fatty alcohol ethoxylates. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 729-735, 2005.
- HOLZGRABE, U.; DIEHL, B. W. K.; WAWER, I. NMR spectroscopy in pharmacy. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 17, p. 557-616, 1998.
- HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J. L.; TERREAUX, C. Modern screening techniques for plant extracts. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, p. 18-32, 2001.

IWASA, K.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; SUGIURA, M.; TAKEUCHI, A.; TODE, C.; TOKUDA, H.; TAKEDA, K. Online Structural Elucidation of Alkaloids and Other Constituents in Crude Extracts and Cultured Cells of *Nandina domestica* by Combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD Analyses. **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 1376–1385, 2008.

_____. Online structural elucidation of alkaloids and other constituents in crude extracts and cultured cells of *Nandina domestica* by combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD analyses. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1376–1385, 2008.

JAYAWICKRAMA, D. A.; SWEEDLER, J. V. Hyphenation of capillary separations with nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 819–840, 2003.

JAYAWICKRAMA, D. A.; WOLTERS, A. M.; SWEEDLER, J. V. Retention characteristics of protonated mobile phases injected into deuterated mobile phases in capillary liquid chromatography (LC) using on-line nuclear magnetic resonance (NMR) detection. **Analyst**, v. 129, p. 629–633, 2004.

KAMEL, A.; PRAKASH, C. High performance liquid chromatography/atmospheric pressure ionization/tandem mass spectrometry (HPLC/API/MS/MS) in drug metabolism and toxicology. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 8, p. 837–852, 2006.

KEIFER, P. A. Flow injection analysis NMR (FIA–NMR): a novel flow NMR technique that complements LC–NMR and direct injection NMR (DI–NMR). **Magn. Reson. Chem.**, v. 41, p. 509–516, 2003.

KESTING, J. R.; HUANG, J.; SØRENSEN, D. Identification of adulterants in a Chinese herbal medicine by LC–HRMS and LC–MS–SPE/NMR and comparative in vivo study with standards in a hypertensive rat model. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 51, p. 705–711, 2010.

KOSKELA, H.; ERVASTI, M.; BJÖRK, H.; VANNINEN, P. On-Flow Pulsed Field Gradient Heteronuclear Correlation Spectrometry in Off-Line LC-SPE-NMR Analysis of Chemicals Related to the Chemical Weapons Convention. **Anal. Chem.**, v. 81, p. 1262–1269, 2009.

KRUCKER, M.; LIENAU, A.; PUTZBACH, K.; GRYNBAUM, M. D.; SCHULER, P.; ALBERT, K. Hyphenation of Capillary HPLC to Microcoil ¹H NMR Spectroscopy for the Determination of Tocopherol Homologues. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 2623–2628, 2004.

LACEY, M. E.; TAN, Z. J.; WEBB, A. G.; SWEEDLER, J. V. Union of capillary high-performance liquid chromatography and microcoil nuclear magnetic resonance spectroscopy applied to the separation and identification of terpenoids. **J. Chromatogr. A**, v. 922, p. 139–149, 2001.

LAMBERT, M.; STÆRK, D.; HANSEN, S. H.; JAROSZEWSKI, J. W. HPLC–SPE–NMR hyphenation in natural products research: optimization of analysis of *Croton membranaceus* extract. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 771–775, 2005.

LAMBERT, M.; WOLFENDER, J. L.; STAERK, D.; CHRISTENSEN, B.; HOSTETTMANN, K.; JAROSZEWSKI, J. W. Identification of natural products using HPLC-SPE combined with CapNMR. **Analytical Chemistry**, v. 79, n. 2, p. 727–735, 2007.

LEWIS, R. J.; BERNSTEIN, M. A.; DUNCAN, S. J.; SLEIGH, C. J. A comparison of capillary-scale LC–NMR with alternative techniques: spectroscopic and practical considerations. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 783–789, 2005.

LIN, Y.; SCHIAVO, S.; ORJALA, J.; VOUIROS, P.; KAUTZ, R. Microscale LC-MS-NMR Platform Applied to the Identification of Active Cyanobacterial Metabolites. **Anal. Chem.**, v. 80, p. 8045–8054, 2008.

LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; WILSON, I. D. Directly coupled HPLC-NMR and HPLC-NMR-MS in pharmaceutical research and development. **Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 748, n. 1, p. 233–258, 2000.

- MA, S. G.; CHOWDHURY, S. K.; ALTON, K. B. Application of mass spectrometry for metabolite identification. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 5, p. 503-523, 2006.
- MACNAMARA, E.; HOU, T.; FISHER, G.; WILLIAMS, S.; RAFTERY, D. Multiplex sample NMR: an approach to high-throughput NMR using a parallel coil probe. **Analytica Chimica Acta**, v. 397, p. 9-16, 1999.
- MAZUMDER, A.; KUMAR, A.; PUROHIT, A. K.; DUBEY, D. K. Application of high performance liquid chromatography coupled to on-line solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance spectroscopy for the analysis of degradation products of V-class nerve agents and nitrogen mustard. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, p. 2887-2894, 2010.
- MILIAUSKAS, G.; BEEK, T. A. V.; WAARD, P. D.; VENSKUTONIS, R. P.; SUDHÖLTER, E. J. R. Identification of Radical Scavenging Compounds in *Rhaponticum carthamoides* by Means of LC-DAD-SPE-NMR. **J. Nat. Prod.**, v. 68, p. 168-172, 2005.
- MILIAUSKAS, G.; VAN BEEK, T. A.; DE WAARD, P.; VENSKUTONIS, R. P.; SUDHOLTER, E. J. R. Comparison of analytical and semi-preparative columns for high-performance liquid chromatography-solid-phase extraction-nuclear magnetic resonance. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1-2, p. 276-284, 2006.
- MOLINSKI, T. F. Microscale methodology for structure elucidation of natural products. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 1-8, 2010.
- MOTTI, C. A.; FRECKELTON, M. L.; TAPIOLAS, D. M.; WILLIS, R. H. FTICR-MS and LC-UV/MS-SPE-NMR Applications for the Rapid Dereplication of a Crude Extract from the Sponge *Ianthella flabelliformis*. **J. Nat. Prod.**, v. 72, p. 290-294, 2009.
- MUTLIB, A. E.; DIAMOND, S.; SHOCKCOR, J.; WAY, R.; NEMETHOE, G.; GAN, L.; CHRIST, D. D. Mass spectrometric and NMR characterization of metabolites of roxifiban, a potent and selective antagonist of the platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor. **Xenobiotica**, v. 30, n. 11, p. 1091-1110, 2000.
- NEDDERMAN, A. N. R.; WRIGHT, P. Looking back through the MIST: a perspective of evolving strategies and key focus areas for metabolite safety analysis. **Bioanalysis**, v. 2, n. 7, p. 1235-1248, 2010.
- NOVAK, P.; TEPEŠ, P.; CINDRIĆ, M.; ILIJAS, M.; DRAGOJEVIĆ, S.; MIHALJEVIĆ, K. Combined use of liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy and liquid chromatography-mass spectrometry for the characterization of an acarbose degradation product. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, n. 2, p. 299-303, 2004.
- OLSON, D. L.; LACEY, M. E.; SWEEDLER, J. V. High-Resolution Microcoil NMR for Analysis of Mass-Limited, Nanoliter Samples. **Anal. Chem.**, v. 70, p. 645-650, 1998.
- OLSON, D. L.; NORCROSS, J. A.; O'NEIL-JOHNSON, M.; MOLITOR, P. F.; DETLEFSEN, D. J.; WILSON, A. G.; PECK, T. L. Microflow NMR: Concepts and Capabilities. **Anal. Chem.**, v. 76, p. 2966-2974, 2004.
- PAN, C.; LIU, F.; JI, Q.; WANG, W.; DRINKWATER, D.; VIVILECCHIA, R. The use of LC/MS, GC/MS, and LC/NMR hyphenated techniques to identify a drug degradation product in pharmaceutical development. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 40, p. 581-590, 2006.
- PAULI, G. F.; CASE, R. J.; INUI, T.; WANG, Y.; CHO, S.; FISCHER, N. H.; FRANZBLAU, S. G. New perspectives on natural products in TB drug research. **Life Sciences**, v. 78, p. 485 - 494, 2005.
- PENG, S. X.; BORAH, B.; DOBSON, R. L. M.; LIU, Y. D.; PIKUL, S. Application of LC-NMR and LC-MS to the identification of degradation products of a protease inhibitor in dosage formulations. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 20, p. 75-89, 1999.
- PETRITIS, K.; GILLLAIZEAU, I.; ELFAKIR, C.; DREUX, M.; PETIT, A.; BONGIBAUT, N.; LUIJTEN, W. Evaporative light scattering detection for in-line monitoring of stopped-flow liquid chromatography-nuclear magnetic resonance

analysis of compounds with weak or no chromophore groups. **J. Sep. Sci.**, v. 25, p. 593–600, 2002.

PHILLIPSON, J. D. 50 years of Medicinal Plant Research - Every Progress in Methodology is a Progress in Science. **Planta Medica**, v. 69, p. 491–495, 2003.

PREISS, A.; ELEND, M.; GERLING, S.; BERGER-PREISS, E.; STEINBACH, K. Identification of highly polar nitroaromatic compounds in leachate and ground water samples from a TNT-contaminated waste site by LC-MS, LC-NMR, and off-line NMR and MS investigations. **Anal Bioanal. Chem.**, v. 389, p. 1979–1988, 2007.

PROVERA, S.; GUERCIO, G.; TURCO, L.; CURCURUTO, O.; ALVARO, G.; ROSSIC, T.; MARC, C. Application of LC-NMR to the identification of bulk drug impurities in NK1 antagonist GW597599 (vestipitant). **Magn. Reson. Chem.**, v. 48, p. 523–530, 2010.

PUKALSKAS, A.; BEEKA, T. A. V.; WAARD, P. D. Development of a triple hyphenated HPLC–radical scavenging detection–DAD–SPE–NMR system for the rapid identification of antioxidants in complex plant extracts. **J. Chromatogr. A**, v. 1074, p. 81–88, 2005.

PULLEN, F. S.; SWANSON, A. G.; NEWMAN, M. J.; RICHARDS, D. S. Online Liquid-Chromatography Nuclear-Magnetic-Resonance Mass-Spectrometry - a Powerful Spectroscopic Tool for the Analysis of Mixtures of Pharmaceutical Interest. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 9, n. 11, p. 1003–1006, 1995.

PUSECKER, K.; ALBERT, K.; BAYER, E. Investigation of hop and beer bitter acids by coupling of high-performance liquid chromatography to nuclear magnetic resonance spectroscopy. **J. Chromatogr. A**, v. 836, p. 245–252, 1999.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J.-L.; ATINDEHOU, K. K.; TRAORE, D.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of the antifungal constituents of *Erythrina vogelii* by liquid chromatography with tandem mass spectrometry, ultraviolet absorbance detection and nuclear magnetic resonance spectrometry combined with liquid chromatographic micro-fractionation. **J. Chromatogr. A**, v. 974, p. 123–134, 2002.

QUEIROZ, E. F.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Modern Approaches in the Search for New Lead Antiparasitic Compounds from Higher Plants. **Current Drug Targets**, v. 10, n. 3, p. 202–211, 2009.

RAPP, E.; JAKOB, A.; SCHEFER, A. B.; BAYER, E.; ALBERT, K. Splitless on-line coupling of capillary high-performance liquid chromatography, capillary electrochromatography and pressurized capillary electrochromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Anal Bioanal. Chem.**, v. 376, p. 1053–1061, 2003.

RUSSELL, D. J.; HADDEN, C. E.; MARTIN, G. E.; GIBSON, A. A.; ZENS, A. P.; CAROLAN, J. L. A Comparison of Inverse-Detected Heteronuclear NMR Performance: Conventional vs Cryogenic Microprobe Performance. **American Chemical Society and American Society of Pharmacognosy**, v. 63, n. 8, p. 1047–1049, 2000.

SANDVOSS, M.; WELTRING, A.; PREISS, A.; LEVSEN, K.; WUENSCH, G. Combination of matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy–tandem mass spectrometry as a new efficient approach for the rapid screening of natural products: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish *Asterias rubens*. **J. Chromatogr. A**, v. 917, p. 75–86, 2001.

SCHEWITZ, J.; PUSECKER, K.; GFRÖRER, R.; GÖSTZ, U.; TSENG, L.-H.; ALBERT, K.; BAYER, E. Direct Coupling of Capillary Electrophoresis and Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy for the Identification of a Dinucleotide. **Chromatographia**, v. 50, n. 5/6, p. 333–337, 1999.

SEGER, C.; GODEJOHANN, M.; TSENG, L.-H.; SPRAUL, M.; GIRTLER, A.; STURM, S.; STUPPNER, H. LC-DAD-MS/SPE-NMR Hyphenation. A Tool for the Analysis of Pharmaceutically Used Plant Extracts: Identification of Isobaric Iridoid Glycoside Regioisomers from *Harpagophytum procumbens*. **Anal. Chem.**, v. 77, p. 878–885, 2005.

SILVA, A. C. O.; GIL, R. A. S. S.; KAISER, C. R.; AZEVEDO, D. A. Combining NMR and GC-MS to Characterize Olefin Rich Fractions of Automotive Gasolines. **Ann. Magn. Reson.**, v. 5, n. 1/3, p. 11–21, 2006.

SIMPSON, A. J.; TSENG, L.-H.; SIMPSON, M. J.; SPRAUL, M.; BRAUMANN, U.; KINGERY, W. L.; KELLEHER, B. P.;

- HAYESD, M. H. B. The application of LC-NMR and LC-SPE-NMR to compositional studies of natural organic matter. **Analyst**, v. 129, p. 1216–1222, 2004.
- SKOGERSON, K.; RUNNEBAUM, R.; WOHLGEMUTH, G.; ROPP, J. D.; HEYMANN, H.; FIEHN, O. Comparison of Gas Chromatography-Coupled Time-of-Flight Mass Spectrometry and ¹H Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Metabolite Identification in White Wines from a Sensory Study Investigating Wine Body. **J. Agric. Food Chem.**, v. 57, p. 6899–6907, 2009.
- SPRAUL, M. Developments in NMR Hyphenation for Pharmaceutical Industry. In: WEBB, G. A. (Ed.). **Modern Magnetic Resonance**, 2008. p.1221–1228.
- SPRAUL, M.; FREUND, A. S.; NAST, R. E.; WITHERS, R. S.; MAAS, W. E.; CORCORAN, O. Advancing NMR Sensitivity for LC-NMR-MS Using a Cryoflow Probe: Application to the Analysis of Acetaminophen Metabolites in Urine. **Anal. Chem.**, v. 75, p. 1546-1551, 2003.
- STAERK, D.; KESTING, J. R.; SAIRAFIANPOUR, M.; WITT, M.; ASILI, J.; EMAMI, S. A.; JAROSZEWSKI, J. W. Accelerated dereplication of crude extracts using HPLC–PDA–MS–SPE–NMR: Quinolinone alkaloids of *Haplophyllum acutifolium*. **Phytochemistry**, v. 70, p. 1055–1061, 2009.
- SUGIMOTO, N.; YOMOTA, C.; FURUSHO, N.; SATO, K.; YAMAZAKI, T.; TANAMOTO, K. Application of liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of ethyldimethylpyrazine, a food flavouring agent. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 12, p. 1253–1259, 2006.
- SUMARAH, M. W.; PUNIANI, E.; BLACKWELL, B. A.; MILLER, J. D. Characterization of polyketide metabolites from foliar endophytes of *Picea glauca*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 8, p. 1393-1398, 2008.
- TANG, J. A.; JERSCHOW, A. Practical aspects of liquid-state NMR with inductively coupled solenoid coils. **Magn. Reson. Chem.**, v. 48, p. 763–770, 2010.
- WALKER, G. S.; O'CONNELL, T. N. Comparison of LC-NMR and conventional NMR for structure elucidation in drug metabolism studies. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 10, p. 1295-1305, 2008.
- WASIM, M.; BRERETON, R. G. Application of evolving factor analysis to on-flow LC–NMR data using spectral windows. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 78, p. 51– 62, 2005a.
- _____. Application of multivariate curve resolution methods to on-flow LC-NMR. **J. Chromatogr. A**, v. 1096, p. 2–15, 2005b.
- WEBB, A. G. Nuclear magnetic resonance coupled microseparations. **Magn. Reson. Chem.**, v. 43, p. 688–696, 2005.
- WILSON, I. D. Multiple hyphenation of liquid chromatography with nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry and beyond. **J. Chromatogr. A**, v. 892, p. 315–327, 2000.
- WILSON, I. D.; BRINKMAN, U. A. T. Hyphenation and hypernation The practice and prospects of multiple hyphenation. **J. Chromatogr. A**, v. 1000, p. 325–356, 2003.
- WILSON, S. R.; MALERØD, H.; PETERSEN, D.; RISE, F.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. An alternative multiple-trapping LC-SPE-NMR system. **J. Sep. Sci.**, v. 30, p. 322 – 328, 2007.
- WILSON, S. R.; MALERØD, H.; PETERSEN, D.; SIMIC, N.; BOBU, M.-M.; RISE, F.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Controlling LC–SPE–NMR systems. **J. Sep. Sci.**, v. 29, p. 582 – 589, 2006.
- WOLFENDER, J.-L.; NDJOKO, K.; HOSTETTMANN, K. The Potential of LC-NMR in Phytochemical Analysis. **Phytochem. Anal.**, v. 12, p. 2-22, 2001.
- WOLFENDER, J.-L.; RODRIGUEZ, S.; HOSTETTMANN, K.; HILLER, W. Liquid Chromatography/Ultra Violet/Mass Spectrometric and Liquid Chromatography/Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Analysis of Crude Extracts of Gentianaceae Species. **Phytochem. Anal.**, v. 8, p. 97-104, 1997.
- WOLFENDER, J. L.; QUEIROZ, E. F.; HOSTETTMANN, K. Phytochemistry in the microgram domain - a LC-NMR

perspective. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 43, n. 9, p. 697-709, 2005.

_____. The importance of hyphenated techniques in the discovery of new lead compounds from nature. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 1, n. 3, p. 237-260, 2006.

WU, L.; HONG, T. Y.; VOGT, F. G. Structural analysis of photo-degradation in thiazole-containing compounds by LC-MS/MS and NMR. **Journal of Pharm. and Biom. Anal.**, v. 44, p. 763-772, 2007.

YAMAUCHI, K.; YAMASAKI, S.; TAKAHASHI, R.; ASAKURA, T. Microscopic structural analysis of fractured silk fibers from *Bombyx mori* and *Samia cynthia ricini* using ¹³C CP/MAS NMR with a 1 mm microcoil MAS NMR probehead. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 38, p. 27-30, 2010.

YANG, Y.-L.; LIAO, W.-Y.; LIU, W.-Y.; LIAW, C.-C.; SHEN, C.-N.; HUANG, Z.-Y.; WU, S.-H. Discovery of New Natural Products by Intact-Cell Mass Spectrometry and LC-SPE-NMR: Malbranpyrroles, Novel Polyketides from Thermophilic Fungus *Malbranchea sulfurea*. **Chem. Eur. J.**, v. 15, p. 11573 – 11580, 2009.

ZANOLARI, B.; WOLFENDER, J. L.; GUILLET, D.; MARSTON, A.; QUEIROZ, E. F.; PAULO, M. Q.; HOSTETTMANN, K. On-line identification of tropane alkaloids from *Erythroxylum vacciniifolium* by liquid chromatography-UV detection-multiple mass spectrometry and liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1020, n. 1, p. 75-89, 2003.

APLICAÇÃO DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A TÉCNICAS ESPECTROMÉTRICAS NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

Eduardo de Jesus Oliveira
José Maria Barbosa Filho
Luiz Elídio Gregório

ESPECTROMETRIA DE MASSAS – INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas (EM) é uma técnica que analisa íons em fase gasosa de forma a determinar a razão entre a massa e a carga (m/z) desses íons. Colocado de forma mais prática, a espectrometria de massas é uma técnica microanalítica (a quantidade de amostra necessária para análise é da ordem de apenas alguns nanogramas a picogramas, ou até menos em alguns casos) que serve para detectar e/ou quantificar espécies químicas. Nesse processo, a espectrometria de massas pode, em alguns casos, levar à determinação da composição elementar dessas espécies e, além disso, gerar alguma informação para fins de determinação ou confirmação estrutural. Outro tipo de informação importante, gerado pelo espectrômetro de massas, é a determinação da abundância dos íons que são gerados, o que fornece sua dimensão quantitativa, permitindo utilizar-se a



técnica para determinar, com elevada sensibilidade, a concentração de um determinado analito em uma amostra, desde que a resposta do detector seja calibrada com amostras do analito de concentração conhecida. Os íons que são analisados pelo espectrômetro de massas não precisam ser gerados em fase gasosa, mas a sua separação (com base na razão m/z) é realizada sempre em fase gasosa, e em alto vácuo (10^{-4} - 10^{-7} Pa¹). Como um espectrômetro de massas não é capaz de determinar a razão m/z de espécies neutras, o processo de ionização da amostra é um pré-requisito importante que deve ser considerado na análise de amostras complexas como amostras biológicas e extratos vegetais. Não existem técnicas de ionização universais, ou seja, não há uma técnica de ionização única que exiba uma eficiência de ionização adequada para qualquer tipo de analito.

Do ponto de vista instrumental, existe uma diversidade bastante grande de espectrômetros de massas que se diferenciam do ponto de vista analítico basicamente no seu poder de resolução (ver item denominado Resolução, Poder de Resolução e Determinação de Massa Exata), sensibilidade e faixa dinâmica. Apesar dessa diversidade de instrumentos, um espectrômetro de massas pode ser visto como sendo constituído de pelo menos 4 partes fundamentais, como esquematizado na figura 1.

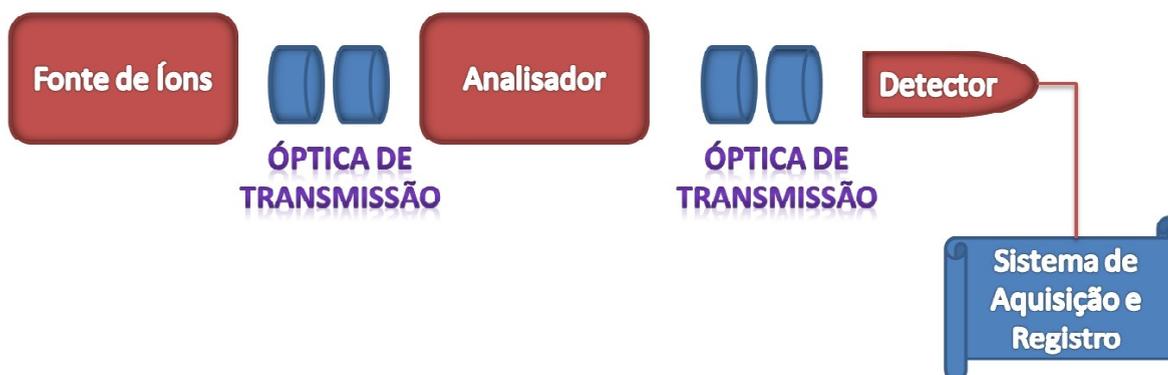


FIGURA 1 | Diagrama esquemático de um espectrômetro de massas.

A primeira destas partes é a fonte de íons. Nessa fonte, serão gerados os íons que serão posteriormente analisados para se determinar a sua razão m/z . A amostra a ser analisada, que pode ser uma substância pura ou uma mistura, pode ser introduzida na fonte de íons de vários modos, mas para os fins da técnica, objeto deste capítulo, ou seja, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas na análise de produtos naturais, a amostra (quimicamente complexa) é normalmente introduzida em solução, após ter sido separada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) ou cromatografia líquida de ultraeficiência (CLUE). Para substâncias puras, a amostra pode ser introduzida diretamente através do uso de uma bomba de infusão, que,

¹ Pascal (Pa): unidade padrão de pressão e tensão no Sistema Internacional. Equivale a força de 1N aplicada uniformemente sobre uma superfície de 1 m².

aliás, é o método mais utilizado para a introdução de substâncias necessárias para calibrar a escala de massa do equipamento (calibrantes). As amostras analisadas por CL-EM são introduzidas na fonte de íons na fase condensada e precisam gerar as espécies iônicas, que após transferência para a fase gasosa serão transmitidas à região do analisador, em um processo que é coletivamente chamado de ionização à pressão atmosférica (IPA). Essa ionização à pressão atmosférica contrasta com a região de alto vácuo do espectrômetro de massas em que os íons serão analisados e detectados. O desenho exato de uma fonte de íons à pressão atmosférica depende do modo de ionização específico, que será utilizado, e de detalhes de cada fabricante, mas invariavelmente a fonte deve servir, no caso de CL-EM, para a transferência seletiva das espécies iônicas geradas (excluindo as espécies neutras do solvente, por exemplo) para a região do analisador, com a máxima eficiência possível, ou seja, minimizando a perda de íons entre a fonte e o analisador.

Após serem gerados na fonte, os íons serão transmitidos ao analisador. A óptica de transmissão na figura 1 representa um ou mais elementos, que através de campos eletromagnéticos realiza a função de maximizar a eficiência de transmissão do feixe de íons gerado na fonte à região do analisador e desse ao detector. O analisador é o segundo elemento invariavelmente presente em qualquer espectrômetro de massas. Esse pode ser considerado o elemento mais importante do instrumento, pois definirá em grande medida o poder de resolução e outras características de desempenho do mesmo. A função do analisador de íons (também referido às vezes como filtro de íons) é justamente a determinação da razão m/z dessas espécies, que serão posteriormente transferidas com a máxima eficiência possível ao detector. Existem muitos tipos diferentes de analisadores de massas, cada um com suas vantagens e desvantagens, e também com princípio de funcionamento próprio. Normalmente, os espectrômetros de massas são classificados de acordo com o tipo de analisador presente no instrumento. Assim temos, por exemplo, espectrômetros de massa do tipo quadrupolo (simples ou de triplo quadrupolo), de aprisionamento de íons (*ion traps* 3D e *traps* lineares), de tempo de voo (*time of flight mass spectrometers*), *Orbitrap* muitos sistemas híbridos, nos quais mais de uma tecnologia de analisador são combinadas no mesmo instrumento. Os principais tipos de analisadores utilizados atualmente em instrumentos de CL-EM comercialmente disponíveis, serão discutidos com maior detalhamento no item Analisadores de Massas. O outro elemento que todo espectrômetro de massas possui é o detector. Nesse, a informação sobre a abundância (quantidade) de íons que chegam a este elemento por unidade de tempo é transformada em um sinal digital que é armazenado para posterior processamento. O detector realiza essa função em quase todos os tipos de instrumentos comerciais atuais, por meio da emissão secundária de elétrons, que cria o sinal elétrico que será processado. Os detectores mais utilizados são o multiplicador de elétrons (*electron multipliers*) e os detectores de microplacas, esses últimos utilizados com muito menos frequência, geralmente em instrumentos com analisadores de tempo de voo. Características importantes em um detector para utilização em instrumentos de CL-EM são o seu ganho (parâmetro que está ligado à performance do instrumento em termos de sua sensibilidade) e a sua compatibilidade com velocidades de escaneamento elevadas. O detector de um espectrômetro de massas possui um tempo finito de uso, pois o bombardeamento contínuo de íons em sua superfície sensível causa uma progressiva diminuição do seu ganho e a necessidade de aumento da voltagem de operação, para manutenção deste ganho eventualmente, gera um ruído eletrônico excessivamente alto. Neste momento, o detector deve ser substituído. Um dos tipos de detectores mais utilizados em instrumentos de CL-EM é o multiplicador de elétrons contínuo.

O último, mas não menos importante componente de um espectrômetro de massas é o sistema de controle, aquisição e processamento de dados. Atualmente todos os sistemas comerciais de espectrometria de massas se beneficiam da alta capacidade dos microprocessadores e da capacidade de armazenamento dos computadores para garantir a aquisição de dados de forma contínua e com a alta velocidade necessária

para ser compatível com os tempos de escaneamento cada vez menores dos espectrômetros de massas modernos. Uma característica importante do sistema de aquisição e processamento de dados nos equipamentos de CL-EM é a comodidade do *software* de permitir realizar, geralmente no mesmo módulo ou em módulos diferentes do mesmo *software*, funções diversas como o controle dos parâmetros do cromatógrafo, monitorização do sistema (como por exemplo o estado do vácuo), configuração dos parâmetros de ionização e detecção do espectrômetro, configuração de métodos de análise, processamento dos resultados e emissão e impressão de relatórios de análise. Sem dúvida, a popularização do uso dos sistemas de espectrometria de massas deve muito à intuitividade e interatividade dos *softwares* de aquisição e processamento de dados.

RESOLUÇÃO, PODER DE RESOLUÇÃO E DETERMINAÇÃO DE MASSA EXATA

Uma característica muito importante nos espectrômetros de massas é o seu poder de resolução. Os instrumentos podem ser divididos em espectrômetros de massas de baixa resolução e de alta resolução, termos de certa forma inadequados, uma vez que o termo resolução refere-se ao grau de separação (desde que definido algum critério para este grau de separação ser considerado aceitável) entre picos com razão m/z próxima em um espectro de massas e não à capacidade do instrumento em efetuar essa separação, ou seja, seu poder de resolução. Desta forma, uma denominação mais apropriada seria espectrômetros de massas de alto (ou baixo) poder de resolução. A consequência prática mais importante de equipamentos de alto poder de resolução é a possibilidade de utilizá-los na determinação da massa exata do íon que está sendo registrado. Essa determinação é importante, pois o peso molecular exato de uma substância é a soma do peso atômico de seus átomos constituintes e, a escala de peso atômico é uma escala relativa, baseada no peso do isótopo mais abundante do carbono, o carbono-12. Assim, os isótopos mais estáveis e mais abundantes dos elementos possuem um peso atômico que não é um número inteiro, mas fracionário. O peso atômico do isótopo mais abundante do oxigênio não é 16,0000, mas sim 15,9949 Da². Desta forma, a massa exata de uma substância cuja fórmula molecular é $C_6H_{12}O_3$ é 132,0786, se considerarmos apenas o peso atômico dos isótopos mais abundantes. Esta massa é geralmente chamada de massa exata monoisotópica, para diferenciar da massa exata média, calculada por intermédio da média geométrica que leva em conta a contribuição relativa (abundância) dos isótopos de cada elemento. O registro gráfico dos íons com uma determinada razão m/z em função de sua abundância (intensidade) é chamado de espectro de massas (Figura 2). No exemplo da substância acima, o espectro de massas da substância exibiria (dependendo da técnica de ionização e das condições utilizadas na análise) um pico com razão m/z igual a 132,0786 (na realidade uma unidade de massa acima ou abaixo deste valor, caso utilize-se ionização no modo positivo ou negativo respectivamente; ver seção mais adiante: Técnicas de Ionização a Pressão Atmosférica). Se o espectrômetro de massas utilizado na análise tiver um elevado poder de resolução, ele será capaz de determinar a massa exata deste íon com um número de casas decimais suficientes para permitir o assinalamento inequívoco a uma determinada fórmula molecular.

² Dalton (Da) ou unidade de massa atômica (u.m.a): unidade de medida para a massa de partículas atômicas (massas atômicas de elementos ou compostos), sendo definida como 1/12 da massa de um átomo de carbono-12 em seu estado fundamental.

Para o exemplo mencionado anteriormente, algumas das possibilidades de fórmula molecular, envolvendo átomos de C, H e O, que podem fornecer esta massa exata, estão listadas na tabela 1.

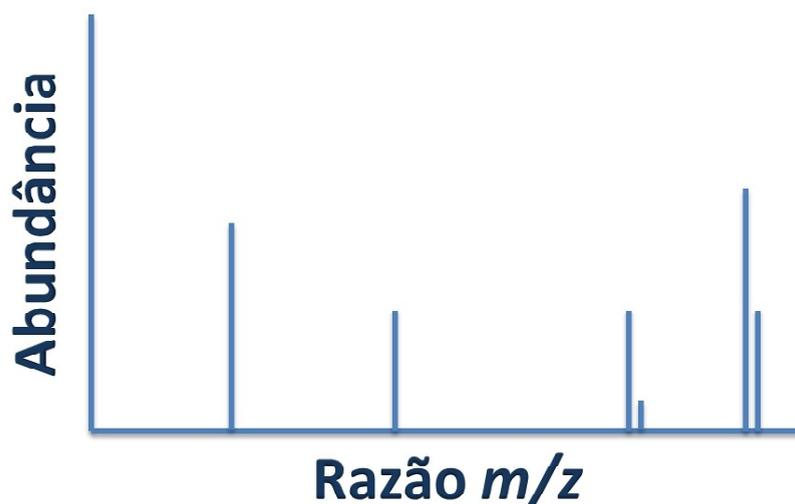


FIGURA 2 | Representação gráfica de um espectro de massas

TABELA 1 - Algumas das possibilidades de fórmulas moleculares com massa nominal 132 e as diferenças em ppm da massa exata 132,0785.

C	H	O	Massa exata monoisotópica teórica	Diferença da massa exata medida (132,0785)	Diferença em ppm*
11	0	0	132,0000	-0,0785	594,3
10	12	0	132,0939	0,0154	116,6
9	8	1	132,0575	-0,0210	159,0
8	4	2	132,0211	-0,0574	434,6
7	0	3	131,9847	-0,0938	710,2
6	12	3	132,0786	0,0001	0,8
5	8	4	132,0422	-0,0363	274,8
4	4	5	132,0058	-0,0727	550,4
3	0	6	131,9694	-0,1091	826,0
2	12	6	132,0633	-0,0152	115,1
1	8	7	132,0269	-0,0516	390,7
0	4	8	131,9906	-0,0879	665,5

*ppm = partes por milhão.

Pode-se perceber que a menor diferença (em ppm) entre a massa exata teórica e a massa observada para o íon com $m/z = 132,0785$, obtido no espectro de massas, é encontrada para a fórmula molecular $C_6H_{12}O_3$ e, portanto, é altamente provável que essa corresponda de fato à fórmula molecular da espécie em questão. Entretanto, a fórmula molecular $C_{10}H_{12}$ possui uma massa exata monoisotópica teórica de 132,0939, diferindo apenas 0,0154 Da da massa exata 132,0785 medida. Isso significa que o espectrômetro de massas utilizado deverá ser capaz de diferenciar (separar com base em algum critério predeterminado) uma massa de 132,0785 da massa 132,0939, ou seja, uma diferença de 0,0154 Da. A característica de um espectrômetro de massas que permite essa diferenciação é o seu poder de resolução. O poder de resolução (R) pode ser definido como sendo a razão entre um determinado valor de massa nominal M e a diferença em termos de razão m/z de dois íons que podem ser separados um do outro (Δm):

$$R = M / \Delta m$$

Qual seria o poder de resolução necessário para separar o íon monoisotópico $C_6H_{12}O_3$ do íon $C_{10}H_{12}$? Para calcular, considere como a massa nominal (M) o ponto médio entre a maior e a menor massa ($132,0785 + 132,0939 / 2 = 132,0862$). Assim, o poder de resolução necessário será de $132,0862 / 0,0154 = 8577$. Assim, um poder de resolução de no mínimo 8577 seria necessário, valor este bem superior ao poder de resolução alcançado com os espectrômetros de massas do tipo quadrupolo, por exemplo, que se situa em torno de 4000 no máximo. Entretanto, na definição de separação discutida anteriormente, algum critério qualificador faz-se necessário, ou seja, que critério deve-se utilizar para aceitar a separação entre dois picos na escala m/z ? Há basicamente duas formas de definir essa separação, ou resolução entre picos adjacentes (Figura 3). Uma delas é considerar como separados (ou resolvidos) dois picos adjacentes quando a altura do vale formado entre esses dois picos corresponder a no máximo 10% da altura máxima dos mesmos. Essa definição é limitada a picos adjacentes de alturas comparáveis, pois se assume que cada pico contribui com cerca de 5% para esta altura, o que não se aplica a picos com alturas muito diferentes. Um conceito mais geral é o que utiliza a largura do pico a meia-altura (*Full width at half maximum, FWHM*). Assim, se a razão m/z de um determinado pico é 500 e, esse pico possui uma largura a meia-altura correspondente a 0,1 m/z , a resolução FWHM para esse pico é de 5000 ($500 / 0,1$). Pode-se perceber pelo pico à esquerda da Figura 3, que na definição de resolução, utilizando o conceito FWHM, o valor de Δm é cerca de metade do valor obtido se utilizar o conceito de vale com 10% da altura (neste caso Δm é medido como sendo a distância compreendida entre os pontos médios dos dois picos na escala m/z). Sendo assim, os valores de poder de resolução (R), utilizando a definição de separação entre picos FWHM são cerca de duas vezes maiores que aqueles obtidos utilizando a definição de vale com 10% de altura, o que deve ser levado em conta na interpretação dos parâmetros de desempenho fornecidas pelos fabricantes de equipamentos comerciais.

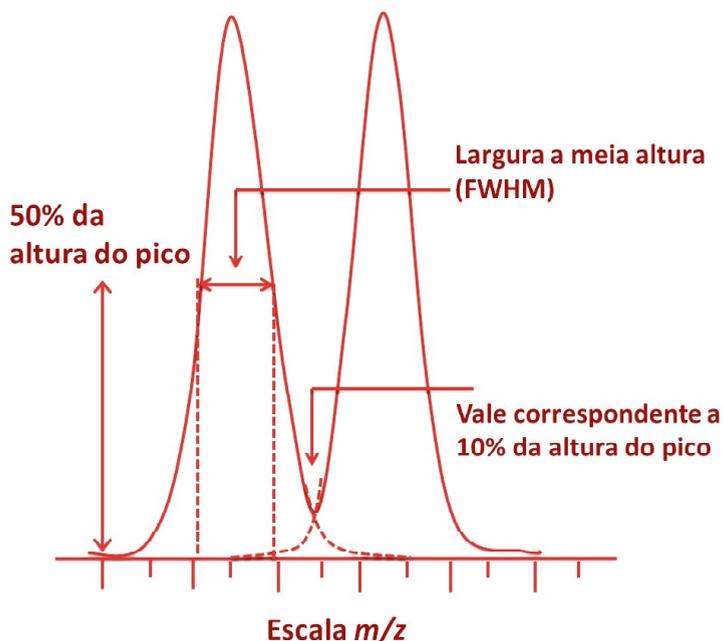


FIGURA 3. | Definições de resolução utilizando o conceito de vale com 10% da altura e largura a meia-altura (FWHM). Adaptado de Watson & Sparkman (2007).

Existem espectrômetros de massas com resolução constante e outros com poder de resolução constante. Por exemplo, os quadrupolos, normalmente, possuem resolução unitária ($\Delta m=1$) constante através de toda a escala de massas, ou seja, são capazes de diferenciar um íon com razão $m/z=100$ de um íon com razão $m/z=101$. Para isso, ele deverá ter um poder de resolução (R) de $100/1=100$. O mesmo instrumento deverá ter um poder de resolução (R) de 1000 para ser capaz de diferenciar um íon $m/z=1001$ de um íon $m/z=1002$ ($R=1000/1$). Desta forma, os espectrômetros de massas de quadrupolos têm resolução constante e poder de resolução crescente com o aumento da razão m/z . Outros espectrômetros de massas possuem poder de resolução constante. Assim por exemplo, espectrômetros com analisadores de tempo de voo possuem poder de resolução constante, mas resolução que varia dependendo da razão m/z considerada.

TÉCNICAS DE IONIZAÇÃO A PRESSÃO ATMOSFÉRICA

IONIZAÇÃO POR ELETRONEBULIZAÇÃO - IEN (*ELECTRO*spray IONIZATION-*ES*)

Já foi mencionado anteriormente que os íons gerados na fonte de íons precisam ser transmitidos com eficiência para a região do analisador e dessa ao detector. Isto significa que a região por onde o feixe de íons

é transmitido deve ser evacuada por bombas de vácuo com elevada eficiência para garantir um vácuo na região do analisador em torno de 10^{-4} - 10^{-7} Pa. Uma das maiores dificuldades, que foi encontrada na tentativa de compatibilizar a técnica de cromatografia líquida com a espectrometria de massas, consistiu no problema representado pela introdução de um fluxo constante de eluente (fluxos de 200 a 1000 $\mu\text{L}/\text{min}$ são normalmente utilizados com CLAE) a partir do cromatógrafo líquido para a região de alto vácuo do espectrômetro de massas sem comprometer esse vácuo. Outra dificuldade é que as técnicas de ionização mais utilizadas antes do advento das técnicas de ionização à pressão atmosférica (como ionização por impacto eletrônico ou ionização química) requeriam que o analito estivesse em fase gasosa, uma situação completamente adversa, se a intenção é introduzir e ionizar analitos a partir do eluente que sai de uma coluna cromatográfica de CLAE. Muitas estratégias foram tentadas com maior ou menor sucesso para contornar essas dificuldades, resultando em muitas interfaces diferentes. Uma das mais bem sucedidas interfaces foi àquela associada ao desenvolvimento da ionização por eletronebulização (IEN) ou ionização por *electrospray* (IES). Nesse modo de ionização, os analitos são introduzidos na fonte de íons em solução (por exemplo após eluição em uma coluna cromatográfica) através de um fino capilar metálico (Figura 4). Esse capilar metálico é mantido a um potencial elétrico positivo ou negativo da ordem de alguns quilovolts (o que irá gerar íons positivos ou negativos respectivamente) em relação a um contraeletrodo, formando um fino *spray* líquido com gotículas carregadas. O potencial elétrico, assim como o diâmetro do capilar metálico são essenciais para a formação do *spray*. Esse processo é conhecido por eletronebulização (*electrospray*) e pode ser descrito como um processo eletrolítico, em que o capilar é a extremidade oxidante e o contraeletrodo a extremidade redutora (Figura 4). O *spray* que se forma assume uma forma cônica característica, que foi descrita por Taylor (1964), e que ficou conhecida por “cone de Taylor”. As gotículas que se formam a partir do cone de Taylor contêm íons *quasimoleculares* dos analitos (formados geralmente por protonação ou desprotonação). À medida que o solvente dessas gotículas sofre evaporação, a densidade de carga aumenta em cada gotícula. Eventualmente, quando o tamanho da gotícula atinge um limite de tamanho, conhecido como limite de Rayleigh³, as forças de repulsão dos íons na superfície da gotícula vencem a tensão superficial dela e essa se fragmenta através de um processo eletro-hidrodinâmico, referido muitas vezes como “explosão coulômbica”, com a ejeção de íons do analito para a fase gasosa. Outro mecanismo alternativo para explicar o processo de ionização por eletronebulização (*charge residue model*) postula a alternância entre ciclos de evaporação e fissão das gotículas, eventualmente levando a produção de íons em fase gasosa. O processo de ionização por eletronebulização revolucionou a espectrometria de massas por algumas razões. Em primeiro lugar, nesse modo de ionização íons multiplamente carregados podem se formar quando a molécula possuir vários sítios para protonação (íons positivos) ou desprotonação (íons negativos). Isto significa que íons com razão m/z , onde z é diferente de 1 são formados. Assim por exemplo, se uma proteína com 20.000 Da é ionizada por eletronebulização e adquire 20 cargas, seu espectro de massas registrará um pico com razão $m/z = 1000$, trazendo para o domínio de equipamentos baseados em analisadores de quadrupolos a análise de substâncias polares, não voláteis e de alto peso molecular como biomoléculas. Depois, a técnica permitiu o interfaciamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas, uma vez que o processo de ionização por eletronebulização ocorre em pressão atmosférica. Dessa forma, os equipamentos de CL-EM atuais, geralmente,

³ Em referência ao físico inglês Lord Rayleigh, que descreveu pela primeira vez a quantidade máxima de carga que uma gotícula de líquido pode carrear antes de se fragmentar.

utilizam fontes de íons mantidas a pressão atmosférica, e os equipamentos são evacuados de forma diferencial por bombas de vácuo com capacidade diferenciada: analisadores são evacuados por bombas turbomoleculares de alta capacidade de forma a manter o alto vácuo necessário para a transmissão dos íons, enquanto que a região da interface entre a fonte de íons e o analisador pode ser mantida evacuada por uma bomba rotatória ou turbomolecular de menor capacidade. Em reconhecimento à importância do desenvolvimento da espectrometria de massas com ionização por eletronebulização para a análise de biomoléculas (FENN *et al.*, 1989), o prêmio Nobel de química, em 2002, foi concedido ao químico norte americano John Fenn, um dos pioneiros na área.

