

GABRIEL MAZZI LEME

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE PARA
DOCUMENTAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E
ESTUDOS METABOLÔMICOS**

**Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari**

**Araraquara
2015**

GABRIEL MAZZI LEME

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO POR CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE PARA
DOCUMENTAÇÃO QUÍMICA DE EXTRATOS VEGETAIS E
ESTUDOS METABOLÔMICOS**

Tese apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos
requisitos para obtenção do título de Doutor em
Química.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro
Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Araraquara
2015

DADOS CURRICULARES

Dados pessoais

Data de nascimento: 15/09/1986
Local: Guariba, São Paulo, Brasil.

Sexo: masculino
Estado civil: solteiro.

Endereço: Rua Gavião Peixoto, n°. 749. Bloco 09, Ap. 201
CEP: 14801-029 – Araraquara, São Paulo – Brasil.
Telefone: +55 (16) 988130362
E-mail: gabrielmazzi@gmail.com
Filiação: Antonio Carlos Leme e Denizi Mazzi Leme

Formação acadêmica

2011 - 2015 Doutorado em Química.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, Brasil.

Título: Desenvolvimento de método por cromatografia líquida bidimensional para documentação química de extratos vegetais e estudos metabólicos.

Orientador: Prof. Dr. Alberto José Cavalheiro

Co-orientador: Prof. Dr. Cristiano Soleo de Funari

Bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

Bolsista do **Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduíche no Exterior** (PDSE), oferecido pela *Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior* (CAPES). Estágio de pesquisa no Departamento de Farmácia, *Università Degli Studi di Messina* (Messina, Itália), sob supervisão do Professor Doutor Luigi Mondello (julho a dezembro de 2013).

Supervisão científica: Sandra Gunesch, bolsista do programa de intercâmbio IAESTE (setembro e outubro de 2014).

2009 - 2011 - Mestrado em Química.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, Brasil.

Título: Desenvolvimento de método analítico para estudo metabólico de cana-de-açúcar.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Vanderlan da Silva Bolzani

Bolsista CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)

2004 - 2008 – Graduação em Bacharelado em Química Tecnológica.

Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, UNESP, Instituto de Química de Araraquara, São Paulo, Brasil.

Iniciação Científica no Departamento de Físico-Química, sob supervisão do Prof. Dr. Antonio Carlos Guastaldi.

Título: Estudo de ligas metálicas Ti-Mo aplicadas como biomaterial para implantes.

Experiência profissional e acadêmica

- Químico de aplicação / vendedor na empresa SINC do Brasil – Instrumentação Científica Ltda. (a partir de março de 2015).
- Estágio de docência na disciplina “*Métodos Analíticos de Separação*”, realizado no período de agosto a dezembro de 2012 - IQ - UNESP, com uma carga horária de 60 horas.
- Estágio de docência na disciplina “*Química Orgânica Experimental I*” realizado no período de março a julho de 2012 - Instituto de Química - UNESP, com uma carga horária de 60 horas.
- Estágio supervisionado, na empresa “*Whitford do Brasil LTDA*”, trabalhando diretamente no controle de qualidade de tintas antiaderentes. Américo Brasileiro, São Paulo (junho a outubro de 2008).

Idiomas

Inglês: compreende, fala, escreve e lê bem.

Espanhol: compreende e lê razoavelmente.

Áreas de Interesse

- Química de produtos naturais;
- Cromatografia.

Participações em eventos científicos

- II Workshop de Bioenergia (BIOEN/FAPESP). Rio Claro/SP, Brasil, 2014.
- VIII Reunião de avaliação do programa BIOTA/FAPESP. São Pedro/SP, Brasil, 2014.
- Congresso Latino-Americano de Cromatografia (COLACRO). Cartagena de Indias, Colômbia, 2014.
- Incontri di Scienza delle Separazioni (SepSci). Messina, Itália. 2013.
- Congresso Latino-Americano de Cromatografia (COLACRO). Florianópolis/SC, Brasil, 2012.
- 3rd Brazilian Conference on Natural Products (BCNP). Ouro Preto/MG, Brasil, 2011.
- ENQUALAB 2010 - Congresso da Qualidade em Metrologia. São Paulo/SP, Brasil, 2010.
- 33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia/SP, Brasil, 2010.
- Biota FAPESP International Workshop on Metabolomics in the Context of System Biology: A Rational Approach to Search for Lead Molecules from Nature. São Paulo/SP, Brasil, 2010.
- International Metabolomics Course and Workshop. Leiden, The Netherlands. 2010.
- 3º Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas - BrMASS. Campinas / SP, Brasil, 2009.
- Workshop BIOEN on Sugarcane Improvement - Biomassa para Bioenergia. São Paulo/SP, Brasil, 2009.
- Escola de Produtos Naturais: Alcalóides. Araraquara/SP, Brasil, 2009.
- Workshop BIOEN on Metabolomics Sugarcane. São Paulo/SP, Brasil, 2009.
- Workshop Rede Temática de Mudanças Climáticas - USP. São Paulo/SP, Brasil, 2009.
- Congressos de Iniciação Científica da UNESP. 2008, 2007, 2006.

