



Desenvolvimento de métodos cromatográficos rápidos e robustos empregando modelagem matemática para quantificação dos compostos bioativos presentes no açafão-da-terra (Curcuma Longa L.)

Igor Bassetto*, Igor Miranda Santana, Márcia Cristina Breitreitz.

Palavras chaves: açafão-da-terra, compostos bioativos, cromatografia de fluido supercrítico (UHPSFC), Analytical Quality by Design.

1. Objetivo da Pesquisa

O principal objetivo deste trabalho é o desenvolvimento de métodos atuais de análise de curcuminoides no açafão da terra, com a estratégia *Analytical Quality by Design*, utilizando a técnica de cromatografia com fluido supercrítico de ultra alta eficiência (*Ultra High Performance Supercritical Fluid Chromatography*, UHPSFC)

2. Resultados

Para realizar os experimentos, foi utilizada uma matéria prima de curcumina, da qual foi preparada uma solução estoque de concentração a 1000 mg L^{-1} em metanol (solvente no qual os curcuminoides são solúveis) e, a partir da mesma, foi preparada uma solução 200 mg L^{-1} em acetonitrila. Essa solução foi utilizada nas etapas de determinação da seletividade das colunas disponíveis no laboratório.

Com o preparo de amostra definido, para planejar experimentos que determinassem a seletividade das colunas disponíveis no laboratório foi utilizado o software Fusion Quality by Design, (S-Matrix, EUA). Foram utilizadas 5 colunas disponíveis no laboratório (Torus 2-PIC, Viridis C18 SB, Aquity HSS C18 SB, Pentafluoro-Fenil, BEH) o volume de injeção foi fixado em 1 uL e a temperatura da coluna mantida em $40 \text{ }^\circ\text{C}$ o modificador escolhido nessa etapa foi o metanol, As corridas foram realizadas em modo gradiente variando as vazões de fase móvel de acordo com as dimensões das colunas utilizadas, tais informações de encontram na Tabela 1.

Em seguida, com a coluna mais promissora foi realizado um estudo de avaliação do modificador da fase móvel mais adequado para eluição dos compostos dentre metanol, etanol, isopropanol e uma solução de acetonitrila:metanol (40:60).

Tabela 1: Colunas utilizadas para o estudo de seletividade

| Coluna | Dimensões (mm) | Tamanho de partícula (um) | Vazão (mL min ⁻¹) |
|-------------------|----------------|---------------------------|-------------------------------|
| Torus 2-PIC | 2,1 x 30 | 1,7 | 1,0 |
| Viridis C18 SB | 2,1 x 100 | 1,8 | 0,75 |
| Aquity HSS C18 SB | 2,1 x 100 | 1,8 | 0,75 |
| Pentafluoro-Fenil | 4,6 x 150 | 2,5 | 1,0 |
| BEH | 2,1 x 50 | 1,7 | 1,0 |

Para cada coluna foi avaliada a sua capacidade de separar os compostos presentes na matéria prima (Curcumina, Demetoxicurcumina, Bisdemetoxicurcumina) os resultados obtidos para as colunas se encontram nas Figuras de 1 a 5.

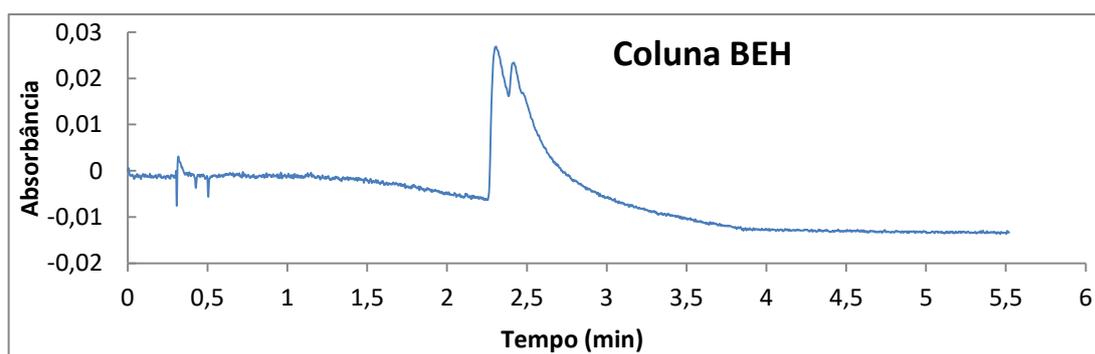


Figura 1: Cromatograma da matéria-prima curcumina na coluna BEH.