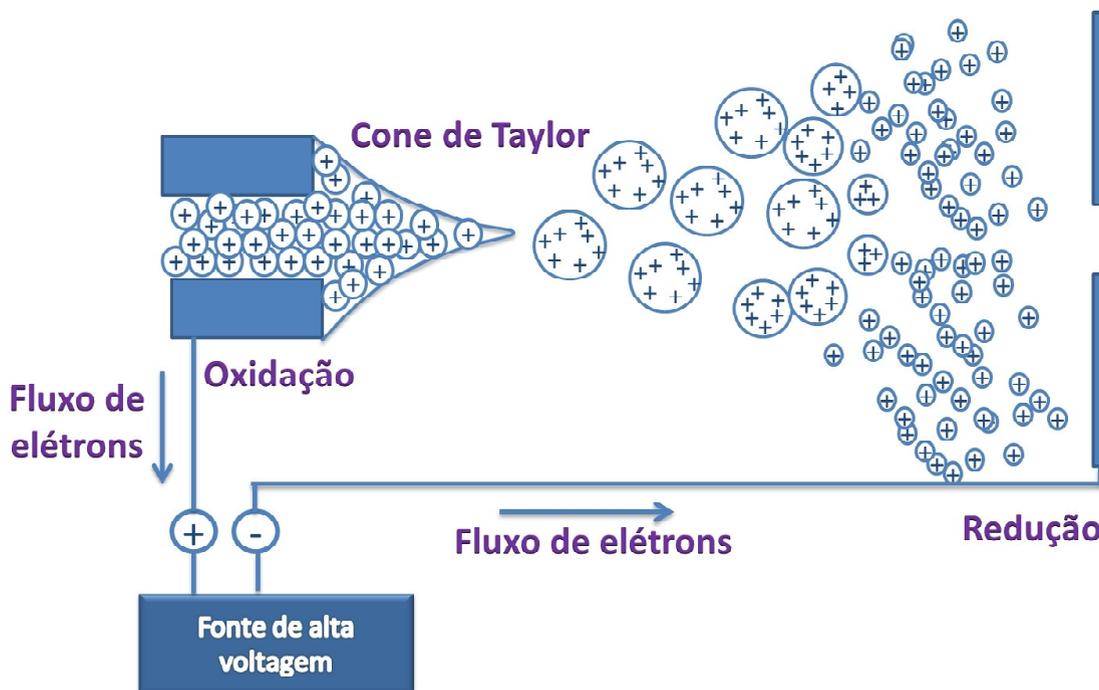


FIGURA 4 | Representação esquemática do processo de ionização por eletronebulização.

IONIZAÇÃO QUÍMICA A PRESSÃO ATMOSFÉRICA - IQPA (*ATMOSPHERIC PRESSURE CHEMICAL IONIZATION - APC*)

IQPA é uma técnica de ionização similar à ionização química (IQ), muito utilizada em análises de Cromatografia em fase Gasosa (CG-EM), entretanto como o próprio nome sugere, ocorre em pressão atmosférica. Esse tipo de ionização permite altas taxas de fluxo de solvente, podendo ser facilmente utilizado em sistemas de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (CL-EM). Como o processo de ionização ocorre a pressão atmosférica, os elétrons necessários para a ionização primária não podem ser produzidos por um filamento metálico aquecido como nas fontes de ionização química (IQ)

convencionais, pois esse filamento poderia se queimar, sofrer corrosão ou oxidação. Como alternativas para contornar este problema podem ser utilizados emissores de partículas β como o ^{63}Ni ou descargas corona, que são fontes de elétrons resistentes à presença de gases corrosivos ou oxidantes, sendo a descarga corona preferencialmente utilizada nos equipamentos comercialmente disponíveis, pela sua segurança e eficácia.

A técnica IQPA é normalmente aplicada a moléculas de polaridade intermediária, sendo que a massa molecular não deve ser maior que 1500 Da (ARDREY, 2003, DE HOFFMANN & STROOBANT, 2007; DASS, 2007).

Princípio da fonte de ionização IQPA

O analito em solução aplicado através de infusão direta ou como eluente de um sistema de cromatografia líquida (CLAE, CLUE), com fluxo de 0,2 a 2 mL/min é introduzido diretamente em um nebulizador pneumático, sendo convertido em uma fina névoa por um feixe de gás nitrogênio em alta velocidade. As gotas são dispersas por um fluxo de gás por meio de um tubo de quartzo aquecido que promove a dessolvatação e vaporização em uma câmara. O calor transferido para as gotas do *spray* possibilita a vaporização da fase móvel e da amostra no fluxo de gás. A temperatura desta câmara é controlada, possibilitando a vaporização, independentemente, da natureza e do fluxo da fase móvel. O gás aquecido (a cerca de 120 °C) e os analitos deixam esse tubo, onde após dessolvatação, são conduzidos para um eletrodo (agulha) de descarga corona, o qual promove a ionização. Os processos de ionização em IQPA, portanto são equivalentes aos da ionização química (IQ), tendo como diferencial a ocorrência à pressão atmosférica. No modo de ionização positivo ocorrem a transferência de próton ou adução de íons do gás reagente, sendo influenciada pela afinidade relativa aos prótons dos íons reagentes e das moléculas do analito em fase gasosa. No modo de ionização negativo, os íons do analito são produzidos através de abstração de próton ou formação de adutos. Geralmente a fase móvel evaporada atua como gás ionizante e os íons reagentes são produzidos a partir de uma descarga corona no solvente nebulizado e vaporizado. Normalmente a descarga corona forma através de ionização por elétrons, íons primários como por exemplo N_2^+ ou O_2^+ , os quais colidem com moléculas vaporizadas do solvente formando os íons reagentes secundários na fase gasosa.

A ionização do substrato é altamente eficiente pois ocorre à pressão atmosférica e com elevada frequência de colisões. Além disso, a alta frequência de colisões serve para termalizar as espécies reagentes. Da mesma maneira, a rápida dessolvatação e vaporização das gotas reduzem consideravelmente a decomposição térmica do analito. O resultado é a produção predominante de íons de espécies moleculares com baixa fragmentação. Os íons produzidos à pressão atmosférica entram no espectrômetro de massas por meio de uma pequena entrada (*inlet*), ou por meio de um capilar aquecido, sendo focalizados em direção ao analisador de massas. Essa entrada (*inlet*) deve possuir largura suficiente para a entrada adequada do maior número possível de íons sem comprometer a pressão negativa (vácuo) necessária para a realização da análise. Para contornar esse problema, a solução mais utilizada consiste na aplicação de diversos diferenciais de pressão de vácuo (bombeamento diferencial), separados por *skimmers*. Na região de vácuo intermediário ocorre o desagrupamento (*declustering*) dos íons formados. A IQPA tem se tornado uma fonte de ionização

popular para aplicações em acoplamento com a cromatografia líquida para a análise de moléculas com polaridade intermediária.

A figura 5 apresenta um esquema e o princípio de ionização de uma fonte IQPA, já a figura 6 mostra as principais reações íon-molécula que ocorrem em fase gasosa para a ionização do analito nos modos positivo e negativo em IQPA.

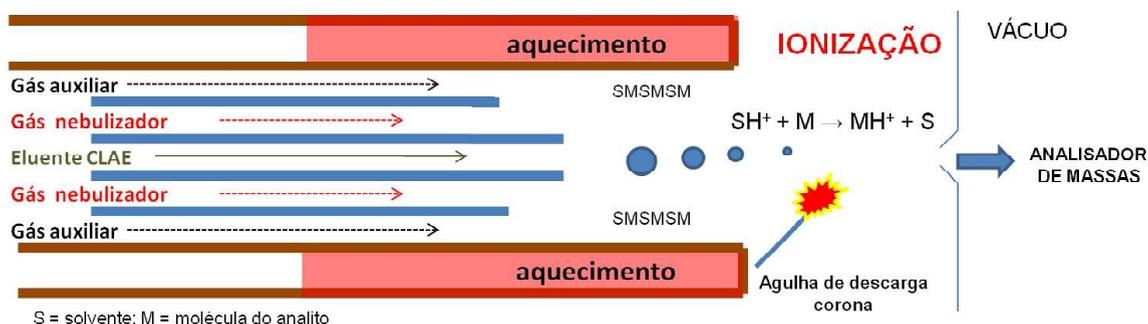


FIGURA 5 | Esquema da fonte de ionização IQPA.

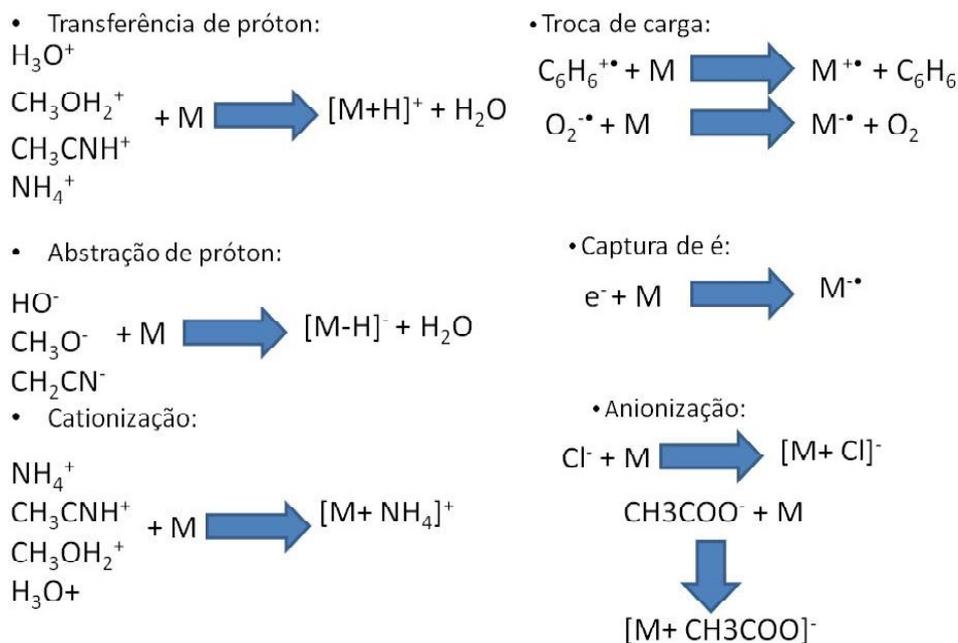


FIGURA 6 | Principais reações íon-molécula em fase gasosa para a produção de íons positivos e negativos em IQPA – Adaptado de Watson & Sparkman (2007).

Comparativo IQPA X IEN

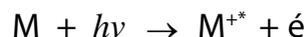
Tanto a ionização química à pressão atmosférica (IQPA) quanto a ionização por eletronebulização ou *electrospray* (IEN) são consideradas técnicas brandas de ionização, no entanto, apresentam diferentes aplicações em termos de polaridade e massa molecular dos analitos. Considerando que várias classes de metabólitos secundários vegetais são altamente polares e apresentam de baixa a alta massa molecular, a IEN constitui o método de ionização mais utilizado, embora não seja universal. Devido ao seu princípio, a IEN também constitui um método de ionização mais brando do que a IQPA e preserva a integridade do analito, pois ao contrário da IQPA, não utiliza temperaturas elevadas (400 °C). As desvantagens da IEN, em comparação com a IQPA, são a sua menor robustez a interferências da matriz e alterações das condições de fase móvel.

FOTOIONIZAÇÃO A PRESSÃO ATMOSFÉRICA – FIPA (*ATMOSPHERIC PRESSURE PHOTOIONIZATION- APPI*)

A fonte FIPA consiste em um dos mais recentes desenvolvimentos de fontes de íons à pressão atmosférica, em que é utilizada a energia de fótons ($h\nu$) para ionizar moléculas em fase gasosa.

Mecanismo de ionização: a amostra em solução é vaporizada por um nebulizador aquecido similar ao utilizado em IQPA. Existem duas abordagens para a ionização por FIPA, na primeira abordagem, após a vaporização, o analito interage com fótons emitidos por uma lâmpada de descarga UV, em que estes fótons induzem uma série de reações em fase gasosa que conduzem a ionização das moléculas da amostra. A fonte FIPA, desta forma, consiste em uma fonte de IQPA modificada, que ao invés de se empregar uma agulha de descarga corona, emprega-se uma lâmpada de descarga que emite fótons. Na segunda abordagem pode ser aplicada na razão de um décimo do fluxo eluente da cromatografia líquida, um dopante (por exemplo tetrahidrofurano ou tolueno) que é ionizado pelos fótons emitidos pela lâmpada de UV, que posteriormente protona o analito, as duas abordagens estão representadas na Figura 7. Nos últimos anos têm sido desenvolvidas diversas fontes de ionização FIPA, as quais estão comercialmente disponíveis. O grande interesse ou particularidade da fotoionização reside em seu potencial em ionizar substâncias não ionizáveis através das técnicas IQPA ou IEN, como por exemplo substâncias muito apolares. As lâmpadas de UV geralmente utilizam fóton em energia maior (10 eV) do que os potenciais dos analitos ou dos dopantes, porém menores do que a do gás atmosférico e dos solventes utilizados, permitindo a formação de íons do analito, com baixa ou ausente formação de íons do solvente, o que reduz o ruído de fundo da análise. O emprego de CL-EM na análise de substâncias apolares foi revisado e discutido por Hayen & Karst (2003), em que não foi eleita nenhuma fonte de ionização universal, mas destacado o grande potencial das fontes de ionização a pressão atmosférica (IEN, IQPA e FIPA) para aplicações específicas, com destaque para a FIPA, que tem sido utilizada como uma técnica complementar ao IQPA na análise de substâncias menos polares, sendo que para a análise de substâncias aromáticas com poucos grupos ou funções polares a FIPA é reconhecidamente superior ao IQPA. A Figura 9 apresenta um comparativo da eficiência das três técnicas de ionização à pressão atmosférica mais utilizadas em acoplamento a cromatografia líquida: IEN (*ES*), IQPA (*APC*) e FIPA (*APPI*).

1) Ionização direta do analito (M) pela abstração de elétron:



Podendo ocorrer protonação do íon radicalar pela participação de solvente prótico (S)



2) Ionização de uma molécula dopante (D) através da luz UV (a) e posterior protonação do molécula do analito (b):

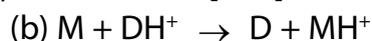
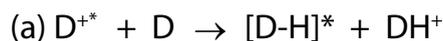


FIGURA 7 | Reações de ionização em FIPA – Extraído de Watson & Sparkman (2007). $+\bullet$

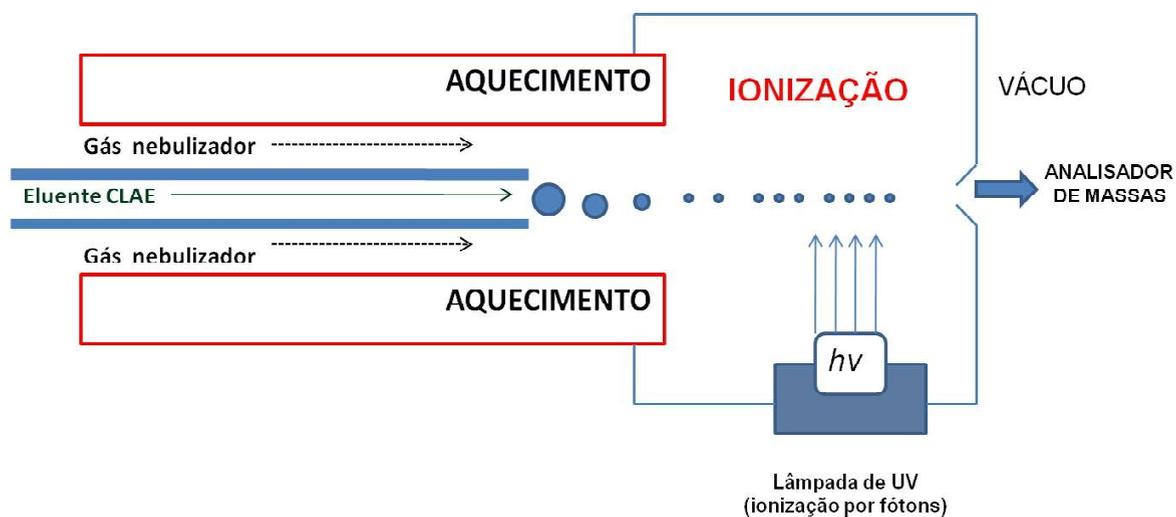


FIGURA 8 | Diagrama de uma fonte de ionização FIPA.

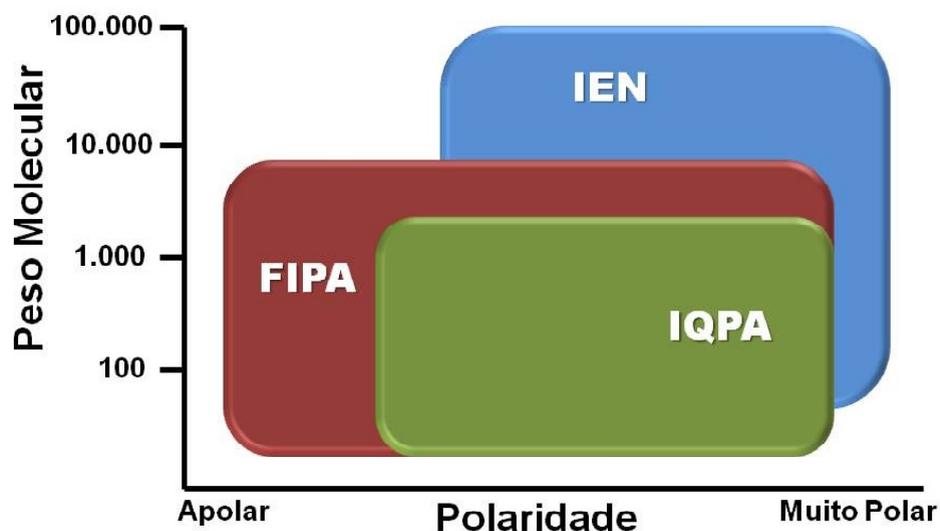


FIGURA 9 | Eficiência dos modos de ionização à pressão atmosférica em função da polaridade e peso molecular dos analitos.

ANALISADORES DE MASSAS

Os analisadores de massas são responsáveis pela separação dos íons no espaço ou no tempo, de acordo com a razão m/z desses íons, por meio de uma combinação de campos elétricos e/ou magnéticos, de forma que a sua abundância possa ser medida. Existem muitos tipos diferentes de analisadores, e convencionou-se utilizar o analisador como sinônimo de espectrômetro de massas, tamanha a sua importância em determinar parâmetros de desempenho como poder de resolução, sensibilidade e faixa dinâmica. A área de pesquisa em novos analisadores de massas encontra-se em constante desenvolvimento, com novos aperfeiçoamentos sendo lançados pelos fabricantes de equipamentos todo ano. A seguir, uma descrição sucinta dos principais analisadores encontrados atualmente nos equipamentos de CL-EM comercialmente disponíveis e algumas de suas vantagens e desvantagens.

ANALISADORES COM QUADRUPOLO DE TRANSMISSÃO (QUADRUPOLO SIMPLES E TRIPLO QUADRUPOLO)

O quadrupolo é um filtro de íons que consiste de quatro barras de metal (geralmente ligas de molibdênio) de seção transversal hiperbólica (ideal) ou circular (aceitável), alinhadas perpendicularmente uma à outra e conectadas aos pares a uma fonte de voltagem de corrente contínua (DC) e voltagem de radiofrequência (Rf) superimpostas (Figura 10). Assim, um dos pares de barras recebe uma voltagem de

corrente contínua com polaridade positiva (+U) e radiofrequência $V \cdot \cos \omega t$, onde ω é a frequência angular da voltagem de radiofrequência. O outro par de barras recebe uma corrente contínua com polaridade -U e radiofrequência de mesma intensidade $V \cdot \cos \omega t$, mas defasada 180° uma da outra ($+(U+V \cos \omega t)$ e $-(U+V \cos \omega t)$ para os dois pares de barras respectivamente). O efeito da aplicação dessas voltagens é a criação de um campo eletromagnético oscilante no centro das barras que é capaz de influenciar o movimento de íons que podem assim ser transmitidos pelo quadrupolo se (a depender de sua razão m/z) adquirirem trajetórias estáveis ao receber a influência do campo quadrupolar. Caso contrário serão neutralizados ao colidir com as barras metálicas no caso de trajetórias instáveis. Variando o campo do quadrupolo (DC/Rf), pode-se obter um espectro de massas transmitindo-se sequencialmente (modo de varredura) íons com razão m/z diferentes, dentro de uma determinada faixa, ao detector. Pode-se alternativamente, caso o analito seja conhecido, operar um quadrupolo no modo *SIM* (*Selected Ion Monitoring*, ou monitoramento de íons selecionados), onde apenas um ou poucos íons são transmitidos, mantendo-se o campo com um valor fixo ou variando-o numa faixa estreita de algumas combinações de valores apenas.

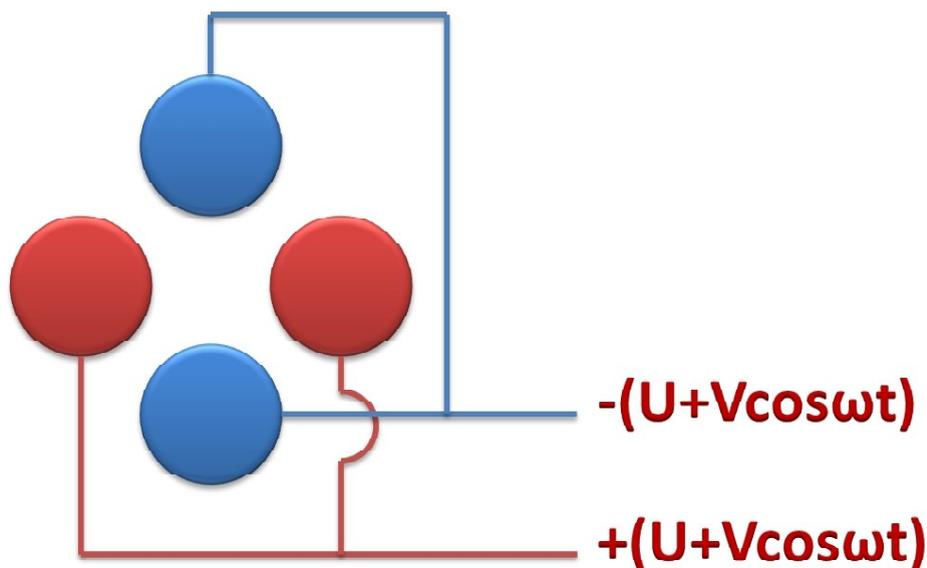


FIGURA 10 | Diagrama esquemático mostrando as conexões de voltagem de corrente contínua e radiofrequência entre os pares de barras de um quadrupolo.

Configurações típicas de instrumentos comerciais de CL-EM baseados na tecnologia de quadrupolos incluem os sistemas de quadrupolo único e os sistemas de espectrometria de massas de triplo quadrupolo. Os equipamentos de triplo quadrupolo (Figura 11) possuem dois quadrupolos (Q1 e Q2) separados por uma câmara de colisão, onde um gás inerte (por exemplo argônio) pode ser introduzido para induzir dissociação dos íons formados na fonte de íons e transmitidos por Q1. Essa dissociação se dá por meio da colisão com as moléculas do gás (*collision-induced dissociation*) e pode fornecer informação estrutural importante.

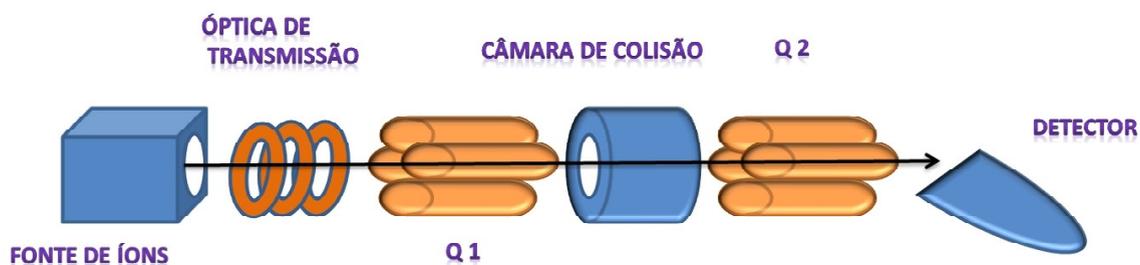


FIGURA 11 | Diagrama esquemático representando um espectrômetro de massas de tripo quadrupolo.

Equipamentos de tripo quadrupolo introduzem a possibilidade de realizar espectrometria de massas em sequência (EM/EM). Assim, como já descrito anteriormente, os quadrupolos podem ser operados no modo de varredura (*scan*) ou no modo de monitoramento de íons selecionados (*SIM*). Com dois quadrupolos em sequência (algumas vezes referidos como “em *tandem*”), as possibilidades de operação desses quadrupolos são diversas:

Varredura de íons produto (Product Ion Scan)

Neste modo o primeiro quadrupolo (Q1) é operado no modo *SIM*, permitindo a transmissão de um determinado íon precursor com razão m/z escolhida. A câmara de colisão funcionará com certa pressão de argônio e com uma energia de colisão que pode ser variada, de modo a induzir maior ou menor fragmentação do íon precursor. Os fragmentos do íon precursor são então transmitidos por Q2 que será operado no modo de varredura (*scan*), cobrindo uma faixa de massa cujo limite superior será a razão m/z do íon precursor. O espectro de massas assim obtido é geralmente referido como espectro de massas de íons produto, antigamente referido como espectro de íons filhos (*daughter ion spectra*). Esse modo de aquisição está representado na Figura 12.



FIGURA 12 | Representação esquemática do modo de aquisição de varredura de íons produto em um equipamento de tripo quadrupolo.

Modo de monitoramento de reação selecionada (SRM, Selected Reaction Monitoring)

Neste modo de operação, geralmente utilizado para fins de quantificação, Q1 é operado no modo *SIM*, permitindo a transmissão de um determinado íon precursor com razão m/z escolhida. Esse íon precursor é então fragmentado na câmara de colisão. Um determinado íon filho com abundância adequada (escolhido geralmente por meio da análise do espectro de íons produto) é então selecionado para ser transmitido por Q2 ao detector (Figura 13). Desta forma, monitora-se a transição de um íon precursor a um íon produto. Qualquer substância presente na amostra que não produza a transição especificada não será detectada, o que torna essa modalidade de aquisição extremamente seletiva, sendo muito adequada para amostras complexas, tais como amostras extraídas de fluidos biológicos como plasma, sangue e urina, ou para quantificação em matrizes complexas como extratos de plantas. Nesse modo de aquisição, não são produzidos espectros de massas, uma vez que apenas íons com razão m/z correspondente aos íons precursores e íons-produto estão sendo monitorados. O monitoramento (e quantificação) de várias substâncias de forma simultânea pode ser feito, incluindo analitos, padrão interno e ainda uma ou mais transições de confirmação para cada analito. Esse é o modo de aquisição mais utilizado em equipamentos de triplo quadrupolo para fins de quantificação, tanto pela sua elevada seletividade, quanto pela sensibilidade.



FIGURA 13 | Representação esquemática do modo de aquisição de monitoramento de reação selecionada em um equipamento de triplo quadrupolo.

Modo de varredura de íons precursores (precursor ou parent ion scan)

Neste modo de operação, Q1 é operado no modo *scan*, configurado para transmitir íons com uma determinada faixa de razão m/z . A câmara de colisão é utilizada para fragmentação e Q2 é operado no modo *SIM*, para transmitir ao detector apenas um íon com uma determinada razão m/z selecionada (Figura 14). Esse modo de aquisição é normalmente utilizado para se avaliar quais íons precursores se fragmentam gerando o mesmo íon produto. Um exemplo da utilidade desse modo de detecção é a investigação de substratos que geram metabólitos de um mesmo tipo, por exemplo, quais substratos serviram para glicuronidação (neste caso os glicuronídeos se fragmentam, gerando um íon produto comum com $m/z=177$).



FIGURA 14 | Representação esquemática do modo de aquisição de varredura de íons precursores em um equipamento de triplo quadrupolo.

Modo de varredura por perda de neutros constante (Constant neutral loss)

Neste modo de aquisição (Figura 15), ambos os quadrupolos são operados em modo *scan*, mas Q2 é operado com uma diferença de massa (*offset*) de certo valor m . Dessa forma, um sinal só será transmitido por Q2 e detectado, se um determinado íon precursor que tenha uma razão m/z dentro da faixa de massa selecionada para escaneamento em Q1 se fragmentar com perda de um fragmento de massa m . Esse modo de operação pode ser utilizado para determinação de uma classe de substâncias que compartilhem algum grupo funcional comum, que no processo de fragmentação gere uma mesma espécie neutra, como por exemplo, álcoois, com perda de um fragmento neutro de 18 Da.



FIGURA 15 | Representação esquemática do modo de aquisição de varredura por perda de neutros constante em um equipamento de triplo quadrupolo.

ANALISADORES DE APRISIONAMENTO DE ÍONS (*ION TRAPS*)

Enquadram-se nesta categoria uma variedade grande de analisadores de massa que utilizam uma combinação de campos eletromagnéticos para armazenar e manipular íons em um volume reduzido de eletrodos ou mesmo de multipolos (quadrupolos, hexapolos ou outros). Os *ion traps* se dividem em *traps* 3D e *traps* lineares, esses últimos utilizando quadrupolos (ou multipolos de outras ordens) com eletrodos com potencial mais elevado nas suas extremidades. Os *ion traps* 3D possuem geralmente dois eletrodos nas extremidades (*endcap electrodes*) por onde os íons são admitidos e ejetados respectivamente, e um eletrodo central (*ring electrode*), como esquematizado na Figura 16. A introdução de certa pressão de um gás inerte no volume de confinamento dos *traps* leva ao aprisionamento dos íons por meio de um fenômeno conhecido como resfriamento colisional (*collisional cooling*). As mesmas equações que descrevem o movimento de íons em um quadrupolo de transmissão (equações de Mathieu) servem para descrever a trajetória dos íons em analisadores de aprisionamento de íons. O desenvolvimento dessa classe de analisadores teve que superar alguns problemas iniciais, relacionados ao confinamento em um espaço limitado de um grande número de íons (e a conseqüente repulsão entre eles), em uma situação conhecida por efeito de carga/espaço (*space-charge effect*). A grande vantagem dos analisadores de aprisionamento de íons é a possibilidade de realizar experimentos de caracterização estrutural através da indução de fragmentação colisional sequencial de um determinado íon precursor que pode ser enriquecido e aprisionado seletivamente no *trap*. O íon precursor pode ser, posteriormente, fragmentado, gerando um espectro de massas, e a partir desse, um novo íon pode ser escolhido para fragmentação e assim sucessivamente, em um processo conhecido geralmente por EMⁿ.

Este é fundamentalmente um processo de separação de íons no domínio do tempo, ao contrário da espectrometria de massas em *tandem* no espaço, como descrito na seção intitulada Analisadores de Quadrupolos de Transmissão (Quadrupolo Simples e Triplo Quadrupolo) para equipamentos de triplo quadrupolo. Atualmente, tanto *traps* lineares quanto 3D são utilizados em uma variedade de configurações de equipamentos, incluindo muitos modelos de espectrômetro de massas híbridos.

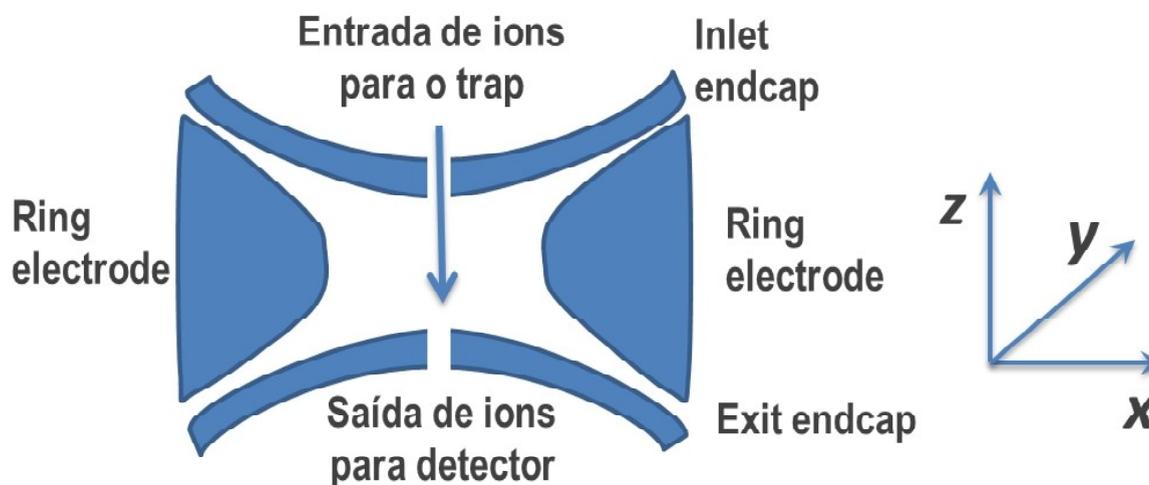


FIGURA 16 | Diagrama esquemático mostrando um corte transversal de um ion trap 3D. Os eletrodos de entrada e de saída e o eletrodo em anel (*ring electrode*) podem ser vistos, assim como a direção das coordenadas. Adaptado de: De Hoffmann & Stroobant, 2007.

ANALISADORES DE MASSA POR TEMPO DE VOO – ATV (*TIME OF FLIGHT-TOF*)

Os analisadores de massas por tempo de voo foram descritos inicialmente em 1946 (STEPHENS, 1946). Entretanto, foi apenas na década de 1980 que o interesse por esse tipo de analisador ressurgiu, em grande medida devido ao desenvolvimento de técnicas de ionização de dessorção como a ionização por dessorção a *laser* assistida por matriz (*matrix-assisted laser desorption ionization, MALDI*), e, posteriormente, a ionização por eletronebulização (IEN). O analisador por tempo de voo é particularmente adequado a uma técnica de ionização pulsada como *MALDI*, e os equipamentos de *MALDI-TOF* foram, durante a década de 1980 e 1990, os principais instrumentos utilizados na análise de biomoléculas de alto peso molecular, encontrando aplicações importantes na área de proteômica. Os analisadores de tempo de voo se baseiam na medida exata e precisa do tempo que íons com razão m/z diferentes levam para completar sua trajetória em uma região de deriva (região do espectrômetro livre de campo, aonde os íons possuem velocidade constante) após sofrerem uma aceleração. Esse tipo de analisador sofreu vários aperfeiçoamentos para aumentar a sua resolução, a sua faixa dinâmica (faixa de linearidade), sua velocidade de escaneamento e a sua eficiência global de transmissão de íons, mas atualmente é uma tecnologia bem estabelecida, sendo um dos equipamentos mais utilizados quando o poder de resolução elevado se faz necessário. A Figura 17 mostra um

diagrama esquemático de um espectrômetro de massas comercial com analisador de tempo de voo. Um dos aperfeiçoamentos importantes desse tipo de equipamento é a introdução de um *reflectron*, ou espelho de íons, como é muitas vezes chamado. Esse equipamento se contrapõe à dispersão inicial na distribuição da energia cinética dos íons de mesma razão m/z que ocorre no início de suas trajetórias e que contribui para a diminuição da resolução, sendo um dos aperfeiçoamentos mais importantes para permitir o elevado poder de resolução dos equipamentos atualmente disponíveis. O *reflectron* atua através do uso de uma série de placas com campo elétrico estático crescente que reverte a direção da trajetória dos íons. O *reflectron* faz com que íons com maior energia cinética penetrem mais ao longo de suas placas do que íons com menor energia cinética inicial. Dessa forma, íons mais energéticos terão uma trajetória maior do que íons de mesma razão m/z , mas com energia cinética inicial menor, de forma que ambos acabam sendo refocados e exibem o mesmo tempo de voo, aumentando assim a resolução. O equipamento mostrado na Figura 16 possui ainda um segundo espelho de íons, de forma que a trajetória do feixe de íons tem um formato em “W”, o que aumenta bastante a resolução, embora à custa de perdas na sensibilidade.

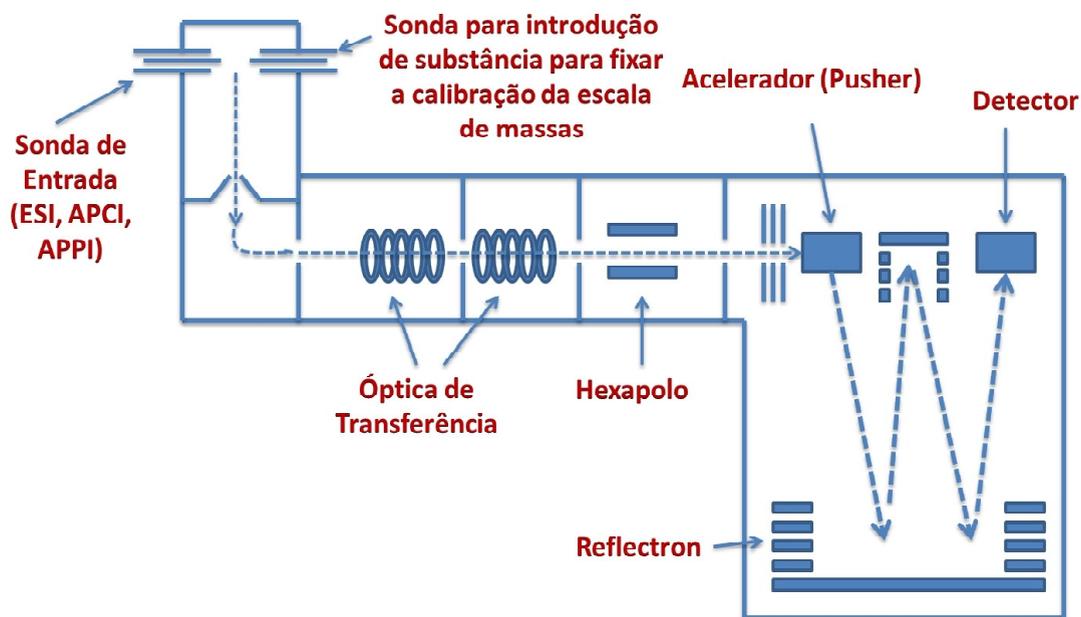


FIGURA 17 | Diagrama esquemático representando um espectrômetro de massas de tempo de voo comercial com *reflectron*. As setas tracejadas indicam o sentido do feixe de íons. Adaptado de Watson & Sparkman, 2007.

ANALISADOR DO TIPO *ORBITRAP*

Este analisador de massas de alto poder de resolução funciona de modo análogo a um analisador de massas por ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier (*FT-ICR MS*), que é o padrão-ouro em

termos de poder de resolução, mas com a vantagem de não necessitar de um magneto supercondutor e do resfriamento criogênico associado ao magneto para a sua manutenção. O princípio básico da técnica de ressonância ciclotrônica de íons por transformada de Fourier se baseia no fato de que íons com razão m/z diferentes irão sofrer movimentos de precessão com frequências diferentes quando submetidos a um campo magnético. Nesse movimento de precessão, os íons induzem um sinal com frequência e amplitude característicos, que decai ao longo do tempo. Após a operação de transformada de Fourier, esse sinal é convertido no domínio da frequência, e gera o espectro de massas, de forma análoga à transformação de um sinal de decaimento livre (*free induction decay*) em um espectro, na técnica de ressonância magnética nuclear por transformada de Fourier. O analisador do tipo *Orbitrap* consiste de um eletrodo externo e um interno com forma de barril (Figura 18). Os íons são introduzidos no trap em uma posição deslocada do eixo central do analisador com certa velocidade perpendicular ao eixo z , como mostrado na figura. Um potencial elétrico constante é aplicado entre os dois eletrodos (não existem campos magnéticos ou elétricos oscilantes). Como esses possuem uma forma assimétrica, e a distância entre eles aumenta em direção ao centro do *Orbitrap*, os íons, apropriadamente, injetados (um *trap* linear curvo, chamado de *C trap* é importante no processo de injeção dos íons no *Orbitrap*) assumem uma trajetória circular entre o eletrodo interno e externo, oscilando na direção Z (devido a inhomogeneidade do campo elétrico resultante do formato dos eletrodos) com uma frequência que é proporcional à massa do íon. Íons com diferentes razões m/z oscilam com frequências diferentes dentro do *Orbitrap*, induzindo uma corrente no eletrodo externo que pode ser medida. Esse sinal é modulado em amplitude e frequência, e após transformada de Fourier, de forma análoga à espectrometria de massas por ressonância ciclotrônica, o espectro de massas é gerado. O *Orbitrap* é considerado a única nova tecnologia em analisadores a surgir nos últimos 20 anos e possui características de desempenho impressionantes, incluindo poder de resolução acima de 70.000, uma performance comparável à técnica *FT-ICRMS*, sem a necessidade de manter um magneto supercondutor para operação.

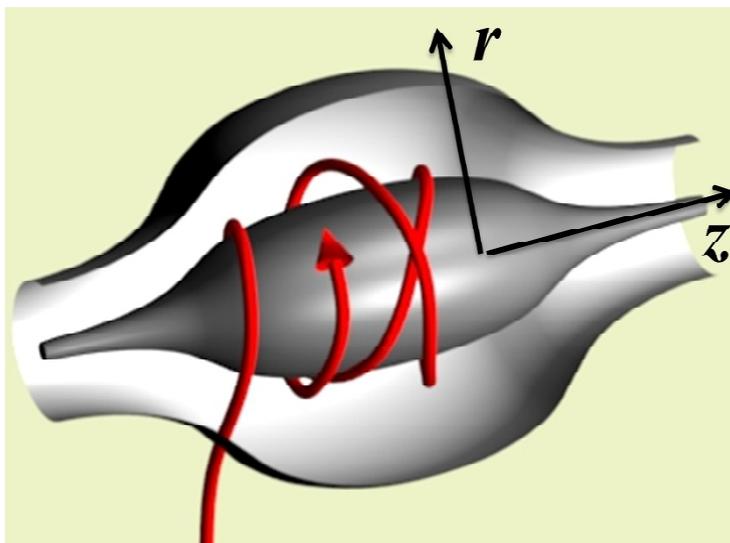


FIGURA 18 | Representação da trajetória de íons em um analisador do tipo *Orbitrap* (Adaptado de: <http://ca.wikipedia.org/wiki/fitxer:Orbitrappe.png>).