Apresentações relevantes / Trabalhos publicados

- Ferreira, V; **Leme, G M**; Funari, C S; Cavalheiro, A J. On-line coupling of extraction, clean up, separation and spectrometric analysis of complex matrices: eliminating sample preparation step. (manuscrito em preparação).
- Leme, G M; Funari, C S; Cavalheiro, A J. *Orthogonality evaluation for LC×LC method development based on real sample fingerprint and fractional coverage surface*. (Apresentação oral no XV Congresso Latino-Americano de Cromatografia – trabalho premiado).
- Leme, G M; Cacciola, F; Donato, P; Cavalheiro, A J; Dugo, P; Mondello, L. Continuous vs. segmented second dimension system gradients for comprehensive two-dimensional liquid chromatography of sugarcane (*Saccharum spp.*). **Analytical Bioanalytical Chemistry**, 406, p.4315-4324, 2014.
- Leme, G M; Coutinho, I D; Creste, S; Hojo, O; Carneiro, R L; Bolzani, V S; Cavalheiro, A J. HPLC-DAD method to metabolome fingerprinting to the phenotyping of sugarcane genotypes. **Analytical methods**, 6, p.7781-7788, 2014.
- Coqueiro, A; Regasini, L O; **Leme, G M**; Polese, L; Nogueira, C; Del Cistia, M; Graminha, M; Bolzani, V S. Leishmanicidal activity of *Brosimum glaziovii* (Moraceae) and chemical composition of the bioactive fractions by using High-Resolution Gas Chromatography and GC-MS. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 25, p.1839-1847, 2014.
- Cavalheiro, A J; Coutinho, I D; **Leme, G M**; Silva, A A; Silva, A P D. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia In: Bioenergia: desenvolvimento, pesquisa e inovação. 1ª ed. São Paulo. Cultura Acadêmica, 2012, v.1, p. 15-34.

*Aos meus caríssimos pai, mãe e irmão,
sem os quais eu não teria finalizado nem o Jardim I.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Seu Toninho e Dona Denizi, meus maiores exemplos de humanidade. Vocês são os pais que eu quero ser um dia...

Ao meu irmão, meu maior exemplo de profissional, músico, amigo, plantador de bananeiras, saltador... Obrigado por estar por perto!

Ao Prof. Alberto Cavalheiro, pelo incentivo, confiança, ensinamentos, toneladas de experimentos, fins de semana no laboratório e sobretudo, pela amizade.

Ao Prof. Cristiano Funari pelas intermináveis discussões e suporte ao trabalho e pelo amigo próximo que se tornou.

Aos meus caríssimos Fernando Passareli e Paula Bueno pela amizade e paciência de ouvir histórias e lamentações sobre válvulas e modulações.

À minha caríssima Isabel Coutinho e sua banda - Luiz Dutra e as pequeninhas.

Ao amigo Phaniel Saroni (in memoriam), que em tão pouco tempo e sem saber, me ensinou tanta coisa...

À minha “truta” Bianca Abib – a irmã que eu não tive! Se por algum motivo eu fosse preso, você provavelmente seria cúmplice.

À minha querida Wanessa, pela paciência e carinho.

Aos amigos do NuBBE, pela convivência e trocas de experiência.

Às agências de fomento pelo apoio financeiro, especialmente à CAPES, pela bolsa concedida.

... a vontade é de escrever aqui TODOS os nomes daqueles que compartilharam de qualquer momento supimpa durante esse tempo (e foram muitos!), mas o espaço é curto e a memória é fraca, então deixo implícito!