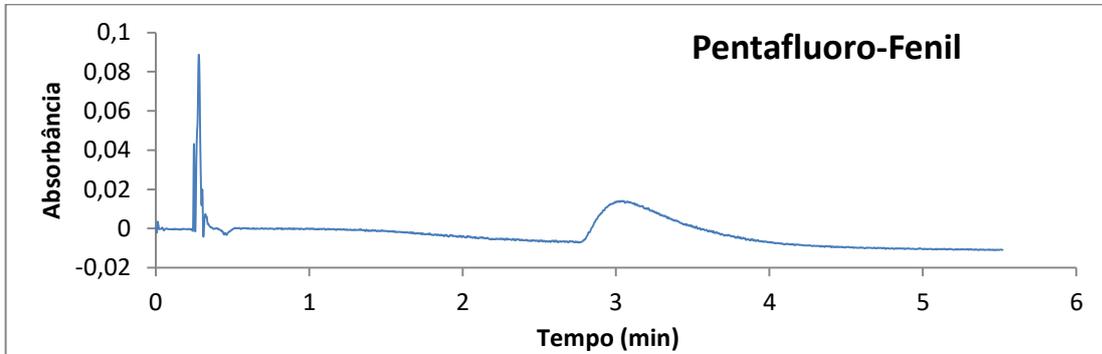


Figura 2: Cromatograma da matéria-prima curcumina na coluna Pentafluoro-Fenil.

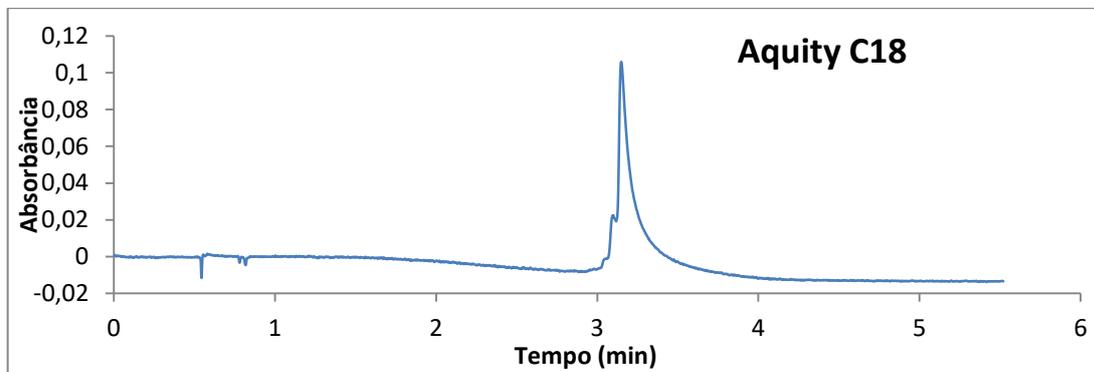


Figura 3: Cromatograma da matéria-prima curcumina na coluna Acquity HSS C18 SB.

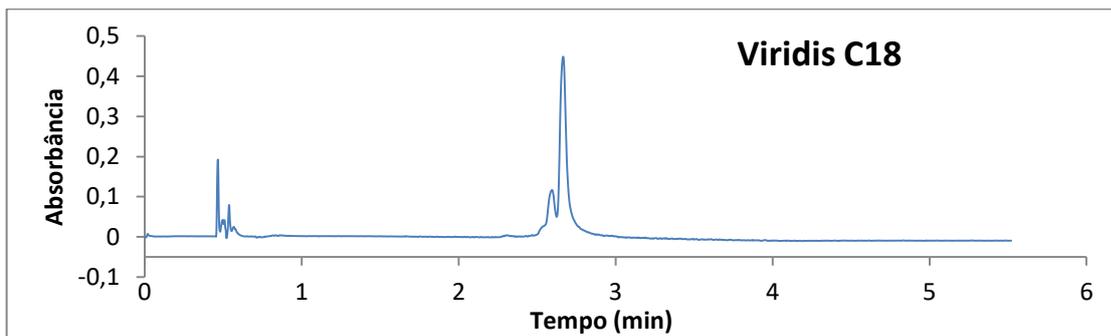


Figura 4: Cromatograma da matéria de curcumina na coluna Viridis HSS C18 SB.

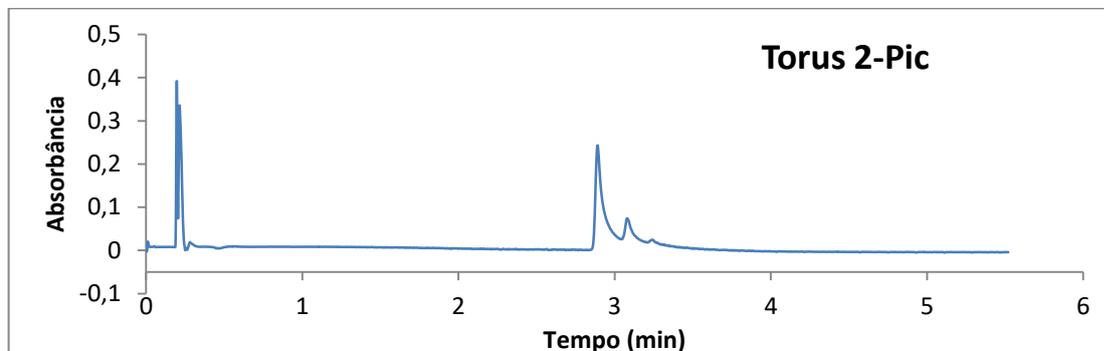


Figura 5: Cromatograma da matéria-prima de curcumina na coluna Torus 2-PIC.

