

# VALIDAÇÃO DE MÉTODO DE CROMATOGRAFIA A LÍQUIDOS DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) PARA DETERMINAÇÃO DO RENDIMENTO DA SÍNTESE DE FLAVONOIDES

**Dayse Alessandra Almeida Silva<sup>1</sup>; Hugo Neves Brandão.**

1. Bolsista PROBIC/UEFS, Graduando em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: dayse.aasilva@hotmail.com

2. Orientador, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, e-mail: hugo@uefs.br

**PALAVRAS-CHAVE:** Flavonoides, CLAE, Validação.

## INTRODUÇÃO

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes entre os produtos de origem natural, por apresentarem grande número de compostos que possuem importância farmacológica, como anticarcinogênico, anti-inflamatório, antialérgico, entre outras, as quais são atribuídas a alguns representantes da classe. Dentre os flavonoides com interesse farmacológico tem-se a 7-hidroxiflavanona que apresenta atividade imunomoduladora (ZUANAZZI, 2000; BARREIROS, 2005).

A reação de síntese partindo-se do resorcinol e ácido cinâmico já é conhecida na literatura, dentre os produtos formados tem-se a 7-hidroxiflavanona e dois neoflavonoides (ADITYACHAUDHURY et al., 1971). Contudo, existe apenas um relato na literatura do monitoramento dessa reação por CLAE e a metodologia utilizada não passou por um processo de validação (BRANDÃO, 2007). Esse acompanhamento do rendimento da reação e formação dos produtos é interessante, visto que a reação pode ser feita em micro escala já que os detectores dos cromatógrafos a líquidos de alta eficiência são bastante sensíveis e detectam quantidades quase mínimas dos componentes. Além de proporcionar maior rapidez nas análises, pois dispensa a realização de isolamento prévio.

Segundo Brandão (2007), CLAE é uma técnica viável e útil no monitoramento de reações de síntese, desde que sejam utilizados padrões externos dos produtos a serem sintetizados. Além disso, apresenta rapidez para o acompanhamento de reações, uma vez que monitora os produtos formados, acompanhando a reação, sem a necessidade de purificação dos mesmos. As técnicas analíticas de separação, identificação e quantificação devem ser submetidas a teste de validação para garantir a confiabilidade dos resultados, sendo assim, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) considera que “a validação deve garantir, através de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados” (BRASIL, 2003).

Tendo em vista a grande importância farmacológica dos flavonoides, em especial a atividade imunomoduladora da 7-hidroxiflavanona, pretendeu-se determinar o rendimento da síntese dessa flavanona e de dois neoflavonoides. Além disso, diante da importância da comprovação da qualidade de medições químicas, através de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade buscou-se validar o método analítico para garantir que a identificação e quantificação por CLAE gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra analisada.

## METODOLOGIA

A síntese de 7-hidroxiflavona foi realizada utilizando como reagentes o resorcinol e o ácido cinâmico. Inicialmente, para a reação em escala convencional, sintetizou-se o ácido polifosfórico (PPA), adicionando em um balão de 50 mL, 12,5 g de anidrido fosfórico ( $P_2O_5$ ) e 20 mL de ácido ortofosfórico ( $H_3PO_4$ ). A mistura formada foi aquecida a 100°C, sob agitação vigorosa, durante 3 horas. Após este tempo, desligou-se o aquecimento e agitação, para que o sistema atingisse temperatura ambiente. Em seguida, procedeu-se com a síntese da 7-hidroxiflavona. Adicionou-se, ao balão contendo 20 mL de ácido polifosfórico, 1,3468 g de ácido cinâmico e 1,001 g de resorcinol. A mistura foi aquecida à temperatura de 80°C, sob

agitação, por três horas. Posteriormente, tratou-se o meio reacional com água gelada, e a mistura foi extraída com clorofórmio (3 x 20 mL). A fase orgânica foi separada, tratada com NaHCO<sub>3</sub>, e seca com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada sob pressão reduzida. Os resíduos obtidos foram submetidos à coluna cromatográfica e as frações resultantes foram submetidas à Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC) para agrupar as que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes.