Muito obrigado!!!

*"Às vezes, não há nenhum aviso. As coisas acontecem em segundos.
Tudo muda.
Você está vivo.
Você está morto.
E as coisas continuam.
Somos finos como papel.
Existimos por acaso entre as percentagens, temporariamente.
E esta é a melhor e a pior parte: o fator temporal.
E não há nada que se possa fazer sobre isso. Você pode sentar no topo de uma
montanha e meditar por décadas e nada vai mudar.
Você pode mudar a si mesmo para ser aceitável, mas talvez isso também esteja errado.
Talvez pensemos demais.
Sinta mais, pense menos."
Charles Bukowski*

RESUMO

Apesar dos recentes avanços em cromatografia líquida monodimensional, a complexidade de algumas amostras exige o emprego de técnicas de separação capazes de oferecer maior poder de resolução e capacidade de picos. Como consequência, o desenvolvimento de técnicas cromatográficas bidimensionais abrangentes (LC×LC, GC×GC, LC×GC) tem recebido atenção crescente nos últimos anos. A principal vantagem dessas técnicas comparadas às técnicas tradicionais é a maior capacidade de picos e possibilidade de se empregar diferentes mecanismos de separação em cada dimensão. O maior desafio relacionado à otimização de métodos desta natureza está relacionado à seleção de complexos parâmetros experimentais, frequentemente baseada na experiência do analista ao invés de rigorosamente estruturada em estratégias teoricamente embasadas. A primeira e mais importante etapa no processo de otimização de métodos LC×LC é a seleção do par cromatográfico (fase estacionária e fase móvel, ¹D e ²D). Quando a amostra é precisamente conhecida, algumas características podem servir como um guia qualitativo na seleção destes parâmetros; em outros casos, padrões “representativos” podem ser empregados para avaliar a correlação entre os sistemas ¹D e ²D, porém, quando pouca ou nenhuma informação é disponível, esta continua sendo uma tarefa difícil. Este trabalho apresenta uma nova estratégia de seleção do par cromatográfico empregando amostras reais de extrema complexidade e cálculos de recobrimento da superfície de separação, além da otimização de métodos em cromatografia líquida bidimensional abrangente baseada em planejamentos estatísticos. A amostra selecionada para o desenvolvimento do método foi uma mistura de extratos vegetais previamente estudados pelo grupo de pesquisa, contendo uma vasta diversidade de metabólitos com diferentes características estruturais e conseqüentemente, diferentes desafios a serem superados na separação cromatográfica. Empregando tal estratégia e condições abrangentes de eluição, foi possível selecionar o par de colunas e modificadores orgânicos para a primeira e segunda dimensões cromatográficas e otimizar parâmetros como vazão, tempo de análise e tempo de modulação. A partir dos cromatogramas bidimensionais obtidos com as condições otimizadas, diferentes métodos de eluição foram avaliados para a segunda dimensão cromatográfica. Finalmente, o método abrangente desenvolvido e otimizado foi aplicado à diferentes amostras vegetais separadamente, confirmando a possibilidade do seu uso na obtenção de *fingerprints* metabólicos que possam ser empregados na comparação e/ou classificação de amostras.

Palavras-chave: LC×LC; cromatografia líquida bidimensional abrangente, *fingerprint*, metabolômica.

ABSTRACT

Despite recent advances in monodimensional liquid chromatography, the complexity of some samples requires the use of separation techniques that can provide greater resolving power and peak capacity. As a consequence, the development of comprehensive two-dimensional chromatographic techniques (LC×LC, GC×GC, LC×LC) has received increasing attention in recent years. The main advantage of these techniques compared to traditional techniques is the largest peak capacity and possibility to employ different separation mechanisms in each dimension. The biggest challenge related to method optimization of this kind of techniques is related to the selection of complex experimental parameters, often based on the analyst's experience rather than theoretically based strategies. The first and most important step in the method optimization process in LC×LC is the selection of the chromatography pair (stationary phase and mobile phase, ¹D and ²D). When the sample is precisely known, some features may serve as qualitative guidance in the selection of these parameters; in other cases, "representative" standards can be used to evaluate the correlation between ¹D and ²D systems, however, when little or no information is available, this remains a difficult task. This work presents a new strategy for the selection of the chromatographic pair using real and extremely complex samples and fractional coverage surface calculations, besides the method optimization in comprehensive two-dimensional liquid chromatography based on statistical designs. The sample selected for the method development was a mixture of plant extracts previously studied by the research group and containing a wide diversity of metabolites with distinct structural characteristics and therefore different challenges to be overcome in the chromatographic separation. Employing such strategy and comprehensive elution conditions, it was possible to select the pair of columns and organic modifiers to the first and second chromatographic dimensions and optimize parameters such as flow rate, analysis times and modulation time. From the two-dimensional chromatograms obtained with optimized conditions different elution methods were assessed for the second chromatographic dimension. Finally, the comprehensive method developed and optimized was applied to different plant extracts separately, confirming the possibility to obtain metabolic fingerprints that may be used for the comparison and/or sample classification.