Com base nos cromatogramas obtidos, foi possível observar que as colunas que resultaram em melhor seletividade para os compostos foram as colunas Viridis C18 e Torus 2-PIC, então as mesmas foram submetidas a próxima etapa que estuda o melhor modificador orgânico

Foi possível observar também que houve uma inversão da ordem de eluição dos compostos na coluna Veridis C 18 para a Torus 2-PIC, uma vez que na matéria prima de curcumina, sempre há uma maior concentração de curcumina, seguida de Demetoxicurcumina e por último Bisdemetoxocurcumina, gerando picos com áreas diretamente proporcionais a essas concentrações.

Definidas as melhores fases estacionárias para o processo, foi realizado então um estudo do modificador orgânico na fase móvel com o modificadores descritos anteriormente.

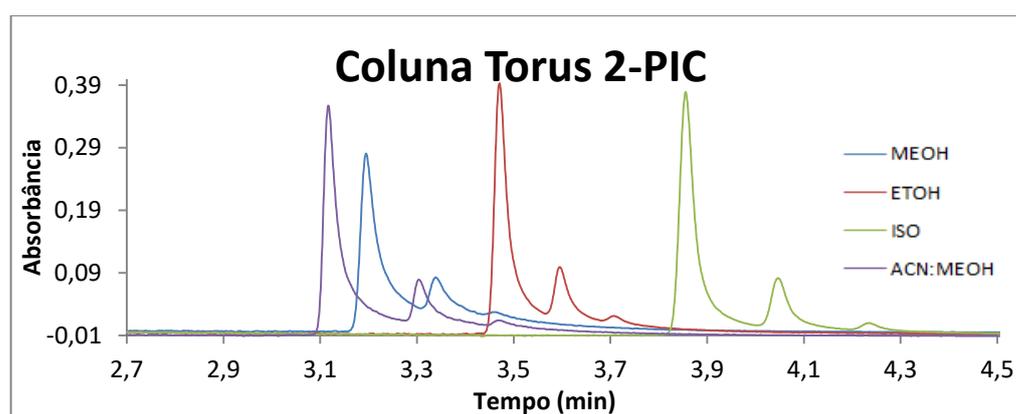


Figura 6: Resultados obtidos para coluna Torus 2-PIC para diferentes modificadores orgânicos. (Cromatograma cortado para visualizar em maiores detalhes a região de 2,7 a 4,5 minutos)

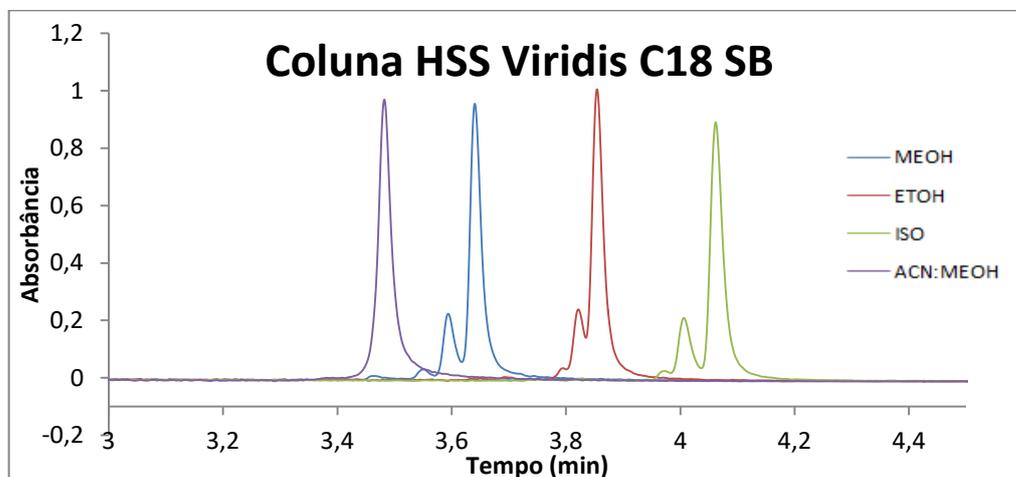


Figura 7: Resultados Obtidos para coluna Viridis HSS C18 SB para diferentes modificadores orgânicos. (Cromatograma cortado para visualizar em maiores detalhes a região de 3,0 a 4,5 minutos)

Com isso foi possível observar que o isopropanol aumentou a resolução dos compostos em ambas as colunas. Os cromatogramas apresentados possuem diferentes concentrações iniciais de modificador (isopropanol) na fase móvel para a coluna Viridis HSS C18 SB a concentração inicial foi de 2% e para a coluna Torus 2-PIC foi de 10%.

A próxima etapa do seria checar o efeito do diluente da amostra e aplicar o planejamento experimental para avaliar a influência das variáveis pressão, temperatura, composição da fase móvel (em gradiente) e vazão de um modo multivariado para otimizar a separação e poder posteriormente quantificar os compostos na matéria prima. Entretanto devido a limitações impostas pela pandemia de COVID-19 que impediram a conclusão dos trabalhos realizados, essas etapas serão realizadas em trabalhos posteriores a esse.