APLICAÇÕES DA CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

CL-DAD

A cromatografia líquida (CLAE ou CLUE) equipada com detector de arranjo de diodos (DAD) é uma técnica amplamente utilizada na análise de produtos naturais, desde que o analito apresente grupos cromóforos que possibilitem a absorção de luz na região do ultravioleta-visível (UV-Vis), sendo muito empregada no controle de qualidade de produtos de origem vegetal; porém, sua utilização na identificação de substâncias é limitada, pois o CL-DAD fornece apenas o espectro UV-Vis de cada substância como informação estrutural, o que não é suficiente para a sua caracterização, pois várias substâncias de um mesmo grupo químico apresentam espectros similares, impossibilitando sua distinção. Os dados fornecidos pelos espectros na região do UV-Vis são importantes para a verificação de algumas classes de metabólitos secundários como flavonoides, que de acordo com o perfil de absorção no UV-Vis (Banda II de 240 - 285 nm; absorção do anel A e Banda I de 300 - 550 nm; absorção do anel B), podemos inferir as classes químicas como: flavonas (Banda I: 304 - 350 nm), flavonóis (Banda I: 328-357 nm), flavanóis (Banda I: 352-385 nm), comparando-se com espectros de referência (bibliotecas de espectros ou com padrões), conforme Campos (2005).

As informações obtidas com essa técnica são complementares a outras técnicas hífenadas em cromatografia líquida, como a espectrometria de massas (CL-EM), e a ressonância magnética nuclear (CL-RMN). A busca por informações mais completas sobre a estrutura de substâncias levou ao acoplamento com o espectrômetro de massas (CL-DAD-EM). Um exemplo da aplicação da técnica de CL-DAD na análise de produtos naturais foi a desreplificação por CL-DAD, complementada por CL-EM de alcaloides colchicinaes na espécie *Colchicum crocifolium* Boiss. (Colchicaceae), em que foram traçados os *fingerprints* de quatro classes de colchicinaes, de acordo com o seu espectro de UV: tipo colchicina ($\lambda_{\text{máx}}$ 248 e 350); tipo androcimbina ($\lambda_{\text{máx}}$ 230; 260 e 290 nm); tipo fenil etil tetrahydroisoquinolina ($\lambda_{\text{máx}}$ 225 e 285 nm) e fotoisômeros da colchicina ($\lambda_{\text{máx}}$ 228 e 266 nm), realizada por Alali *et al.* (2008).

5.2 Identificação de flavonoides por CL-EM

Com o recente desenvolvimento das técnicas de ionização a CL-EMⁿ tornou-se uma poderosa ferramenta para a identificação de flavonoides glicosilados. De acordo com a revisão de Vukics & Guttman (2010), a CL-EMⁿ tornou possível a determinação de várias características estruturais importantes como tipos de glicosilação (O, C ou mista), tipos de unidades de açúcar (hexoses, desóxi-hexoses ou pentoses), a distribuição dos resíduos de açúcar, sequência de glicanos, ligações interglicosídicas, posição da glicosilação e a natureza da aglicona. Apesar das grandes vantagens na aplicação de CL-EMⁿ em relação a RMN e CL-RMN, com relação a sensibilidade, custo e facilidade de uso, o fato dessa técnica não fornecer informações adequadas sobre a estereoquímica das moléculas, torna necessária a utilização de moléculas de referência ou da realização de análises complementares em RMN.

A utilização de CL-DAD-EMⁿ possibilita tanto a obtenção de informações sobre a classe do flavonoide pelo seu espectro UV-Vis, quanto os dados de fragmentação, importantíssimos para as informações anteriormente mencionadas.

Como fase móvel, de acordo com a revisão de Cuyckens & Claeys (2004), a utilização de eluentes ácidos como soluções contendo ácido fórmico ou tampão acetato de amônio apresentam melhores resultados, ao passo que a adição de eluentes básicos influenciam negativamente tanto para a separação na CL, quanto ao processo de ionização em IEN. A técnica de ionização IEN proporciona maior sensibilidade e baixa fragmentação, tornando-a mais adequada para inferir a massa molecular dos flavonoides separados, especialmente no caso em que as concentrações são baixas. O pico com a razão massa/carga (m/z) mais elevada nem sempre corresponde ao íon *quasimolecular*, pois pode ocorrer a cationização no modo positivo, assim como a anionização no modo negativo com as moléculas do(s) solvente(s) da fase móvel. Um aumento na tensão do cone reduz a incidência de cationização/anionização. O método de ionização positivo contém mais informações estruturais do que no modo negativo, assim sendo o uso combinado de ambos os modos de ionização, fornece maior embasamento para a determinação da massa molecular, especialmente para substâncias de menor razão massa/carga, em que o nível de ruído é maior. O tempo de retenção nas colunas de fase reversa C-8 e C-18 (as mais utilizadas) também podem fornecer informações estruturais importantes, em que as substâncias mais polares eluem primeiro, o tempo de retenção é inversamente proporcional com o aumento da glicosilação e diretamente proporcional com o aumento de metilação, acilação ou prenilação.

A coluna cromatográfica é fundamental para a qualidade da análise, colunas com muitos grupos silanóis residuais não protegidos prejudicam a qualidade da separação. As colunas mais utilizadas são as de fase reversa com 3 a 4,6 mm de diâmetro interno, muitas vezes com um divisor de fluxo (*split*) para tornar as taxas de fluxos compatíveis com o espectrômetro de massas, sendo que a proporção de fluxo desviada pode ser passada através de um detector de arranjo de diodos, ao invés de descartá-lo, pois os flavonoides apresentam alta e característica absorção na região do UV (200-380 nm), fornecendo informações sobre o tipo de aglicona e o seu padrão de oxigenação e substituição nos anéis A e B.

Identificação estrutural de flavonoides por EM/EM

Modo de ionização positivo

As fragmentações mais úteis em termos da identificação da porção aglicônica de flavonoides são as que promovem a clivagem de duas ligações C-C do anel C, resultando nos íons informativos $^{ij}A^+$ e $^{ij}B^+$ onde as letras i e j à esquerda representam as ligações clivadas em C (Figura 19). Estes íons podem ser racionalizados por intermédio de reações de retro-Diels-Alder (RDA) e são os principais fragmentos diagnósticos para a identificação de flavonoides, uma vez que esses fornecem informações sobre o número e tipo de substituintes nos anéis A e B. Além desses íons, são observadas perdas de pequenas moléculas e/ou radicais a partir do íon *quasimolecular* $[M+H]^+$, como por exemplo H_2O (-18 u⁴), CO (-28 u) e C_2H_2O (-42 u), as quais possibilitam a identificação de grupos funcionais específicos como metóxi, através da perda de 15 u (CH_3) a partir do íon precursor.

⁴ Unidade de massa atômica (u): equivalente a Dalton (Da).

Modo de ionização negativo

Fabre *et al.* (2001) estudaram o perfil de fragmentação no modo negativo a partir do íon *quasimolecular* $[M-H]^-$ de várias agliconas (flavonas, flavonóis e flavanonas) empregando IEN-EMⁿ com a utilização de um analisador de massas *Ion Trap*. A clivagem do anel C, por mecanismo de RDA, conduz aos íons $^{i,j}A^-$ e $^{i,j}B^-$, fornecendo informações sobre o número e tipo de substituintes nos anéis A e B, onde as letras i e j à esquerda representam as ligações rompidas no anel C.

O fragmento $^{1,3}A^-$ é o principal fragmento observado no modo negativo, enquanto o fragmento $^{0,3}B^-$ é característico de isoflavonoides (HUGHES *et al.*, 2001). O grau de hidroxilação no anel B influencia a fragmentação. Em flavonóis contendo uma ou mais hidroxilas no anel B, como por exemplo quercetina, fisetina e miricetina podem ser observados os íons $[^{1,2}A-H]^-$ e $[^{1,2}B+H]^-$ (CUIKENS *et al.*, 2000; FABRE *et al.*, 2001) enquanto no caso de um anel B não substituído, a energia necessária para obter a fragmentação é muito maior, levando a muitos íons produto (HUGHES *et al.*, 2001), ocorrendo em alguns casos a clivagem direta da ligação entre os anéis B e C, gerando o fragmento $[M-\text{anel B}]^-$ (SCHIEBER *et al.*, 2002). Perdas de pequenas moléculas neutras como CO (-28 u), CO₂ (-44 u), C₂H₂O (-42 u), são importantes nesse processo de caracterização como a verificação de presença de metilas por meio da perda de 15 u, resultando em um radical $[M-H-CH_3]^-$ que geralmente consiste no pico base (CUIKENS *et al.*, 2000; FABRE *et al.*, 2001; JUSTESEN, 2001). Justesen (2001) avaliou o perfil de fragmentação de 10 flavonoides metoxilados a partir do íon *quasimolecular* $[M-H]^-$ e verificou comportamentos de fragmentação diferentes entre isômeros, mas a posição exata do grupo metoxila não pôde ser determinada sem a comparação com padrões de referência ou análises de RMN. Outra observação foi a dificuldade na identificação de flavonoides prenilados em modo negativo, pois não foi observada a clivagem do substituinte isoprenila.

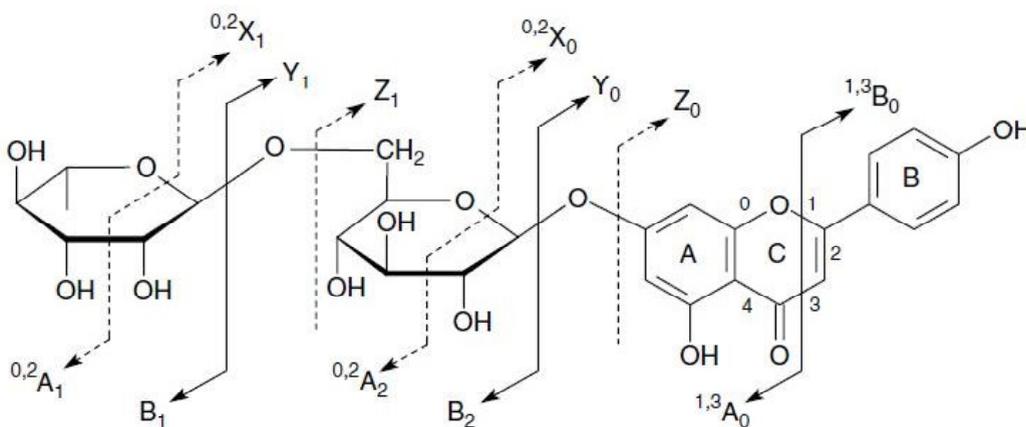


FIGURA 1 | Nomenclatura de fragmentação de heterosídeos flavonoides (apigenina 7-*O*-rutinosídeo), extraída de Cuyckens & Claeys (2004).

Na análise estrutural de flavonoides os espectros obtidos no modo de ionização positivo com fragmentação por DIC (dissociação induzida por colisão) são os mais utilizados, por serem mais fáceis de

interpretar em relação ao modo negativo. Com relação ao modo negativo são necessárias maiores energias de colisão para possibilitar fragmentação adequada, além de que alguns íons observados no modo positivo importantes para a identificação estrutural não são observados em modo negativo (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

O modo de ionização negativo, entretanto, é mais sensível em análises envolvendo flavonoides, devido as suas características químicas como o presença de hidroxilas fenólicas, comumente presentes nesta classe de metabólitos que favorecem a ionização em modo negativo, com a presença do íon *quasimolecular* [M-H]⁻; além de apresentar um padrão de fragmentação diferente, fornecendo informações adicionais e complementares ao modo positivo (FABRE *et al.*, 2001).

ANÁLISES EM CL-DAD-IQPA-EM

Li *et al.* (2010) desenvolveram e validaram um método empregando cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos (DAD) acoplada a espectrometria de massas com ionização por IQPA, permitindo a identificação e quantificação de iridoïdes glicosilados na espécie *Lamiophlomis rotata* (Benth. ex Hook. f.) Kudô (Labiatae), utilizada na China para promover hemostasia e aliviar dores. Essa espécie apresenta como constituintes majoritários iridoïdes e flavonoides. Conforme estudos, os flavonoides seriam os responsáveis pela atividade analgésica e os iridoïdes pela atividade hemostática, indicando a necessidade de se analisar esses constituintes na planta. Os espectros de UV característicos de iridoïdes glicosilados, contendo grupo carboxílico na posição 4, apresentam somente uma forte absorção na região entre 230-240 nm, sendo então selecionado o $\lambda = 238$ nm, para a detecção em DAD, a qual foi utilizada para quantificação dos iridoïdes glicosilados. A detecção por espectrometria de massas foi utilizada para identificar iridoïdes glicosilados em *L. rotata* (derivados do shanzisídeo e loganina) comparando-se os dados obtidos com padrões, além disso, foram observados quatro iridoïdes não identificados por apresentarem espectros de UV característicos da classe.

Ouyang *et al.* (2007) determinaram triptolídeo e triptolólídeo (diterpenos diepóxidos) em extratos da planta *Tripterygium wilfordii* Hook. f. (Celastraceae), utilizada na Medicina Tradicional Chinesa como anti-inflamatória e imunossupressora, com a utilização de um método baseado em CLAE-IQPA-EM, desenvolvido com padrões comerciais destas substâncias, onde foram observados em modo negativo de ionização íons moleculares desprotonados [M-H]⁻ (triptolídeo: m/z 359; triptolólídeo: m/z 375) e íons desprotonados seguidos da perda de uma molécula de água [M-H-H₂O]⁻ (triptolídeo: m/z 341 e triptolólídeo m/z 357).

Lai *et al.* (2007) realizaram a identificação dos flavonoides e ácidos cafeoilquínicos majoritários em três espécies da família Asteraceae: *Chrysanthemum morifolium* Ramat. (folhas e flores), *Chrysanthemum coronarium* L. (folhas) e *Artemisia annua* L. (folhas) através de CL-DAD-IQPA-EM, sendo a identificação das substâncias realizadas por meio da comparação do tempo de retenção, espectro de UV-Vis e espectro de massas com padrões de referência e dados da literatura. Os principais constituintes em *A. annua* L. foram os flavonoides quercetina-*O*-glicosídeo, rhamnetina, crisosplenol D e luteolina 7,4'-dimetil éter; em *C. coronarium* o ácido clorogênico e os ácidos 1,3; 1,5 e 3,5 di-*O*-cafeoilquínicos e em *C. morifolium* o ácido clorogênico, luteolina e seus derivados glicosilados, linarina, apigenina e o ácido 3,5-di-*O*-cafeoilquínico.

Por meio do desenvolvimento de metodologias, empregando CLAE-IQPA-EM, foram identificadas várias saponinas triterpênicas (astragalosídeos) e isoflavonoides em raízes de plantas do gênero *Astragalus*

(Fabaceae) utilizada na medicinal tradicional chinesa como antiperspirante, diurético e tônico (XU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2007).

ANÁLISES EM CLAE-DAD-IEN-EM E CLAE-DAD-IEN-EM/EM

Gobbo-Neto & Lopes (2008) desenvolveram um método para a identificação *online* de derivados do ácido quínico (ácidos clorogênicos), lactonas sesquiterpênicas e flavonoides em *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica brasileira), família Asteraceae, popularmente utilizada como anti-inflamatório tópico, por meio de análises em CLAE-DAD-IEN-EM e CLAE-DAD-IEN-EM/EM, operando nos modos de ionização negativo e positivo e com analisador por tempo de voo (ATV), as quais foram utilizadas para a identificação dos picos cromatográficos em comparação com padrões de referência e dados da literatura, a partir dos dados de absorção no UV-Vis, massa exata do íon *quasimoleculare*, perfil de fragmentação e ordem de eluição em colunas C-18, assim como validaram um método em CLAE-DAD para a quantificação de alguns destes metabólitos secundários. Os dados de algumas substâncias identificadas estão apresentados na tabela 2. Gobbo-Neto (2007) com a aplicação de técnicas hifenadas CLAE-DAD, CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM avaliou a influência populacional e temporal (circadiana e sazonal) no metabolismo secundário de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae).

TABELA 2 - Dados de UV-Vis, massa exata do íon *quasimoleculare* perfil de fragmentação (modos negativo e positivo utilizados na identificação de alguns flavonoides e lactonas sesquiterpênicas de *Lychnophora ericoides* - dados obtidos a partir do trabalho de Gobbo-Neto (2007) e Gobbo-Neto & Lopes (2008).

Substância	UV λ_{\max}	Ionização positiva (massa exata)	Fragmentação modo positivo	Ionização negativa (massa exata)	Fragmentação modo negativo
Flavonoides					
Vicenina -2	271; 334	[M+ H] ⁺ 595,1655(pb)	15 eV: 595→577, 559, 541, 529, 523, 511, 481, 475, 473 (pb), 427,	[M-H] ⁻ 593,1518 (pb)	25 eV: 593→575, 503, 473 (pb), 383, 353
6,8-di-C-β-glicopiranosil crisina	272; 317	[M+ H] ⁺ 579,1708 (pb)	15 eV: 579 →561, 543, 525, 513, 507,495,465, 459, 441 (bp), 411,	[M-H] ⁻ 577,1570 (pb)	25 eV: 577→559,487, 487, 457(pb),367, 337
Pinocembrina	289; 326 sh	[M+ H] ⁺ 257.0805 (pb)	-	[M- H] ⁻ 255.0650	20 eV: 255→213 (pb), 211, 185, 171, 169, 151
Pinostrobrina	290; 330 sh	[M+ H] ⁺ 271,0977 (pb)	15 eV: 271→167 (pb), 131	-	-
		[M+Na] ⁺ 293			
Lactonas sesquiterpênicas					
Centraterrina	269	[M + H] ⁺ 375,1452 (pb)	15 eV: 375→275, 257, 239, 229 (pb), 211, 201, 183	[M-H] ⁻ : 373,1272 (pb)	-
		[M + Na] ⁺ 397			
4,5-diidro-15- desoxigoyzensolido	264	[M + H] ⁺ 347,1501 (pb); [M + Na] ⁺ 369	15 eV: 347→261, 243, 233, 215 (pb), 197, 187, 159	-	-
4,5-diidrolychnopholido	264	[M + H] ⁺ 361,1644 (pb); [M + Na] ⁺ 383	10 eV: 361→261, 243, 233, 215 (pb), 197, 187, 169	-	-
4,5-diidroeremantolido C	265	[M+ H] ⁺ 349,1660 [M + H - H ₂ O] ⁺ 331(pb)	12 eV: 349→331, 189 (bp), 161, 15 eV: 331 → 285, 257, 217, 189 (bp), 161.	[M - H] ⁻ - 347,1497 (pb)	-

sh = ombro bp = pico base

Moraes *et al.* (2009) desenvolveram um método para a identificação de constituintes fenólicos (flavonóides e derivados do ácido quínico) em quatro espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (*L. candelabrum* Sch. Bip., *L. pohlii* Sch. Bip., *L. pseudovillosissima* Semir & Leitão e *L. villosissima* Mart.), em que os flavonoides foram identificados comparando-se os dados de UV, EM e EM/EM com padrões de referência. Os derivados do ácido quínico foram identificados comparando-se os dados de EM e EM/EM com o esquema hierárquico de identificação desenvolvido por Clifford *et al.* (2003), aliado aos espectros de UV e perfil de eluição em coluna C-18. Também foram identificadas lactonas sesquiterpênicas por meio de seu perfil em UV (λ_{max} 268 nm), assim como a comparação de íons precursores e íons fragmentos (EM/EM) em comparação com dados da literatura (CROTTI *et al.*, 2005). Os cromatogramas obtidos estão apresentados na figura 20 e as substâncias/ classes químicas identificadas na tabela 3.

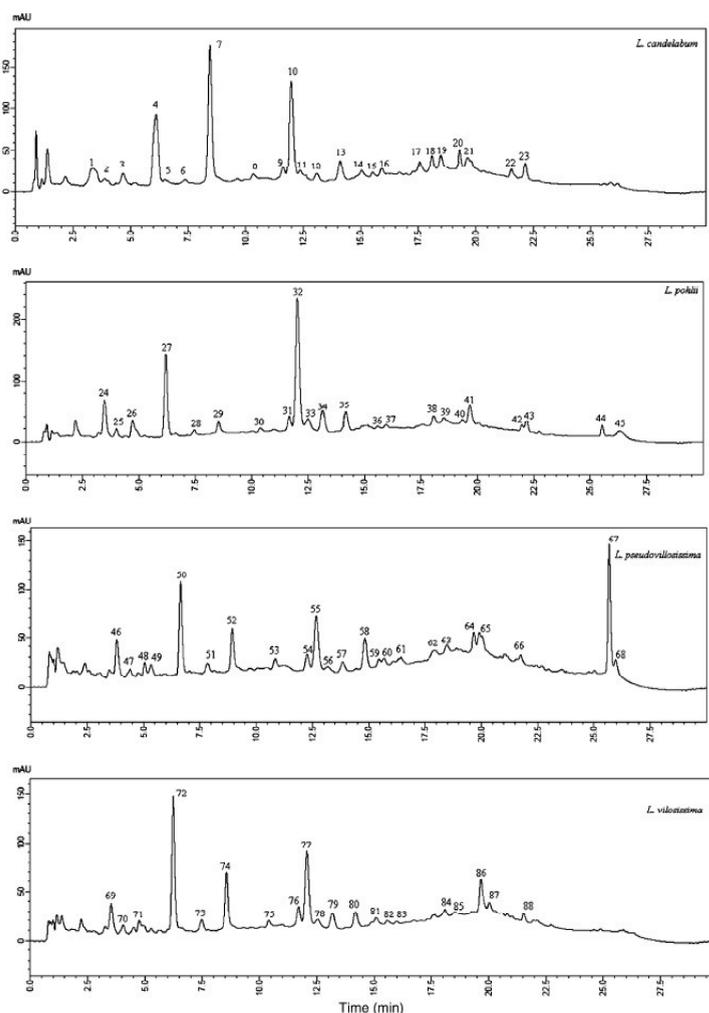


FIGURA 20 | Cromatogramas obtidos nas análises em CLAE-DAD-IEN-EM (detecção UV) dos extratos de *L. candelabrum* Sch. Bip., *L. pohlii* Sch. Bip., *L. pseudovillosissima* Semir & Leitão e *L. villosissima* Mart., extraído de Moraes *et al.* (2009).

TABELA 3 - Comparativo das principais substâncias identificadas nas análises em CLAE-DAD-EM e CLAE-DAD-EM/EM das espécies vegetais: *Lychnophora candelabrum*, *L. pohlii*, *L. pseudovillosissima* e *L. villosissima*, extraída de Moraes *et al.* (2009).

Classe /Substância	<i>L. candelabrum</i>	<i>L. pohlii</i>	<i>L. pseudovillosissima</i>	<i>L. villosissima</i>
Derivados do ácido quínico				
Ácido 3-cafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido 5-cafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido 4-cafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido 4-feruloilquínico	X			
Ácido 5-feruloilquínico	X	X		X
Ácido 3,4-dicafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido 3,5-dicafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido 4,5-dicafeoilquínico	X	X	X	X
Ácido cafeoilferuloilquínico	X	X	X	X
Ácido diferuloilquínico	X			
Flavonoides				
Vicenina-2	X	X	X	X
6,8-di- <i>C-β</i> -glicosilcrisina	X	X	X	X
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo	X	X		X
Quercetina-3- <i>O</i> -metil-éter	X	X	X	
Pinocembrina	X	X		
Tilirosídeo			X	
3- <i>O</i> -(6"- <i>O-E-p</i> -cumaroil)- β -glicosilisoramnetina			X	X
Lactonas				
Centraterina	X	X		
Lychnopholideo			X	

CLAE-FIPA-EM NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

Rauha *et al.* (2001) aplicaram a APPI na análise dos flavonoides catequina, isoramnetina, vitexina, isoquercetrina e luteolina-3',7-diglicosídeo e avaliaram o efeito da fase móvel utilizada na cromatografia líquida na eficiência da ionização em IQPA e FIPA. Nas análises em FIPA, operando no modo negativo foram observados íons *quasimoleculares* ([M-H]⁻), indicando que reações de transferência de prótons em fase gasosa, seja o principal mecanismo de ionização. Foi também observada a formação de ânions com ácido fórmico em alguns eluentes e a presença de íons [2M-H]⁻ de agliconas. Com relação ao efeito do eluente em FIPA, no modo negativo, as melhores respostas para as agliconas foram obtidas com a água pura. A adição de acetato de amônio reduziu a sensibilidade, entretanto, para glicosídeos respostas significativamente maiores foram obtidas com hidróxido de amônio, comparando-se com o eluente sem hidróxido de amônio. Os flavonoides foram ionizados com eluentes básicos, mas a retenção na coluna de fase reversa em C-18 torna-se fraca, comprometendo a resolução da separação na cromatografia líquida. O decréscimo da sensibilidade sobre condições ácidas pode estar relacionado a neutralização das cargas negativas por íons hidrônio (H₃O⁺). No

modo positivo de ionização foram observadas, majoritariamente, moléculas protonadas dos flavonoides, não sendo observados cátions radicais, o que indica que o principal mecanismo de ionização seja a transferência de prótons entre moléculas protonadas do eluente e os analitos. A fragmentação dos analitos no modo positivo foi mais intensa do que no modo negativo. Foi observado aumento da sensibilidade com o emprego de dopantes (tetrahydrofurano e tolueno) na ordem de 10-100 vezes, indicando que a reação inicial de ionização seja de um cátion radical do dopante, que foi observada a melhor sensibilidade com o tolueno (cerca de 2 vezes maior), embora o THF possa ser utilizado.

Outro exemplo da aplicação da CL-FIPA-EM na análise de produtos naturais foi o trabalho desenvolvido por Rhourri-Frih *et al.* (2009) que realizaram a triagem e a quantificação de triterpenos pentacíclicos dos grupos lupano, oleano, ursano e friedelano em três extratos de espécies vegetais. As primeiras análises foram realizadas no modo *scan*, em que os principais triterpenos foram identificados por meio de seus espectros nos modos de ionização positivo e negativo e dos tempos de retenção em comparação com padrões. Foram também comparadas as fontes de ionização FIPA e IQPA na análise destes triterpenos, onde foi observado que ambas as fontes apresentaram sensibilidade na análise dos triterpenos através de CL-EM. A otimização da fonte IQPA foi simples, bastando ajustar a temperatura da fonte e a corrente da agulha de descarga corona, já a otimização da fonte FIPA foi mais complicada, devido ao maior número de parâmetros a serem avaliados, destacando-se a temperatura da fonte e a natureza do dopante. A fonte FIPA foi mais sensível no modo de ionização positivo, porém a IQPA apresentou elevada sensibilidade para ácidos triterpênicos no modo negativo. O estudo mostrou que ambas as fontes podem ser utilizadas na determinação desses metabólitos em extratos vegetais.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; GHARAIBEH, A.; GHAWANMEH, A.; TAWAHA, K. OBERLIES, N. H. Colchicinoids from *Colchicum crocifolium* Boiss.: a Case Study in Dereplication Strategies for (–)-colchicine and Related Analogues using LC-MS and LC-PDA Techniques. **Phytochemical Analysis**, v. 19, n. 05, p. 385 – 394, 2008.
- ARDREY, R. E. **Liquid Chromatography-Mass Spectrometry: An Introduction**. Huddersfield: Wiley, 2003. 276p.
- CAMPOS, M. G. Flavonoides. In: DA CUNHA, A. P. (Org.). **Farmacognosia e Fitoquímica**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005. p. 236-289.
- CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical Scheme for LC-MS n Identification of Chlorogenic Acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2900-2911, 2003.
- CROTTI, A. E. M.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Triple quadrupole tandem mass spectrometry of sesquiterpene lactones: a study of goyazensolide and its congeners. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 40, n. 8, p. 1030-1034, 2005.
- CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1; p. 1-15, 2004.
- CUYCKENS, F.; MA, Y. L.; POCSFALVI, G.; CLAEYS, M. Tandem mass spectral strategies for the structural characterization of flavonoid glycosides. **Analisis**, v. 28, n. 10, p. 888 – 895, 2000.
- DASS, C. **Fundamentals of Contemporary Mass Spectrometry**. New Jersey: Wiley, 2007, 608 p.

- DE HOFFMANN, E; STROOBANT V. **Mass spectrometry Principles and Applications**. Chichester: Wiley, 2007, 502 p.
- FABRE, N.; RUSTAN, I., DE HOFFMANN E., QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electro-spray ion trap mass spectrometry. **Journal of The American Society for Mass Spectrometry**, v.12, n.6, p. 707-715, 2001.
- FENN, J. B.; MANN, M.; MENG, C. K.; WONG, S. F.; WHITEHOUSE, C. M. Electro-spray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. **Science**, v. 246, n. 4926, p. 64–71, 1989.
- GOBBO-NETO, L. **Emprego de técnicas hífenadas na identificação de metabólitos secundários de *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) e determinação de suas variações populacionais e temporais**. 2007. 254 p. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online identification of chlorogenic acids, sesquiterpene lactones, and flavonoids in the brazilian arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a validated HPLC-DAD method for their simultaneous analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 4, p. 1193-1204, 2008.
- HAYEN, H.; KARST, U. Strategies for the liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of non-polar compounds. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1-2, p. 549 – 565, 2003.
- HUGHES, R.J.; CROLEY, T.R.; METCALFE, C. D.; MARCH, R. E. A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 210/211, p. 371 - 385, 2001.
- JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electro-spray ionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 2, p. 169 - 178, 2001.
- LAI, J. P.; LIM, Y. H.; SU, J.; SHEN, H. M.; ONG, C. N.; Identification and characterization of major flavonoids and caffeoylquinic acids in three Compositae plants by LC/DAD-APCI/MS. **Journal of Chromatography B**, v.848, n. 2, p. 215-225, 2007.
- LI, M.; ZHANG, R.; LI, C.; FAN, P.; ZHANG, Q.; JIA, Z. Development of a validated HPLC-PAD-APCI/MS method for the identification and determination of iridoid glycosides in *Lamiophlomis rotata*. **Analytical Methods**, v. 2, n. 6, p. 714 – 721, 2010.
- MORAES, S. L. DE; GREGÓRIO, L. E.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P. Rapid screening and identification of polar constituents from brazilian arnica *Lychnophora* sp. by LC-UV/DAD-ESI-MS and LC-UV/DAD-ESI-MS/MS analysis. **Chromatographia**, v. 69, s. 2, p. 157-165, 2009.
- OUYANG, X.; JIN, M.; HE, C. Simultaneous determination of triptolide and triptolide in extract of *Tripterygium wilfordii* Hook. f. by LC-APCI-MS. **Chromatographia**, v. 65, n. 5-6, p. 373-375, 2007.
- RAUHA, J.; VUORELA, H.; KOSTIAINEN, R. Effect of eluent on the ionization efficiency of flavonoids by ion spray, atmospheric pressure chemical ionization, and atmospheric pressure photoionization mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 36, n. 12, p. 1269-1280, 2001.
- RHOURRI-FRIH, B.; CHAIMBAULT, P.; CLAUDE, B.; LAMY, C.; ANDRÉ, P.; LAFOSSE, M. Analysis of pentacyclic triterpenes by LC-MS. A comparative study between APCI and APPI. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 44, n. 1, p. 71-80, 2009.
- SCHIEBER, A.; KELLER, P.; STREKER, P.; KLAIBER, I.; CARLE, R. Detection of isorhamnetin glycosides in extracts of apples (*Malus domestica* cv. "Brettachen") by HPLC-PDA and HPLC-APCI-MS/MS. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 2, p. 87-94, 2002.
- STEPHENS, W. E. A pulsed mass spectrometer with time dispersion, **Physical Review**, v. 69, p.691, 1946.
- TAYLOR, G. Disintegration of water drops in an electric field. **Proceedings of the Royal Society of London**.

Series A, **Mathematical and Physical Sciences**, v. 280, n. 1382, p.383-397, 1964.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 29, n. 1, p. 1-16, 2010.

WATSON, J.T.; SPARKMAN, O.D. **Introduction to mass spectrometry: Instrumentation, applications and strategies for data interpretation**. Chichester: Wiley, 2007, 819p.

XU, Q. ; MA, X. ; LIANG, X. Determination of astragalosides in the roots of *Astragalus* spp. using liquid chromatography tandem atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 5, p. 419-427, 2007.

ZHANG, X. ; XIAO, H. B. ; XUE, X. Y. ; SUN, Y. G. ; LIANG, X. M. Simultaneous characterization of isoflavonoids and astragalosides in two *Astragalus* species by high-performance liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 13, p. 2059-2069, 2007.

FRAGMENTAÇÃO DE ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS VIA IONIZAÇÃO POR *ELECTROSPRAY*

Adrian Martin Pohlit
Carolina Maria Xaubet Olivera
João Luis Callegari Lopes
Márcio Adriano Andreo
Michael Niehues
Norberto Peporine Lopes

INTRODUÇÃO

A utilização de espectrometria de massas (EM) com ionização por *electrospray* (ESI) vem se disseminando pelas mais diversas áreas da ciência, aparecendo como um dos principais métodos de ionização comercialmente disponíveis. A espectrometria de massas, por ser um método de alta sensibilidade e especificidade, possibilita determinar uma substância mesmo em amostras complexas, podendo ainda ser empregada na elucidação estrutural quando associada à espectrometria de massas em sequência (*tandem*). O estudo dos mecanismos de fragmentação constitui uma ferramenta para a elucidação estrutural. Neste contexto, a compreensão do mecanismo de fragmentação dos alcaloides isoquinolínicos possui



importância para a química de produtos naturais e também para a área biomédica. Isso se dá porque a atividade biológica de plantas que contêm estes alcaloides vem sendo explorada pela indústria farmacêutica e também porque muitos fármacos como a morfina, codeína, papaverina entre outras pertencem à classe dos alcaloides isoquinolínicos. Esse fato cria a necessidade de explorar técnicas e aplicações modernas de ionização por *electrospray* acoplada a espectrometria de massas (em *tandem*), para a elucidação de parâmetros farmacológicos dessas substâncias como cinética e dinâmica, bem como metabolismo. O presente capítulo fornece uma visão geral baseada na literatura atual sobre os mecanismos de fragmentação de alcaloides isoquinolínicos por espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

Em termos gerais, os alcaloides são substâncias tipicamente derivadas de fontes naturais, com características básicas, contendo um ou mais átomos de nitrogênio (usualmente em anéis heterocíclicos). Porém algumas substâncias sintéticas não encontradas em plantas podem ser classificadas como alcaloides (p. ex.: hematropina). Frequentemente, os alcaloides apresentam efeitos fisiológicos marcantes para o homem e animais (EVANS, 2009).

Os primeiros alcaloides isolados datam do século 19, sendo eles a narcotina, isolada em 1803 e a morfina (**1**) (Figura 1), um alcaloide benzilisoquinolínico, isolada em 1806 e 1816. Nos anos seguintes, vários alcaloides foram isolados, principalmente por Pelletier e Caventou, tais como: estricnina (1817), emetina (1817), brucina (1819), piperina (1819), cafeína (1819), quinina (1820), colchicina (1820) e coniina (1826). A coniina foi o primeiro alcaloide a ter a sua estrutura determinada (1870) e sintetizada (1889). Atualmente, com métodos e equipamentos mais avançados a investigação dos alcaloides tem sido facilitada (EVANS, 2009).

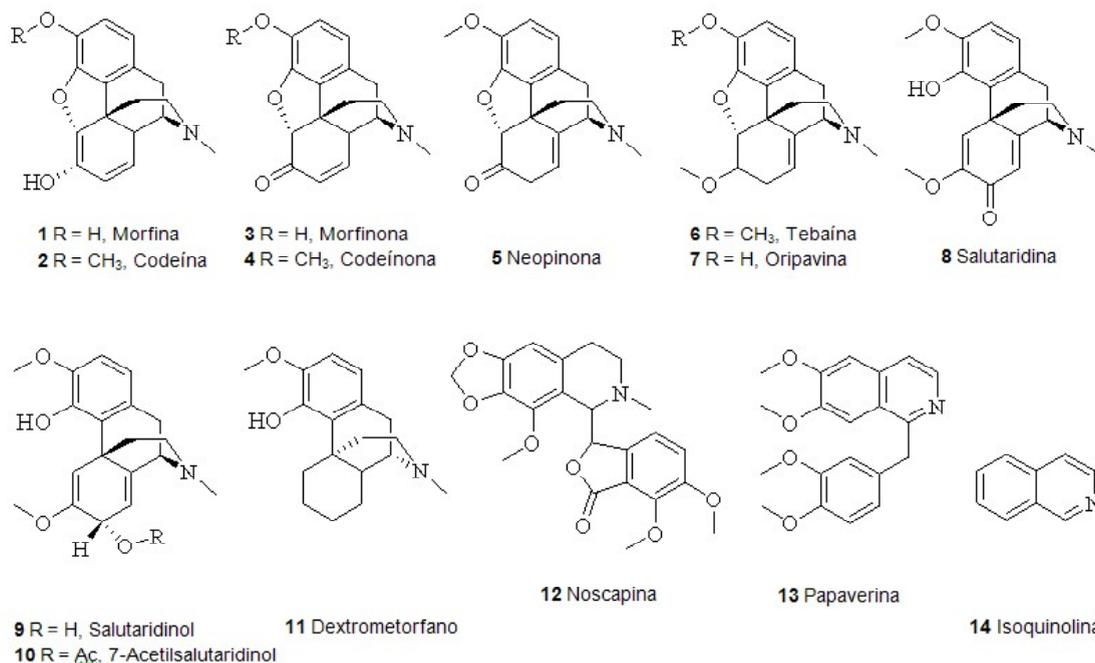


FIGURA 1 | Alcaloides benzilisoquinolínicos morfina (**1**), derivados morfínicos (**2-11**), outros derivados opioides (**12-13**) e isoquinolina (**14**).

Os alcaloides isoquinolínicos são substâncias aromáticas heterocíclicas possuindo um anel benzeno fundido a um anel piridínico (Figura 1). Os alcaloides isoquinolínicos mais conhecidos são os alcaloides do ópio, dentre os quais se destacam a morfina (**1**) e a papaverina (**13**), além de seus derivados. A isoquinolina (**14**), de odor levemente adocicado, foi isolada pela primeira vez em 1885 do alcatrão de hulha. Os alcaloides isoquinolínicos são uma família atualmente composta por mais de 400 substâncias com as mais variadas atividades biológicas: antimalárica, anti-HIV, inseticida, antitumoral, antimicrobiana, antileucêmica e anti-Parkinsoniana (BENTLEY, 1992).

Por apresentarem uma grande variedade de origens botânica e bioquímica, de estruturas químicas e de atividade biológicas, diferentes sistemas de classificação são possíveis para os alcaloides isoquinolínicos. Genericamente agrupados em alcaloides não-heterocíclicos (pseudo-alcaloides ou aminas biológicas) e alcaloides heterocíclicos, esse último grupo pode ser ainda dividido em 14 classes, de acordo com a estrutura do anel (EVANS, 2009).

Muitas plantas utilizadas tradicionalmente contêm alcaloides isoquinolínicos, com destaque para a *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae). Paralelamente ao estudo das atividades biológicas das plantas utilizadas tradicionalmente, as técnicas de isolamento e identificação de substâncias extraídas de fontes naturais tiveram uma evolução marcante no último século, com destaque para as técnicas hifenadas.

As técnicas de ESI-EM e ESI-EMⁿ

A ionização por *electrospray* (ESI) combinada com espectrometria de massas (EM) foi introduzida em 1984 e poucos anos se passaram para que a importância desse método fosse reconhecida (YAMASHITA & FENN, 1984; SMITH *et al.*, 1988).

Recentemente, ESI-EM tem se difundido às mais diversas áreas da ciência, aparecendo como um dos principais métodos de ionização comercialmente disponíveis (CROTTI *et al.*, 2006; GATES *et al.*, 2006). A importância dessa técnica reflete-se no número crescente de artigos publicados, sendo a mais utilizada da última década. Além disso, a utilização para o estudo de produtos naturais atinge em torno de 7% do total de artigos que aplicam essa técnica, seja para simples determinação do peso molecular e/ou quantificação de substâncias (CROTTI *et al.*, 2006).

Embora os espectros obtidos nesse método de ionização forneçam um baixo grau de fragmentação, essa técnica também pode ser empregada na elucidação estrutural quando associada à espectrometria de massas *tandem* (ESI-EMⁿ) (STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Atualmente a ESI é considerada um método rápido de ionização, podendo ser utilizado para uma variedade de substâncias (desde proteínas e peptídeos até moléculas orgânicas de baixo peso molecular, tais como os produtos naturais). Na análise de alcaloides, a ESI-EM foi empregada pela primeira vez há mais de uma década, sendo considerada desde então como uma técnica poderosa na determinação estrutural de alcaloides (WILSON *et al.*, 1992; ZHOU & HAMBURGER, 1996).

A espectrometria de massas por ser um método de alta sensibilidade e especificidade possibilita determinar uma substância mesmo em amostras que não apresentam alto teor de pureza. Uma das ferramentas

para a elucidação estrutural é o estudo dos mecanismos de fragmentação, sendo esses determinados através de marcações específicas com isótopos estáveis (POEAKNAPO *et al.*, 2004; HESSE *et al.*, 1997).

Classes de alcaloides isoquinolínicos

Os alcaloides são, em sua maioria, substâncias bioativas, e os alcaloides isoquinolínicos exibem grande variedade de atividades biológicas (BRUNETON, 1999). Praticamente todos os alcaloides isoquinolínicos (com exceção dos naftilisoquinolínicos) são biossintetizados a partir da tirosina (BENTLEY, 1998). Podem ainda ser divididos de acordo com o número de insaturações na estrutura básica em: isoquinolínicos, diidroisoquinolínicos e tetra-hidroisoquinolínicos. Constituem um dos grupos mais numerosos e de maior variedade estrutural dentre os alcaloides, podendo ser divididos e classificados em mais de 20 subgrupos, dentre os quais serão abordados neste trabalho: benzilisoquinolínicos (morfinanos e outros), aporfínicos, oxaporfínicos, aporfino-benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos, berberínicos, protoberberínicos, secoberberínicos, tetra-hidroprotoisoquinolínicos, benzofenantridínicos, protopínicos, ftalisoquinolínicos, espirobenzilisoquinolínicos, pavínicos, entre outros (BENTLEY, 1992; BENTLEY, 1998; BRUNETON, 1999).

Objetivo e escopo

A compreensão do mecanismo de fragmentação dos alcaloides isoquinolínicos possui importância para a química, mas também para a área biomédica. Os estudos de plantas que contêm esses alcaloides são frequentes e de acordo com o aumento de sua utilização pela indústria farmacêutica (FABRE *et al.*, 2000), como é o caso da *Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae) usada como sedativa e ansiolítica, sem efeitos tóxicos (VINCIERI *et al.*, 1988; ROLLAND *et al.*, 1991).

O objetivo dessa revisão consiste em agrupar as informações de diversos trabalhos sobre os mecanismos de fragmentação dos alcaloides isoquinolínicos, utilizando ESI-EM, nos modos positivo e negativo, acoplados a diversos analisadores, tais como, *ion trap* (IT), triplo quadrupolo (TQ), tempo de voo (TOF) e de ressonância ciclôtrica de íons com transformada de *Fourier* (FT-ICR).