Keywords: LC×LC; comprehensive two-dimensional liquid chromatography; fingerprint; metabolomics.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Formas de gradiente que podem ser empregados em LC×LC: (a) *Full in Fraction*, (b) *Segment in Fraction*, (c) *Continuously Shifting*, (d) *Shift Gradients*..... 10
- Figura 2. (a) Gradientes empregados nos testes de tempo de recondicionamento (t_e) das colunas ²D: 0,5 min; 0,4 min; 0,3 min; 0,2 min de t_e . (b) em detalhe, etapas de recondicionamento..... 19
- Figura 3. Procedimento para obtenção do valor de ocupação da superfície bidimensional (a) obtenção do cromatograma bruto; (b) conversão em cromatograma bidimensional (usando o *software* GCIImage); (c) detecção automática dos picos pelo *software*; (d) dados exportados no formato de uma tabela de picos com tempos de retenção em ¹D e ²D; (e) normalização dos dados e geração de um cromatograma 2D “virtual” empregando a planilha desenvolvida por Gilar e colaboradores^{70; 123} 23
- Figura 4. Método de limpeza e recondicionamento em ¹D, empregado entre as análises. 25
- Figura 5. Método de limpeza e recondicionamento em ²D, empregado entre as análises. 25
- Figura 6. Cromatograma bidimensional obtido com as condições otimizadas e modo de eluição *Full in Fraction* em ²D. Em destaque, a área efetivamente ocupada pelos picos. Amostra: extrato de folhas de cana-de-açúcar; detecção no UV a 254 nm..... 26
- Figura 7. Proposta de segmentação (2 segmentos) a partir da visualização do cromatograma bidimensional..... 27
- Figura 8. Cromatogramas monodimensionais das amostras vegetais selecionadas (coluna Kinetex C18, 150 x 4,6 mm, 2,6 μ m; fase móvel (A) água e (B) metanol, acidificados com 0,05% de ácido fórmico; gradiente: 0 min, 5% B; 30 min, 100% B; 40 min, 100% B; vazão: 1 mL/min; detecção CAD e UV a 254 nm, respectivamente). 30
- Figura 9. Cromatograma obtido utilizando a configuração adotada nos testes de tempo de recondicionamento (t_e) da coluna Discovery HSF5 (4,6 mm x 33 mm, 3 μ m), com MeOH (cores separando os diferentes tempos de equilíbrio, sendo, da esquerda para a direita, de 0,5; 0,4; 0,3 e 0,2 min)..... 36
- Figura 10. Comparação entre os plots bidimensionais obtidos empregando (a) software comercial LC Image e (b) conversão *home-made*..... 38