As cromatoplasmas das frações resultantes da CCDC foram borrifadas com solução etanólica de cloreto de alumínio 2%, para detecção de flavonoides, e com solução etanólica a 5% de hidróxido de potássio, para detectar a presença de cumarinas (Wagner e Bladt, 1995). As frações que apresentaram resultado positivo tanto para flavonoides quanto cumarinas foram injetadas no Cromatógrafo a Líquidos de Alta Eficiência para comprovação da eficiência na purificação dos compostos de interesse.

Os experimentos cromatográficos foram realizados com sistema HPLC EZChrom Elite, consistindo de bomba VRW HITACHI L-2130, equipado com injetor e detector de arranjo de diodo (DAD) VRW HITACHI L-2455, e forno VRW HITACHI L-2300. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (75 mm x 4 mm i.d.) (3µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5 µm) da Merck. As condições de análise incluíram método isocrático de eluição conduzido com fase móvel de metanol (CH<sub>3</sub>OH) e solução de ácido acético 1% (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) na proporção (60:40), o tempo de corrida de 15 minutos e fluxo de 1mL/min e o volume de injeção correspondente a 20 µl. A leitura do detector de arranjo de diodo foi realizada na faixa de 210 à 400 nm e a aquisição cromatográfica foi definida em 280 nm.

Após análise das frações resultantes da síntese em escala convencional, procedeu-se com a realização da síntese em micro escala, que teve como base a metodologia de Brandão (2007) e foi realizada nas mesmas condições e etapas da síntese convencional. Para tanto, sintetizou-se o ácido polifósforico (PPA) com menores quantidades de reagentes, 300mg de P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> e 0,5mL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>. Para a síntese da 7-hidroxi-flavanona adicionou-se 56mg de ácido cinâmico e 50,5mg de resorcinol, ao PPA.

Foram obtidos os padrões secundários da 7-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina e do ácido 3-(4-hidroxifenil)-3-fenilpropanóico (nova substância identificada como produto da síntese do ácido cinâmico e resorcinol). Esses padrões foram submetidos a análise por cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE), assim como, o produto da reação em microescala do resorcinol e ácido cinâmico. As condições cromatográficas foram as mesmas que a utilizada para análise dos produtos da síntese em escala convencional, modificando apenas o aparelho.

As análises dos padrões secundários foram realizadas com sistema HPLC Workstation, consistindo de bomba Varian Polaris e detector de arranjo de diodo (DAD) Varian ProStar. A separação cromatográfica foi realizada por meio de coluna LiChroCART Purospher Star® RP18-e (75 mm x 4 mm i.d.) (3µm) (Merck, Darmstadt, Germany) combinado com pré-coluna LiChroCART 4-4 LiChrospher 100RP18 (5 µm) da Merck. As condições de análise incluíram método isocrático de eluição conduzido com fase móvel de metanol (CH<sub>3</sub>OH) e solução de ácido acético 1% (CH<sub>3</sub>CO<sub>2</sub>H) na proporção (60:40), o tempo de corrida de 15 minutos e fluxo de 1mL/min e o volume de injeção correspondente a 20 µl. A leitura do detector de arranjo de diodo foi realizada na faixa de 210 à 400 nm e a aquisição cromatográfica foi definida em 280 nm.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A primeira etapa da síntese de 7-hidroxi-flavona foi à condensação do anidrido fosfórico e ácido fosfórico para produzir o ácido polifósforico, o qual apresentou consistência viscosa e cor cristalina. Os produtos resultantes da reação do resorcinol e ácido cinâmico,

submetidos à agitação, por três horas, em temperatura de 80°C apresentou mudança de coloração amarela até laranja intenso, indicativo da formação dos produtos 7-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina, 5-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina e 7-Hidroxiflavanona.