Alcaloides benzilisoquinolínicos

Dentre os alcaloides isoquinolínicos, os benzilisoquinolínicos constituem um dos grupos de maior destaque, com grande número de estudos químicos e biológicos. Também conhecidos como alcaloides do ópio, são representados principalmente pelos derivados morfinanos, tais como a morfina (**1**), a codeína (**2**), a morfina (**3**), a codeinona (**4**), a neopinona (**5**), a tebaína (**6**), a oripavina (**7**), a salutaridina (**8**), o salutaridinol (**9**), o 7-*O*-acetil salutaridinol (**10**) e o dextrometorfano (**11**) (Figura 1). Embora sejam biossintetizados a partir da tirosina, via benzilisoquinolínicos, tanto a morfina quanto a codeína podem ser considerados também derivados fenantrênicos (FABRE *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2002). Outros alcaloides benzilisoquinolínicos, tais como a papaverina (**13**) (Figura 1), escolamidina (**15**), tembetarina (**16**) e a reticulina (**17**) também são importantes, química e biologicamente (WICKENS *et al.*, 2006) (Figura 2).

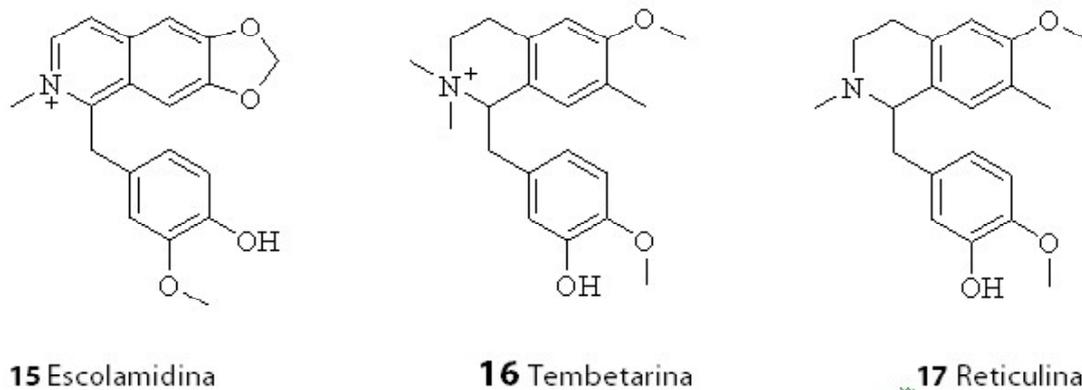


FIGURA 2 | Alcaloides benzilisoquinolínicos escolamidina, tembatarina e reticulina (15-17).

No estudo desenvolvido por Raith *et al.* (2003), foram obtidos espectros de alta resolução das moléculas protonadas $[M+H]^+$ de derivados morfínicos. Trabalhando no modo *tandem* (EMⁿ), foram comparados espectros obtidos por equipamento de captura de íons (*ion trap* – IT) aos obtidos por analisadores do tipo (TQ). Os alcaloides morfínicos possuem um nitrogênio básico, podendo ser assim investigados por ESI no modo positivo, apresentando alta sensibilidade (< 1 ng/mL). De acordo com os resultados obtidos, os alcaloides foram agrupados em 4 subgrupos, que serão detalhados adiante.

Morfina e codeína

Os alcaloides **1** e **2** mostraram uma fragmentação bastante similar, visto que a codeína (**2**) possui apenas um grupo metílico adicional em comparação com a morfina (**1**). A maioria dos fragmentos encontrados para **1** também são detectados para **2** com diferença de 14 u (Figura 3). As fórmulas moleculares para os fragmentos foram determinadas por intermédio de experimentos, usando Q-TOF e FT-ICR (alta resolução). Em estudo posterior do mesmo grupo, utilizando a técnica de dissociação multifóton no infravermelho (IR-MPD), de alta resolução acoplada a ESI, foi mostrado que a fragmentação foi similar ao TQ (WICKENS *et al.*, 2006). O íon $[M+H-H_2O]^+$ formado pela perda de H_2O na posição 6 é encontrado apenas em IT - EM². Os fragmentos do tipo **a** são formados pela quebra do anel piperidínico e perda de amina ($CH_2CHNHCH_3$, $\Delta m = 57$ u), tais fragmentos são detectados para todos os derivados morfínicos e desempenham um papel crucial nessas vias de fragmentação. Fragmentos $[a-2H]^+$ não são encontrados para IT, mas são em TQ (EM/EM). A partir do íon **a**, a perda de H_2O leva ao fragmento **b** e a perda de CO leva ao fragmento **c**. Ambas as rotas convergem ao fragmento **e** pela perda de CO e $H_2O/MeOH$ do íon **a**, respectivamente. O íon $[e-H_2O]^+$ com m/z 165 representa o fragmento mais abundante em TQ, Q-TOF e FT-ICR, enquanto o fragmento $[e-CO]^+$ com m/z 155 é especialmente

abundante no TQ-EM/EM. Os íons **d** com m/z 185 ou 199 são gerados de forma independente a partir de **a**. A partir de **a** ou $[M+H-H_2O]^+$, IT EM³ gera **b**, mas o fragmento **c** só é gerado a partir de **a** (RAITH *et al.*, 2003). Os íons **f** (m/z 58) e **g** (m/z 44), representando partes do anel piperidínico, são exibidos no espectro de massa do TQ, mas não no IT (EM²), porque esses íons estão abaixo do limite de detecção para o *ion trap* ($m/z < 75$). Em geral, o IT (EM²) mostra mais fragmentos de alta massa do que as outras técnicas, além disso, os fragmentos **a**-2H não ocorrem em IT (RAITH *et al.*, 2003).

A marcação isotópica com ¹³C dos precursores da morfina (**1**) e da codeína (**2**) permitiu, por meio da espectrometria de massas, a identificação de todos os principais íons fragmentos desses alcaloides sem ambiguidade e também permitiu conhecer o destino dos átomos de isótopos pesados individualmente (Figura 3) (POEAKNAPO *et al.*, 2004). Em experimentos de incorporação de precursores biossintéticos da codeína em *P. somniferum* foram preparados derivados marcados em ¹³C₁₂, ¹³C₆, ¹³C₂ e realizados utilizando espectrometria de massas de alta resolução ESI-IR-MPD e ESI-FT-ICR (POEAKNAPO *et al.*, 2004).

Morfinona, codeinona e neopinona

O espectro da morfinona (**3**) é muito similar ao da codeinona (**4**), com diferença de massa de 14u (Figura 4). A codeinona e a neopinona (**5**) apresentam mecanismo de fragmentação similar, pois diferem entre si pela posição de apenas uma dupla ligação, mas a intensidade dos picos é o ponto diferencial dos espectros desses isômeros estruturais (RAITH *et al.*, 2003). Apesar dos picos principais ocorrerem em ambos (IT e TQ), os espectros apresentam diferenças. Em relação aos mecanismos de fragmentação, ocorre: a) eliminação de C₂H₅NHCH₃ formando o íon do tipo **a**-2H, que é encontrado para morfinona (**3**) e codeinona (**4**), somente através de TQ (EM/EM); b) O pico base do TQ - (EM/EM) da morfinona (m/z 227), codeinona e neopinona (m/z 241) está representado pelo íon do tipo **a** (RAITH *et al.*, 2003).

Tebaína e oripavina

A presença de duas ligações duplas no anel C implica numa fragmentação completamente diferente e mais simples quando comparada com a morfina e seus análogos até aqui discutidos (RAITH *et al.*, 2003). No processo de fragmentação ocorre (ver Figura 3 para referência): a) perda de CH₃NH₂ gerando os íons do tipo **a** de m/z 281 e 267 $[M+H-31]^+$ para tebaína (**6**) e oripavina (**7**), respectivamente, ambos picos base em IT-EM²; b) o íon **f** de m/z 58 corresponde ao pico base de ambas as substâncias no espectro de massas em TQ; c) eliminação do grupo metóxi formando o íon $[a-CH_3OH]$ ocorre na tebaína; d) o íon **c** em m/z 249 é encontrado tanto na fragmentação de tebaína como oripavina, o qual é derivado de $[M+H-31]^+$ pela perda de H₂O ou CH₃OH (RAITH *et al.*, 2003).

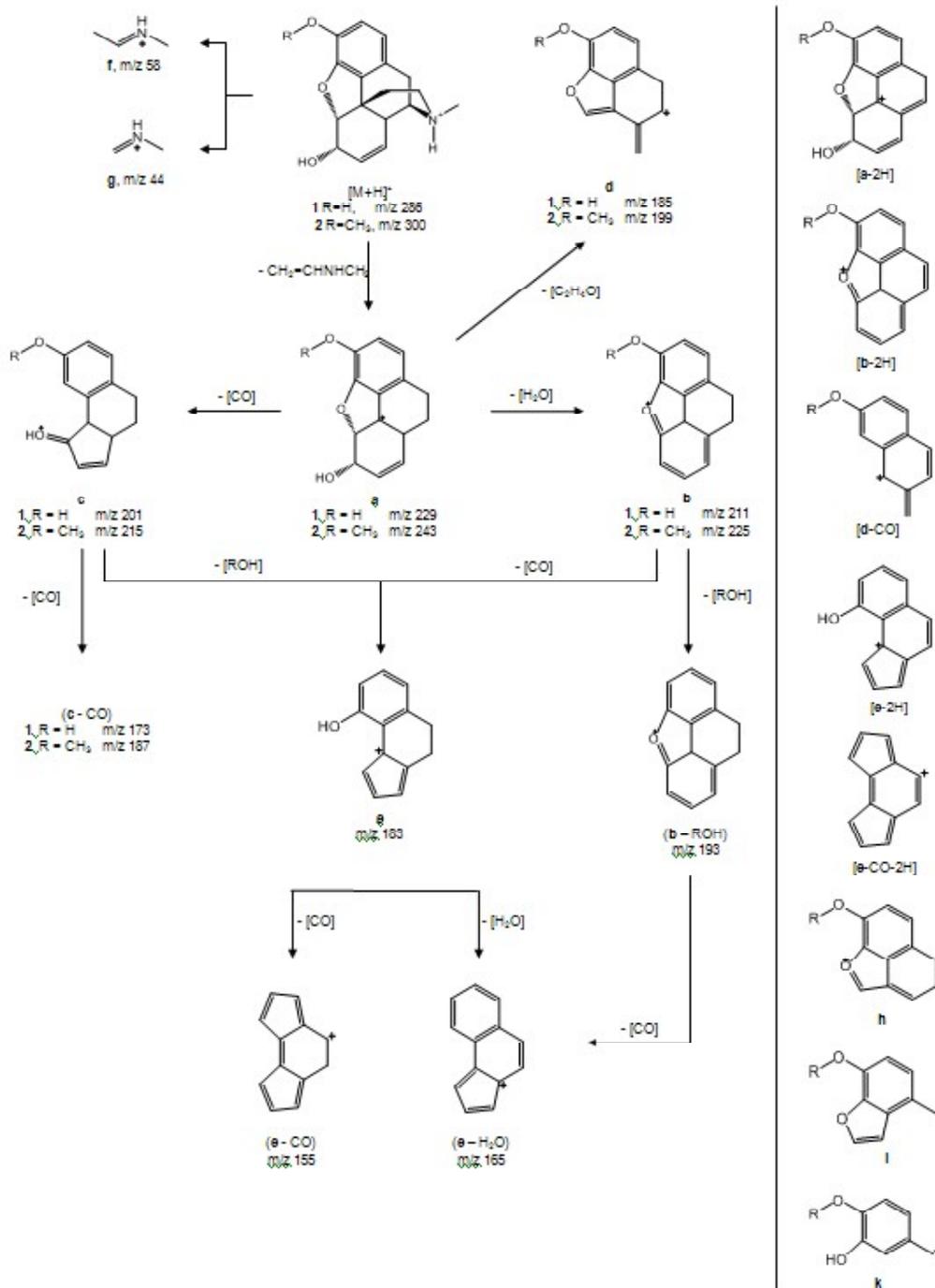


FIGURA 3 | Mecanismos de fragmentação dos alcaloides **1** e **2** utilizando ESI baseados em experimentos de EM/EM de alta resolução (fonte: RAITH *et al.*, 2003). As estruturas propostas para os fragmentos de morfina **1** e codeína **2** são baseadas em estudos com marcação com isótopos ^{13}C e análises por EM de alta resolução (fonte: POEAKNAPO *et al.*, 2004).

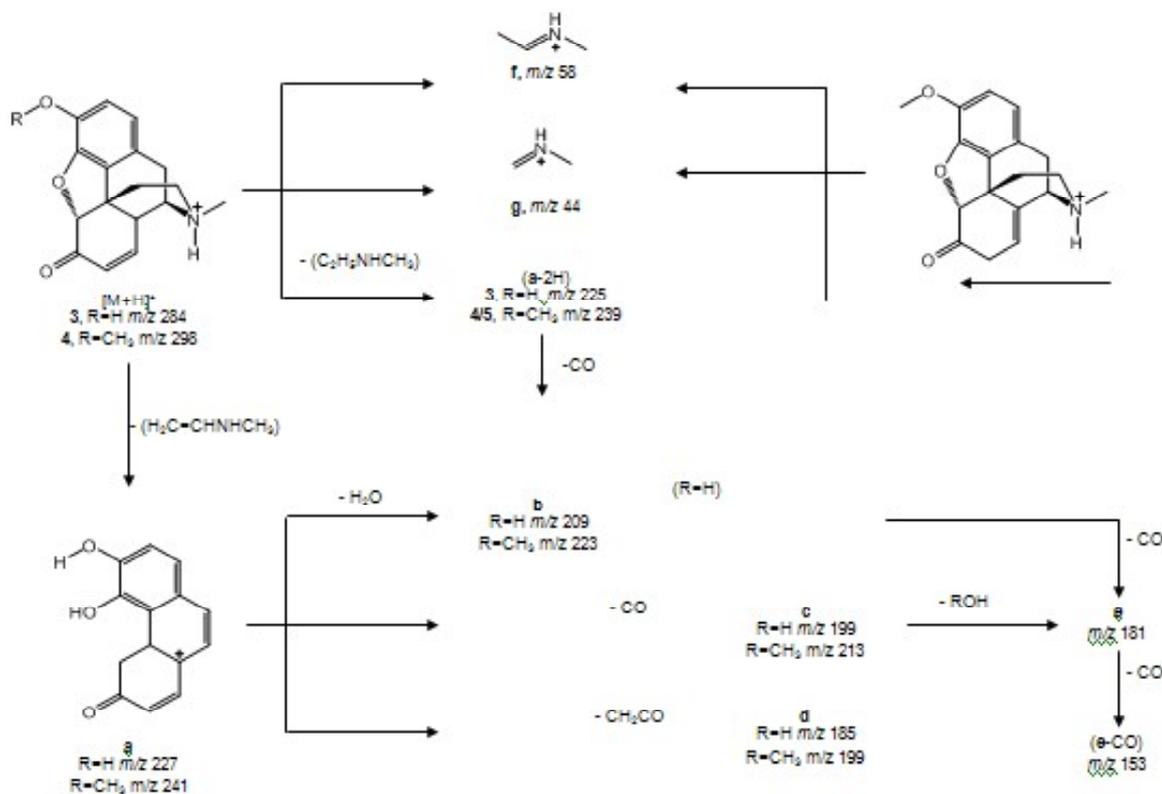


FIGURA 4 | Mecanismos de fragmentação proposto para os alcaloides morfina (3), codeína (4) e neopina (5) obtidos por ESI-EMⁿ (fonte: RAITH *et al.*, 2003).

Salutaridina e salutaridinol

Os mecanismos de fragmentação da salutaridina (8) e do salutaridinol (9) seguem reações semelhantes às aquelas discutidas até agora. Seguindo uma primeira rota, os alcaloides 8 e 9 perdem CH_3NH_2 , gerando o íon $[M+H-31]^+$ com m/z 297 e 299, respectivamente (ver Figura 3 para referência). Na sequência, este íon fragmenta gerando o íon i com m/z 265 e 267, pela eliminação de CH_3OH . Pela eliminação de CO do íon i, o íon i-CO com m/z 237 e 239 é gerado. E, finalmente, o íon i-CO se fragmenta, gerando o íon i-CO- CH_3OH pela eliminação de metanol com m/z 205 e 207. Outra rota determinada gera o íon do tipo a, assim como observado para os outros derivados, sendo mais significativo do que para 6 e 7. O íon a em EM³ pode perder H_2O , gerando o íon a- H_2O com m/z 253 e m/z 255, ou perder CH_3OH , gerando o íon j com m/z 239 e m/z 241. Ambos os íons gerados em EM³ podem perder CH_3OH em EM⁴. Em EM⁵ é gerado o íon j-CO- CH_3OH com m/z 181. Além disso, a ausência da ponte epóxi facilita a formação de um fragmento isoquinolínico de m/z 192, assim como a maioria dos íons é detectada em IT e TQ modo *tandem*, porém com intensidades diferentes (RAITH *et al.*, 2003).

7-O-acetil-salutaridinol

Apesar da semelhança apresentada com o salutaridinol (**9**), o 7-O-acetil-salutaridinol (**10**) deve ser analisado separadamente, isso porque a perda de ácido acético ($\Delta m=60$ u) resulta no pico base m/z 312, conduzindo a partir desse íon a uma direção de fragmentação por outra via ainda não totalmente elucidada¹⁸. Os íons subsequentes detectados por IT e TQ, com m/z 281, 269, 255, 249 e 221, são similares aos encontrados para a tebaína (RAITH *et al.*, 2003).

Dextrometorfano

Strife e colaboradores definiram um mapa genealógico para as fragmentações do dextrometorfano (**11**), um derivado da morfina, utilizando ESI-IT-EM(n). Substância **11** contém um grupo metil e apresenta múltiplas perdas de radicais metílicos (m/z 187, m/z 172, m/z 157), mostrando que deve ocorrer rearranjo (STRIFE *et al.*, 2000). Analisando as reações de fragmentação do dextrometorfano e alguns derivados utilizando ESI-EM no modo positivo e IT, mapas genealógicos de fragmentação foram desenvolvidos utilizando abordagens tais como, síntese simples com derivados delterados e de ¹³C, rotulagem para intensidade de processos inesperados e análise de produtos de oxidação (Figura 5) (STRIFE *et al.*, 2000).

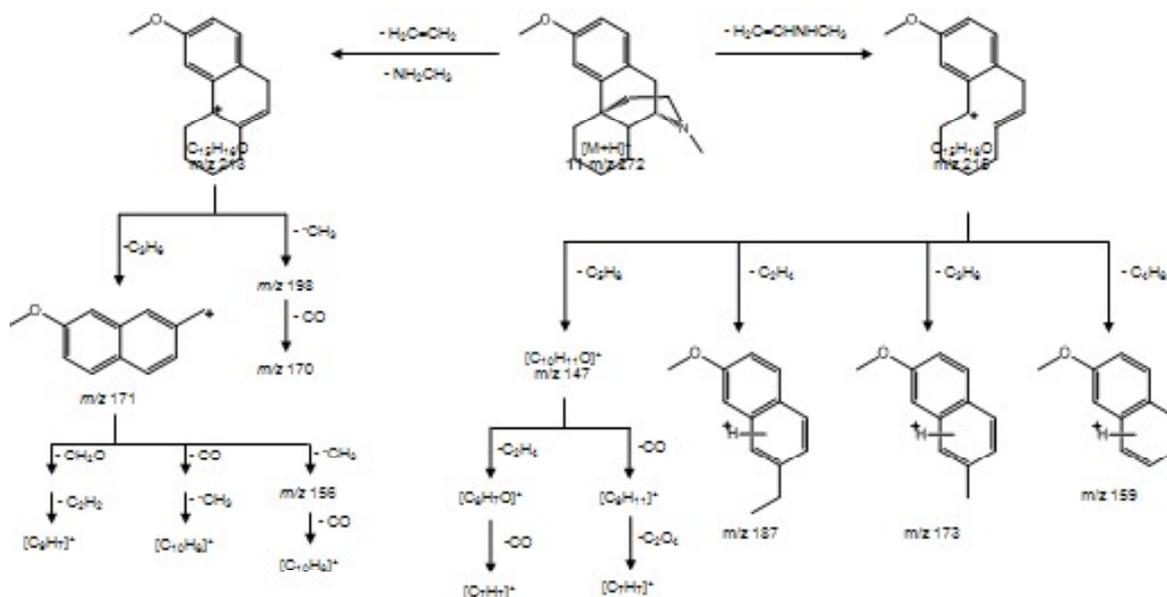


FIGURA 5 | Mecanismos de fragmentação propostos para o dextrometorfano (**11**), usando ESI como fonte de ionização e *ion trap* como detector (fonte: STRIFE *et al.*, 2000).

Outros alcaloides benzilisoquinólicos

Papaverina

A papaverina (**13**) é um dos principais alcaloides encontrados no ópio, juntamente com a morfina (**1**) (WICKENS *et al.*, 2006). Assim como os derivados da morfina, que também apresentam boa resposta em espectrometria de massas por ESI e APCI (Ionização Química a Pressão Atmosférica) no modo positivo (FABRE *et al.*, 2000; HENRIQUES *et al.*, 2002).

Os estudos da fragmentação do alcaloide 13 foram realizados por meio da marcação com deutério e utilizando espectrômetro de massas LCQ *ion trap*. Os íons resultantes de EM² da papaverina podem ser classificados em dois grandes grupos, aquele que envolve a perda de $\cdot\text{CH}_3$ dos grupos periféricos CH_3O e aquele envolvendo a perda da porção dimetoxifenílico, sendo a porção isoquinolínica o fragmento que retém a carga. Mais uma vez, o sítio mais provável de protonação desse alcaloide é o nitrogênio. A papaverina ainda possui dois diferentes pontos para a perda radicalar nos substituintes CH_3O aromáticos, um na porção isoquinolínica e o outro no núcleo benzênico (WICKENS *et al.*, 2006) (Figura 6).

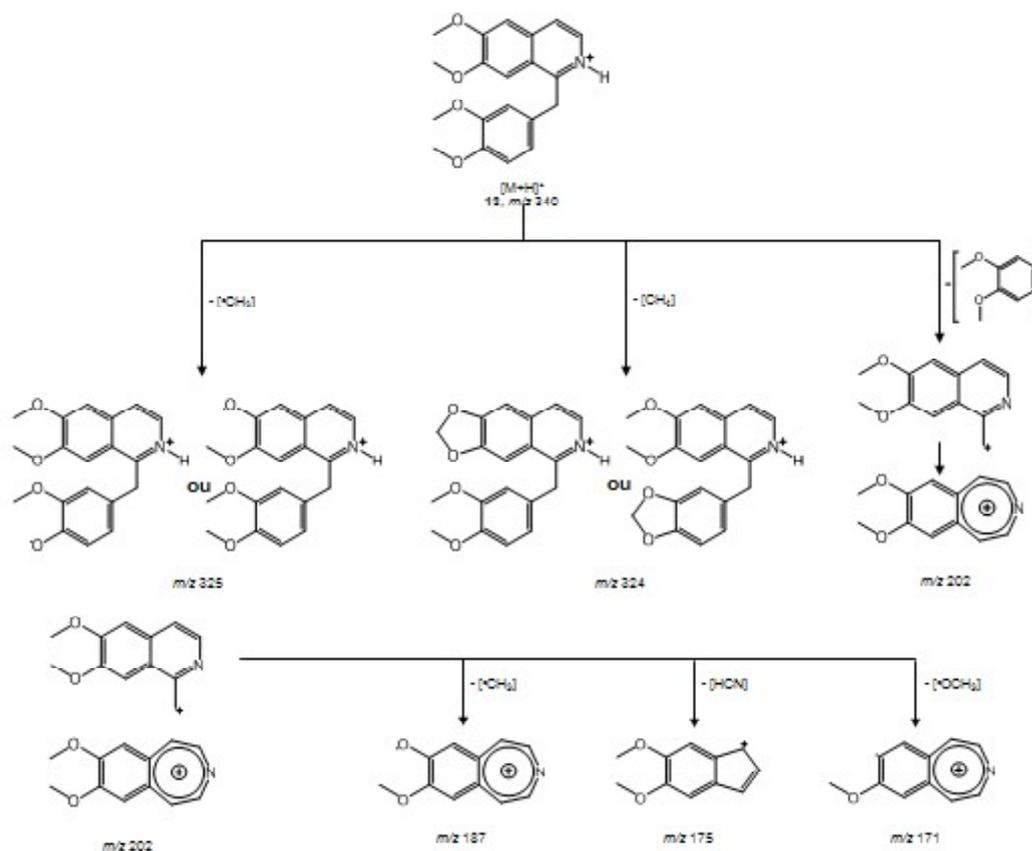


FIGURA 6 | Transições EM² e EM³ (íons produtos do íon de m/z 202) na fragmentação da papaverina (**13**) (fonte: WICKENS *et al.*, 2006).

O íon mais intenso de m/z 202 é explicado pela perda de dimetoxibenzeno do íon $[M+H]^+$. Para a estrutura formada pela protonação da papaverina no nitrogênio da porção isoquinolínica, a perda requer a transferência do hidrogênio da porção isoquinolínica para a porção dimetoxibenzênica.

Dois íons resultantes em EM^2 podem ocorrer por perdas neutras de CH_3 e CH_4 , gerando os íons de m/z 325 e m/z 324, respectivamente. Não é possível nesse caso distinguir em qual ponto ocorre a eliminação. A eliminação de 15 u é um processo radicalar, localizado num dos substituintes CH_3O que estão ligados aos sistemas aromáticos. A eliminação CH_3 em ESI-EM tem sido estudada e de acordo com estudos baseados em cálculos teóricos a quebra homolítica da ligação C-O é devido ao enfraquecimento dessa ligação (CARDOZO *et al.*, 2008).

O espectro EM^3 de m/z 202 contém os íons de m/z 187, 175 e 171. O primeiro e o último correspondem à perda de CH_3 e CH_3O , respectivamente. O íon m/z 175 é produzido pela perda de HCN, perda importante no diagnóstico das alquilpiridinas (MARX & DJERASSI, 1968; WICKENS *et al.*, 2006) (Figura 6).

O íon produto EM^2 de m/z 324 é formado pela eliminação de CH_4 , ocorrendo através da formação de um resíduo dioximetileno, já o íon produto EM^2 de m/z 325 é formado pela perda de um CH_3 , enquanto os íons EM^3 de m/z 325 também formam dois grupos (Figuras 7 e 8). O primeiro compreende os íons de m/z 310, 308, 296, 294, formados provavelmente pela perda de um CH_3O , CH_4 , CHO e CH_3O . O segundo grupo de íons é referente à perda da porção benzênica. O espectro de ESI-EM da solução de **13** e em H_2O são dominadas pelos íons $[M+H]^+$ de m/z 340 (WICKENS *et al.*, 2006). Por outro lado, os espectros das soluções de noscapina (**12**) (Figura 9) e **13** em 2H_2O são dominadas pelos íons $[M+^2H]^+$ de m/z 415 e 341, com pouca evidência de $[M+H]^+$.

Fabre e colaboradores caracterizaram alcaloides isoquinolínicos presentes em extrato metanólico purificado da papoula da Califórnia, *Eschscholzia californica* Cham. (Papaveraceae), dentre eles a escolamidina (**15**). Para tanto, foi utilizado CLAE-ESI-EM(n) com detector triplo quadrupolo, no modo positivo (Fabre *et al.*, 2000). Outros alcaloides benzilisoquinolínicos, tais como tembetarina (**16**) e reticulina (**17**), também foram estudados (ZHANG *et al.*, 2006).

Alcaloides ftaloisoquinolínicos

Noscapina

Assim como nos derivados da morfina, o sítio de protonação está no nitrogênio da porção isoquinolínica. O íon molecular $[M+H]^+$, pela perda de meconina gera o produto EM^2 de m/z 220, este íon por sua vez, pela perda de um radical gera o produto EM^3 de m/z 205. O mecanismo que segue, pelo qual o radical hidroxil é perdido não está claro, mas a estrutura do íon resultante de m/z 188 tem sido designada como um íon biradical do tipo *p*-benzino. O espectro EM^4 do íon de m/z 205 indica que ocorre perda do grupo metoxílico. O íon de m/z 188 é o pico base encontrado em EM^4 (Figura 9) (WICKENS *et al.*, 2006). Ambos os espectros de noscapina (em H_2O e 2H_2O) exibem pequena quantidade de íons $[M+Na]^+$ de m/z 436 e a presença de $[M+H_2O]^+$ de m/z 432 é aparente no espectro gerado, a partir da solução em H_2O . As similaridades e diferenças na abundância relativa dos íons fragmentos da noscapina de m/z 220, 353 e 354 sugerem que a posição da ionização com deutério pode ser deduzida por comparação com o espectro com e sem a incorporação do isótopo (WICKENS *et al.*, 2006). A Figura 10 mostra mais exemplos de alcaloides que pertencem à classe dos alcaloides ftaloisoquinolínicos.

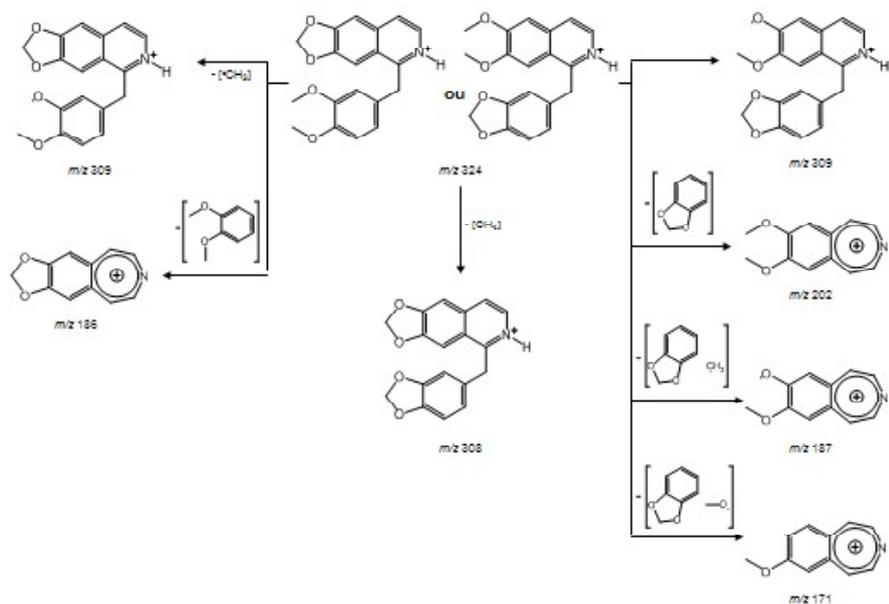


FIGURA 7 | Transições EM³ (íons produtos do íon de m/z 324) na fragmentação da papaverina (13) (fonte: WICKENS *et al.*, 2006).

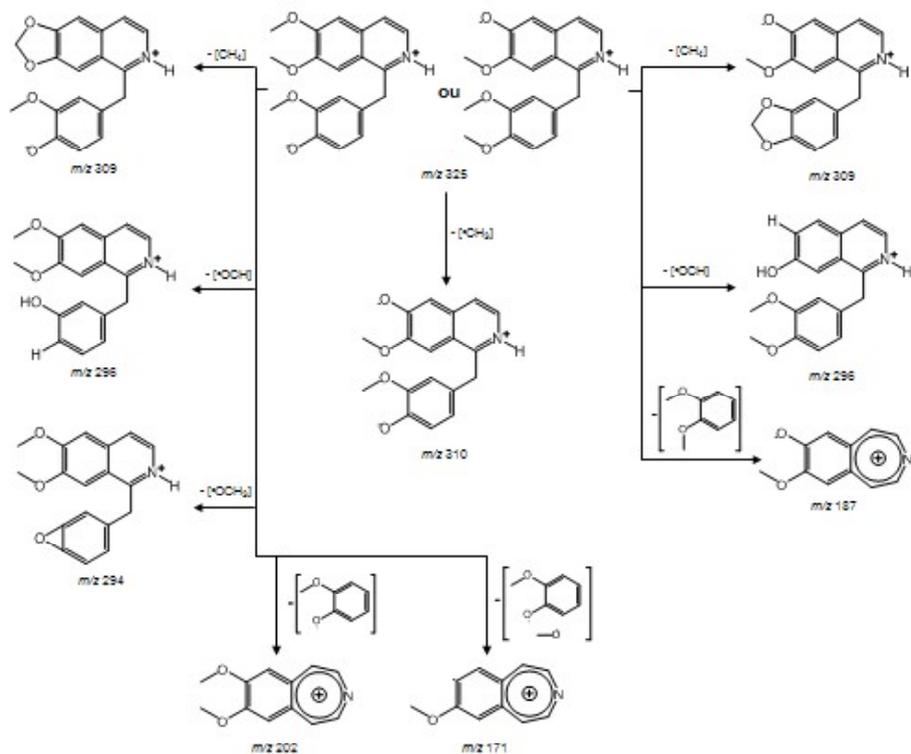


FIGURA 8 | Transições EM³ na fragmentação da papaverina, íons produtos do íon de m/z 325 (fonte: WICKENS *et al.*, 2006)

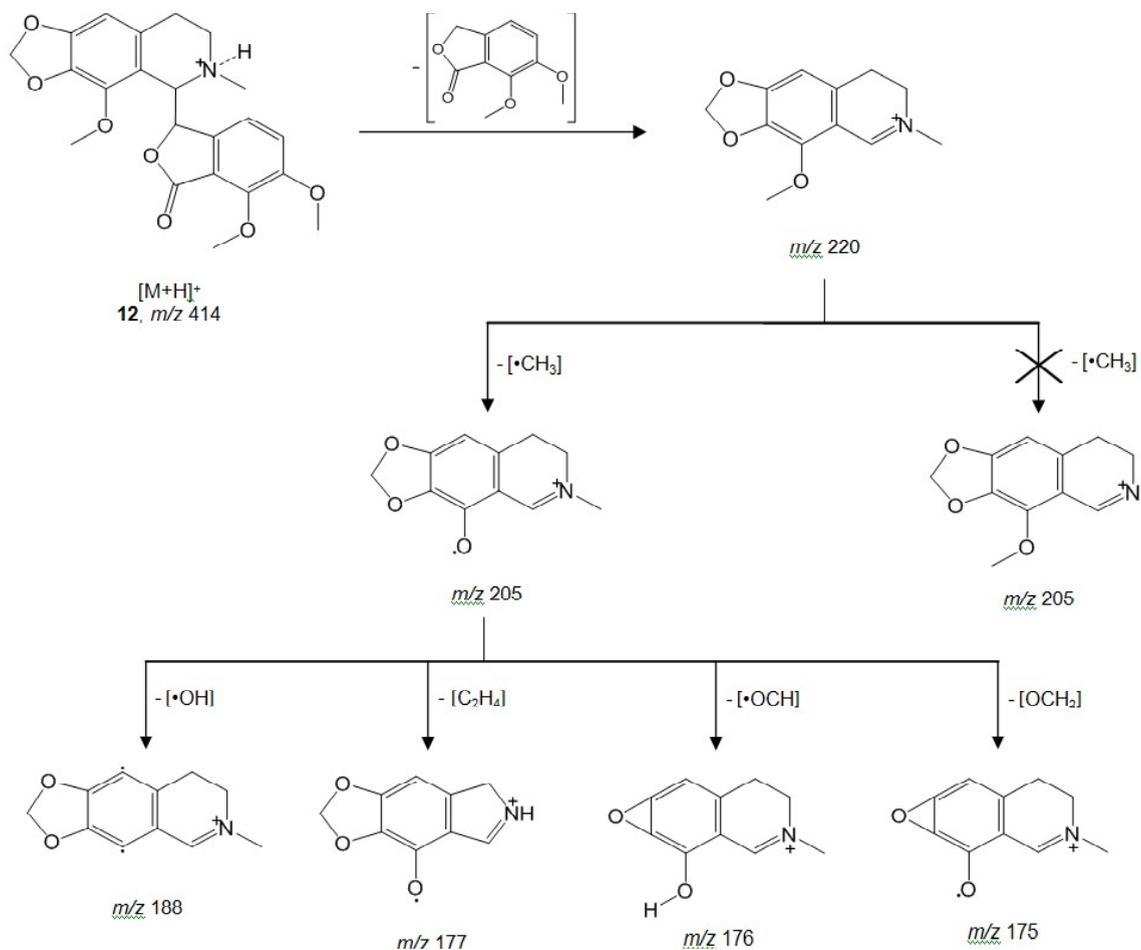
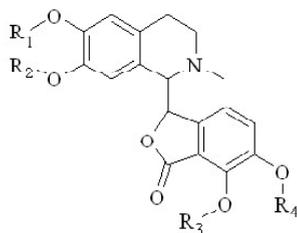


FIGURA 9 | Transições EMⁿ na fragmentação da noscapina (**12**) (fonte: WICKENS *et al.*, 2006)

Sturm e colaboradores utilizaram (+)-ESI-IT-EM(n) acoplada à eletroforese capilar (EC) para caracterizar os alcaloides isoquinolínicos (+)-adlumina (**18**), (-)- α -A-hidrastina (**19**) e (+)-corlumina (**20**), os quais estão ilustrados na Figura 10, provenientes da *Fumaria officinalis* L. Todos esses alcaloides foram detectados como $[M+H]^+$ e apresentaram perfis de fragmentação distintas (STURM *et al.*, 2006). A adlumina (**18**) apresentou EM m/z 384, EM² m/z 335 (58%), 323 (100%) e 206 (56%) e EM³ (do fragmento m/z 323) m/z 292 (100%) e 276 (80%), a (-)- α -A-hidrastina (**19**) EM m/z 384, EM² m/z 323 (82%) e 190 (100%) e EM³ (do fragmento m/z 323) 292 (100%) e 265 (82%) e a (+)-corlumina (**20**) EM m/z 384, EM² m/z 323 (100%) e 206 (36%) e EM³ (do fragmento m/z 323) m/z 292 (100%) e 276 (75%).



	Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
18	Adlumina	CH ₃	CH ₃	- CH ₂ -	
19	Hidrastina		- CH ₂ -	H	OCH ₃
20	Corlumina	CH ₃	CH ₃	- CH ₂ -	

FIGURA 10 | Estrutura dos alcaloides ftaloisoquinolínicos **18-20** (da mesma classe da noscapina (**12**)).

Escolamidina

A escolamidina (**15**) (Figura 2) é um alcaloide benzoisoquinolínico do tipo quaternário e seu íon molecular foi detectado como $[M]^+$. Assim como observado para a substância **13**, ocorre a perda do grupo fenil dissustituído, mas na forma de metoxihidroxibenzil radicalar. Esse alcaloide também possui um grupo CH₃O em anel aromático na posição *orto* a um grupo hidroxílico, ocorrendo a eliminação neutra de metanol, além da eliminação de CH₃ (FABRE *et al.*, 2000).

Tembetarina e reticulina

Assim como as substâncias anteriores, a tembetarina (**16**) e a reticulina (**17**) foram analisadas em ESI-EMⁿ. Para as substâncias **16** e **17** foram observados em EM² a presença dos fragmentos com m/z 192 e 206, referentes à perda do grupo benzil dissustituído, assim como nas substâncias **12** e **13**. Ainda em EM², foram observados para a substância **16** os íons com m/z 329, referente à perda de 15 u pela eliminação de CH₃, conforme já observado e discutido anteriormente, além dos íons com m/z 301, 312 e 269, referentes às eliminações neutras de CO, direta de CH₃OH (presença de substituintes em *orto*, CH₃O e OH) e eliminação de CH₃OH após a eliminação de CH₃ (ZHANG *et al.*, 2006). Outro fragmento importante em EM² é o $[M-(CH_3)_2NH]^+$ com m/z 299, este tipo de fragmentação não foi observado para **12** e **13**, mas sim para **16** e **17**, pois são alcaloides tetra-hidroisoquinolínicos, sendo provável a fragmentação mostrada na Figura 11.

Alcaloides aporfínicos

Dentre os alcaloides isoquinolínicos encontra-se um subgrupo denominado aporfínicos, esses vêm sendo cada vez mais investigados pelas atividades biológicas que apresentam (STÉVIGNY *et al.*, 2004). Os alcaloides aporfínicos norneolitsina (**21**), neolitsina (**22**), dicentrina (**22**), actinodafnina (**24**) e cassitina (**25**) (isolados de *Cassytha filiformis* L., Lauraceae), além de outros obtidos comercialmente, como: boldina (**26**), bulbocapnina (**27**), isocoridina (**28**) e glaucina (**29**) (Figura 12) foram analisados por ESI-EMⁿ no modo positivo (STÉVIGNY *et al.*, 2004). O alcaloide *n*-metilaurtetemina (**30**) também foi estudado por ESI-EM/EM (FABRE *et al.*, 2000). Dentre esses alcaloides alguns (**22-25**) apresentam atividade citotóxica contra diferentes linhagens de células tumorais (BOUSTIE *et al.*, 1998; STÉVIGNY *et al.*, 2004; STÉVIGNY *et al.*, 2005).

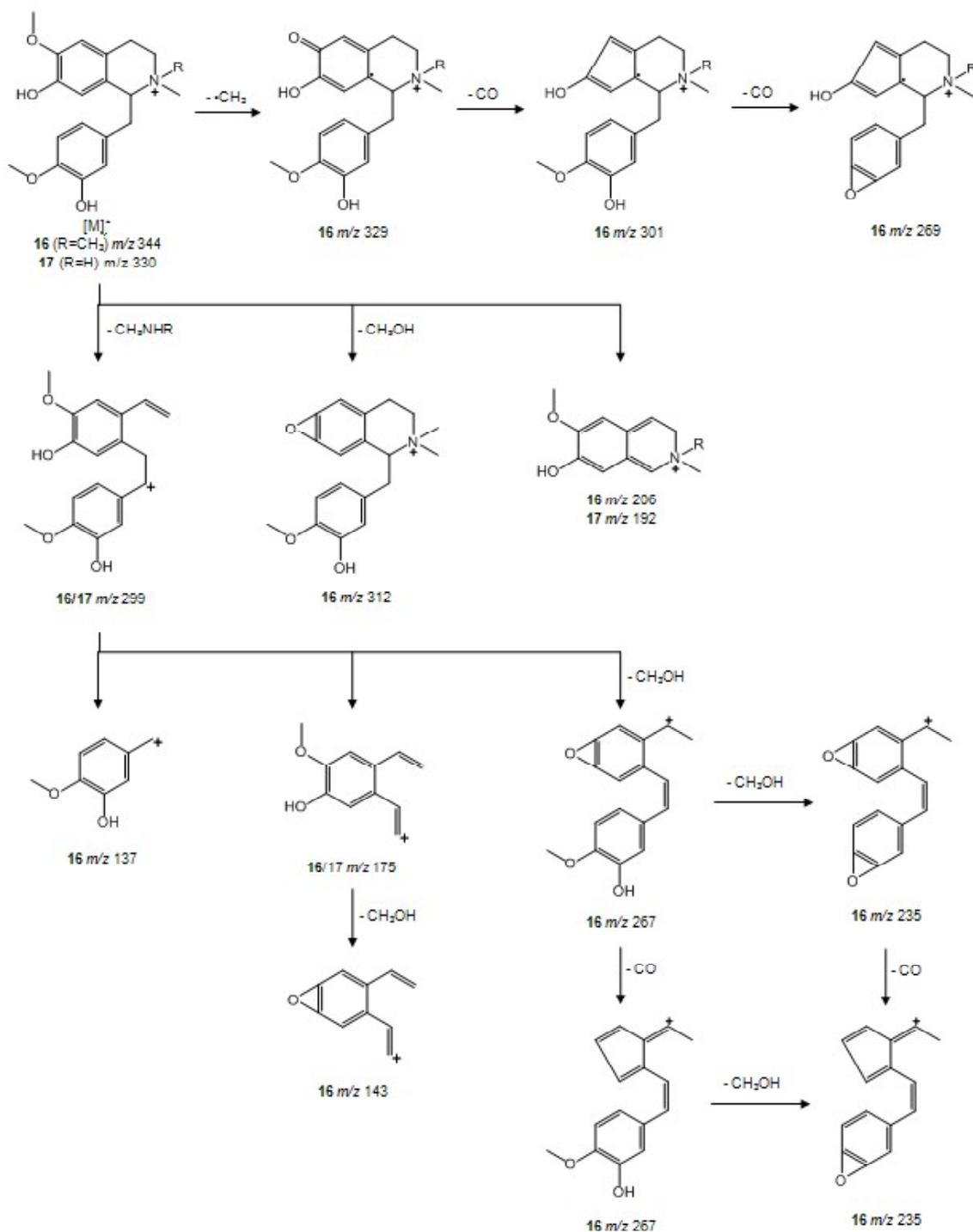
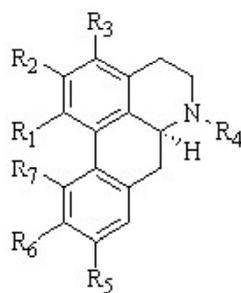


FIGURA 11 | Propostas de mecanismos de fragmentação para a tembetarina (**16**) e reticulina (**17**), transições EMⁿ (fonte: ZHANG *et al.*, 2006).