- Figura 11. Ocupação relativa do espaço de separação das 24 combinações experimentais avaliadas (em azul, intervalo entre a média \pm desvio padrão) para o extrato de folhas de cana-de-açúcar. 40**
- Figura 12. Cromatogramas bidimensionais das condições 7 e 12; (a) ¹D C18/ACN, ²D Phenyl/ACN; (b) ¹D Hydro/ACN, ²D PFP/MeOH. Condições cromatográficas: ¹D: 0 min, 10% B/C, 100min, 100% B/C, 120min, 100% B/C a uma vazão de 10 μ L/min. ²D: 0-0,1 min, 5% B/C, 0,1-1,3 min, 5-100% B/C, 1,3-1,5 min, 100% B/C, 1,5-1,51 min, 100-5% B/C, 1,51-2,0 min, 5% B/C, vazão de 3,0 mL/min. Modulações de 2,0 min. Detecção a 254 nm..... 41**
- Figura 13. Derivado esterificado do ácido protocatecuico..... 44**
- Figura 14. Separação cromatográfica dos 7 padrões selecionados. Coluna Kinetex PFP (4,6 x 3,0 cm; 2,6 μ m), gradiente linear, 0 min, 5% C; 10 min, 100% C, 2 mL/min. ((C) ACN + 0,05% ácido fórmico)..... 44**
- Figura 15. Separação cromatográfica dos 7 padrões selecionados. Coluna Kinetex PFP (4,6 x 3,0 cm; 2,6 μ m). Gradiente linear (a) 0 min, 5% B; 10 min, 100% B; (b) 0 min, 12,5% C; 10 min, 100% C; (c) 0 min, 12,5% C; 10 min, 65% C; 2 mL/min. ((C) ACN + 0,05% ácido fórmico)..... 45**
- Figura 16. Separação LC \times LC de extrato de folhas de cana-de-açúcar. ¹D coluna Synergi Hydro (150 x 1 mm, 4 μ m), gradiente linear 0 min, 5% B, 120 min, 100%B, 10 μ L/min ; ²D coluna Kinetex PFP (4,6 x 30 mm, 2,6 μ m), (a) FIF, 0 min, 5%B; 1,3 min, 100%B, (b) SIF, 1^o segmento (0-40 min) 0 min, 5% B, 1,3 min, 55% B; 2^o segmento (42-80 min) 0 min, 16% B, 1,3 min, 71% B; 3^o segmento (82-120 min) 0 min, 51% B, 1,3 min, 80% B. 46**
- Figura 17. Região compreendida entre 62 e 68 min (referente a três modulações consecutivas), dos cromatogramas apresentados anteriormente. (a) FIF, (b) SIF..... 46**
- Figura 18. Ocupação relativa do espaço de separação das 16 combinações experimentais avaliadas (em azul, intervalo entre a média \pm desvio padrão) para a mistura de extratos. 50**
- Figura 19. Cromatogramas 2D das condições 12 e 7; (a) ¹D C18/ACN, ²D Phenyl/ACN; (b) ¹D Hydro/ACN, ²D PFP/MeOH. Condições cromatográficas: ¹D: 0 min, 10% B/C, 100min, 100% B/C, 120min, 100% B/C a uma vazão de 10 μ L/min. ²D: 0-0,1 min, 5% B/C, 0,1-1,3 min, 5-100% B/C, 1,3-1,5 min, 100% B/C, 1,5-1,51 min, 100-5% B/C, 1,51-2,0 min, 5% B/C, vazão de 3,0 mL/min. Modulações de 2,0 min. Detecção a 254 nm. 51**
- Figura 20. Cromatograma 2D da mistura de extratos, empregando gradiente segmentado (SIF). Em destaque, região de interface entre diferentes segmentos e picos possivelmente duplicados. 52**

