

DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA POR ELETROFORESE CAPILAR DE FRAÇÃO SEMIPURIFICADA DE *Limonium brasiliense*

Raquel Garcia Isolani (PIBIC/CNPq/UEM), João Carlos Palazzo de Mello
(Orientador), e-mail: mello@uem.br.

Universidade Estadual de Maringá / Departamento de Farmácia/Maringá,
PR.

Área e subárea do conhecimento: Farmácia/Farmacognosia

Palavras-chave: *Limonium brasiliense*, eletroforese capilar, controle de qualidade.

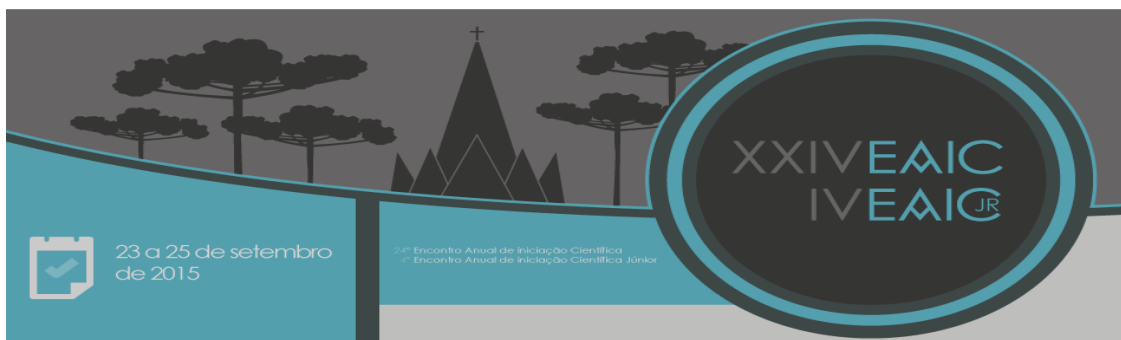
Resumo:

Limonium brasiliense, conhecida por baicuru ou guaicuru, é utilizada popularmente no tratamento de tensão pré-menstrual e outros distúrbios menstruais. O objetivo foi avaliar os rizomas de *L. brasiliense* por eletroforese capilar (EC) para identificação de polifenóis presentes em uma fração semipurificada. Os resultados mostraram um perfil eletroforético com o uso de metil- β -CD como seletor quiral, condição fundamental na separação das substâncias. A comparação com CLAE, a EC mostrou-se melhor quanto à resolução e tempo de análise (40 min x 10 min). Assim, o método EC pode ser utilizado na rotina laboratorial para o controle de qualidade dos rizomas de *L. brasiliense*.

Introdução

A espécie vegetal *Limonium brasiliense* (Boiss.) Kuntze (Plumbaginaceae) é conhecida popularmente por baicuru ou guaicuru. É uma planta encontrada na América do Sul e que vegeta no litoral, de preferência em terrenos baixos e em banhados com água levemente salgada.

O baicuru possui como farmacógeno os rizomas. A valorização de suas propriedades terapêuticas levou a sua inclusão na Farmacopeia Brasileira 1ª edição (FARMACOPEIA, 1929) e não foi reproduzida nas edições subsequentes. Os rizomas são empregados nas formas de infuso, decocto, como antisséptico nas infecções genito-urinárias e possui a propriedade de ser adstringente. São indicados, ainda, como diurético, no tratamento de reumatismo, artrismo, úlceras, na hemorragia intestinal e diarreia crônica.



Os extratos são recomendados também para normalizar os períodos menstruais nas mulheres com atraso ou irregularidades na menstruação. Existem estudos em andamento em nosso grupo de pesquisa para avaliar a atividade biológica dos rizomas de *L. brasiliense* e com isso a necessidade de estudos de controle de qualidade da matéria-prima vegetal. Assim, esse trabalho desenvolveu metodologia analítica por eletroforese capilar de uma fração semipurificada dos rizomas de *L. brasiliense*.

Materiais e métodos

Preparo de extrato bruto e fração acetato de etila

A droga vegetal foi submetida a processo de extração por Ultra-Turrax (UTC115KT; 20 min, $t < 40^{\circ}\text{C}$), utilizando-se acetona:água (7:3 v/v) como líquido extrator, seguido de filtração. O filtrado foi concentrado em evaporador rotatório *in vacuo*, congelado e liofilizado, obtendo-se o extrato bruto (EB). Com o EB realizou-se a partição com acetato de etila. As fases acetato de etila foram reunidas e concentradas em evaporador rotatório *in vacuo*, após foi congelada e liofilizada, fornecendo as frações acetato de etila (FAE) e aquosa (FAQ).