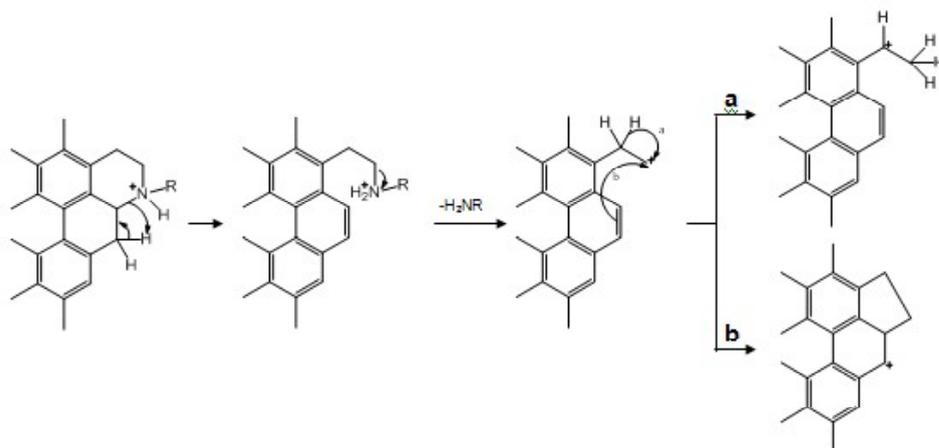


	Substância	MM	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅	R₆	R₇
21	Norneolitsina	309	-OCH ₂ O-	H	H	H	-OCH ₂ O-	H	H
22	Neolitsina	323	-OCH ₂ O-	H	H	CH ₃	-OCH ₂ O-	H	H
23	Dicentrina	339	-OCH ₂ O-	H	H	CH ₃	O-CH ₃	OCH ₃	H
24	Actinodafnina	311	-OCH ₂ O-	H	H	H	OH	OCH ₃	H
25	Cassitina	341	-OCH ₂ O-	OCH ₃	OH	H	CH ₃	OH	OCH ₃
26	Boldina	327	OCH ₃	OH	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H
27	Bulbocapnina	325	-OCH ₂ O-	H	H	CH ₃	H	OCH ₃	OH
28	Isocoridina	341	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	H	OCH ₃	OH
29	Glaucina	355	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H
30	<i>n</i> -Metillaurotetamina	341	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃	OH	OCH ₃	H

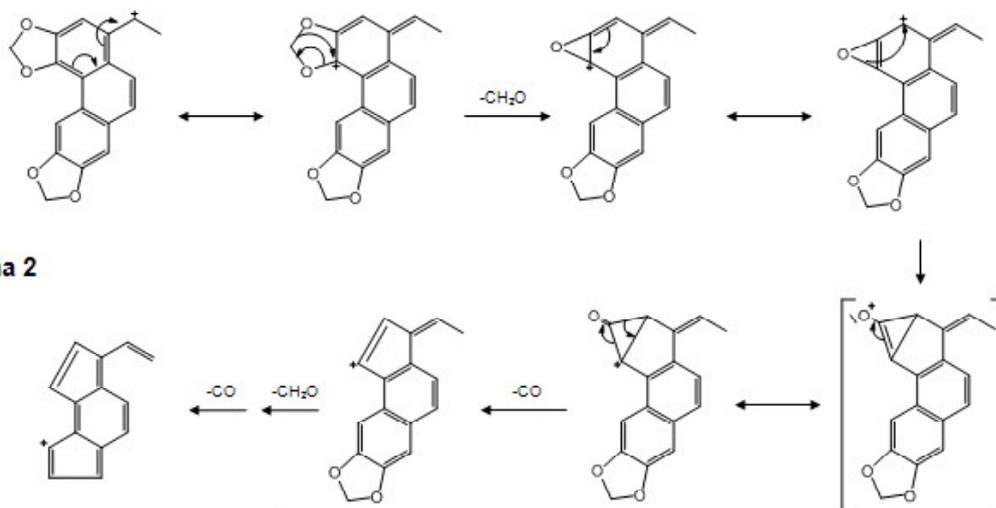
FIGURA 12 | Estrutura dos alcaloides aporfínicos (fonte: STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Em geral, os espectros de ESI-EM¹ mostraram apenas a perda do grupo amino com seu respectivo substituinte, com picos do íon fragmento de baixa intensidade, mas através de espectros de ESI-EMⁿ foram obtidas maiores informações sobre a natureza dos substituintes do grupo amino e dos substituintes periféricos nos anéis aromáticos (STÉVIGNY *et al.*, 2004). Todos os espectros ESI mostraram o íon [M+H]⁺ como o pico principal, apresentando também um íon fragmento importante observado como [M+H-17]⁺, pela eliminação de NH₃ ou [M+H-31]⁺ pela eliminação de CH₃NH₂. Na reação de fragmentação proposta para esta etapa, Stévigny *et al.* (2004) propõem duas rotas prováveis. Por se tratarem de alcaloides tetra-hidroisoquinolínicos pode também ocorrer decomposição semelhante à apresentada na Figura 13.

Esquema 1



Esquema 2



Esquema 3

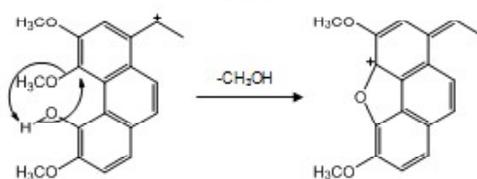


FIGURA 13 | Mecanismo de fragmentação proposto para os alcaloides de **21** a **29** (esquema 1 = perda de RNH_2 ; esquema 2 = vias de fragmentação a partir do íon $[\text{14}+\text{H}-\text{NH}_3]^+$; esquema 3 = proposta para o mecanismo de fragmentação do alcaloide **28**) (fonte: STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Os espectros EM^3 a partir dos íons $[\text{M}+\text{H}-\text{RNH}_2]^+$ apresentam mecanismos de eliminação que dependem do tipo dos substituintes do anel aromático e a partir desses mecanismos, Stévigny *et al.* (2004) propuseram

as regras que seguem: compostos com um grupo $-\text{OCH}_2\text{O}-$ sempre perdem CH_2O e depois CO . Aqueles compostos contendo um grupo OH e um grupo CH_3O em posição vicinal, perdem CH_3OH seguido por CO . Já aquelas substâncias, contendo um ou mais grupos CH_3O não-vicinais a um OH ou $-\text{OCH}_2\text{O}-$ (substâncias **23** e **28, 29**), irão apresentar, após a perda de um grupo amino, perdas de $\cdot\text{CH}_3$ ou $\cdot\text{OCH}_3$ em competição com as regras de fragmentação descritas anteriormente⁵. Esses mecanismos de fragmentação podem ser paralelos ou consecutivos, mas a perda de um CO nunca é observado diretamente de um fragmento $[\text{M}+\text{H}-\text{RNH}_2]^+$. As fragmentações das substâncias **24** e **27** também seguem as regras gerais para seus principais mecanismos (STÉVIGNY *et al.*, 2004) (Figura 13). A substância **30** apresentou fragmentação semelhante ao discutido para os demais alcaloides aporfínicos, com perda de grupo amino em EM^2 , gerando o íon com m/z 311 e na sequência perda de CH_3 ou OCH_3 em EM^3 , gerando os íons com m/z 296 e 280, respectivamente e por fim perda de OCH_3 em EM^4 a partir do íon com m/z 296 (FABRE *et al.*, 2000).

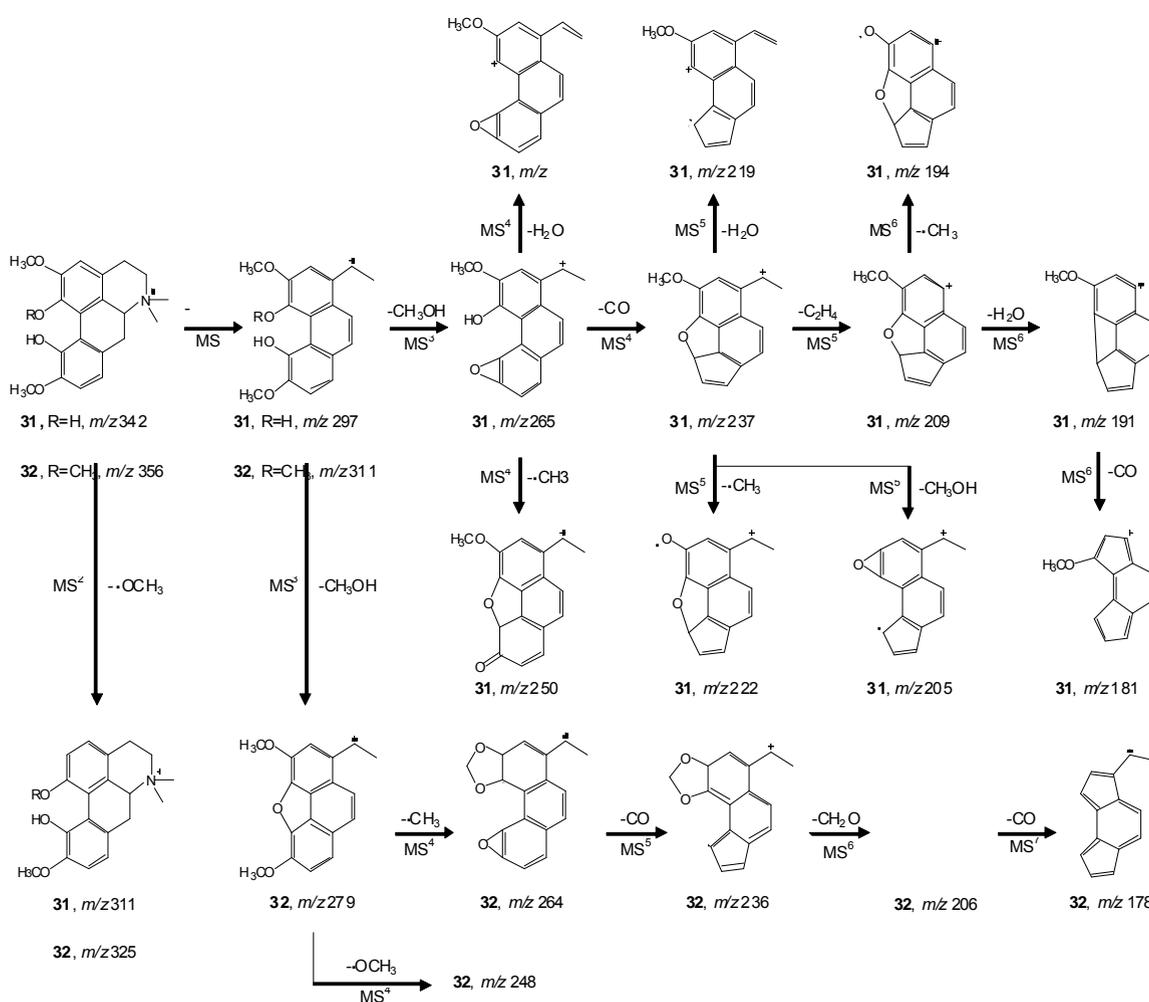


FIGURA 14 | Rotas de fragmentação dos alcaloides magnoflorina (**31**) e menisperina (**32**) por ESI-EMⁿ (adaptado de ZHANG *et al.*, 2006).

As reações de fragmentação dos alcaloides magnoflorina (**31**) e menisperina (**32**) (Figura 14) também parecem seguir as regras acima mencionadas, com alguns detalhes adicionais (FABRE *et al.*, 2000). Esses alcaloides seguem a mesma via de fragmentação em EM² e EM³, sendo o íon mais marcante em ESI aquele gerado pela perda do grupo amino, seguido pelo íon referente a perda de CH₃OH. Outras perdas tais como CO, C₂H₄ e H₂O foram observadas. Todas as vias parecem seguir as regras estabelecidas por Stevigny *et al.* (2004). Além disso, nesses alcaloides também foram observadas perdas de 15 u em determinadas etapas, conforme já discutido anteriormente.

Alcaloides oxaporfínicos

Os alcaloides oxaporfínicos constituem um subgrupo dentro dos aporfínicos, possuem esqueleto totalmente aromático e com presença de grupo carbonílico em C-7, sendo encontrados em diferentes espécies de Annonaceae, mas também podem ser encontrados em outras famílias. São importantes pelas suas atividades biológicas e farmacológicas, das quais a atividade citotóxica merece destaque (STÉVIGNY *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2007).

Como alcaloide oxaporfínico terciário, a liriodenina (**33**) (Figura 15) apresentou em seu espectro de ESI-EM o íon *quasi*-molecular [M+H]⁺ com *m/z* 276, com a provável protonação do nitrogênio. Além disso, a estrutura isoquinolínica não permite a perda de grupo amino, resultando em pouca informação obtida através da via de fragmentação da substância **28**, pois em EM² foi observado apenas o fragmento [M+H-CO]⁺ com *m/z* 248 (LIANG *et al.*, 2006).

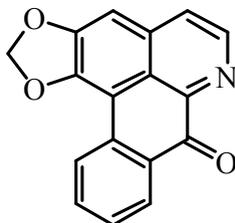
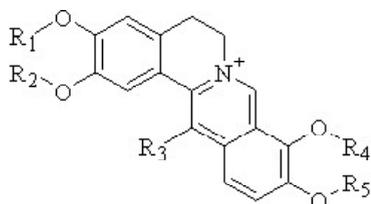


FIGURA 15 | Estrutura química do alcaloide oxaporfínico liriodenina (**33**).

Alcaloides berberínicos

Alcaloides isoquinolínicos do tipo berberínicos foram encontrados na erva-chinesa *jin-guo-lan* (*Tinospora sagittata* (Oliv.) Gagnep. and *T. capillipes* Gagnep.) e as propriedades desses últimos foram estudadas por CL-ESI-EM(n) por Zhang *et al.* (2006). Alguns dos alcaloides dessa classe estão apresentados na Figura 16.



	Substância	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
34	Berberina	- CH ₂ -		H	CH ₃	CH ₃
35	Berberubina	- CH ₂ -		H	H	CH ₃
36	Columbamina	CH ₃	H	H	CH ₃	CH ₃
37	Coptisina	- CH ₂ -		H	- CH ₂ -	
38	Dehidrocoridalmina	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	H
39	Dehidrodiscretamina	H	CH ₃	H	CH ₃	H
40	Demetilenoberberina	H	H	H	CH ₃	CH ₃
41	13-hidroxicolumbamina	CH ₃	H	OH	CH ₃	CH ₃
42	13-hidroxijatrorrizina	H	CH ₃	OH	CH ₃	CH ₃
43	13-hidroxipalmatina	CH ₃	CH ₃	OH	CH ₃	CH ₃
44	Jatrorrizina	H	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
45	Palmatina	CH ₃	CH ₃	H	CH ₃	CH ₃
46	Palmatrubina	CH ₃	CH ₃	H	H	CH ₃
47	Stefaranina	CH ₃	H	H	CH ₃	H

FIGURA 16 | Estrutura dos alcaloides berberínicos **34-47**.

Dados de fragmentação, utilizando ionização por electrosprayacoplada a espectrometria de massas para os alcaloides berberínicos, foram gerados no trabalho de Zhang *et al.* (2006). Os dados referentes aos fragmentos EM(n) estão apresentados na Tabela 1 para os alcaloides berberínicos encontrados em *Tinospora sagittata* and *T. capillipes*. Pode-se observar a perda de 15 u (perda de CH₃ radicalar) como fragmentação comum para muitos dessa classe de substância. Também, o nitrogênio está preso ao anel e fragmentos, contendo nitrogênio não são comuns. Reconhece-se pelo menos duas situações que influem no perfil de fragmentação: a existência ou não de um ou mais substituintes de CH₃O com ou sem OH vicinal (Figuras 17 e 18).

TABELA 1 - Íon fragmentos provenientes de ESI-EM(n) para alcaloides beberínicos encontrados em *Tinospora sagittata* and *T. capillipes* (adaptado a partir de: ZHANG *et al.*, 2006).

No.	EM; (+)-EM(n) m/z*
35	EM(+): 322 [M] ⁺ ; EM ² : 321 [M+H] ⁺ ; 307 [M-CH ₃] ⁺ ; 293 [M-H-CO] ⁺
37	EM (+): 320
36	EM (+): 338 [M] ⁺ ; EM ² [338]: 338(76), 323(100); EM ³ [338→323]: 322(100), 294(91)
38	EM (+): 338 [M] ⁺ ; EM ² [338]: 338; EM ³ [338→323]: 323
39	EM (+): 324 [M] ⁺ ; EM ² [324]: 324(73), 309(100); EM ³ [324→309]: 309
40	EM (+): 324 [M] ⁺ ; EM ² [324]: 324(100), 309(63); EM ³ [324→309]: 309(88), 308(100), 280(91)
41	EM (+): 354 [M] ⁺ ; EM ² [354]: 354(97), 339(100); EM ³ [354→339]: 338(100), 310(79); EM ⁴ [354→339→338]: 338
42	EM (+): 354 [M] ⁺ ; EM ² [354]: 354(69), 339(100); EM ³ [354→339]: 338(73), 324(100), 310(70); EM ⁴ [354→339→338]: 338
43	EM (+): 368 [M] ⁺ ; EM ² [368]: 368(100), 353(52); EM ³ [368→353]: 352(100), 324(70); EM ⁴ [368→353→352]: 352
45	EM (+): 352 [M] ⁺ ; EM ² [352]: 352(100), 337(56); EM ³ [352→337]: 336(100), 308(71)
46	EM (+): 338 [M] ⁺ ; EM ² [338]: 338; EM ³ [338→323]: 323
47	EM (+): 324 [M] ⁺ ; EM ² [324]: 324(64), 309(100); EM ³ [324→309]: 309(100), 294(64)

*EM m/z são referente a modo positivo EM(+) ou positivo e negativo EM(+/-). Os valores de EM2, EM3, entre outros são de modo positivo. Os valores de m/z relacionados são de intensidade relativa e"50%. Onde apenas um valor de m/z é listado para determinado EM(n) o mesmo corresponde à intensidade relativa (int. rel.) máxima (100%).

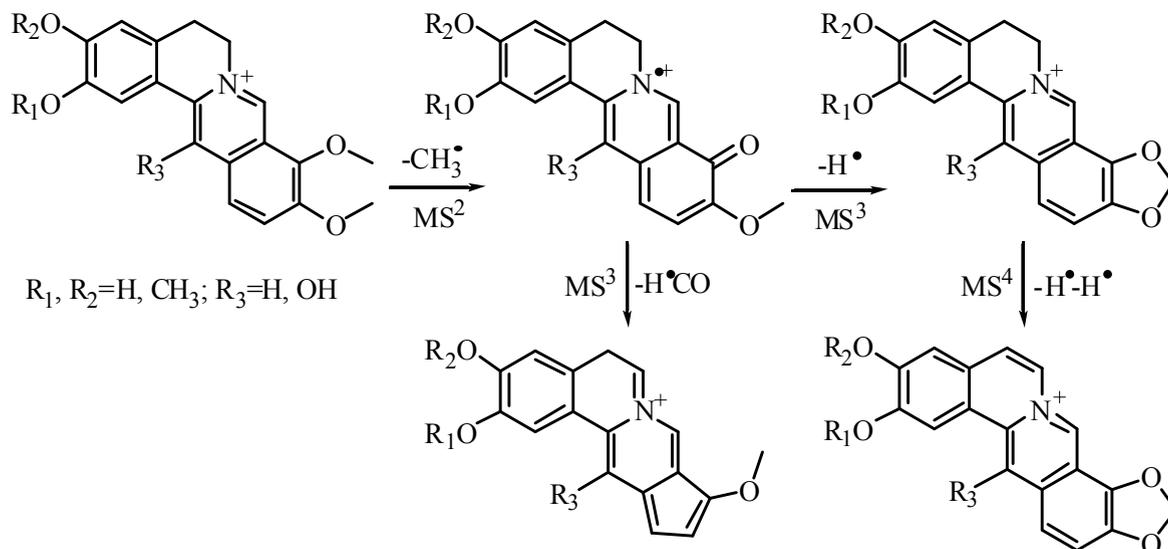


FIGURA 17 | Esquema geral mostrando a fragmentação de alcaloides berberínicos com substituintes de CH_3O sem OH vizinhos.

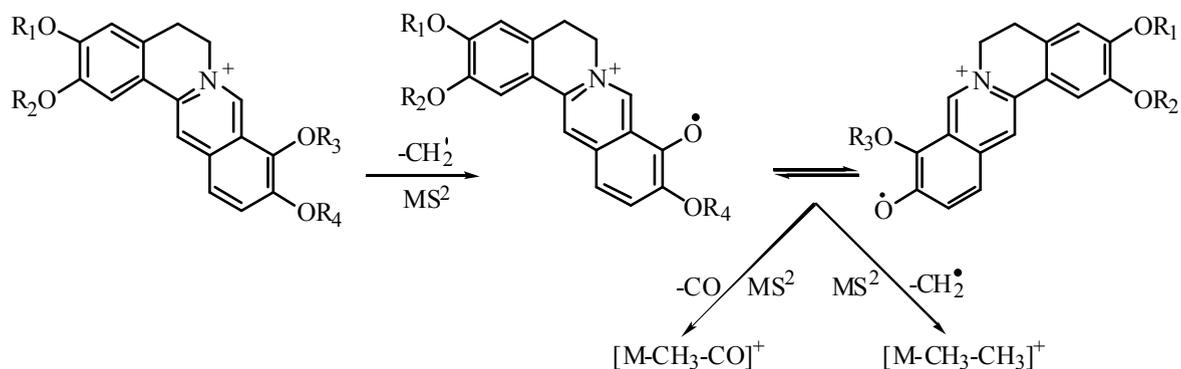


FIGURA 18 | Esquema geral da fragmentação dos íons pseudomoleculares de alcaloides berberínicos apresentando substituintes CH_3O com OH vizinhos, perda de $\text{CH}_3\cdot$ e CO.

Alcaloides secoberberínicos e tetra-hidroprotoberberínicos

Sturm *et al.* (2007) aplicaram a técnica de eletroforese não-aquosa (NACE) acoplada a ESI(+)-IT-EM(n) para identificar alcaloides isoquinolínicos em *Corydalis* spp. encontradas na Europa Central. Essa técnica foi usada para caracterizar o alcaloide secoberberínico coridamina (**48**) (Figura 27) e o alcaloide tetra-hidroprotoberberínico sinactina (**49**) (Figura 20), provenientes da *Fumaria officinalis* L. Essas duas substâncias foram detectadas como $[M+H]^+$. A coridamina (**48**) apresentou EM m/z 351, EM² m/z 320 e EM³ m/z 292 (88%) e 277 (100%) e a sinactina (**49**) apresentou EM m/z 340, EM² m/z 192 (100%), 165 (90%) e EM³ (do fragmento m/z 192) 177 (100%) e 148 (48%) (STURM *et al.*, 2006). A formação de um íon de pico base com m/z 192 no EM² da substância **49** é fragmentação análoga aquela apresentada na discussão e Figura 19 para tetraidropalmatina (**50**).

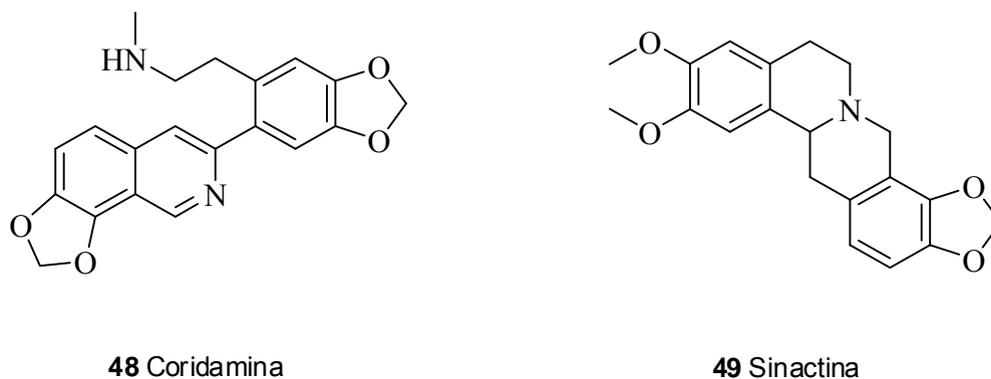


FIGURA 19 | Estrutura do alcaloide secoberberínico (**48**) e do alcaloide tetraidroproto-berberínico (**49**).

O (+)-ESI-EM de tetraidropalmatina (**50**) apresentou m/z 356 $[M]^+$, 214 e 159 e o (+)-ESI-EM de canadina (**51**) apresentou m/z 340 $[M]^+$, 214 e 159. O alcaloide **50** apresentou EM² (do fragmento m/z 356) m/z 340, 308, 192 (100%) e 165 e EM³ (do fragmento m/z 192) m/z 176 (100%) e 148 (ca. 30%). O alcaloide **51** apresentou EM² (do fragmento m/z 340) m/z 324, 292, 176 (100%) e EM³ (do fragmento m/z 176) m/z 161 (ca. 40%) (eliminação de CH_3) e 148 (100%) (eliminação de H_2CO). Sturm e colaboradores interpretaram as fragmentações em EM² e EM³ referente a tetraidropalmatina (**50**) e a canadina (**51**) (Figura 20) e, notando que é impossível determinar a posição exata de agrupamentos metilenodioxí em geral, concluíram que ESI-EM(n) representa ferramenta importante para análises por fornecer informações relevantes para atribuição de picos, porém que não substitui espectrometria de RMN para elucidação estrutural, sem ambiguidade, de substâncias desconhecidas (STURM *et al.*, 2007).

TABELA 2 - Íon fragmentos provenientes de experimentos em ESI-EM(n) para alcaloides benzofenantridínicos encontrados em *Fumaria officinalis* (adaptado a partir de: STURM *et al.*, 2006).

No.	Name	EM (m/z)	EM ² Íon Fragmento (m/z)
52	Nitidina	348 [M] ⁺	333 [M-CH ₃] ⁺ ; 332 [M-CH ₃ -H] ⁺ ; 318 [M-CH ₃ -CH ₃] ⁺ ; 304 [M-CH ₃ -H-CO] ⁺ ; 290 [M-CH ₃ -CH ₃ -CO] ⁺
53	Queleritrina	348 [M] ⁺	333 [M-CH ₃] ⁺ ; 332 [M-CH ₃ -H] ⁺ ; 318 [M-CH ₃ -CH ₃] ⁺ ; 304 [M-CH ₃ -H-CO] ⁺ ; 290 [M-CH ₃ -CH ₃ -CO] ⁺
56	Sanguinarina	332 [M] ⁺	317 [M-CH ₃] ⁺ ; 304 [M-CO] ⁺
57	TMB	364 [M] ⁺	349 [M+H-CH ₃] ⁺ ; 334 [M+H-2CH ₃] ⁺ ; 320 [M+H-CH ₃ -H-CO] ⁺
58	Diidroqueleritrina	350 [M] ⁺	335 [M+H-CH ₃] ⁺ ; 319 [M+H-CH ₃ -CH ₄] ⁺ ; 290 [M+H-CH ₃ -CH ₄ -H-CO] ⁺
59	Oxiavicina	348 [M] ⁺	333 [M+H-CH ₃] ⁺ ; 318 [M+H-CH ₃ -CH ₃] ⁺ ; 304 [M+H-CH ₃ -H-CO] ⁺ ; 290 [M+H-CH ₃ -CH ₃ -CO] ⁺

Icaloides protopínicos

Sturm e colaboradores utilizaram (+)-ESI-IT-EM(n) acoplada à eletroforese capilar (EC) para caracterizar os alcaloides isoquinolínicos protopina (**60**), criptopina (**61**) provenientes da *Fumaria officinalis* L. (Figura 22). Esses alcaloides foram detectados como [M+H]⁺. A protopina (**60**) apresentou EM *m/z* 384, EM² *m/z* 188 (100%) e 149 (91%) e EM³ (do fragmento *m/z* 188) *m/z* 159 (100%) e 130 (90%) e a criptopina (**61**) EM *m/z* 370, EM² *m/z* 204 (92%) e 165 (100%) e EM³ (do fragmento *m/z* 204) *m/z* 188 (98%) e 140 (100%) (STURM *et al.*, 2006).

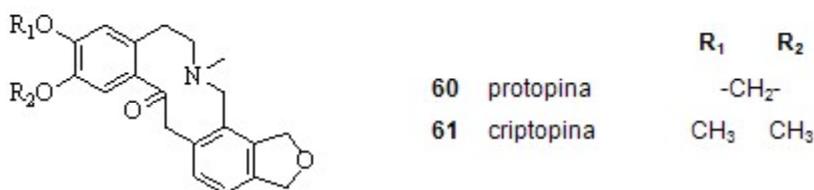
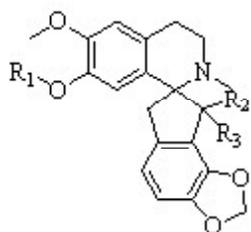


FIGURA 22 | Estrutura dos alcaloides protopínicos **60** e **61**.

Alcaloides espirobenzilisquinolínicos

Sturm e colaboradores utilizaram (+)-ESI-IT-EM (n) acoplada à eletroforese capilar (EC) para caracterizar os alcaloides espirobenzilisquinolínicos (-)-fumaroficina (**62**), (-)-*O*-metilfumaroficina (**63**) e (+)-parfumina (**64**) (Figura 23), provenientes da *Fumaria officinalis* L. $[M+H]^+$ (STURM *et al.*, 2006). A fumaroficina (**62**) apresentou EM m/z 398, EM² m/z 338 (perda de AcOH) e EM³ m/z 323 (20%) (perda de CH₃), 308 (100%) e 277 (90%), a (-)-*O*-metilfumaroficina (**63**) apresentou EM m/z 414, EM² m/z 352 e EM³ m/z 321 (100%), 308 (10%) e 291 (30%) e a (+)-parfumina (**64**) apresentou EM m/z 354, EM² m/z 336 (95%) e 323 (100%) e EM³ m/z (do fragmento m/z 323) 292.

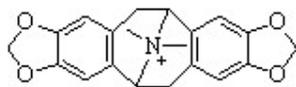


Substâncias	R ₁	R ₂	R ₃
62 Fumaroficina	H	H	OCOCH ₃
63 <i>O</i> -metilfumaroficina	CH ₃	H	OCOCH ₃
64 Parfumina	H		=O

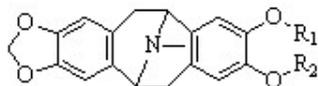
FIGURA 23 | Estrutura dos alcaloides espirobenzilisquinolínicos **62-64**.

Alcaloides pavínicos

A Figura 24 mostra os íons produtos do tipo pavina detectados na papoula da Califórnia, que são a californidina (**65**), escholtzina (**66**), *O*-metilcariachina (**67**) e a cariachina (**68**). Esses compostos consistem em um quaternário, californidina (**65**) e três pavinas terciárias **66-68**. Para californidina (**65**) e escholtzina (**66**), os íons fragmentos característicos foram encontrados em m/z 177, 205, 235, 263 e 293; para os compostos **67** e **68** foram observados dois íons diagnósticos em m/z 235 e 263 do espectro. Os íons pavinas terciárias compartilham um íon em comum em m/z 188 que poderia ser devido à perda de agrupamentos benzênicos dissustituídos, levando à formação de metilenodioxi-tetraidroquinolina protonada (FABRE *et al.*, 2000).



65 californidina



Substâncias	R ₁	R ₂
66 escholtzina	- CH ₂ -	-
67 <i>O</i> -metilcariachina	CH ₃	CH ₃
68 cariachina	H	CH ₃

FIGURA 24 | Estrutura dos alcaloides pavínicos **65-68**.

Nesses diferentes casos, essas fragmentações podem ter ocorrido por várias perdas neutras e/ou radicalares. A clássica perda de amônia não foi observada, mas a primeira perda neutra é de $(\text{CH}_3)_2\text{NH}$ [$\text{M}+\text{H}-45$] para o composto quaternário **65** e CH_3NH_2 [$\text{M}+\text{H}-31$] para as pavinas terciárias e a perda do nitrogênio, contido no heterociclo, pode ser explicada pela fragmentação de *retro*-Diels-Alder (FABRE *et al.*, 2000).

Alcaloides isoquinolínicos estereoméricos

Gioacchini e colaboradores caracterizaram os alcaloides isoquinolínicos diastereoisoméricos sintéticos **69a,b-72a,b**, utilizando ESI-EM para gerar íons MH^+ no modo positivo, bem como *ion trap* para fazer a fragmentação sequencial (EM(n)) desses íons (Figura 25).

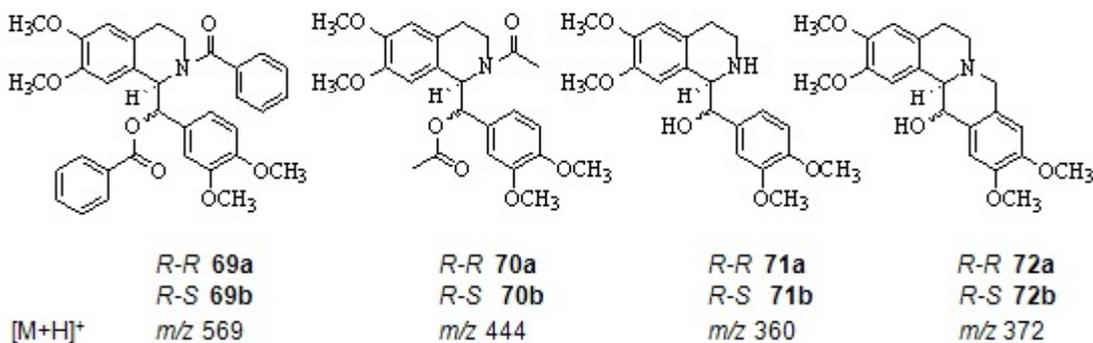


FIGURA 25 | Estrutura dos alcaloides isoquinolínicos diastereoisoméricos sintéticos **69a,b – 72a,b**.

A técnica de ESI-EM(n) funciona muito bem para a caracterização estrutural dessa classe de alcaloide. Em geral, estereoisômeros apresentam fragmentações bastante semelhantes em geral entre si. Assim, **69a,b** M^+ (m/z 569) $[\text{M}+\text{H}]^+$ geram EM^2 de m/z 446 (perda de ácido benzóico) e 326 (perda de duas unidades de ácido benzóico) e EM^3 [569 \rightarrow 446]: m/z 428 (perda de água), 341. No entanto, os estereoisômeros **72a,b** têm em comum os dados de fragmentação M^+ (m/z 372) $[\text{M}+\text{H}]^+$ e EM^2 m/z 354 e EM^3 (m/z 372 \rightarrow 354): m/z 338, 324, 323, 322 (Figura 26). Porém, os diastereoisômeros **72a** (R-R) e **72b** (R-S) apresentam diferenças na sua fragmentação EM^2 . Por exemplo, o estereoisômero **72a** (R-R) apresenta um íon fragmento em m/z 192 que essencialmente inexistente na fragmentação EM^2 do seu estereoisômero **72b** (R-S), devido a fragmentação (formalmente, *retro*-Diels-Alder), ver Figura 26. Os outros estereoisômeros têm diferenças semelhantes no processo de fragmentação primária, ocasionadas pelas diferenças acarretadas pelos centros estereogênicos. Por exemplo, entre os dois isômeros, o isômero R-S parece ser o isômero energeticamente mais favorável para sofrer fragmentação primária. Substâncias que contêm os grupos ésteres apresentam uma facilidade na formação dos íons adutos com íons de metal $[\text{M}+\text{Na}]^+$ e $[\text{M}+\text{K}]^+$, o que pode ser explicado também pelo efeito da alta densidade eletrônica associada aos átomos de oxigênio das carbonilas devido sua alta eletronegatividade, favorecendo a formação de moléculas queladas com os íons metálicos (GIOACCHINI *et al.*, 2000).

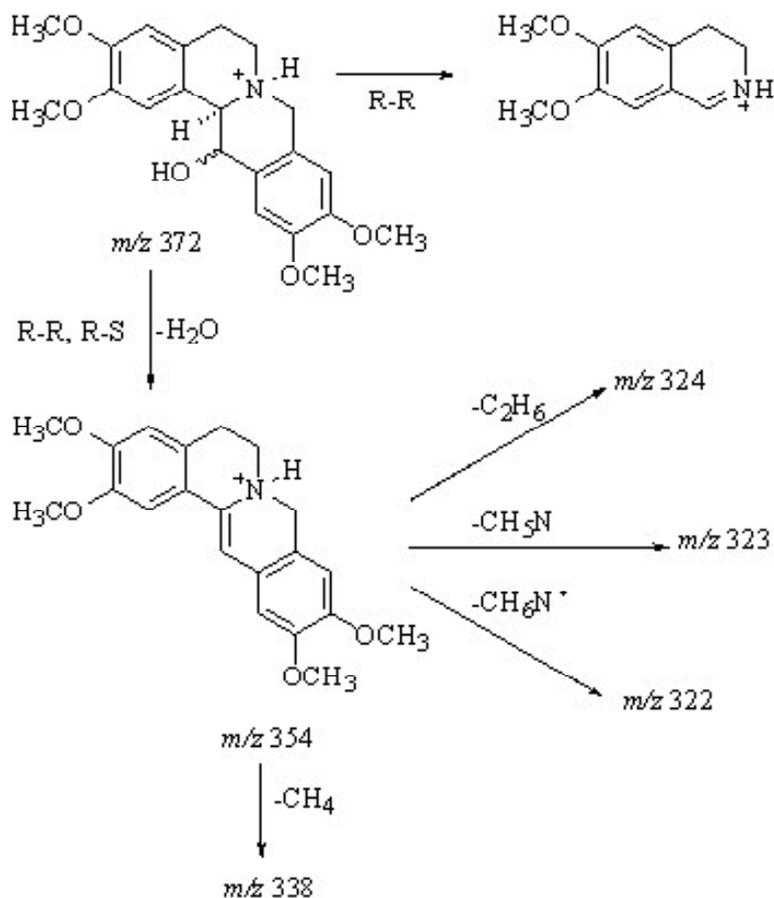


FIGURA 26 | Comparação da fragmentação de alcaloides isoquinolínicos sintéticos estereoméricos **72a** e **72b**. Via de fragmentação que leva à formação do íon m/z 192 é favorecida totalmente pelo diastereômero *R-R*.

Atropoisômeros de alcaloides isoquinolínicos

Entre os alcaloides naftilisoquinolínicos, estão as korupensaminas e as michelaminas que são monômeros e dímeros, respectivamente. As michelaminas são encontradas exclusivamente em plantas da espécie *Ancistrocladus korupensis* D.W. Thomas & Gereau (THOMAS *et al.*, 1993; BRINGMANN *et al.*, 1998).

Por outro lado, Bringmann e colaboradores investigaram um grupo de alcaloides naftilisoquinolínicos diméricos (atropodiastereoméricos) usando espectrometria de massas em *tandem* com ionização por ESI. Utilizaram CLAE-ESI-EM-EM, a análise foi feita com um triplo quadrupolo TSQ com interface ESI no modo positivo. As estruturas dos alcaloides diméricos michelaminas A (**73a**), B (**73b**) e C (**73c**) com seus monômeros, korupensaminas A (**74a**) e B (**74b**) estão demonstradas na Figura 27 (BRINGMANN *et al.*, 1998).

No modo positivo, observam-se moléculas protonadas $[M+H]^+$ em m/z 380,4 (100% abundância relativa) para os alcaloides monoméricos, as korupensaminas A (**74a**) e B (**74b**). A colisão de baixa energia induz a dissociação dos korupensaminas. O íon produto mais abundante em m/z 363,4 (84% abundância), aparentemente, é resultante da eliminação de amônia (-17 u). Existe a perda da porção neutra C_2H_5N (-43 u) devido à fragmentação *retro*-Diels-Alder, resultando em um íon produto em m/z 337 (37% abundância relativa). Entretanto, os alcaloides atropisoméricos **73a** e **73b** apresentaram um espectro idêntico (BRINGMANN *et al.*, 1998).

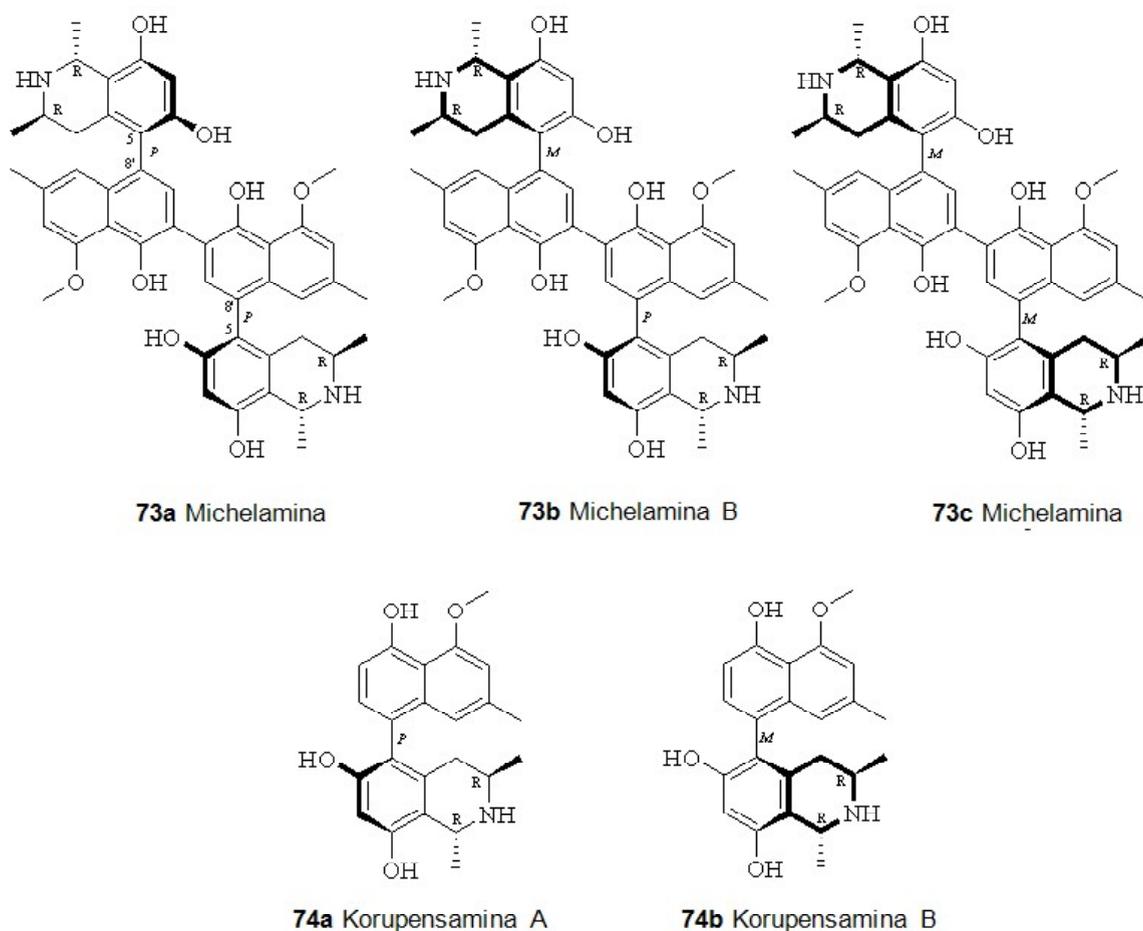


FIGURA 27 | Estrutura dos alcaloides naftilisoquinolínicos diméricos michelaminas A (**73a**), B (**73b**) e C (**73c**) e seus precursores biossintéticos korupensaminas A e B (**74a** e **74b**).