O ácido polifosfórico, foi produzido na primeira etapa da síntese de 7-hidroxiflavona, através da condensação do anidrido fosfórico e ácido fosfórico. Esse ácido é responsável por promover a esterificação do ácido cinâmico com o resorcinol. Posteriormente, ocorreu a condensação do ácido cinâmico com ácido polifósforico, seguido de sua protonação na qual, segundo BARREIROS (2005), é possível observar três estruturas de ressonância principais.

A etapa subsequente foi a esterificação com o resorcinol, que de acordo com TALAPATRA (1986) pode levar à formação dos neoflavonoides ou da flavanona. A depender das condições do meio, e do mecanismo seguido, essa esterificação pode resultar em pelo menos dois caminhos. O primeiro leva a perda do PPA seguida de ciclização e tautomerização, formando preferencialmente o 7-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina e em menor quantidade o 5-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina devido ao impedimento estérico que dificulta a ciclização entre os dois oxigênios. O segundo caminho é o que leva à formação da flavanona e pode ser justificado pelo rearranjo de Fries que ocorre antes da ciclização e da tautomerização.

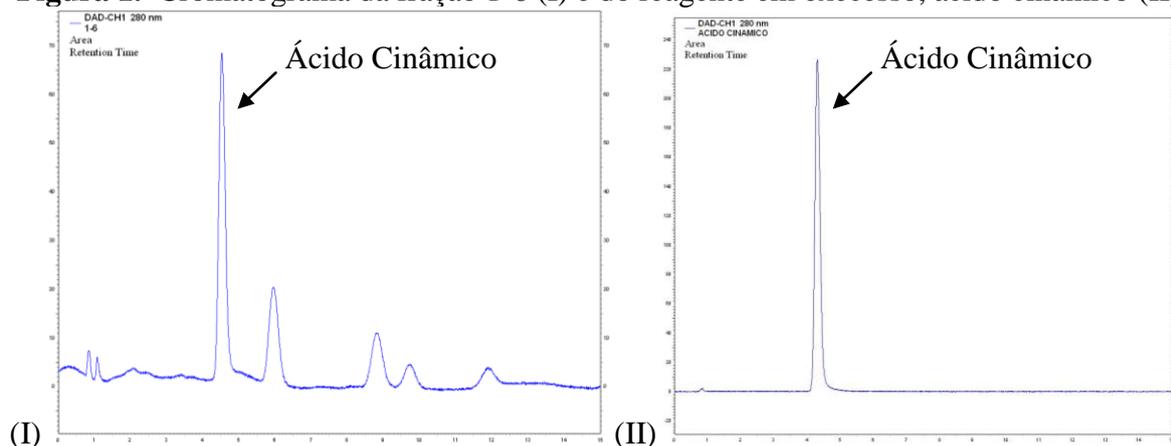
Os produtos resultantes da reação do ácido cinâmico com resorcinol foram tratados com  $\text{NaHCO}_3$ , sal ácido que apresenta hidrogênio ionizável, utilizado para neutralização parcial do ácido em excesso na reação. Além disso, o cloreto de cálcio, sal inorgânico anidro, foi empregado como agente secante que tem a capacidade de se ligar às moléculas de água, formando hidratos.

Após o término da síntese, procedeu-se com a etapa de separação e purificação dos produtos de interesse, através da análise cromatográfica. Diante dos resultados apresentados pelas 12 frações resultantes de CCDC após serem reveladas com Cloreto de Alumínio e Hidróxido de Potássio, foi possível sugerir que as frações 1-6 e 36-37 que apresentaram reação positiva para  $\text{AlCl}_3$  e  $\text{KOH}$  podem ser os neoflavonoides 7-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina e 5-hidroxi-3,4-diidro-4-fenilcumarina, isso porque os neoflavonoides apresentam semelhança estrutural das cumarinas. A fração 23-35 foi comparada por CCD com o ácido cinâmico e apresentou tempo de retenção semelhante, podendo ser o reagente excedente, ácido cinâmico. Sendo assim, pode-se dizer que a fração 38-45 com reação positiva para  $\text{AlCl}_3$  seja a 7-Hidroxiflavanona.