Desenvolvimento de metodologia analítica por Eletroforese Capilar

Foi empregado o sistema capilar eletroforético Beckman P/ACE MDQ com detector UV-Vis, em software Beckman 32 Karat versão 7.0. Utilizou-se capilar de sílica fundida de 375 μm D.E. x 50 μm D.I. com comprimento de 50/60,2 cm. Inicialmente o capilar foi acondicionado, a temperatura do capilar ajustada para 25°C e as amostras foram injetadas hidrodinamicamente, a 0,5 psi, por 3 s. Antes de cada injeção, realizou-se um pré-condicionamento do capilar, bombeando-se solução de NaOH 1,0 mol/l por 5 min, água ultrapura por 7 min e tampão de enxague por 10 min, e ao fim das análises foi realizado outro enxague do capilar (ITO, 2011).

A FAE na concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ foi solubilizada em 5 ml de solução metanol:água (2:8 v/v). A solução foi submetida à passagem em cartucho C18 previamente condicionado, o volume completado para 10 ml com a mesma solução, e após filtrada por membrana de 0,45 μm e armazenada em geladeira por no máximo uma semana.

As soluções estoques foram preparadas: tetraborato de sódio 100 mmol/l (sol. A) e ácido bórico 100 mmol/l (sol. B) ambas em água ultrapura e filtradas com membrana de 0,45 μm . Para obtenção da solução eletrolítica, as soluções A e B foram previamente diluídas até obtenção do pH desejado. Nos ensaios com β -ciclodextrinas (β -CD), metil- β -CD e 2-hidroxipropil- β -CD, foi adicionada a quantidade adequada de CD na solução eletrolítica pronta.



As soluções estoques foram armazenadas em geladeira por no máximo 48 h e as misturas foram preparadas diariamente (SEREIA, 2013).

Os seguintes parâmetros foram testados: 1) Comprimento de onda: 200, 214 e 254 nm; 2) Concentração do tampão: 60, 80 e 100 mmol/l; 3) pH do tampão: 8,4; 8,8 e 9,2; 4) Tipo e concentração de seletor quiral: ciclodextrinas (CD): β -CD, metil- β -CD e 2-hidroxipropil- β -CD. Cada CD foi adicionada à solução eletrolítica nas concentrações: 5, 10, 15 e 20 mmol/l; 5) Voltagem: 25 e 30 kV; 6) Tempo de injeção de amostra: 3 e 5 segundos.

Resultados e Discussão

As condições estabelecidas para o perfil eletroforético de *L. brasiliense* foram: detecção a 214 nm, tampão borato 80 mmol/l, pH 8.8, metil- β -CD a 10 mmol/l como seletor quiral, voltagem de 30 kV, injeção por 3 segundos (0,5 psi) e concentração da FAE 250 μ g/ml. O perfil eletroforético definido pode ser visto na figura 1.

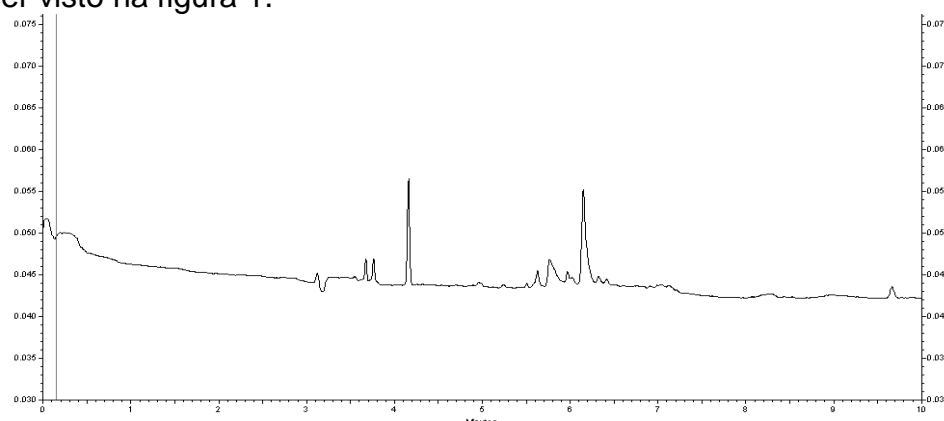
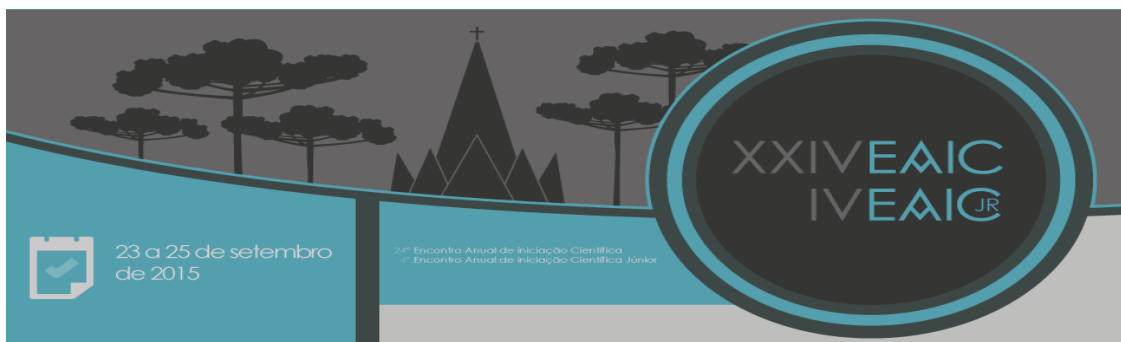