Os alcaloides atropodiastereoméricos, as michelaminas A (**73a**), B (**73b**) e C (**73c**), produzem moléculas duplamente protonadas $[M+2H]^{2+}$ em m/z 379,4 (100% abundância relativa), além de espécies monoprotônicas $[M+H]^+$ m/z 757,4 (1% abundância relativa). Foram observadas duas rotas de reação do precursor m/z 379,4: (a) perda de um fragmento com massa 8,5 u pela perda neutra de uma unidade de amônia produzindo um íon $[M+2H-NH_3]^{2+}$ em m/z 371 (22% abundância relativa) e (b) perda de 21,5 u devido a uma fragmentação *retro*-Diels-Alder, resultando em um íon produto $[M+2H-C_2H_5N]^{2+}$ em m/z 358 (15% abundância relativa) (BRINGMANN *et al.*, 1998).

Alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos

O grupo dos alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos é derivado via oxidação fenólica de uma unidade aporfínica com uma unidade benzilisoquinolínica. Alcaloides bisbenzilisoquinolínicos e aporfínicos-benzilisoquinolínicos já foram encontrados nas seguintes famílias: Annonaceae, Berberidaceae, Hernandiaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae e Rutaceae (WU *et al.*, 2004).

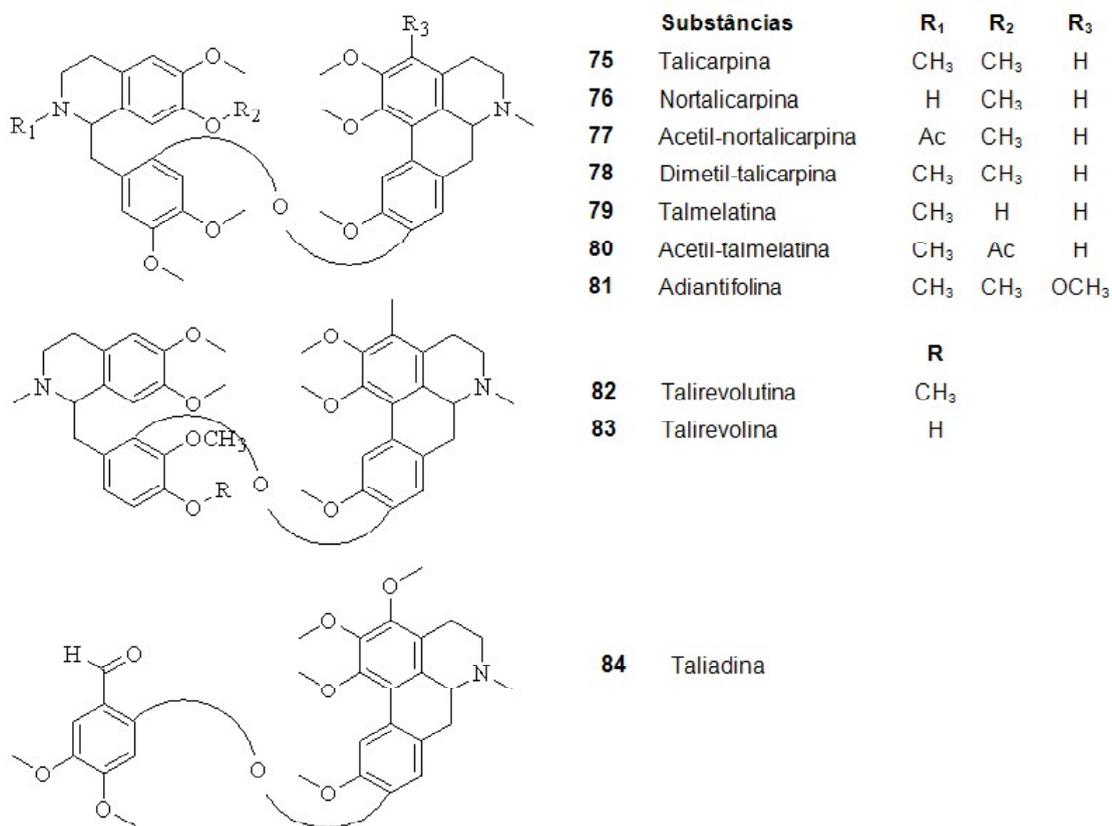


FIGURA 28 | Estrutura dos alcaloides aporfino-benzoquinolínicos 75-84.

Os alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos podem ainda ser classificados em três grupos conforme a semelhança de suas estruturas químicas: Grupo A, formado pela talicarpina (**75**), nortalicarpina (**76**), acetilnortalicarpina (**77**), dimetiltalicarpina (**78**), talmelatina (**79**), acetiltalmelapina (**80**) e adiantifolina (**81**); Grupo B, formado por talirevolutina (**82**) e talirevolina (**83**); e Grupo C, formado pela taliadina (**84**), todos ilustrados na Figura 28. Foram utilizadas técnicas de ESI-EM/EM em TQ para elucidar a estruturas de dez alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos (WU *et al.*, 2004).

Os alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos (**75 a 84**) foram analisados utilizando CLAE-ESI-EM/EM com analisador de TQ, sendo todas as análises realizadas no modo positivo (WU *et al.*, 2004). Os dados de ESI-EM desses alcaloides aporfino-benzilisoquinolínicos apresentam íon $[M+H]^+$ intenso, para os alcaloides terciários (**75-77**, **79-83**) e íon $[M]^+$ intenso para o alcaloide diquaternário **78**, apresentando também os íons $[M+H]^{2+}$ intensos (pico base) para todas as substâncias, com exceção da substância **84** (WU *et al.*, 2004).

Para esse grupo de alcaloides foram determinadas três rotas principais de fragmentações, demonstradas com a fragmentação da talicarpina **75** na Figura 29. A clivagem da ligação no anel benzílico AB da unidade benziltetraidroisoquinolínica E, forma íons aporfino-benzílicos (via 1, Figura 29) em ESI-EM/EM, que são similares aos fragmentos encontrados na técnica de espectrometria de massa por impacto por elétrons (IE-EM), entretanto esses íons não são observados ou mostrados em pequena abundância nas técnicas por ionização química (IQ-EM) e ionização via bombardeamento rápido de átomos (FAB) (WU *et al.*, 2004). A clivagem da ligação éter (via 2 e 3) leva à formação de íons aporfino-benzílicos (talicarpina: m/z 371 e 355) ou benziltetraidroisoquinolínicos (talicarpina m/z 325 e 341), com eliminação posterior de CO nos íons m/z 325 e m/z 355 (Figura 29).

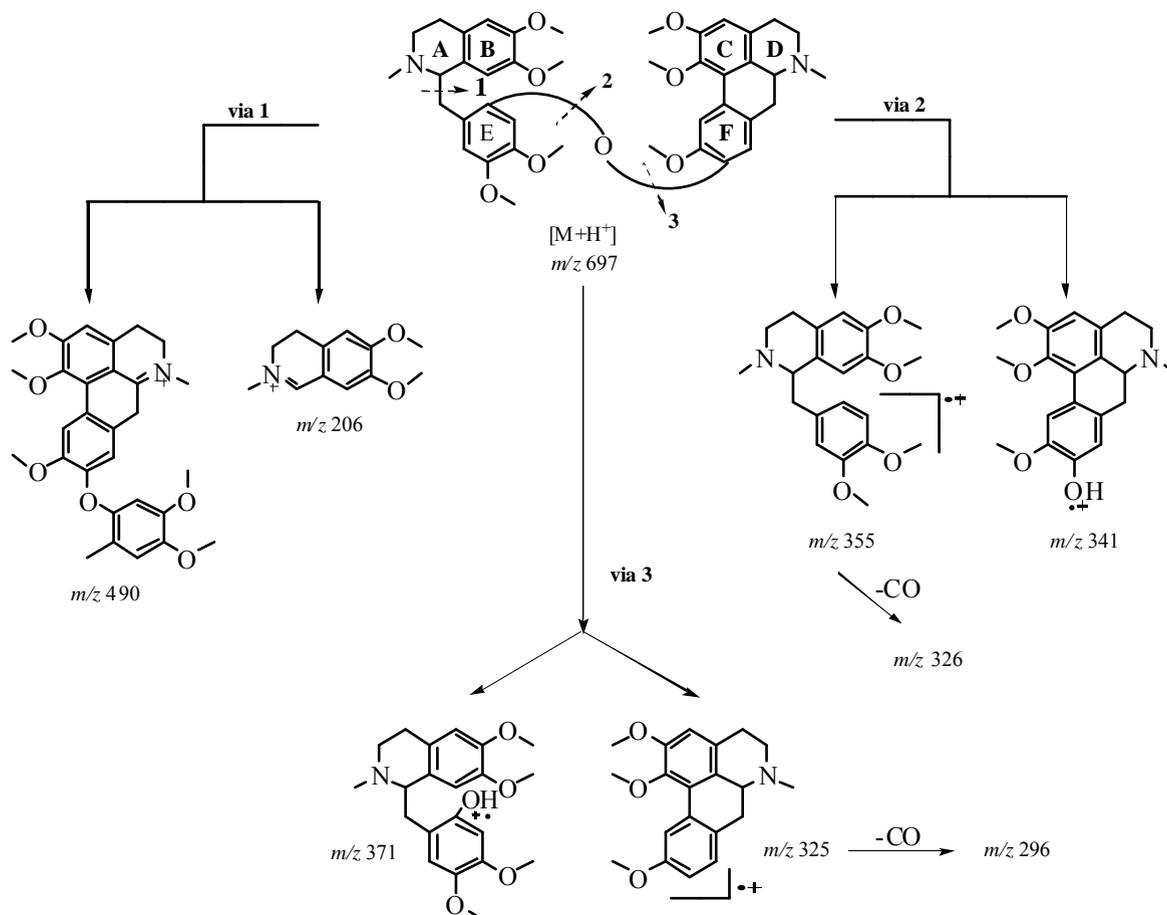


FIGURA 29 | Vias de fragmentações básicas encontradas para os alcaloides aporfino-benzoquinolínicos. Fragmentação da talicarpina **75** (m/z 697), proveniente de experimentos ESI-EM/EM (WU *et al.*, 2004). Rota 1: clivagem da ligação no anel benzílico. Rota 2 e 3: clivagem da ligação éter entre as posições 10-aporfina e 8-benziltetraidroisoquinolona-benzílica.

Os íons aporfino-benzílicos, dos alcaloides **76** a **81**, formados podem perder H e metanol, mas também poder ocorrer perdas de 15 u (radical metila) e 30 u (OCH_3), depois da CH_3OH . A presença de íons isoquinolínicos (ex.: m/z 206, alcaloide **76**) e benzílicos (m/z 151), corrobora com esta via de fragmentação (WU *et al.*, 2004).

O espectro de massas do alcaloide **82**, também apresenta os íons benzil-aporfínico (m/z 519), isoquinolínico (m/z 206) e benzílico (m/z 151). Além disso, por características estruturais já discutidas apresentam perdas neutras de CH_3OH e perdas de CH_3 (WU *et al.*, 2004).

Alcaloides Bis-benzilisoquinólicos

Os alcaloides bisbenzilisoquinólicos podem ser encontrados nas mesmas famílias em que são encontrados os aporfino-benzilisoquinólicos. Esses alcaloides diméricos são importantes, pois podem exercer atividades variadas, tais como: cardiovascular (anti-hipertensivo e antiarrítmico), antiangiogênica, antimicrobiana, analgésica, bloqueadora neuromuscular, relaxante muscular, antitumoral e anti-HIV (Wu *et al.*, 2004). Esses alcaloides são derivados via oxidação fenólica de duas unidades benzilisoquinólicas (cabeça-cauda) e estão representados na Figura 30 (WU *et al.*, 2004).

Quando estudados por ESI-EM/EM e também por ESI-EMⁿ (com detector *ion trap*), utilizando a troca de hidrogênio por deutério na elucidação da identidade dos fragmentos, os alcaloides fenolo-bisbenziltetraidroisoquinólicos neferina (**85**), liensinina (**86**) e isoliensinina (**87**) (importantes por seu potencial anti-HIV), em geral, observou-se a clivagem da ligação C1'-C9', resultando na formação de fragmentos, contendo o núcleo aromático C e D, com perda de 4-etil-1-fenol ou 4-etil-1-metóxi-benzeno após rearranjos. Outros fragmentos estáveis formados se devem à perda de H₂O, CH₃NH₂, CH₃OH e CH₃-N=CH₂, todos ilustrados na Figura 31 (ZHOU *et al.*, 2007).

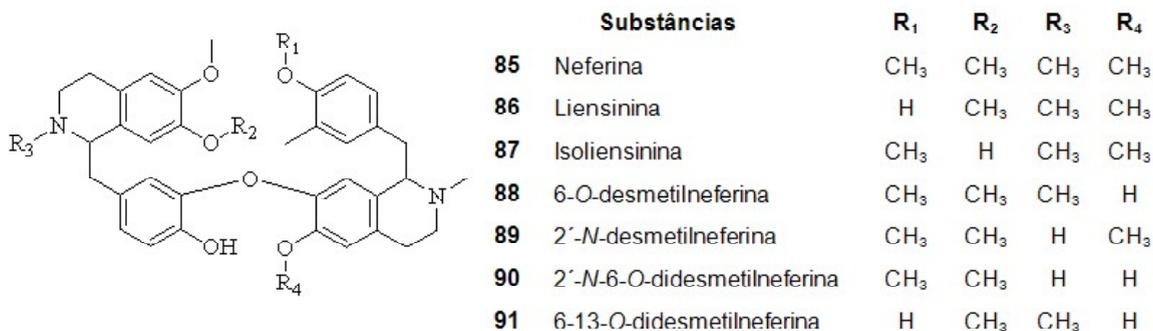


FIGURA 30 | Estrutura dos alcaloides bisbenzilisoquinólicos **85-91**.

No mesmo trabalho, a substância **85** foi incubada com microsomas hepáticas, levando a identificação de quatro derivados novos mono ou didesmetilados de **85**, a saber: 6-O-desmetilneferina **88**, 2'-N-O-didesmetilneferina **89**, 2'-N-6-O-didesmetilneferina **90**, e 6,13-O-didesmetilneferina **91**, cujas fragmentações também foram estudadas e seus principais mecanismos estão ilustrados na (Figura 20).

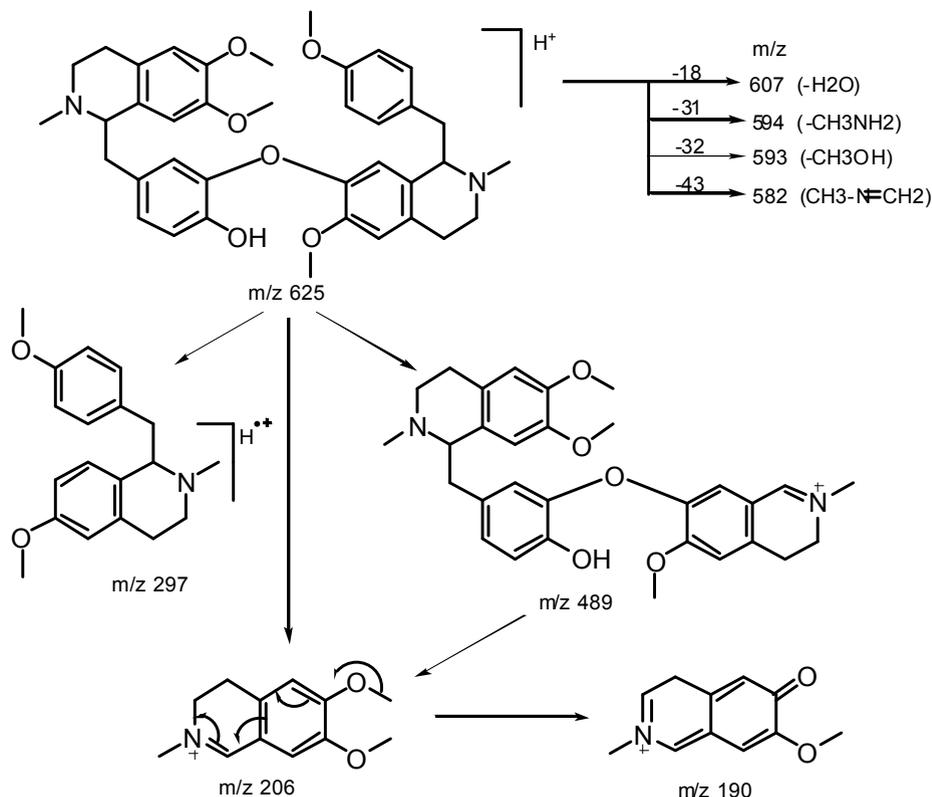


FIGURA 31 | Vias de fragmentação da neferina **83**, estudada por ESI-EM/EM (ZHOU *et al.*, 2007).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A espectrometria ESI EM/EM é uma ferramenta útil na análise de alcaloides isoquinolínicos. Em relação ao estudo dos morfínicos, tanto *ion trap* quanto o triplo quadrupolo EM/EM providenciam informações sobre a substituição no esqueleto morfínico. No entanto, a posição das duplas ligações no anel C, o número e as posições das duplas ligações influenciam o processo de fragmentação do íon molecular. A maioria dos fragmentos é encontrada em ambos os analisadores, porém com intensidades diferentes. Em geral o *ion trap* detecta fragmentos de alto peso molecular, já os fragmentos de menor peso molecular, que são detectados pelo triplo quadrupolo, só são identificados no *ion trap* em EM³ ou EM⁴. O mecanismo principal de fragmentação dos morfínicos consiste na clivagem do anel piperidínico e na eliminação do grupamento amina (RAITH *et al.*, 2003).

Os alcaloides opioides noscapina **12** e papaverina **13** podem ser analisados por ESI-EM, observando os íons $[M+H]^+$. Apesar dos analitos apresentarem esqueletos carbônicos similares, as suas fragmentações diferem

significativamente. A substância **12** produz muitos produtos de íons em EM², enquanto os fragmentos da substância **13** produzem somente íons únicos, ambos em EM² e EM³. O local da ionização é revelado vaporizando os analitos com solução contendo ²H₂O e as transições EMⁿ têm sido designadas sem a despesa de utilizar analitos isotopicamente marcados com carbonos, oxigênios e nitrogênios (WICKENS *et al.*, 2006).

Em geral, as análises de ESI/EM e EM/EM são as únicas técnicas que provêm um bom diagnóstico de íons de fragmentação para a elucidação estrutural dos alcaloides diméricos aporfínicos-benzilisoquinolínicos. O mecanismo de fragmentação principal dos alcaloides aporfínicos-benzilisoquinolínicos consiste na clivagem da ligação dos anéis benzílicos A, B e E e eliminação (WU *et al.*, 2004).

Além do mais, a marcação com isótopos estáveis em espectrometria de massa ESI com fragmentação por ativação colisional (CID) consiste numa ferramenta importante para a investigação dos mecanismos de fragmentação dos alcaloides (POEAKNAPO *et al.*, 2004).

Os isômeros *R-R* e *R-S* dos alcaloides isoquinolínicos têm sido diferenciados em relação à energia requerida para o processo de fragmentação primária; o isômero *R-S* parece energeticamente mais favorável. Substâncias que contêm o grupo éster, tanto para o isômero **a** e o isômero **b** (69 e 70) apresentam uma facilidade na formação dos íons [M+Na]⁺ e [M+K]⁺, o que pode ser explicado também pelo efeito doador dos átomos de oxigênio ou pela alta basicidade dos grupos amino presentes nas substâncias **71** e **72** favorecendo a formação de moléculas protonadas (GIOACCHINI *et al.*, 2000).

Por outro lado, a fragmentação dos alcaloides aporfínicos acontece, primeiramente, pela perda do grupo amino e seus substituintes e, posteriormente, pela perda de grupos periféricos. As eliminações de metanol e CO são observadas se um OH é vicinal a um OCH₃ no anel aromático. O espectro mostra eliminações CH₃ ou CH₃O. Se um grupo dioxi-metileno está presente, observa-se a perda de formaldeído seguido de CO (STÉVIGNY *et al.*, 2004).

Os alcaloides naftil-isoquinolínicos são identificados pela geração de moléculas protonadas [M+2H]⁺ para korupensaminas e duplamente protonadas [M+2H]²⁺ para michelaminas (BRINGMANN *et al.*, 1998).

As reações de fragmentação dos alcaloides isoquinolínicos propostas envolvem eliminações neutras e radiculares e formação de íons [M+H]⁺ para os alcaloides terciários e [M]⁺ para os quaternários (FABRE *et al.*, 2000).

De uma forma geral, os mecanismos de fragmentação via ESI para os alcaloides isoquinolínicos encontrados são: a clivagem (anéis piperidínicos, benzílicos), a eliminação (moléculas neutras, radicais) e RDA. Pode haver a formação dos íons [M+2H]⁺, [M+2H]²⁺, [M+H]⁺, [M]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺. Existe a tendência para a rota de formação de substâncias altamente conjugadas, devido a sua estabilidade e o sítio mais provável da protonação é o N da parte isoquinolínica. Essas reações vão depender da estrutura química do alcaloide, se são terciários ou quaternários e também da natureza e posição dos substituintes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BENTLEY, K.W. *â*-Phenylethylamines and the isoquinoline alkaloids. **Natural Product Reports**, v.9, n.4, p. 365-391, 1992.

- BENTLEY, K.W. **Chemistry and biochemistry of organic natural products: the isoquinoline alkaloids**. 1 ed., CRC Press, 1998. 512p.
- BOUSTIE, J.; STIGLIANI, J.L.; MONTANHA, J.; AMOROS, M.; PAYARD, M.; GIRRE, L. Antipoliiovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. **Journal of Natural Products**, v.61, n.4, p.480-484, 1998.
- BRINGMANN, G.; RÜCKERT, M.; SCHLAUER, J.; HERDERICH, M. Acetogenic isoquinoline alkaloids: CXII. Separation and identification of dimeric naphthylisoquinoline alkaloids by liquid chromatography coupled to electro *spray* ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.810, n.1-2, p.231-236, 1998.
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants**. 2 ed., London, Paris, New York: Intercept Ltd., 1999. 1119p.
- CARDOZO, K.H.M.; VESSECCI, R.; CARVALHO, V.M.; PINTO, E.; GATES, P.J.; COLEPICOLO, P.; GALEMBECK, S.; LOPES, N.P. A theoretical and mass spectrometry study of the fragmentation of mycosporine-like amino acids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v.273, n.1-2, p.11-19, 2008.
- CROTTI, A.E.M.; VESSECHI, R.; LOPES, J.L.C.; LOPES, N.P. Espectrometria de massas com ionização por "electro *spray*": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v.29, n.2, p.287-292, 2006.
- EVANS, W.C. **Trease and Evans' pharmacognosy**. 16th ed., Edinburgh, London, New York, Philadelphia, St Louis, Sydney, Toronto, Elsevier- Saunders (W.B.) Co. Ltd., 2009. 603p.
- FABRE, N.; CLAPAROLS, C.; RICHELME, S.; ANGELIN, M.L.; FOURASTE, I.; MOULIS, C. Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography–electro *spray* ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. **Journal of Chromatography A**, v.904, n.1, p.35-46, 2000.
- GATES, P.J.; SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; CAROLLO, C.A.; CROTTI, A.E.M.; VESSECHI, R.; LOPES, N.P. **Current Methods in Medicinal Chemistry and Biological Physics** Vol.1, p.187-206, Kerala: Research Signpost, 2006.
- GIOACCHINI, A.M.; Czarnock, Z.; Arazny, Z.; Munari, P.; Traldi, I. Electro *spray* ionization, accurate mass measurements and multistage mass spectrometry experiments in the characterization of stereoisomeric isoquinoline alkaloids. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.14, n.17, p.1592-1599, 2000.
- HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. 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**. 4. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2002. p.651-666.
- HESSE, M.; MEIER, H.; ZEEH, B. Spectroscopic methods in organic chemistry. In: ENDERS, D., NOYORI, R.; TROST, B.M. (eds). **Spectroscopic Methods in Organic Chemistry**. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 1997. p.254-257.
- LIANG, M.; ZHANG, W.; HUA, J.; LIU, R.; ZHANG, C. Simultaneous analysis of alkaloids from *Zanthoxylum nitidum* by high performance liquid chromatography–diode array detector–electro *spray* tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.42, n.2, p.178-183, 2006.
- MARX, M.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. CXLIX. Question of ring expansion in the fragmentation of carbon-13 nitrogen heterocycles. **Journal of American Chemical Society**, v.90, n.3, p.678-681, 1968.
- POEAKNAPO, C.; FISINGER, U.; ZENK, M.H.; SCHMIDT, J. Evaluation of the mass spectrometric fragmentation of codeine and morphine after ¹³C-isotope biosynthetic labeling. **Phytochemistry**, v.65, p.1413-1420, 2004.
- RAITH, K.; NEUBERT, R.; POEAKNAPO, C.; BOETTCHER, C.; ZENK, M.H.; SCHMIDT, J. Electro *spray* tandem mass

spectrometric investigations of morphinans. **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v.14, n.11, p.1262–1269, 2003.

ROLLAND, A.; FLEURETIN, J.; LANHERS, M.C.; YOUNOS, C.; MISSLIN, R.; MORTIER, F.; PELT, J.M. Behavioural effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica*, v.57, n.3, p.212–216, 1991.

SILVA, D.B.; MATOS, M.F.C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H.S.; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v.30, n.8, p.1809–1812, 2007.

SMITH, R.D.; OLIVARES, J.A.; NGUYEN, N.T.; UDSETH, H.R. Capillary zone electrophoresis-mass spectrometry using an electro *spray* ionization interface. **Analytical Chemistry**, v.60, n.5, p.436–441, 1988.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J.-L.H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E.; QUÉTIN-LECLERCQ, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electro *spray* ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.18, n.5, p.523–528, 2004.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUÉTIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry**, v.5, n.2, p.173–182, 2005.

STRIFE, R.J.; ROBOSKY, L.C.; GARRETT, G.; KETCHA, M.M.; SHAFFER, J.D.; ZHANG, N. Ion trap MSⁿ genealogical mapping—approaches for structure elucidation of novel products of consecutive fragmentations of morphinans. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.14, n.4, p.250–260, 2000.

STURM, S.; STRASSER, E.-M.; STUPPNER, H. Quantification of *Fumaria officinalis* isoquinoline alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis–electro *spray* ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1112, n.1–2, p.331–338, 2006.

STURM, S.; SEGER, C.; STUPPNER, H. Analysis of Central European *Corydalis* species by nonaqueous electrophoresis–electro *spray* ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v.1159, n.1–2, 2007.

THOMAS, D.W.; GEREAU, R.E. *Ancistrocladus korupensis* (Ancistrocladaceae): a new species of liana from Cameroon. **Novon**, v.3, n.4, p.494–498, 1993.

VINCIERI, F.F.; CELLI, S.; MULINACCI, N.; SPERONI, E. An approach to the study of the biological activity of *Eschscholtzia californica* Cham. **Pharmacological Research Communications**, v.20, n. 5 (suppl), p.41–44, 1988.

WICKENS, J.R.; SLEEMAN, R.; KEELY, B.J. Atmospheric pressure ionization mass spectrometric fragmentation pathways of noscapine and papaverine revealed by multistage mass spectrometry and in-source deuterium labeling. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, n.3, p.473–480, 2006.

WILSON, S.R.; PEREZ, J.; WU, Y. Characterization of alkaloids by electro *spray* mass spectrometry. **Natural Product Research** (former Natural Product Letters), v.1, n.2, p.103–108, 1992.

WU, W.N.; MOYER, M.D. Electro *spray* tandem mass spectrometry for structural characterization of aporphine-benzylisoquinoline alkaloids. **European Journal of Mass Spectrometry**, v.10, n.5, p.683–689, 2004.

YAMASHITA, M.; FENN, J.B. Electro *spray* ion source. Another variation on the free-jet theme. **Journal of Physical Chemistry**, v.88, n.20, p.4451–4459, 1984.

ZHANG, Y.; SHI, Q.; SHI, P.; ZHANG, W.; CHENG, Y. Characterization of isoquinoline alkaloids, diterpenoids and steroids in the Chinese herb jin-guo-lan (*Tinospora sagittata* and *Tinospora capillipes*) by high-performance liquid chromatography/electro *spray* ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.20, n.15, p.2328–2342, 2006.

ZHOU, S.; HAMBURGER, M.J. Application of liquid chromatography-atmospheric pressure

ionization mass spectrometry in natural product analysis. Evaluation and optimization of electro*spray* and heated nebulizer interfaces. **Journal of Chromatography A**, v.755, n.2, p.189-204, 1996.

ZHOU, H.; JIANG, H.; YAO, T.; ZENG, S. Fragmentation study on the phenolic alkaloid neferine and its analogues with anti-HIV activities by electro*spray* ionization tandem mass spectrometry with hydrogen/deuterium exchange and its application for rapid identification of in vitro microsomal metabolites of neferine. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.21, n.13, p.2120–2128, 2007.

APLICAÇÃO DA ELETROFORESE CAPILAR NA ANÁLISE DE PRODUTOS NATURAIS

João Carlos Palazzo de Mello
Lia Akina Ito

INTRODUÇÃO

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 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 vasta 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, aplicados na análise qualitativa e quantitativa de metabólitos secundários de plantas (ISSAQ, 1997, 1999; SUNTORNSUK, 2002; UNGER, 2009).

INSTRUMENTAÇÃO

Uma das principais vantagens da EC é a utilização de uma instrumentação simples. O equipamento consiste de frascos 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 tratamento de dados (TAGLIARO *et al.*, 1998; SANTORO *et al.*, 2000; SUNTORNSUK, 2010).

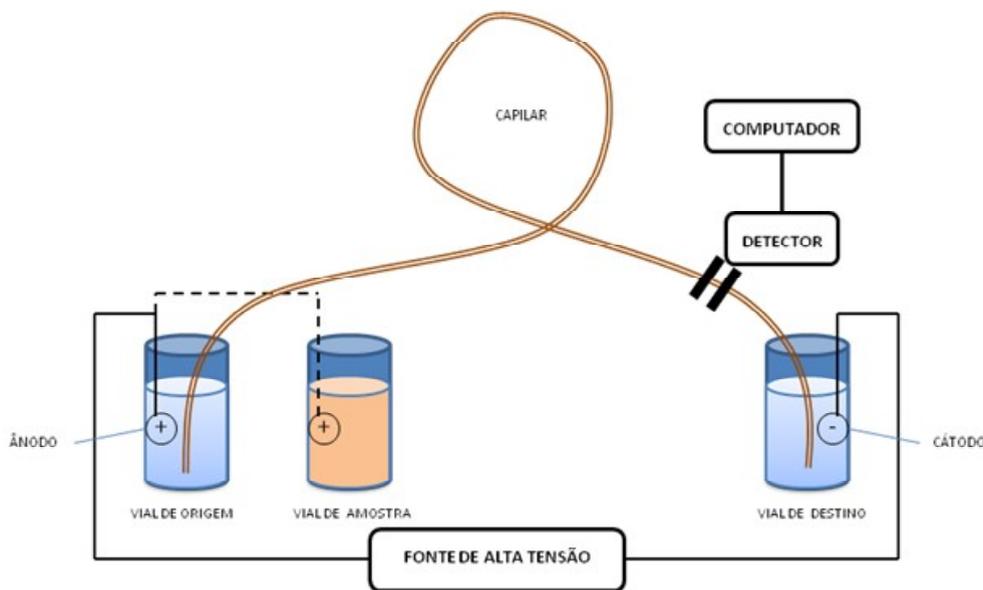


FIGURA 1 | Representação esquemática de um sistema de eletroforese capilar.

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 colocado 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 eletro-osmótico 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, passam pelo detector em tempos diferentes, aparecendo no eletroferograma com diferentes tempos de migração.

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 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 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).

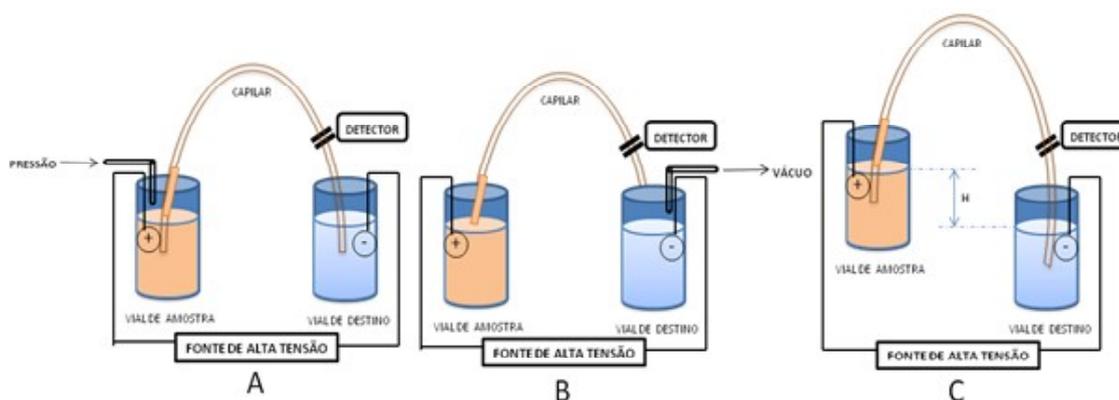


FIGURA 2 | Injeção hidrodinâmica por pressão (A); Injeção hidrodinâmica por vácuo (B) e Injeção hidrodinâmica por gravidade (C).

A injeção eletrocinética, 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 migraram 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 esse oferece maior resistência para injeções por gravidade e injeções por pressão podem empurrar o gel para fora do capilar (TAVARES, 1997).

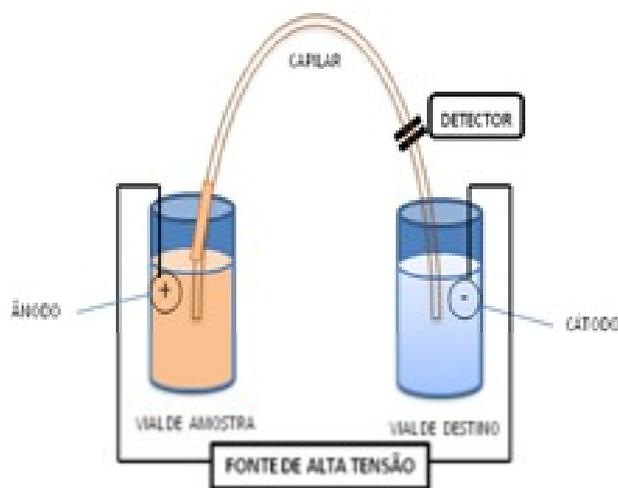


FIGURA 3 | Esquema geral de uma injeção eletrocinética.

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 desse revestimento. Retira-se por raspagem ou pela queima desse revestimento, posicionando essa janela no caminho da luz do detector (TAGLIARO *et al.*, 1998).

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/ml (ppm) a 1 mg/ml (ppb).

Detector Ultravioleta-Visível (Uv-Vis)

A detecção pela absorbância na luz ultravioleta ou visível é a mais amplamente utilizada na eletroforese capilar. A maioria das substâncias apresenta grupos 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).

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 nos diversos 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).

Detector de Fluorescência

Fluorescência é um tipo seletivo de detecção, pois somente solutos que fluorescem são detectados. Esses correspondem à aproximadamente 10% das substâncias orgânicas que têm uma eficiência quântica suficientemente alta para ser detectado pelo detector de fluorescência.

Quando uma energia em forma de luz atinge uma molécula, parte dessa energia é dissipada como calor e parte como luz. Essa dissipação de luz varia de acordo com as transições eletrônicas dentro da molécula, podendo ser fluorescente, fosforescente ou quimioluminescente, e quanto maior a dissipação de luz maior o sinal obtido no espectro.

Nesse tipo de detecção, o comprimento de onda da luz utilizado para a excitação é menor do que o comprimento de onda da luz emitido, portanto, são obtidos dois espectros de fluorescência associados a um mesmo composto, um espectro de excitação e um espectro de emissão. O espectro de excitação é um gráfico da intensidade de luz emitida *versus* o comprimento de onda da luz na excitação, e o espectro de emissão é um gráfico da intensidade de luz emitida *versus* o comprimento de onda da luz emitida.

Detector de Fluorescência Induzida por *Laser*

Na detecção por fluorescência, quanto maior a intensidade da luz emitida por uma molécula, maior a sensibilidade da detecção e, logo, maior o pico no eletroferograma. A intensidade de luz emitida depende da

eficiência quântica do soluto e do número de moléculas excitadas, enquanto que essa é proporcional a incidência da radiação.

No detector de fluorescência induzida por *laser*, ao invés da luz branca é utilizado um feixe capaz de produzir radiações de alta intensidade para excitação das moléculas, aumentando drasticamente a sensibilidade da detecção quando comparada a detecção de fluorescência utilizando luz branca (PAPPAS *et al.*, 2005)

Como são poucas as substâncias que possuem fluorescência, e as espécies que podem ser derivatizadas são limitadas, outra forma de se aplicar essa técnica é pela detecção indireta. Nesse caso, um fluoróforo é adicionado ao eletrólito, produzindo um sinal constante de intensidade de fluorescência, a partir do momento que um analito passa pela região do detector, o sinal da intensidade de fluorescência varia (WANG *et al.*, 2007).

Detecção por Espectrometria de Massas

O espectrômetro de massas apresenta uma boa sensibilidade e funciona como um detector universal, detectando qualquer composto que tenha massa molecular dentro da faixa de massas do espectrômetro (PAPPAS *et al.*, 2005).

O espectrômetro de massas é acoplado à eletroforese capilar por meio de uma interface de ionização por *electrospray*. No espectrômetro de massas, a molécula é quebrada em fragmentos carregados que são analisados e produzem um espectro de massa, apresentando a razão massa-carga (m/z) *versus* a intensidade para cada fragmento. Essa fragmentação e a abundância relativa de cada fragmento permitem determinações qualitativas (SUNTORNUSUK, 2010).

Detecção por Condutividade

A detecção por condutividade é baseada na mudança da condutividade elétrica da solução quando um soluto iônico entra em contato com essa solução. O detector de condutividade apresenta dois eletrodos no frasco de destino, além de uma fonte de energia que aplica um potencial nesses eletrodos. Depois de passar pelo capilar, os solutos passam por esses eletrodos reduzindo a resistência elétrica da solução, portanto aumentando a condutância elétrica. O detector mede essa condutância, fornecendo a condutividade. A resposta do detector estará diretamente relacionada com a mobilidade iônica dos solutos (HUANG *et al.*, 1989; ZEMANN *et al.*, 1998).

Detecção pelo Índice Amperométrico

A detecção pelo índice amperométrico mede a corrente resultante da oxidação ou da redução de solutos eletroativos na superfície de um eletrodo. A extremidade do capilar de separação é conectado ao capilar de detecção por uma junta porosa, que é colocado no frasco do tampão que contém o cátodo para eletroforese. A outra extremidade do capilar de detecção é posicionada em uma célula amperométrica com

um eletrodo de fibra de carbono, onde irá ocorrer a oxidação ou a redução, e um eletrodo de referência (WALLINGFORD & EWING, 1987).

A oxidação acontece quando um elétron é transferido da molécula do soluto para a superfície do eletrodo contido na célula amperométrica, aumentando a carga do soluto. Na redução acontece o contrário, o elétron da superfície do eletrodo passa para o molécula do soluto, reduzindo a carga do soluto. A corrente que passa pelo eletrodo da célula amperométrica é proporcional ao número de elétrons transferidos, portanto proporcional também à concentração do soluto (WALLINGFORD & EWING, 1988).

Detecção pelo Índice Radiométrico

A detecção radiométrica é utilizada quando os solutos são radioativos. Pode-se adicionar um marcador radioativo em uma substância, podendo então detectá-lo (PAPPAS *et al.*, 2005).

Na detecção radiométrica a emissão de partículas β atravessam a parede do capilar e reagem com um semiconductor, resultando em um sinal.

Detecção pelo Índice de Refração

A detecção pelo índice de refração é realizada medindo a quantidade de luz emitida que é defletida depois de passar através do soluto em relação à posição da luz passando somente pelo tampão. Utiliza-se um *laser* como fonte de luz, que quando defletido é medido por um sensor de posição da luz irradiada.

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 μ A, respectivamente.

Geralmente nos capilares de sílica, a direção do fluxo eletro-osmótico é direcionado para o cátodo, a polaridade normal é do eletrodo positivo, ânodo, para o eletrodo negativo, o cátodo. No entanto, em casos particulares, a polaridade pode ser revertida (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).

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. Porém, a eletroforese capilar não é uma boa técnica qualitativa.

Ao contrário, a eletroforese capilar é uma excelente técnica quantitativa, já que as alturas e áreas dos picos são proporcionais a sua concentração. Análises quantitativas são feitas a partir de curvas de calibração.

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 electrocinética micelar (MEKC), electrocromatografia capilar (CEC), isotacoforese capilar (CITP), eletroforese capilar em gel (CGE) e focalização isoelétrica capilar (CIEF) (SUNTORNSUK, 2002; SILVA *et al.*, 2007; SUNTORNSUK, 2010).

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).

Antes da corrida da amostra, normalmente é feito uma lavagem 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 os cátions positivamente carregados do tampão, formando uma camada interna de cátions na parede do capilar (TAGLIARO *et al.*, 1998; SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003). Como esses cátions não têm uma densidade suficiente para neutralizar todas as cargas negativas, uma segunda camada de cátions é formada. A camada interna de cátions que está fortemente ligada aos grupamentos silanoatos é chamada de camada fixa, enquanto que a camada externa de cátions, como não se encontra fortemente ligada aos grupamentos silanoatos é chamada de camada móvel. Essas duas camadas formam a camada dupla difusa de cátions (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, a fase móvel de cátions é atraída em direção ao cátodo carregado negativamente, causando o fluxo eletro-osmótico (SCHMITT-KOPPLIN & FROMMBERGER, 2003).