As frações que apresentaram resposta positiva aos reveladores cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ) e hidróxido de potássio ( $\text{KOH}$ ) foram injetadas no Cromatógrafo a Líquidos de Alta Eficiência para monitorar a eficácia na separação. Contudo, observou-se que os cromatogramas apresentaram mais de um pico, indicando que as amostras não estavam puras, e, portanto, a separação não foi eficaz (Figura 1-I). E o ácido cinâmico, reagente em excesso (Figura 1-II), encontrou-se presente em todas amostras analisadas.

Os cromatogramas dos padrões secundários e do produto da síntese em microescala não apresentaram uma boa separação dos componentes e não estavam 100% puros, isso se deve, possivelmente as condições cromatográficas. Visto que, a troca do equipamento pode ter influenciado de alguma forma no resultado da separação, sendo, necessário alterar o método cromatográfico para que se consiga maior resolutividade na separação dos picos. Além disso, no caso do produto da síntese em micro escala, que apresentou perfil cromatográfico diferente do apresentado pela fração 1-6 da síntese convencional, também pode ter ocorrido alguma interferência na realização da síntese em microescala. Isso porque, além dos erros inerentes ao processo experimental existe a possibilidade da ocorrência de erros sistêmicos, como por exemplo, oscilação da temperatura da placa de aquecimento, termômetro mal calibrado, entre outros, que afetaria a formação dos produtos.

**Figura 1.** Cromatograma da fração 1-6 (I) e do reagente em excesso, ácido cinâmico (II)



### CONSIDERAÇÕES FINAIS

A determinação do rendimento da síntese de flavonoides por cromatografia a líquidos de alta eficiência (CLAE) é de grande relevância, já que, devido à alta sensibilidade dos detectores desse cromatógrafo é possível utilizar quantidades mínimas de reagentes químicos. Tendo em vista os resultados obtidos será necessário alterar a metodologia utilizada na cromatografia a líquidos de alta eficiência, visando melhorar a separação das substâncias de interesse, para assim, quantificar os flavonoides sintetizados em microescala. Além disso, serão analisadas as possíveis interferências no processo de síntese. Contudo, como não houve tempo hábil para realizar todas as alterações e análises supracitadas, esses dados só poderão ser disponibilizados no plano de trabalho posterior, justificando-se a necessidade da renovação para dar continuidade no desenvolvimento do presente estudo.

### REFERÊNCIAS

- ADITYACHAUDHURY, N.; et al. Chalcones of *Flemingia chappar* Ham The Structure and Synthesis of Flemichappararin. **Tetrahedron**, v. 27, p. 2111 – 2117, 1971.
- BARREIROS, A. L. B. S. **Constituintes Químicos Bioativos de *Dioclea violacea***. 2005. 285f. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, UFBA, Salvador, 2005.
- BRANDÃO, H. N. **Testes de atividades biológicas em extratos vegetais e aplicação de cromatografia a líquidos de alta eficiência no isolamento, síntese e identificação de produtos naturais**. 2007. 92f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) - Instituto de Química, UFBA, Salvador, 2007.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Resolução, Agência Nacional de Vigilância Sanitária nº 899, de 29 de maio de 2003. **Diário Oficial da União**, Poder Executivo, Brasília, DF, 02 jun. 2003.
- TALAPATRA, B.; et al. Condensation of Phenols & Cinnamic Acids in Presence of Polyphosphoric Acid: A Novel Biogenetic-type Oxidative Self-cyclisation of *p*-Methoxycinnamic Acid to 7-Methoxycoumarin. **Indian Journal of Chemistry**, v. 25B, p. 1122 – 1125, 1986.
- WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 1995.
- ZUANAZZI, J. A. C. Flavonoides. 2. ed. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Org.) **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Florianópolis: Ed. UFRGS: UFSC. 2000. p.489-516.