Figura 1 - Eletroferograma da FAE de *Limonium brasiliense* nas seguintes condições eletroforéticas: detecção a 214 nm, tampão borato 80 mmol/l, pH 8.80, metil- β -CD 10 mmol/l, 30 kV, injeção de 3 segundos, FAE 250 μ g/ml.

A definição de um perfil eletroforético é uma maneira de fazer um controle de qualidade de matérias-primas vegetais, pois permite que várias substâncias sejam quantificadas, as quais podem estar associadas às atividades biológicas. Também pode ser útil para avaliar autenticidade da amostra e identificação de adulterantes.

No controle de qualidade, a comparação com resultados obtidos por outros pesquisadores pode ser útil para a avaliação da qualidade de espécies vegetais que não possuem monografia atualizada na Farmacopeia Brasileira, como é o caso do *L. brasiliense*. Quando compara-se a eletroforese capilar com a metodologia por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) desenvolvida por Blainski (comunicação pessoal) (Figura



2), pode-se dizer que o método eletroforético apresentou melhor poder de resolução e menor tempo de análise para o mesmo grupo de substâncias.

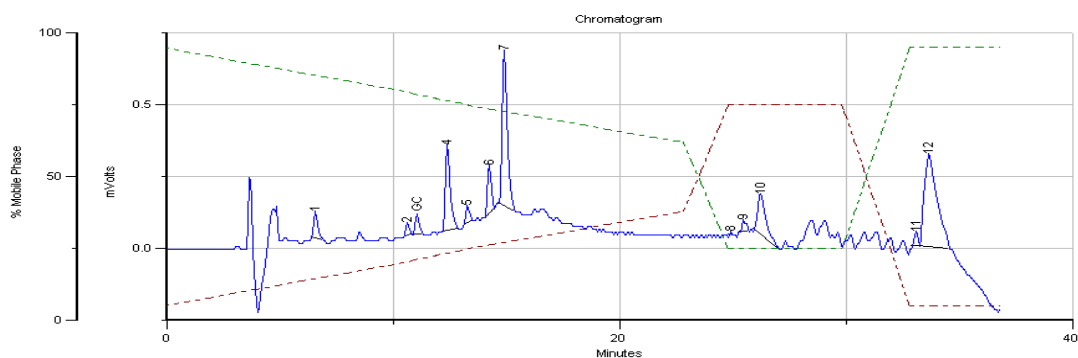


Figura 2 - Cromatograma desenvolvido por CLAE para a FAE de *Limonium brasiliense*. Gilson Surveyor; temperatura coluna 24 °C; detecção 210 nm; vazão 0,4 ml/min; FAE 80 µg/ml.

Conclusões

O modo eletroforese capilar de zona serviu à separação dos marcadores químicos da FAE. O uso da metil- β -CD como seletor quiral foi fundamental para se ter uma resolução adequada na separação das substâncias. Quando comparado com CLAE, o método desenvolvido se mostrou melhor quanto à resolução e tempo de análise (10 min EC x 40 min CLAE). O método EC pode ser utilizado na rotina laboratorial para o controle de qualidade dos rizomas de *Limonium brasiliense*.

Agradecimentos

CNPq; Doutorandas Ana Luiza Sereia, Andressa Blainski e Tânia Mara Antonelli Ushirobira; FINEP/Comcap-UEM.

Referências

- FARMACOPEIA BRASILEIRA. 1.ed. São Paulo: Siqueira, 1929.
- ITO, L. A. (2011). Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para isolar, identificar e quantificar cafeína e flavan-3-ol em extrato de *Paullinia cupana* var. *sorbilis* (Mart.) Ducke – Sapindaceae. (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SEREIA, A. L. (2013). Desenvolvimento de metodologia analítica por eletroforese capilar para identificação e quantificação de polifenóis de fração semipurificada de *Trichilia catigua* A. Juss. (Meliaceae). (Mestrado), Universidade Estadual de Maringá, Maringá.