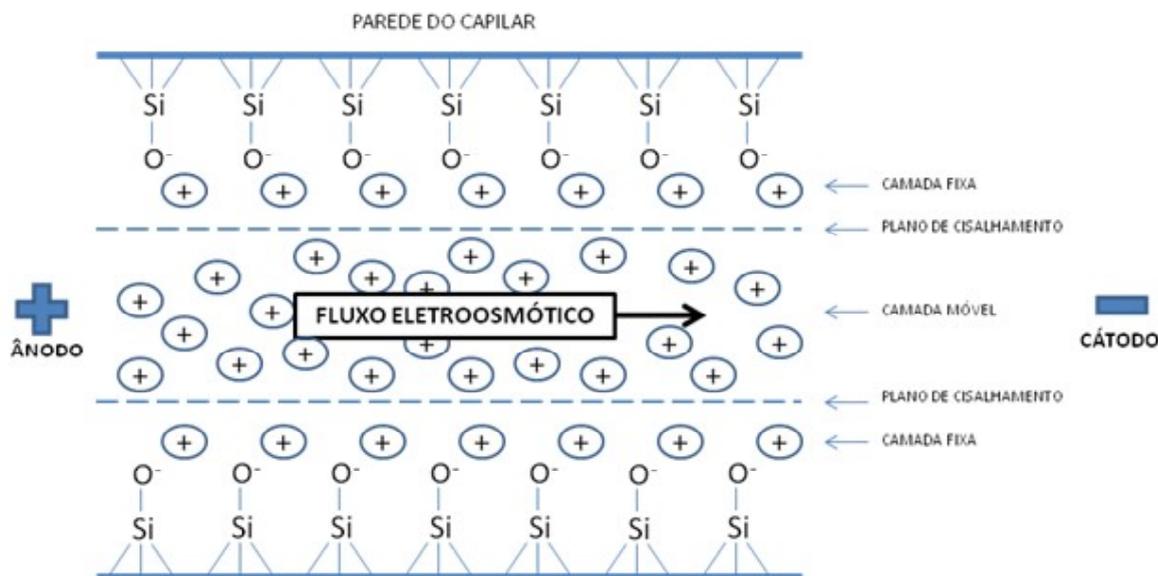


FIGURA 4 | Representação do fluxo eletroosmótico no interior do capilar.

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 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. No entanto, o fluxo eletro-osmótico é maior do que as mobilidades eletroforéticas dos solutos, carregando todos eles em direção ao detector e, posteriormente, ao cátodo. Ou seja, a velocidade de cada soluto será a interação da mobilidade eletroforética de cada soluto com o fluxo eletro-osmótico 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 todos no mesmo pico, sofrendo a ação somente do fluxo eletro-osmótico (TAGLIARO *et al.*, 1998).

CROMATOGRAFIA ELETROCINÉTICA MICELAR (MEKC)

A cromatografia eletrocínética 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; SUNTORNSUK, 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 possuem um formato esférico, com 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 (SUNTORNSUK, 2002). O surfactante mais amplamente utilizado na cromatografia eletrocinética micelar é o dodecil sulfato de sódio (SDS), com o grupamento hidrofílico SO_3^- em uma extremidade e o grupamento hidrofóbico $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}$ em outra (TAVARES, 1997; PAPPAS *et al.*, 2005; UNGER, 2009).

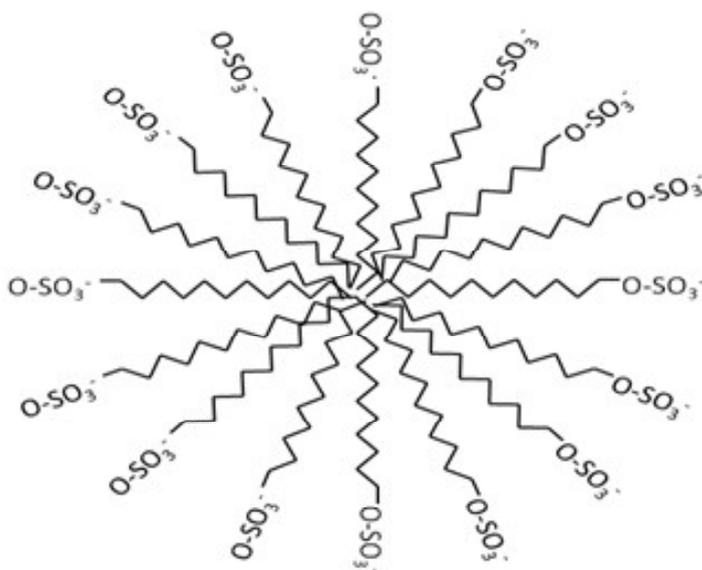


FIGURA 5 | Micela de dodecil sulfato de sódio (SDS). Com grupamentos hidrofílicos O-SO_3^- em contato com o tampão aquoso na parte exterior da micela, e grupamentos hidrofóbicos $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{11}$ no interior da micela. As micelas de SDS são formadas por 62 moléculas de SDS, porém, as micelas 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 à voltagem, será criado um fluxo eletro-osmótico 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 eletro-osmótico. Assim, moléculas hidrofílicas presentes na solução tampão serão carregadas pelo capilar, sofrendo ação do fluxo eletro-osmótico 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 retenção proporcionais ao tempo que permanecem dentro das micelas (TAGLIARO *et al.*, 1998).

ELETROCROMATOLOGRAFIA CAPILAR (CEC)

A eletrocromatografia capilar é uma técnica de separação que une características da eletroforese capilar e da cromatografia líquida de alta eficiência (STOGGL *et al.*, 2006; UNGER, 2009; VALLS *et al.*, 2009; SUNTORNSUK, 2010; YANG *et al.*, 2010). Nessa técnica encontra-se dentro do capilar uma fase estacionária composta por micropartículas de sílica fundida contendo um ligante hidrofóbico que retém os solutos, e uma fase móvel, geralmente uma mistura de tampões aquosos, que se movimentam através do capilar por um fluxo eletro-osmótico (ALTRIA, 1999; SCHERZ *et al.*, 2007).

A separação é realizada pela diferença de partição entre as duas fases, pela diferença na eletromigração, ou a combinação das duas (ALTRIA, 1999; SCHERZ *et al.*, 2007; VALLS *et al.*, 2009; YANG *et al.*, 2010).

ISOTACOFORESE CAPILAR (CITP)

Na isotacoforese capilar, coloca-se a amostra entre dois tampões no capilar, um eletrólito carreador líder e um eletrólito carreador terminal, aplicando-se um campo elétrico. A separação será realizada de acordo com as diferenças nas mobilidades eletroforéticas dos íons da amostra em relação aos íons dos eletrólitos líder e terminal. Porém, na isotacoforese capilar não é possível separar ânions e cátions na mesma corrida, sendo aplicado somente às misturas de um ou de outro (SUNTORNSUK, 2010).

Na separação de uma mistura de cátions, deve-se selecionar um eletrólito carreador líder que possua cátions com a mobilidade maior do que a dos cátions presentes na amostra, enquanto que o eletrólito carreador terminal deve apresentar cátions com a mobilidade menor do que os cátions da amostra. A partir do momento que se aplica o campo elétrico, todos os cátions, tanto da amostra quanto dos eletrólitos, migrarão em direção ao cátodo, no entanto, como as mobilidades dos cátions são diferentes, os cátions da amostra com maior mobilidade ficarão próximos do eletrólito líder e os de menor mobilidade próximos ao eletrólito terminal, formando zonas. Depois de formadas as zonas, os eletrólitos e os solutos da amostra migram através do capilar e detector. Todos os cátions dos eletrólitos e da amostra migram na mesma velocidade do eletrólito carreador líder, por isso o nome *isotacho*- que significa “velocidade constante” (TAVARES, 1997).



FIGURA 6 | Representação da isotacoforese de cátions.

ELETROFORESE CAPILAR EM GEL (CGE)

A eletroforese em placa de gel é a técnica de separação mais tradicional na biomedicina e bioquímica para separação e caracterização de proteínas, sequenciamento de DNA e mapeamento de fragmentos de DNA (TAGLIARO *et al.*, 1998).

A eletroforese capilar em gel (CGE) combina os princípios da eletroforese em gel com a instrumentação e os capilares de pequeno diâmetro da eletroforese capilar. Como os capilares dissipam o calor melhor do que as placas, pode-se utilizar maiores campos elétricos, obtendo separações mais rápidas.

Na eletroforese capilar em gel, o capilar é preenchido com um gel, normalmente um polímero poliacrilamida/bisacrilamida reticulado ou um polímero poliacrilamida linear não reticulado.

Na eletroforese capilar de zona os solutos são separados de acordo com diferenças nas razões massa-carga, entretanto, quando essas razões são muito próximas não é possível realizar essa separação. A eletroforese capilar em gel é aplicada nas análises de moléculas carregadas que variam no tamanho, mas não na razão massa-carga, já que os solutos são separados por um mecanismo de peneiramento molecular com base em seus tamanhos, moléculas pequenas são capazes de atravessar o gel e eluir primeiro, enquanto que moléculas grandes são retardadas pelo gel e eluem depois (TAVARES, 1997).



FIGURA 7 | Representação da eletroforese capilar em gel no interior do capilar.

Na eletroforese capilar em gel, é necessário que o gel seja covalentemente ligado à parede do capilar para que o fluxo eletro-osmótico não empurre o gel para fora do mesmo. Outro cuidado que se deve ter é com relação à formação de bolhas de gás dentro do capilar que geram correntes instáveis (TAGLIARO *et al.*, 1998).

FOCALIZAÇÃO ISOELÉTRICA CAPILAR (CIEF)

Na focalização isoelétrica, os solutos são separados de acordo com seus pontos isoelétricos (pI). Essa técnica é utilizada principalmente para separação de espécies anfóteras, como proteínas e polipeptídeos, mas pode ser utilizada também para separar qualquer mistura de substâncias com diferentes pontos isoelétricos, contanto que o gradiente de pH formado abranja os pontos isoelétricos da amostra (WU *et al.*, 1998; LÓPEZ-LORENTE *et al.*, 2011).

Substâncias anfóteras são aquelas que podem ser tanto ânions quanto cátions, dependendo do pH da solução, em que o pH dessa substância é neutra, assim é denominado de ponto isoelétrico (pI). Uma solução de anfólitos contém uma mistura de substâncias com diferentes pI, normalmente formados por grupos de aminoácidos e ácidos carboxílicos, que em presença de um campo elétrico formarão um gradiente de pH no capilar.

A focalização isoelétrica capilar é realizada preenchendo o capilar com uma mistura de anfólitos e amostra. O frasco que contém o cátodo é preenchido com um católito, normalmente uma solução básica de hidróxido de sódio 0,02 M, com o pH menor do que o pI do anfólito mais ácido, e o frasco que contém o ânodo é preenchido com um anólito, uma solução ácida de ácido fosfórico 0,02 M, devendo essa solução ter um pH maior do que o pI do anfólito mais básico. Quando uma pequena voltagem é aplicada, solutos da amostra e os anfólitos migram através do capilar até alcançar um ponto onde eles são neutros, ou seja, onde o pH da solução seja igual ao ponto isoelétrico da substância. Quando a corrente diminui para um valor de 10 a 25% do seu valor inicial é indicativo de que todas as substâncias já se encontram em seu ponto isoelétrico. As substâncias ficam em estado constante, pois não sofrem ação do fluxo eletro-osmótico, já que o capilar é previamente tratado para não produzir o fluxo eletro-osmótico e nem para que ocorra a absorção da amostra na parede do capilar (TAVARES, 1997).

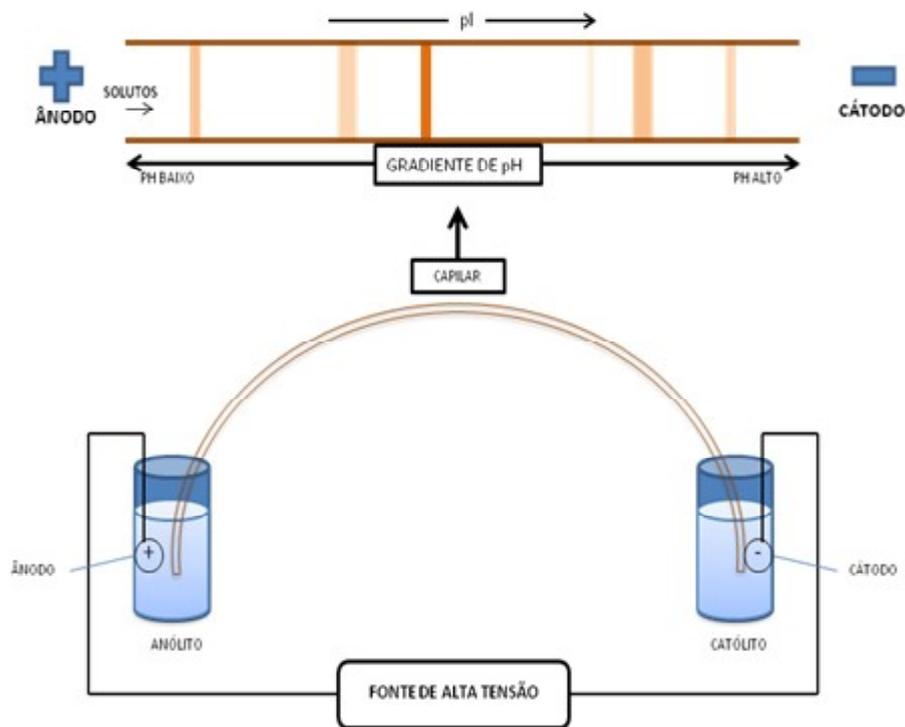


FIGURA 8 | Representação da focalização isoeletrica capilar. pI =ponto isoeletrico.

Após a focalização da amostra, os anfólitos e as zonas de solutos da amostra sofrem uma mobilização, ou seja, são empurrados através do capilar para serem então detectados, obtendo-se um eletroferograma. Existem dois tipos de mobilização, a mobilização hidrodinâmica por aplicação de pressão, ou a mobilização eletroforética, que ocorre pela aplicação de voltagem, sendo necessária a adição de um sal em um dos reservatórios do ânólito ou do católito. Geralmente, é utilizada a mobilização eletroforética, devido à menor perda de resolução das bandas pré-focalizadas (RODRIGUEZ-DIAZ *et al.*, 1997; WU *et al.*, 1998).

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 seletores quirais neutros é realizada por eletroforese capilar, de zona (CZE), e a separação com seletores quirais carregados é 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 para os enantiômeros em meio isotrópico. Logo, enantio-separação se torna impraticável na

eletroforese capilar de zona original. As enantioseparações descritas para a eletroforese capilar de zona envolvem a adição de um seletor quirál na solução tampão. Logo, a enantioseparação é baseada na interação estereosseletiva dos enantiômeros com o seletor quirál 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 quirál. As principais vantagens dessa técnica são a alta eficiência, o rápido equilíbrio do sistema, e a possibilidade de uso de seletores quiráls caros, já que são necessárias poucas quantidades. Encontram-se disponíveis dois métodos de eletroforese capilar para separação quirál: direto e indireto. O método indireto é baseado na formação de diastereoisômeros estáveis a partir de derivatização quirál 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 quirál direta é realizada adicionando seletores quiráls diretamente na solução tampão. Seletores quiráls 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 quirál, 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).

APLICAÇÕES COM PRODUTOS NATURAIS

FLAVONOIDES

Lee & 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-3¹-monogalato, teaflavina-3,3¹-digalato. Essas substâncias foram separadas por CLAE em 27 minutos, com coluna C18 e utilizando duas fases móveis com diferentes composições de acetonitrila e ácido trifluoroacético. Já a separação por EC foi obtida em menos de 10 minutos, utilizando um eletrólito consistindo de 200 mM acetonitrila-ácido bórico (pH 7,2), 100 mM dihidrogenofosfato de potássio (pH 4,5), contendo 20 mM de β -CD (72.5:27.5, v/v); aplicando uma voltagem de 25 kV a 30 °C. A análise por EC foi três vezes mais rápida, no entanto, foi cinco vezes menos sensível do que a CLAE. Os dois métodos foram utilizados para quantificação de polifenóis em diferentes chás, incluindo o chá verde japonês, os chás *Long-jin*, *jasmin*, *chrysanthemum*, *pu-erh*, *iron buddha*, *oolonge*

o *ceylong*. 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 minimizava o desperdício de solvente utilizado na CLAE, sendo considerada a EC uma ferramenta prática e rápida na análise rotineira de chás.

Gotti *et al.* (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. Podemos 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 eletrocinética micelar (MEKC) foi otimizada para as substâncias mais encontradas na composição dos chás (figura 9), 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]. Obtiveram-se limites de detecção de 0,05 µg/ml para epigalocatequina, 0,4 µg/ml para *ent*-galocatequina, 0,7 µg/ml para galocatequina, e 0,1 µg/ml para as demais substâncias. A porcentagem dos desvios padrões relativos dos tempos de retenção para intra-dia e inter-dia foram <0,7 e <1,6, respectivamente. Depois de validado o método, foram identificadas e quantificadas as catequinas de diversos chás provenientes de diferentes regiões da China, Japão e Ceilão; o resultado foi consistente com a informação do fornecedor com relação a qualquer tipo de tratamento térmico resultando em epimerização. O método aplicado possibilitou a diferenciação rápida de chás com base no conteúdo de catequinas associado com o processamento e armazenamento desses produtos.

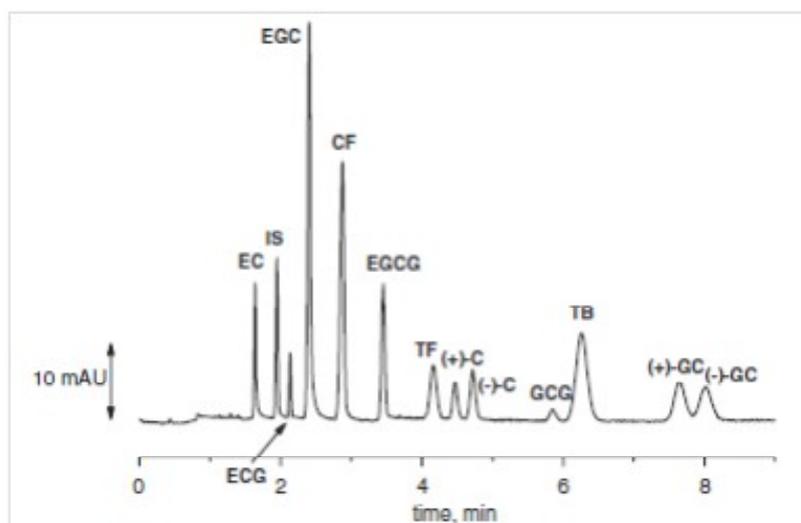


FIGURA 9 | Eletoferograma CD-MEKC de mistura de padrões de catequinas e metilxantinas. Condições de separação: 25 mM borato-fosfato (pH 2,5), com SDS 90 mM e hidroxipropil- β -CD 25 mM. Capilar de sílica fundida (50 µm id, 30 cm comprimento total, 8,5 cm comprimento efetivo); voltagem 15 kV; temperatura 25 °C; injeção hidrodinâmica a 25 mbar por 2 s; detecção à 200nm.

Na medicina chinesa, a raiz da *Scutellaria baicalensis* Georgi é muito utilizada como antipirético, anti-inflamatório, antitumor, antibacteriano e antioxidante. Essas atividades biológicas são atribuídas aos seus principais constituintes ativos, a baicalina e a baicaleína, devendo o medicamento apresentar pelo menos 8% de baicalina. No entanto, as raízes da *S. baicalensis* são frequentemente confundidas com as raízes da *Astragalus membranaceus* Moench, devido ao seu formato e coloração. As raízes da *A. membranaceus* são utilizadas na medicina chinesa para tratamento de diabetes, além de revitalizante e cicatrizante, porém o uso errôneo dessa planta pode acarretar em efeitos colaterais. Como a raiz da *S. baicalensis* possui a baicalina e baicaleína que não estão presentes na raiz da *A. membranaceus*, Chen *et al.* (2000) diferenciaram as duas espécies com relação à identificação dessas duas substâncias por EC, aplicando detecção eletroquímica. Os analitos foram separados em menos de 8 minutos, utilizando como eletrólito uma solução tampão de 100 mM borato com pH 9,0, com uma voltagem de 12 kV. O sistema apresentou uma boa estabilidade e reprodutibilidade com um desvio padrão <5% com relação ao tempo de migração e a corrente do pico (n=7), sendo eficiente na diferenciação das duas espécies.

ALCALOIDES

Os alcaloides pirrolizidínicos são encontrados em uma variedade de plantas, além de serem identificados como carcinogênicos. Yu *et al.* (2005) demonstraram a separação de quatro alcaloides pirrolizidínicos tóxicos, senquirquina, senecionina, retrorsina e senecifilina, em dois fitomedicamentos tradicionais chineses (*Qian liguang* e *Kuan donghua*). As condições de separação otimizadas consistiam de 20 mM borato, 30 mM SDS, 20% metanol em pH 9,1. Os alcaloides foram separados em 17 minutos, apresentando uma boa linearidade na faixa de 8,3-166,7 µg/ml com coeficientes de correlação (R^2) entre 0,9940 e 0,9988. Os limites de detecção foram de 2,7 µg/ml para senquirquina, 1,9 µg/ml para senecionina, 1,20 µg/ml para retrorsina e 1,80 µg/ml para senecifilina. A determinação desses alcaloides pirrolizidínicos extraídos de *Qian liguang* e *Kuan donghua* foi realizada, porém nenhum dos quatro alcaloides foram encontrados em *Qian liguang*, e somente a senquirquina foi detectada em *Kuan donghua* com uma quantidade de 79,1 µg/g de planta.

Yuan *et al.* (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. Na busca por tempos de análise mais rápidos, foi utilizado um capilar curto de 18 cm e uma alta voltagem de separação (20 kV), ainda assim garantindo uma boa eficiência de separação. Os alcaloides foram separados em 4,5 minutos, com faixas de linearidade para atropina, anisodamina, e escopolamina de 0,5-50, 5-2000, e 50-2000 µM, respectivamente. 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, e, de acordo com a equação linear, foi encontrada a presença de escopolamina, atropina e anisodamina na *Flos daturae* nas quantidades de 1,08, 0,69 e 0,20 mg/g, respectivamente.

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 10). Os alcaloides foram separados dentro de 25 minutos, 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. Analisando cinco amostras de resina de ópio, as porcentagens na composição das amostras variavam na faixa de 14,45-15,95% na morfina, 2,0-3,45% na codeína, 1,32-2,73% na tebaína, 0,92-2,37% na papaverina e de 3,85-5,77% na narcotina.

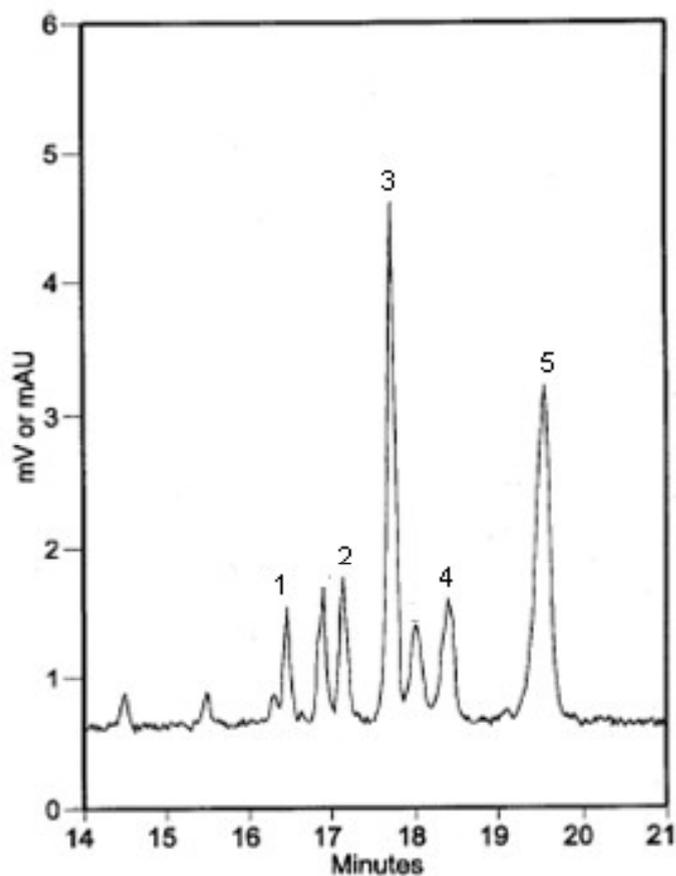


FIGURA 10 | Perfil de separação por CZE de amostra de resina de ópio nas condições otimizadas. Condições – eletrólito: metanol – acetato de sódio (pH 3,1) em água (7:3; v/v), 15 kV, detecção à 224 nm. Picos: 1-tebaína, 2-codeína, 3-morfina, 4-papaverina, 5-narcotina.

Na produção de cigarros, um parâmetro na qualidade é o nível de alcaloides totais encontrados, dentre eles a nicotina, nornicotina, anatabina e anabasina. Kodama *et al.* (2009) apresentaram a separação simultânea dos enântiômeros da nicotina, cotinina, nornicotina, anatabina e anabasina, empregando a CZE com β -CDs sulfatadas como seletores quirais. A metodologia utilizava um capilar com grupamentos aminos, fazendo com que o fluxo eletro-osmótico migrasse em direção ao polo positivo. Porém, com a adição de β -CDs sulfatadas ocorria a adsorção iônica dessas com os grupamentos amino da parede do capilar, invertendo o fluxo eletro-osmótico em direção ao polo negativo. Além disso, ocorria a formação de complexos aniônicos estáveis entre cátions e β -CDs sulfatadas, fazendo com que analitos catiônicos migrassem como ânions. Esse sistema foi aplicado a cinco amostras de cigarro (figura 11), sendo que apenas a cotinina não foi detectada em nenhuma das amostras. No caso da nicotina, somente a (-)-nicotina foi detectada, no entanto a nornicotina, anatabina e anabasina tiveram seus isômeros detectados, sendo a razão do (-)-isômero para o total de isômeros nas faixas de 58-70, 81-85 e 59-65%, respectivamente. O sistema também foi testado para amostra de cigarro após utilizado, sendo detectado somente os isômeros (-) e (+) da nicotina na razão de 96:4, mostrando que as altas temperaturas da queima do cigarro levam a racemização produzindo a (+)-nicotina.

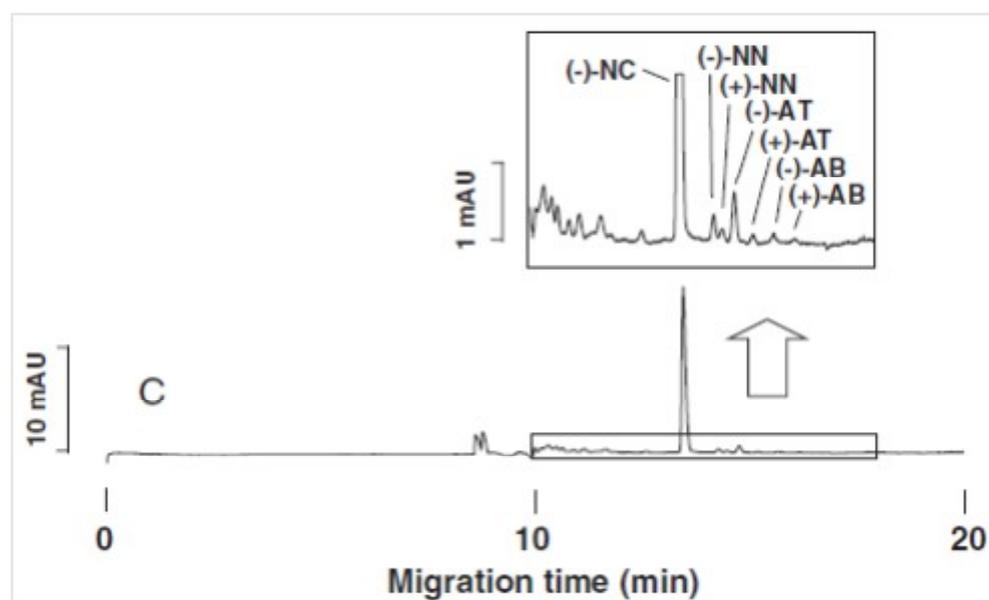


FIGURA 11 | Eletroferograma de amostra de cigarro. Condições: eletrólito 30 mM tampão acetato (pH 5,0) contendo 8% β -CDs sulfatadas, voltagem de +15 kV a 30 °C, detecção direta à 260 nm. (-)-NC: (-)-nicotina; (-)-NN: (-)-nornicotina; (+)-NN: (+)-nornicotina; (-)-AT: (-)-anatabina; (+)-AT: (+)-anatabina; (-)-AB: (-)-anabasina; (+)-AB: (+)-anabasina.

TERPENOIDES

A separação quiral de monoterpenos, incluindo α -pineno, β -pineno, canfeno e limoneno, foi apresentado por Gahm *et al.* (1997) utilizando β -CDs sulfatadas e α -CD como seletores 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 mM de β -CDs sulfatadas, obtiveram-se diferenças na mobilidade dos enantiômeros dos terpenoides resultando na sua separação. As condições otimizadas foram eletrólito 10 mM fosfato (pH 3,3) contendo 6,5 mM β -CDs sulfatadas e voltagem aplicada de 20 kV, sendo a única diferença entre as corridas a concentração de α -CD. As separações enantioméricas foram obtidas para α -pineno ($R_s=25$) e β -pineno ($R_s=12$), usando uma concentração de 7,5 mM de α -CD; para canfeno ($R_s=12$), utilizando 10 mM de α -CD; e para o limoneno ($R_s=4$), com uma concentração de 15,1 mM de α -CD. Dos quatro monoterpenos estudados, concluiu-se que o α -pineno é o terpenoide que se liga mais fortemente com os seletores 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 *et al.* (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 12). 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. As resoluções dos picos para água-óleo ficou entre 0,70 e 8,73, sendo muito menores do que as dos picos para óleo-água que ficaram na faixa de 1,50 e 37,21. Além disso, no método óleo-água se obteve uma separação mais rápida de todos os analitos em 35 minutos comparado aos 39 minutos do método água-óleo. Com base na comparação definiu-se o método óleo-água como sendo o melhor, sendo esse 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). Quando aplicada a técnica para as amostras de RRSM, dos cinco diterpenoides validados, o único que não foi detectado em nenhuma das amostras foi o miltirona enquanto que os demais apresentaram quantidades de 0,10-1,01 mg/g para diidrotanshinona I, 0,39-1,70 mg/g para criptotanshinona, 0,33-1,14 mg/g para metileno tanshiquinona, 1,75-3,30 mg/g para tanshinona IIA.

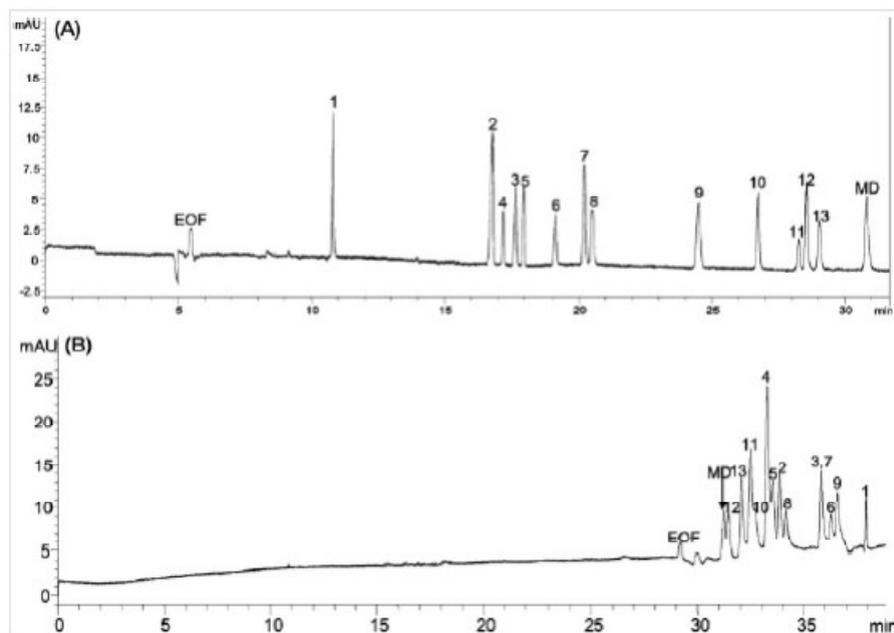


FIGURA 12 | Eletroferogramas de oito ácidos fenólicos e cinco diterpenoides determinados por cromatografia eletrocinética com microemulsão pelos métodos: (A) óleo-água e (B) água-óleo. Condições de separação: (A) 0,6% (p/v) ciclohexano, 3,0% (p/v) SDS, 6,0% (p/v) 1-butanol, 3,0% (p/v) acetonitrila e 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 eletro-osmótico, 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.

Cheung *et al.* (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 minutos (figura 13). Os coeficientes de correlação das curvas de calibração dos analitos foram todos maiores que 0,998, observando limites de detecção e quantificação para os três triterpenos em 2,65 e 8,85 $\mu\text{g/ml}$, respectivamente. As recuperações foram de 96,8 a 103,6%. 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.

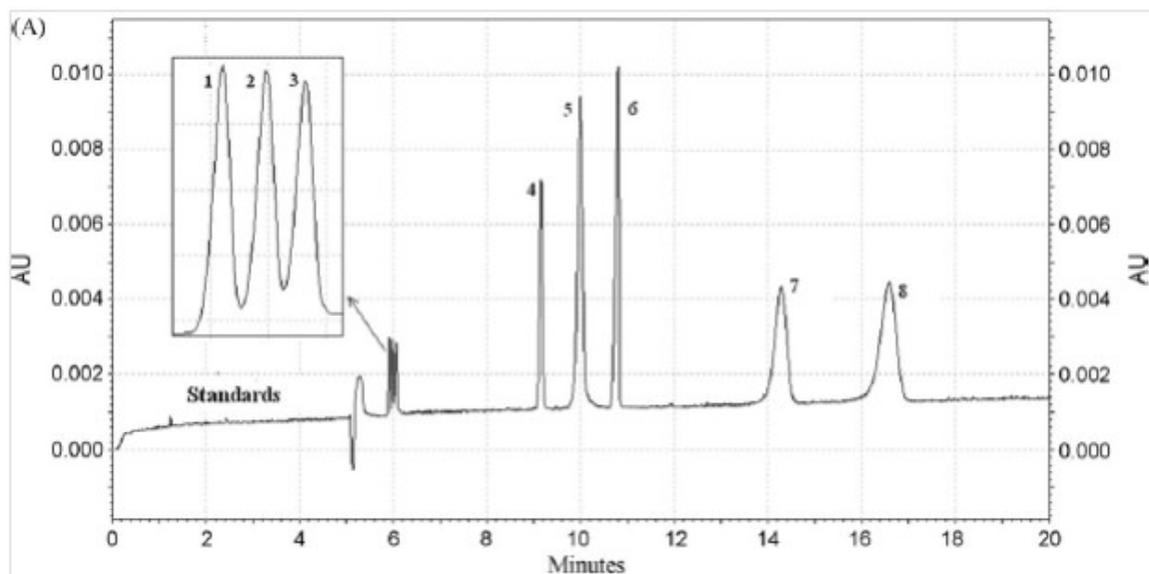


FIGURA 13 | Eletroferograma dos padrões. Condições: 40 mM tetraborato de sódio (pH 9,4), 2 mM β -CD, 4% (v/v) MeOH, 25 kV a 25 °C, 210 nm. Picos: 1 - ácido oleanólico, 2 - ácido ursólico, 3 - ácido betunílico, 4 - rutina, 5 - quercetina, 6 - ácido *p*-cumárico, 7 - ácido rosmarínico, 8 - ácido cafeico, IS - padrão interno.

ÁCIDOS FENÓLICOS

Um método, utilizando a isotacoforese e a eletroforese capilar de zona acoplados, foi desenvolvido por Safrá *et al.* (2007) para separação e determinação de cinco ácidos fenólicos (rosmarínico, *p*-cumárico, ferúlico, cafeico e clorogênico) e do flavonoide quercetrina em extrato metanólico de *Melissa herba*. Essa técnica de acoplamento de duas técnicas de eletroforese capilar é vantajosa, pois pode melhorar a eficiência de separação e reduzir os limites de detecção devido ao efeito concentrador de solutos, proporcionada pela técnica de isotacoforese, podendo-se injetar grandes quantidades de amostras diluídas. Posteriormente, as amostras concentradas são direcionadas ao capilar da eletroforese capilar de zona, onde os analitos serão melhor separados. As condições otimizadas para a isotacoforese foram eletrólito líder com 10 mM HCl, 0,2% hidroxietilcelulose (pH 7,2) e eletrólito terminal constituído por 50 mM H_3BO_3 (pH 8,2), ambos eletrólitos com 20% de metanol. Já as condições para a eletroforese capilar de zona foram eletrólito 25 mM ácido 3-(*N*-morfolino)-2-hidroxiopropanosulfônico (MOPSO), 50 mM Tris, 40 mM H_3BO_3 , 0,2% hidroxietilcelulose (pH 8,1). Os analitos foram separados dentro de 34 minutos, apresentando limites de detecção entre 0,018 e 0,035 μ g/ml. Essa metodologia foi utilizada na análise dos constituintes do extrato de *Melissa herba* detectando, quantidades 43,54 mg/g de ácido rosmarínico, 3,70 mg/g de ácido ferúlico, 1,65 mg/g de ácido cafeico, 1,25 mg/g de quercitrina, 1,0 mg/g de ácido *p*-cumárico, 0,30 mg/g de ácido clorogênico.

Andrade *et al.* (2001) compararam a CZE com a CLAE com relação à análise de substâncias fenólicas em vinhos. A análise por EC foi realizada utilizando um eletrólito constituído de 100 mM borato de sódio (pH 9,5), com uma voltagem aplicada de 20 kV e detecção à 280 nm. Enquanto que para análise por CLAE utilizou-se uma coluna de fase reversa ODS-Hypersyl (20 x 2,1 mm, tamanho da partícula 5 µm), fase móvel gradiente composta por água acidificada (5% ácido fórmico) e metanol, com fluxo de 0,3 mL/min e detecção à 280 nm. Foram testadas 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 siríngico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, ácido cafeico, ácido gálico, ácido 3,4-diidroxibenzoico, ácido tartárico *cis*-cumaroil, ácido tartárico *trans*-cumaroil, ácido tartárico cafeoil. Pela comparação das metodologias, a eletroforese capilar provou ser mais conveniente para análise rotineira desses vinhos, devido a melhor separação das diferentes substâncias, melhores formatos dos picos e menor tempo de análise que a CLAE (figuras 14 e 15).

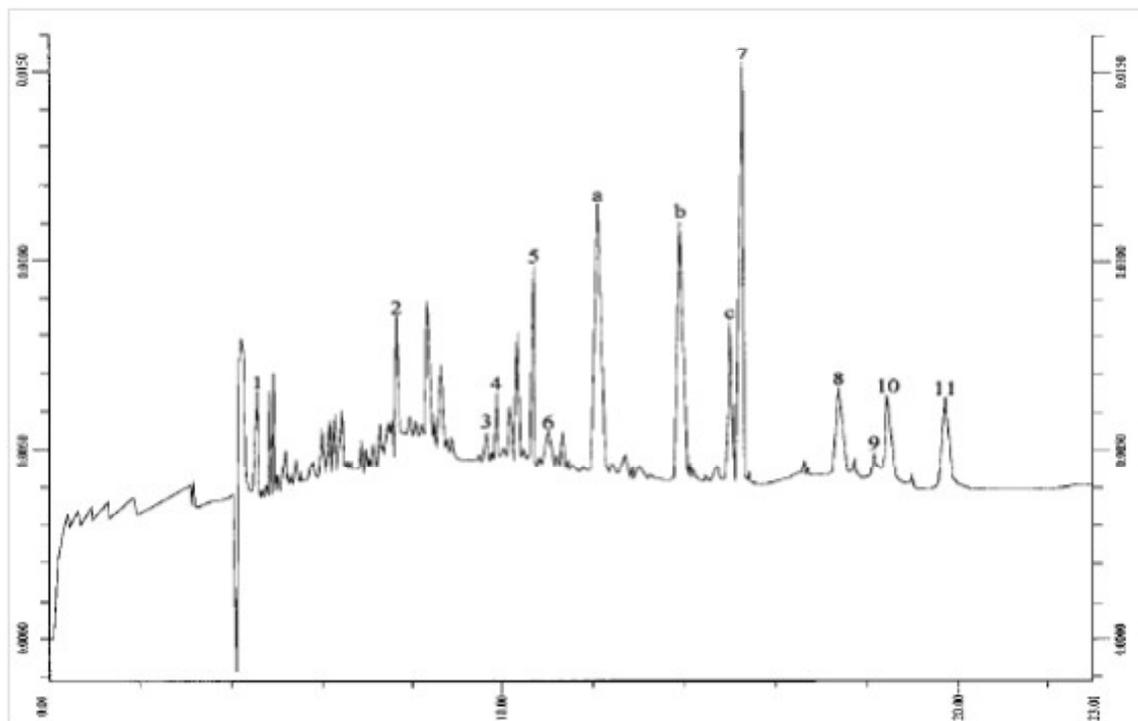


FIGURA 14 | Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por eletroforese capilar. Picos: 1 – tirosol, 2 – epicatequina, 3 – ácido siríngico, 4 – ácido ferúlico, 5 – ácido *p*-cumárico, 6 – ácido cafeico, 7 – ácido gálico, 8 – ácido 3,4-diidroxibenzoico, 9 – ácido tartárico *cis*-cumariol, 10 – ácido tartárico *trans*-cumariol, 11 – ácido tartárico cafeoil; a, b, c – ésteres hidroxicinâmicos.

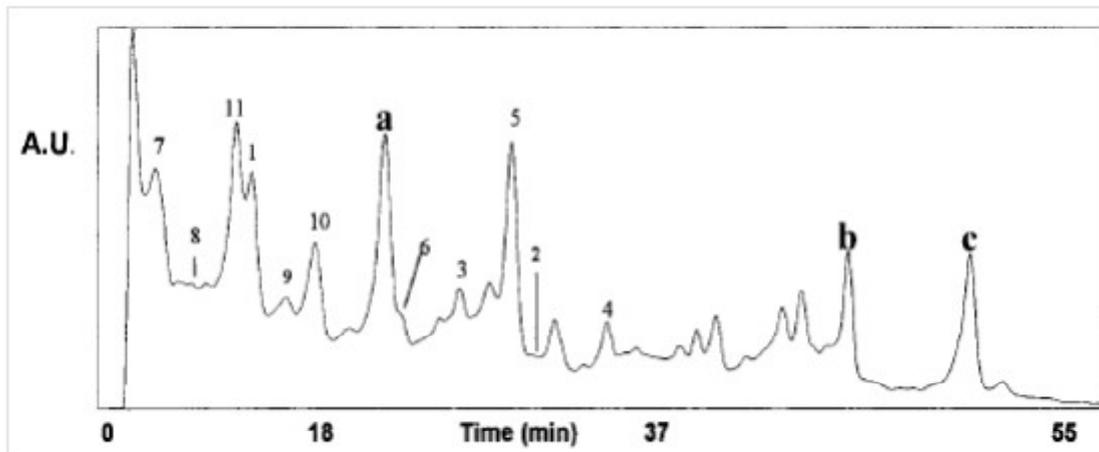


FIGURA 15 | Perfil das substâncias fenólicas de amostra de vinho Alvarinho por CLAE. Picos como figura anterior.

QUINONAS

Glatz *et al.* (2000) apresentaram uma metodologia por eletroforese capilar de zona para separação da quinona pirroloquinolínica (PQQ - ácido 4,5-diidro-4,5-dioxi-1H-pirrolo[2,3-f]quinolina-2,7,9-tricarboxílico). As condições de separações foram otimizadas com relação a diferentes parâmetros incluindo pH e força iônica do eletrólito de corrida, voltagem de separação e temperatura do capilar, obtendo-se a melhor separação, utilizando um eletrólito constituído de 50 mM β -alanina-HCl (pH 3,0), com uma voltagem aplicada de 25 kV a 25 °C. Por essa metodologia obtiveram-se baixos limites de detecção na faixa de 0,1-0,2 μ M, devido as altas eficiências de separação ($N=164000$). Foram analisadas amostras contendo meio de cultura de bactérias *Paracoccus denitrificans* em metanol em busca de PQQ, além disso, foram estudadas as reações da PQQ com os aminoácidos glicina e valina. A reação da PQQ com a glicina resultou em oxazole 1, já na reação da PQQ com valina foi gerado oxazole 2 e um pouco de PQQ que não reagiu.

Koyama *et al.* (2007) analisaram 11 antraquinonas do ruibarbo, entre elas emodina, crisofanol, reína, aloe-emodina, emodina-1- β -D-glicosídeo, emodina-8- β -D-glicosídeo, crisofanol-1- β -D-glicosídeo, crisofanol-8- β -D-glicosídeo, reína-8- β -D-glicosídeo, sensosídeo A e sensosídeo B, utilizando e comparando duas metodologias, a CLAE e a eletroforese capilar (EC). Os limites de detecção para as antraquinonas do ruibarbo foram entre 0,02-0,2 μ g/ml e 0,1-0,8 μ g/ml para CLAE e EC, respectivamente. Pelos dois métodos foi possível separar oito das onze antraquinonas dentro de 25 minutos, delas a emodina, crisofanol, reína, aloe-emodina, emodina-1- β -D-glicosídeo, emodina-8- β -D-glicosídeo, crisofanol-1- β -D-glicosídeo e crisofanol-8- β -D-glicosídeo, sendo que reína-8- β -D-glicosídeo, sensosídeo A e sensosídeo B foram bem separados somente pela eletroforese capilar. Os desvios padrões relativos obtidos para reprodutibilidade com relação ao tempo de migração ficaram nas faixas de 0,05-5,44 e 0,90-1,99% para CLAE e EC, respectivamente. Posterior à otimização de ambas metodologias, essas foram aplicadas ao extrato de ruibarbo, conseguindo-se identificar as antraquinonas.

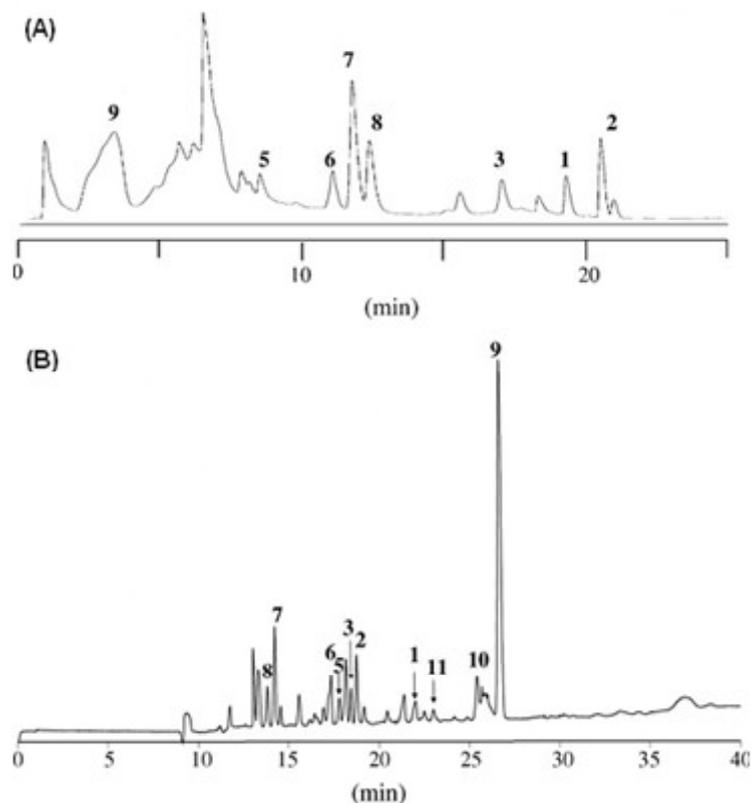


FIGURA 16 | (A) Cromatograma de antraquinonas por CLAE do extrato de ruibarbo, eluente: gradiente de acetonitrila/água, fluxo de 1,0 mL/min, temperatura da coluna de 60 °C. (B) Eletroferograma de antraquinonas por CE do extrato de ruibarbo, eletrólito: 30 mM borato (pH 10,0) contendo 25% (v/v) de acetonitrila com 2 mM de 2,6-di-*O*-metil- β -CD e 5 mM de α -CD, com voltagem aplicada de 20 kV a 20 °C. Picos: 1 - emodina, 2 - crisofanol, 3 - aloe-emodina, 4 - reína, 5 - emodina-1- β -D-glicosídeo, 6 - emodina-8- β -D-glicosídeo, 7 - crisofanol-1- β -D-glicosídeo, 8 - crisofanol-8- β -D-glicosídeo, 9 - reína-8- β -D-glicosídeo, 10 - sensosídeo A, 11 - sensosídeo B.

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 sofricosídeo, em menos de cinco minutos com um eletrólito de 5,0 mM borato (pH 9,4), 20% (v/v) metanol, 10^{-7} fluoresceína de sódio, essa atuando como fluoróforo de fundo para detecção indireta. 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 sofricosídeo apresentando 87,2 mg/g, já no extrato de *Herb sarcandrae* foi possível quantificar 3 cumarinas, sendo elas a esculina, isofraxidina e esculetina, nas quantidades de 1,06, 1,43 e 1,66 mg/g, respectivamente.

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 minutos, 11 substâncias fenólicas foram bem separadas (figura 18), 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.

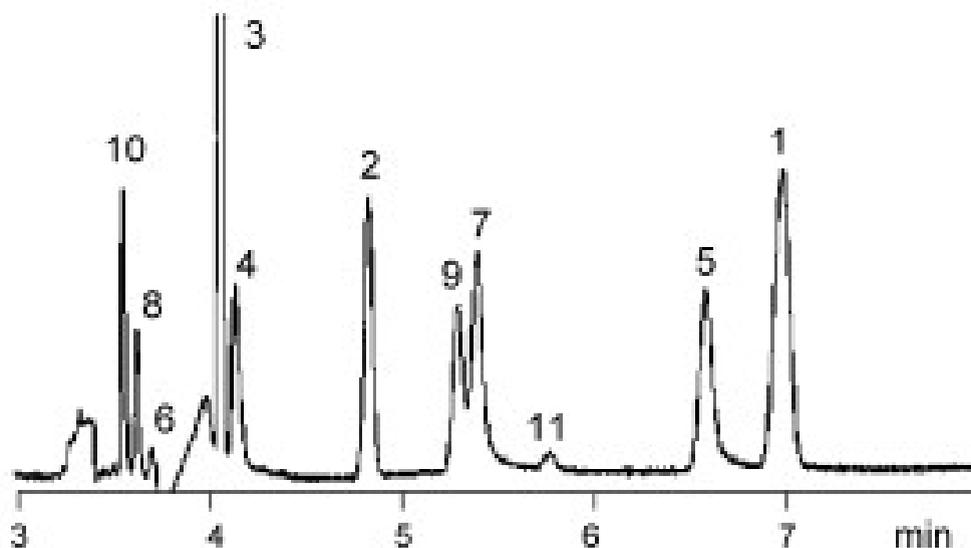


FIGURA 17 | Cromatograma capilar de substâncias fenólicas padrões da camomila por eletrocromatografia capilar SCX-C18. Condições: coluna SCX/C18, 50 μ m i.d., partícula de 3 μ m; injeção de 12 bar/0,4 min; voltagem aplicada de 25 kV, temperatura de 25 $^{\circ}$ C, detecção à 337 nm. Picos: 1 - herniarina, 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.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLEN, D. J.; GRAY, J. C.; PAIVA, N. L.; SMITH, J. T. An enantiomeric assay for the flavonoids medicarpin and vestitone using capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 21, p. 2051-2057, 2000.
- ALTRIA, K. D. Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 856, p. 443-463, 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, p. 1568-1472, 2001.
- ATURKI, Z.; FANALI, S.; D'ORAZIO, G.; ROCCO, A.; ROSATI, C. Analysis of phenolic compounds in extra virgin olive oil by using reversed-phase capillary electrochromatography. **Electrophoresis**, v. 29, p. 1643-1650, 2008.
- AUCAMP, J. P.; HARA, Y.; APOSTOLIDES, Z. Simultaneous analysis of tea catechins, caffeine, gallic acid, theanine and ascorbic acid by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 235-242, 2000.
- BACHMANN, S.; HUCK, C. W.; BAKRY, R.; BONN, G. K. Analysis of flavonoids by CE using capacitively coupled contactless conductivity detection. **Electrophoresis**, v. 28, p. 799-805, 2007.
- BITAR, Y.; HOLZGRABE, U. Enantioseparation of chiral tropane alkaloids by means of cyclodextrin-modified microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 28, p. 2693-2700, 2007.
- BJORNSDOTTIR, I.; HANSEN, S. H. Comparison of aqueous and non-aqueous capillary electrophoresis for quantitative determination of morphine in pharmaceuticals. **Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis**, v. 15, p. 1083-1089, 1997.
- BJORNSDOTTIR, I.; HANSEN, S. H. Determination of opium alkaloids in crude opium using non-aqueous capillary electrophoresis. **Journal of Pharmaceutical and Biological Analysis**, v. 13, p. 1473-1481, 1995.
- BUCHBERGER, W.; GSTOTTENMAYR, D.; HIMMELSBACH, M. Determination of cinchona alkaloids by non-aqueous CE with MS detection. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1208-1213, 2010.
- 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, p. 2310-2320, 2008.
- CAO, J.; QU, H.; CHENG, Y. Separation of flavonoids and phenolic acids in complex natural products by microemulsion electrokinetic chromatography using surfactant-coated and carboxylic single-wall carbon nanotubes as additives. **Electrophoresis**, v. 31, p. 1689-1696, 2010.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Capillary electrophoresis – electro-spray ionization – mass spectrometry method to determine the phenolic fraction of extra – virgin olive oil. **Electrophoresis**, v. 27, p. 2182-2196, 2006.
- CARRASCO-PANCORBO, A.; NEUSUB, C.; PELZING, M.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. CE- and HPLC-TOF-MS for the characterization of phenolic compounds in olive oil. **Electrophoresis**, v. 28, p. 806-821, 2007.
- CHAI, Y.; JI, S.; ZHANG, G.; WU, Y.; YIN, X.; LIANG, D.; XU, Z. Determination of icariin in Chinese traditional medicine by capillary zone electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 13, p. 373-375, 1999.
- CHANKVETADZE, B. Separation selectivity in chiral capillary electrophoresis with charged selectors. **Journal of Chromatography A**, v. 792, p. 269-295, 1997.
- CHEN, G.; YING, X.; YE, J. Differentiation of Scutellariae Radix from Astragali Radix by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analyst**, v. 125, p. 815-818, 2000.

- CHEN, J.; ZHAO, H.; WANG, X.; LEE, F. S.-C.; YANG, H.; ZHENG, L. Analysis of major alkaloids in *Rhizoma coptidis* by capillary electrophoresis – electro-spray– time of flight mass spectrometry with different background electrolytes. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2135-2147, 2008.
- CHENG, J.; MITCHELSON, K. R. Improved separation of six harmine alkaloids by high-performance capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 761, p. 297-305, 1997.
- CHERKAOUI, S.; MATEUS, L.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.-L. Nonaqueous capillary electrophoresis for the analysis of selected tropane alkaloids in a plant extract. **Chromatographia**, v. 49, p. 54-60, 1999.
- 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, p. 231-238, 2008.
- CHIANG, H.-Y.; SHEU, S.-J. Analysis of ephedra-alkaloids using sweeping and cation-selective exhaustive injection and sweeping micellar electrokinetic chromatography methods. **Electrophoresis**, v. 25, p. 670-676, 2004.
- CHIU, C.-W.; LIANG, H.-H.; HUANG, H.-Y. Analyses of alkaloids in different products by NACE-MS. **Electrophoresis**, v. 28, p. 4220-4226, 2007.
- CIFUENTES, A.; BARTOLOMÉ, B.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C. Fast determination of procyanidins and other phenolic compounds in food samples by micellar electrokinetic chromatography using acidic buffers. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1561-1567, 2001.
- DADÁKOVÁ, E.; PROCHÁZKOVÁ, KRÍZEK, M. Application of micellar electrokinetic capillary chromatography for quantitative analysis of quercetin in plant materials. **Electrophoresis**, v. 22, p. 1573-1578, 2001.
- DEBUSSCHÈRE, L.; DEMESMAY, C.; ROCCA, J. L.; LACHATRE, G.; LOFTI, H. Separation of cardiac glycosides by micellar electrokinetic chromatography and microemulsion electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 779, p. 227-233, 1997.
- DEEB, S. E.; HASEMANN, P.; WATZIG, H. Strategies in method development to quantify enantiomeric impurities using CE. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3552-3562, 2008.
- DELGADO, C.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A.; TALOU, T.; GASET, A. Capillary electrophoresis as an alternative to HPLC for determination of honey flavonoids. **Chromatographia**, v. 38, p. 71-78, 1994.
- EFFER, M. D.; LIU, Y.; SEVCÍK, J.; TESAROVÁ, E.; ROZHKOV, R.; LAROCK, R. C.; ARMSTRONG, D. W. Enantioseparation of dihydrofurocoumarin derivatives by various separation modes of capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2650-2656, 2003.
- FANALI, S. Chiral separations by CE employing CDs. **Electrophoresis**, v. 30, p. S203-S210, 2009.
- FENG, H.-T.; LI, S. F. Y. Determination of five toxic alkaloids in two common herbal medicines with capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 973, p. 243-247, 2002.
- FENG, H.-T.; YUAN, L.-L.; LI, S. F. Y. Analysis of Chinese medicine preparations by capillary electrophoresis – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1014, p. 83-91, 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, p. 2834-2840, 1998.
- FONSECA, F. N.; TAVARES, M. F. M.; HORVÁTH, C. Capillary electrochromatography of selected phenolic compounds of *Chamomilla recutita*. **Journal of Chromatography A**, v. 1154, p. 390-399, 2007.
- 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, p. 149-155, 1997.
- GEL-MORETO, N.; STREICH, R.; GALENSA, R. Chiral separation of diastereomeric flavanone-7-O-glycosides in

- citrus by capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 24, p. 2716-2722, 2003.
- GEL-MORETO, N.; STREICH, R.; GALENSA, R. Chiral separation of six diastereomeric flavanona-7-O-glycosides by capillary electrophoresis and analysis of lemon juice. **Journal of Chromatography A**, v. 925, p. 279-289, 2001.
- GLATZ, Z.; MORAVCOVÁ, M.; JANICZEK, O. Determination of pyrroloquinoline quinone by capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography B**, v. 739, p. 101-107, 2000.
- GONG, Z.; ZHANG, Y.; ZHANG, H.; CHENG, J. Capillary electrophoresis separation and permanganate chemiluminescence on-line detection of some alkaloids with β -cyclodextrin as an additive. **Journal of Chromatography A**, v. 855, p. 329-335, 1999.
- GOTTI, R.; FURLANETTO, S.; LANTERI, S.; OLMO, S.; RAGAINI, A.; CAVRINI, V. Differentiation of Green tea samples by chiral CD-MEKC analysis of catechins content. **Electrophoresis**, v. 30, p. 1-9, 2009.
- HAMOUDOVA, R.; URBÁNEK, M.; POSPÍŠILOVÁ, M.; POLÁSEK, M. Assay of phenolic compounds in red wine by on-line combination of capillary isotachopheresis with capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p. 281-287, 2004.
- HOU, J.; ZHENG, J.; SHAMSI, S. A. Simultaneous chiral separation of ephedrine alkaloids by MEKC-ESI-MS using polymeric surfactant II: Application in dietary supplements. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1426-1434, 2007.
- HUANG, H-Y.; LIEN, W-C. Analyses of phenolic compounds by microemulsion electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3134-3140, 2005.
- HUANG, X.; LUCKEY, J. A.; GORDON, M. J.; ZARE, R. N. Quantitative analysis of low molecular weight carboxylic acids by capillary zone electrophoresis – conductivity detection. **Analytical Chemistry**, v. 61, p. 766-770, 1989.
- ISSAQ, H. J. Capillary electrophoresis of natural products II. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3190-3202, 1999.
- ISSAQ, H. J. Capillary electrophoresis of natural products. **Electrophoresis**, v. 18, p. 2438-2452, 1997.
- JI, S-G.; CHAI, Y-F.; ZHANG, G-Q.; WU, Y-T.; LIANG, D-S.; XU, Z-M. Determination of berberine in *Rhizoma coptidis* and its preparations by non-aqueous capillary electrophoresis. **Biomedical Chromatography**, v. 13, p. 439-441, 1999.
- JI, X.; LI, Y.; LIU, H.; YAN, Y.; LI, J. Determination of the alkaloids content in different parts of some *Mahonia* plants by HPCE. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 387-391, 2000.
- KODAMA, S.; MORIKAWA, A.; NAKAGOMI, K.; YAMAMOTO, A.; SATO, A.; SUZUKI, K.; YAMASHITA, T.; KEMMEI, T.; TAGA, A. Enantioseparation of nicotine alkaloids in cigarettes by CE using sulfated β -CD as a chiral selector and a capillary coated with amino groups. **Electrophoresis**, v. 30, p. 349-356, 2009.
- KOFINK, M.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; GALENSA, R. Enantioseparation of catechin and epicatechin in plant food by chiral capillary electrophoresis. **European Food Research Technology**, v. 225, p. 569-577, 2007.
- KOYAMA, J.; MORITA, I.; KOBAYASHI, N. Simultaneous determination of anthraquinones in rhubarb by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1145, p. 183-189, 2007.
- KREFT, S.; KNAPP, M.; KREFT, I. Extraction of rutin from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) seeds and determination by capillary electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4649-4652, 1999.
- KULOMAA, A.; SIRÉN, H.; RIEKKOLA, M-L. Identification of antioxidative compounds in plant beverages by capillary electrophoresis with the marker index technique. **Journal of Chromatography A**, v. 781, p. 523-532, 1997.

- KVASNICKA, F. Application of CE in hydrodynamically closed systems for analysis of bioactive compounds in food. **Electrophoresis**, v. 28, p. 3581-3589, 2007.
- KVASNICKA, F.; BÍBA, B.; CVAK, L. Capillary zone electrophoresis separation of enantiomers of lisuride. **Journal of Chromatography A**, v. 1066, p. 255-258, 2005.
- LARGE, T.; LAFONT, R.; MORGAN, E. D.; WILSON, I. D. Advances in capillary electrophoresis. Micellar capillary electrophoresis of ecdysteroids. **Analytical Proceedings**, v. 29, p. 386-388, 1992.
- 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, p. 152-158, 2004.
- LEE, B.-L.; ONG, C.-N. Comparative analysis of tea catechins and theaflavins by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 881, p. 439-447, 2000.
- LI, P.; LI, S. P.; WANG, Y. T. Optimization of CZE for analysis of phytochemical bioactive compounds. **Electrophoresis**, v. 27, p. 4808-4819, 2006.
- LIANG, H. R.; SIRÉN, H.; RIEKKOLA, M. L.; VUORELA, P.; VUORELA, H.; HILTUNEN, R. Optimized separation of pharmacologically active flavonoids from *Epimedium* species by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 746, p. 123-129, 1996.
- LIEBICH, H. M.; LEHMANN, R.; STEFANO, C. D.; HARING, H. U.; KIM, J. H.; KIM, K. R. Analysis of traditional Chinese anticancer drugs by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 795, p. 388-393, 1998.
- LIU, J. J.; LI, S. P.; WANG, Y. T. Optimization for quantitative determination of four flavonoids in *Epimedium* by capillary zone electrophoresis coupled with diode array detection using central composite design. **Journal of Chromatography A**, v. 1103, p. 344-349, 2006.
- LÓPEZ-LORENTE, A. I.; SIMONET, B. M.; VALCÁRCEL, M. Electrophoretic methods for the analysis of nanoparticles. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 30, p. 58-71, 2011.
- LU, Y.; BREADMORE, M. C. Analysis of phenolic acids by non-aqueous capillary electrophoresis after electrokinetic supercharging. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, p. 7282-7287, 2010.
- LU, Y.; CHEN, D.-F. Analysis of *Schisandra chinensis* and *Schisandra sphenanthera*. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, p. 1980-1990, 2009.
- MA, B.; ZHOU, X.; WANG, G.; HUANG, H.; DAÍ, Z.; QIN, J.; LIN, B. Integrated isotachophoretic preconcentration with zone electrophoresis separation on a quartz microchip for UV detection of flavonoids. **Electrophoresis**, v. 27, p. 4904-4909, 2006.
- MATEUS, L.; CHERKAOUI, S.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.-L. Capillary electrophoresis-diode array detection – electro-spray mass spectrometry for the analysis of selected tropane alkaloids in plant extract. **Electrophoresis**, v. 20, p. 3402-3409, 1999.
- MATEUS, L.; CHERKAOUI, S.; CHRISTEN, P.; VEUTHEY, J.-L. Capillary electrophoresis for the analysis of tropane alkaloids: pharmaceutical and phytochemical applications. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 18, p. 815-825, 1998.
- MELLENTHIN, O.; GALENSA, R. Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: detection of soy, lupin, and pea protein in meat products. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 594-602, 1999.
- MORAES, M. L. L.; MICKE, G. A.; FUJIYA, N. M.; TAVARES, M. F. M. Separação e análise de metilxantinas em extratos de guaraná e erva mate por eletroforese capilar. **Revista Analytica**, p. 44-50, 2003.
- MULLER, U.; MRESTANI, Y.; NEUBERT, R.; DRAGER, B. Chiral separation of the plant lignin matairesinol by capillary

- electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 29, p. 3582-3587, 2008.
- NG, C. L.; ONG, C. P.; LEE, H. K.; LI, S. F. Y. Systematic optimization of micellar electrokinetic chromatographic separation of flavonoids. **Chromatographia**, v. 34, p. 166-172, 1992.
- OCHOCKA, R. J.; RAJZER, D.; KOWALSKI, P.; LAMPARCZYK, H. Determination of coumarins from *Chrysanthemum segetum* L. by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 709, p. 197-202, 1995.
- 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 involucreta* Hook. f. by capillary electrophoresis and reversed-phase high-performance liquid chromatography on a C18 column. **Journal of Chromatography A**, v. 1185, p. 117-129, 2008.
- PAPPAS, T. J.; GAYTON-ELY, M.; HOLLAND, L. A. Recent advances in micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 719-934, 2005.
- PARK, H.; JUNG, S. Separation of some chiral flavonoids by microbial cyclosophoraoses and their sulfated derivatives in micelar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3833-3838, 2005.
- PREINERSTORFER, B.; LAMMERHOFER, M.; LINDNER, W. Advances in enantioselective separations using electromigration capillary techniques. **Electrophoresis**, v. 30, p. 100-132, 2009.
- QA'DAN, F.; PETEREIT, F.; LECHTENBERG, M.; NAHRSTEDT, A. Qualitative determination of proanthocyanidin cleavage products after acid-catalyzed degradation in the presence of excess phloroglucinol by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography. **Pharmaceutical Biology**, v. 44, p. 309-314, 2006.
- QI, S.; CUI, S.; CHEN, X.; HU, Z. Rapid and sensitive determination of anthraquinones in Chinese herb using 1-butyl-3-methylimidazolium – based ionic liquid with β -cyclodextrin as modifier in capillary zone electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 1059, p. 191-198, 2004.
- RALAPATI, S. Capillary electrophoresis as an analytical tool for monitoring nicotine in ATF regulated tobacco products. **Journal of Chromatography B**, v. 65, p. 117-129, 1997.
- 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, p. 1437-1441, 2003.
- RODRIGUEZ-DIAZ, R.; ZHU, M.; WEHR, T. Strategies to improve performance of capillary isoelectric focusing. **Journal of Chromatography A**, v. 772, p. 145-160, 1997.
- SAFRA, J.; POSPÍŠILOVÁ, M.; HONEGR, J.; SPILKOVÁ, J. Determination of selected antioxidant in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration. **Journal of Chromatography A**, v. 1171, p. 124-132, 2007.
- SANTORO, M. I. R. M., AURORA-PRADO, M. S.; STEPPE, M.; KEDOR-HACKMANN, E. R. M.. Electroforese capilar: teoria e aplicações na análise de medicamentos. **Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 97-110, 2000.
- SCHERZ, H.; HUCK, C. W.; BONN, G. K. CEC and EKC of natural compounds. **Electrophoresis**, v. 28, p. 1645-1657, 2007.
- SCHMITT-KOPPLIN, P.; FROMMBERGER, M. Capillary electrophoresis – mass spectrometry: 15 years of developments and applications. **Electrophoresis**, v. 24, p. 3837-3867, 2003.
- SEVČÍK, J.; VICAR, J.; ULRICHOVÁ, J.; VÁLKA, I.; LEMR, K.; SIMÁNEK, V. Capillary electrophoretic determination of sanguinarine and chelerythrine in plant extracts and pharmaceutical preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 866, p. 293-298, 2000.
- SILVA, J. A., COLTRO, W. K. T., CARRILLO, E., TAVARES, M. F. M. Terminologia para as técnicas de eletromigração em

capilares. **Química Nova**, v. 30, p. 740-744, 2007.

SIMÓN, B. F.; ESTRELLA I.; HERNÁNDEZ, T. Flavonoids separation by capillary electrophoresis. Effect of temperature and pH. **Chromatographia**, v. 41, p. 289-392, 1995.

SMITH, A. R.; KIRCHHOFF, J. R.; ZHANG, Z.; TILLEKERATNE, L. M. V.; HUDSON, R. A. Separation of the enzyme cofactor pyrroloquinoline quinone and three isomeric analogues by capillary electrophoresis with ion-pairing media. **Journal of Chromatography A**, v. 876, p. 193-199, 2000.

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

SONG, J-Z.; XU, H-X.; TIAN, S-J.; BUT, P. P-H. Determination of quinolizidine alkaloids in traditional Chinese herbal drugs by nonaqueous capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 857, p. 303-311, 1999.

STOGL, W. M.; HUCK, C. W.; STECHER, G.; BONN, G. K. Capillary electrochromatography of biologically relevant flavonoids. **Electrophoresis**, v. 27, p. 787-792, 2006.

STURM, S.; SCHINNERL, J.; GREGER, H.; STUPPNER, H. Nonaqueous capillary electrophoresis – electro-spray ionization-ion trap-mass spectrometry analysis of pyrrolo- and pyrido[1,2-a]azepine alkaloids in *Stemona*. **Electrophoresis**, v. 29, p. 2079-2087, 2008.

STURM, S.; STRASSER, E-M.; STUPPNER, H. Quantification of *Fumaria officinalis* isoquinoline alkaloids by nonaqueous capillary electrophoresis – electro-spray ion trap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, p. 331-338, 2006.

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

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

SUNTORNUSUK, L.; ANURUKVORAKUN, O. Precision improvement for the analysis of flavonoids in selected Thai plants by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 26, p. 648-660, 2005.

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

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

TIAN, K.; ZHANG, H.; CHEN, X.; HU, Z. Determination of five anthraquinones in medicinal plants by capillary zone electrophoresis with β -cyclodextrin addition. **Journal of Chromatography A**, v. 1123, p. 134-137, 2006.

TONIN, F. G.; JAGER, A. V.; MICKE, G. A.; FARAH, J. P. S.; TAVARES M. F. M. Optimization of the separation of flavonoids using solvent-modified micellar electrokinetic chromatography. **Electrophoresis**, v. 26, p. 3387-3396, 2005.

TRUTE, A.; NAHRSTEDT, A. Separation of rosmarinic acid enantiomers by three different chromatographic methods (HPLC, CE, GC) and the determination of rosmarinic acid in *Hedera helix* L. **Phytochemical Analysis**, v. 7, p. 204-208, 1996.

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

UNGER, M.; STOCKIGT, D.; BELDER, D.; STOCKIGT, J. General approach for the analysis of various alkaloid classes using capillary electrophoresis and capillary electrophoresis – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 767, p. 263-276, 1997.

URBÁNEK, M.; POSPÍŠILOVÁ, M.; POLÁSEK, M. On-line coupling of capillary isotachopheresis and zone

electrophoresis for the assay of phenolic compounds in plant extract. **Electrophoresis**, v. 23, p. 1045-1052, 2002.

VAHER M.; KOEL, M. Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 990, p. 225-230, 2003.

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, p. 7143-7172, 2009.

VOLPI, N. Separation of flavonoids and phenolic acids from propolis by capillary zone electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 25, p. 1872-1878, 2004.

WALLINGFORD, R. A.; EWING, A. G. Amperometric detection of catechols in capillary zone electrophoresis with normal and micellar solutions. **Analytical Chemistry**, v. 60, p. 258-263, 1988.

WALLINGFORD, R. A.; EWING, A. G. Capillary zone electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical Chemistry**, v. 59, p. 1762-1766, 1987.

WANG, S.; XUE, C.; CHEN, X.; LIU, M.; HU, Z. Study on the quantitative relationship between the structures and electrophoretic mobilities of flavonoids in micellar electrokinetic capillary chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1033, p. 153-159, 2004.

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.

WANG, W.; TANG, J.; WANG, S.; ZHOU, L.; HU, Z. Method development for the determination of coumarin compounds by capillary electrophoresis with indirect laser-induced fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1148, p. 108-114, 2007.

WEDIG, M.; HOLZGRABE, U. Enantioseparation of tropane alkaloids by means of anionic cyclodextrin-modified capillary electrophoresis. **Electrophoresis**, v. 20, p. 1555-1560, 1999.

WOJCIECHOWSKI, H.; GUMBINGER, H. G.; VAHLENSIECK, U.; WINTERHOFF, H.; NAHRSTEDT, A.; KEMPER, F. H. Analysis of the compounds of *Lycopus europaeus* L. in body fluids during metabolism studies, comparison of capillary electrophoresis and high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 717, p. 261-270, 1995.

WU, J.; LI, S-C.; WATSON, A. Optimizing separation conditions for proteins and peptides using imaged capillary isoelectric focusing. **Journal of Chromatography A**, v. 817, p. 163-171, 1998.

XU, L.; FENG, Y-Q.; SHI, Z-G.; DA, S-L.; REN, Y-Y. Nonaqueous capillary electrophoresis using a titania-coated capillary. **Journal of Chromatography A**, v. 1028, p. 165-170, 2004.

YANG, B.; ZHANG, X.; ZHANG, R. A comparative study on analytical method of total alkaloids from cortex *Phellodendri amurens* by reversed phase performance liquid chromatography (RP-HPLC) and pressurized capillary electrochromatography (pCEC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

YANG, F-Q.; ZHAO, J.; LI, S-P. CEC of phytochemical bioactive compounds. **Electrophoresis**, v. 31, p. 260-277, 2010.

YANG, S. S.; SMETENA, I. Evaluation of capillary electrophoresis for the analysis of nicotine and selected minor alkaloids from tobacco. **Chromatographia**, v. 40, p. 375-378, 1995.

YANG, S. S.; SMETENA, I.; GOLDSMITH, A. I. Evaluation of micellar electrokinetic capillary chromatography for the analysis of selected tobacco alkaloids. **Journal of Chromatography A**, v. 746, p. 131-136, 1996.

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, p. 3397-3404, 2005.

242 YU, L-S.; XU, X-Q.; HUANG, L.; LIN, J-M.; CHEN, G-N. Separation and detection of isoquinoline alkaloids using MEEKC coupled with field-amplified sample injection induced by ACN. **Electrophoresis**, v. 30, p. 661-667, 2009.

—
YU, L-S.; XU, X-Q.; HUANG, L.; LING, J-M.; CHEN, G-N. Separation and determination of flavonoids using microemulsion EKC with electrochemical detection. **Electrophoresis**, v. 29, p. 726-733, 2008.

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, p. 171-174, 2010;

ZAKARIA, P.; MACKA, M.; HADDAD, P. R. Separation of opiate alkaloids by electrokinetic chromatography with sulfated-cyclodextrin as a pseudo-stationary phase. **Journal of Chromatography A**, v. 985, p. 493-501, 2003.

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

LEITURA COMPLEMENTAR

BAKER, D. R. Capillary Electrophoresis: Techniques in Analytical Chemistry. **John Wiley & Sons, Inc.**, 1ª ed., 1995.

Autores | Endereços



Adrian Martin Pohlit

Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
Av. André Araújo, 2936, Petrópolis
69083-000 – Manaus – AM
E-mail: ampohlit@gmail.com

Andersson Barison

Universidade Federal do Paraná
Departamento de Química
Centro Politécnico - Laboratório de Ressonância
Magnética Nuclear
81530-900 – Curitiba - PR
E-mail: andernmr@ufpr.br

Camila Gambini Pereira

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Departamento de Engenharia Química
59072-970 – Natal – RN
E-mail: camila@eq.ufrn.br

Carlos Alexandre Carollo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Laboratório de Farmacognosia
Cidade Universitária s/n - Caixa Postal 549
79070-900 - Campo Grande – MS
E-mail: carollo@ufms.br

Carolina Maria Xaubet Olivera

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão
Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
Avenida do Café s/n
14040-903 - Ribeirão Preto – SP
E-mail: cxaubet@gmail.com

Daniel Pecoraro Demarque

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Laboratório de Farmacognosia
Cidade Universitária s/n - Caixa Postal 549
79070-900 - Campo Grande – MS
E-mail: danieldemarque@hotmail.com

Daniel Petinatti Pavarini

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
Avenida do Café s/n
14040-903 - Ribeirão Preto – SP
E-mail: danielpetpav@hotmail.com



Denise Brentan da Silva

Lychnoflora Pesquisa e Desenvolvimento em
Produtos Naturais LTDA
Incubadora Supera - Campus da USP
Avenida dos Bandeirantes, 3900
14040-900 - Ribeirão Preto - SP
E-mail: denisebrentan@lychnoflora.com.br

Eduardo de Jesus Oliveira

Universidade Federal da Paraíba
Laboratório de Tecnologia Farmacêutica
Cidade Universitária - Campus I
58051-970 – João Pessoa – PB
E-mail: eduardo@ltf.ufpb.br

Fernando Batista da Costa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Avenida do Café s/n
14040-903 - Ribeirão Preto – SP
E-mail: febcosta@fcfrp.usp.br

João Carlos Palazzo de Mello

Universidade Estadual de Maringá

Departamento de Farmácia

Avenida Colombo, 5790

87020-900 - Maringá – PR

E-mail: mello@uem.br

João Luis Callegari Lopes

Universidade de São Paulo

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos

Avenida do Café s/n

14040-903 - Ribeirão Preto – SP

E-mail: joaoluis@usp.br

José Maria Barbosa Filho

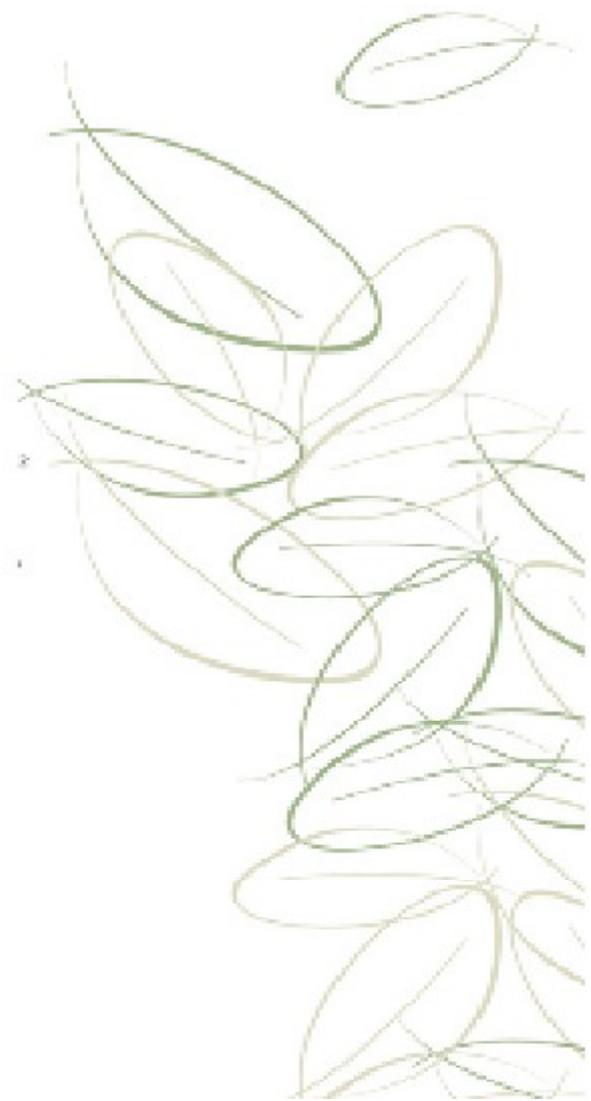
Universidade Federal da Paraíba

Laboratório de Tecnologia Farmacêutica

Cidade Universitária - Campus I

58051-970 – João Pessoa – PB

E-mail: jbarbosa@ltf.ufpb.br



Lia Akina Ito

Universidade Estadual de Maringá
Departamento de Farmácia
Avenida Colombo, 5790
87020-900 - Maringá - PR
E-mail: lia_akina@hotmail.com

Luiz Elídio Gregório

Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri
Laboratório de Farmacognosia e Fitoquímica
Campus JK
Rodovia MGT 367, km 583, n. 5000 - Alto da Jacuba
39100-000 - Diamantina - MG
E-mail: luiz.gregorio@ufvjm.edu.br

Maique Weber Biavatti

Universidade Federal de Santa Catarina
Departamento de Ciências Farmacêuticas
Campus Trindade - Laboratório de Farmacognosia
88040-900 - Florianópolis - SC
E-mail: maique@ccs.ufsc.br

Marcelo Aparecido da Silva

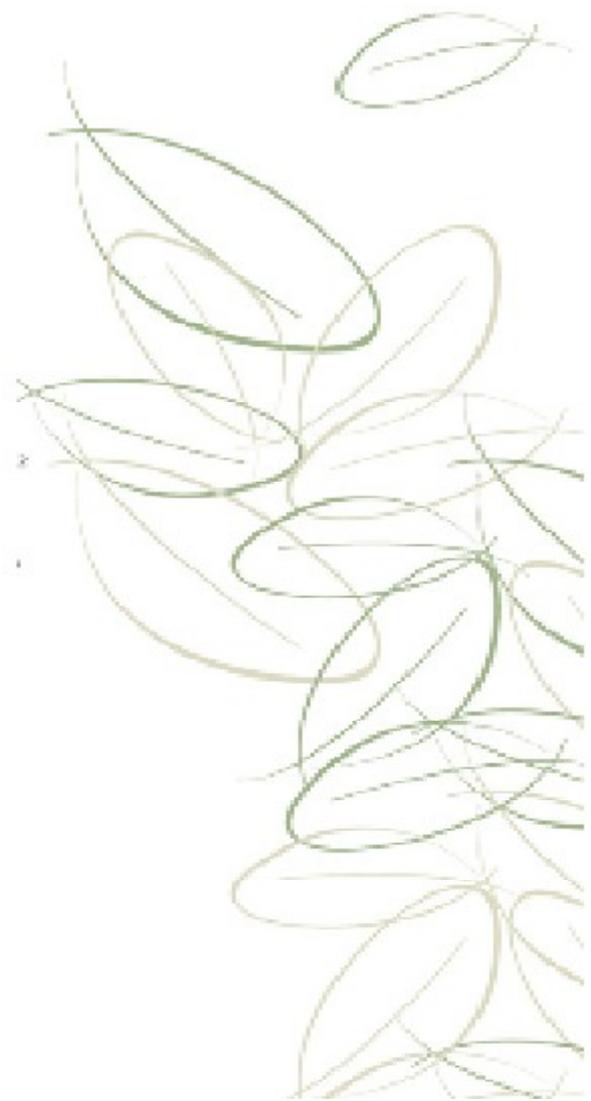
Universidade Federal de Alfenas
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Departamento de Alimentos e Medicamentos
Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
37130-000 – Alfenas – MG
E-mail: marcamosilva@gmail.com

Márcio Adriano Andreo

Universidade Federal de São Paulo
Campus Diadema
Rua Prof. Artur Riedel, 275
09972-270 - Diadema – SP
E-mail: andreom2002@yahoo.com.br

Marcus Tullius Scotti

Universidade Federal da Paraíba - *Campus* IV
Departamento de Engenharia e Meio Ambiente
Rua Mangueira s/n
58297-000 - Rio Tinto – PB
E-mail: mtscotti@cdae.ufpb.br



Michael Niehues

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
Avenida do Café s/n
14040-903 - Ribeirão Preto – SP
E-mail: m_niehues@hotmail.com

Norberto Peporine Lopes

Universidade de São Paulo
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos
Avenida do Café s/n
14040-903 - Ribeirão Preto – SP
E-mail: npelopes@fcfrp.usp.br

Wagner Vilegas

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Instituto de Química - *Campus* de Araraquara
Departamento de Química Orgânica
Laboratório de Fitoquímica
Caixa Postal 355
14801-970 – Araraquara – SP
E-mail: vilegasw@gmail.com

Esta obra foi impressa pela Imprensa Universitária da Universidade Federal de Ouro Preto,
composta na fonte Myriad-Pro e Ottawa,
em papel 100% reciclado, capa 380 g/m² e miolo 90 g/m²,
em outubro de 2011.



EDITORA UFOP

APOIO



Em meados de 2008, um grupo de pesquisadores da área de Farmácia, coordenado pelos professores Ivan da Rocha Pitta e Dulcinéia Saes Parra Abdalla, lançou-se no desafio de organizar um dos maiores grupos para participar dos Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia. Essa iniciativa tem como missão *desenvolver, internalizar e difundir práticas científicas e tecnológicas capazes de superar as fragilidades e lacunas da cadeia inovativa e produtiva farmacêutica, propondo mecanismos operacionais capazes de viabilizar a transformação de resultados científicos promissores em resultados econômicos efetivos com impactos sociais*. Nessa missão, um espaço significativo foi destinado à formação de recursos humanos e difusão do conhecimento. Hoje o instituto conta com mais de 400 pesquisadores organizados em oito redes temáticas, sendo uma delas a de Produtos Naturais Bioativos (PNBio). Considerando a constante necessidade de novas informações de pesquisa dos Biomas Nacionais e dos grupos brasileiros que atuam na área de Farmácia com Plantas Medicinais, a PNBio teve como uma de suas metas iniciais compilar informações em uma coleção de livros com os objetivos de informação e ensino. Nesta edição, os leitores terão acesso a algumas coletâneas realizados, por pesquisadores da área, vinculados ao INCT, versando sobre atividade de plantas do Brasil.

ISBN 85-288-0084-9



9 788528 800845

APOIO