Figura 21. Condições avaliadas e cromatogramas bidimensionais obtidos.	53
Figura 22. Cromatograma 2D da mistura de extratos, empregando modo de eluição <i>Shift Gradients</i> (detecção no UV a 254 nm e CAD, respectivamente).....	55
Figura 23. Cromatogramas bidimensionais de diferentes espécies vegetais. Condições experimentais apresentadas na Tabela 10 (detecção no UV a 254 nm e CAD, respectivamente).....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Gradiente configurado para a determinação do tempo de recondicionamento das colunas avaliadas.	20
Tabela 2. Colunas e solventes avaliados na etapa de seleção do par cromatográfico.	21
Tabela 3. Combinações experimentais avaliadas na etapa de seleção do par cromatográfico.....	22
Tabela 4. Fatores e níveis avaliados na etapa de seleção de variáveis.....	24
Tabela 5. Fatores e níveis empregados no planejamento composto central.	26
Tabela 6. Espécies vegetais selecionadas e respectivos valores de rendimento de extração empregando as condições descritas em 3.5 <i>Preparo das amostras</i>	29
Tabela 7. Valores mínimos ideais de volume de recondicionamento obtidos para diferentes colunas destinadas à ² D.....	36
Tabela 8. Combinações experimentais empregadas na etapa de seleção dos sistemas cromatográficos e respectivas áreas relativas ocupadas (amostra: extrato de folhas de cana-de-açúcar).....	39
Tabela 9. Dados referentes à avaliação da repetibilidade do método proposto.....	48
Tabela 10. Combinações experimentais empregadas na etapa de seleção dos sistemas cromatográficos e respectivas áreas relativas ocupadas (amostra: mistura de extratos).....	49
Tabela 11. Condições experimentais otimizadas, empregando gradientes deslocados (<i>Shift Gradients</i>) em ² D.	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	monodimensional
2D	bidimensional
¹D	1ª dimensão
²D	2ª dimensão
ACN	Acetonitrila
ANOVA	<i>Analysis of Variance</i> (Análise de Variância)
CAD	<i>Charged Aerosol Detector</i> (Detector de Aerossol Carregado)
CCD	<i>Central Composite Design</i> (Planejamento Composto Central)
C18	Octadecilsilano
CV%	Coefficiente de Variação Percentual
d.i.	Diâmetro Interno
DAD	<i>Diode Array Detector</i> (Detector de Arranjo de Diodos)
DIMS	<i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas por Infusão Direta)
EtOH	Etanol
SIF	<i>Segmented in Fraction</i>
FIF	<i>Full in Fraction</i>
CS	<i>Continuously Shifting</i>
SG	<i>Shift Gradients</i>
FE	Fase Estacionária
FM	Fase Móvel
GC	<i>Gas Chromatography</i> (Cromatografia Gasosa)
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i> (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência)
IPA	Isopropanol

MeOH	Metanol
MS	<i>Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas)
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i> (Ressonância Magnética Nuclear)
ppm	Partes por milhão
RP	<i>Reversed Phase Mode</i> (Modo Reverso)
RSM	<i>Response Surface Methodology</i> (Metodologia de Superfície de Resposta – MSR)
SD	<i>Standard Deviation</i> (Desvio Padrão)
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i> (Extração em Fase Sólida)
u.a.	Unidades Arbitrárias
UV	Ultravioleta
V_m	Volume morto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Cromatografia líquida bidimensional abrangente	3
1.2.	Fingerprints metabólicos.....	10
2	OBJETIVOS	14
3	MATERIAIS E MÉTODOS	14
3.1.	Estratégia experimental.....	14
3.2.	Reagentes e materiais	15
3.3.	Métodos cromatográficos.....	16
3.4.	Material vegetal	17
3.5.	Preparo das amostras.....	18
3.6.	Estudos de recondicionamento do sistema (coluna ² D).....	19
3.7.	Desenvolvimento do método cromatográfico	20
3.7.1	Seleção do par cromatográfico (FE/FM, ¹ D, ² D)	20
3.7.2	Seleção das variáveis relevantes na otimização – Planejamento Fatorial Fracionário.....	23
3.7.3	Otimização (Planejamento Composto Central)	26
3.7.4	Otimização do gradiente em ² D	26
3.8.	Estudo da repetibilidade do método	28
3.9.	Aplicação da proposta de otimização a diferentes amostras	29
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	29
4.1.	Seleção das amostras vegetais e preparo das amostras	29
4.2.	Estudos de recondicionamento do sistema (coluna ² D).....	35
4.3.	Transformação e visualização dos dados.....	36
4.4.	Desenvolvimento do método cromatográfico	38
4.4.1	Seleção do par cromatográfico (para cana-de-açúcar)	38
4.4.2	Seleção das variáveis relevantes na otimização – Planejamento Fatorial Fracionário (2^{n-2}).....	41
4.4.3	Otimização (Planejamento Composto Central)	42
4.4.4	Otimização do gradiente em ² D	43
	Segmentação (<i>Segment in Fraction</i>)	43
4.5.	Estudo da repetibilidade do método	47
4.6.	Aplicação da proposta de otimização a diferentes amostras	48
5	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	62

1 INTRODUÇÃO

A fitoquímica clássica, baseada na prospecção e isolamento de substâncias naturais com diferentes aplicações, tem enfrentado o dilema de como maximizar a descoberta de novos compostos, minimizando a repetição de processos e isolamentos de substâncias já descritas na literatura. Uma vez isolado, identificado e descrito, deveria ser possível identificar um composto a partir dessas informações, evitando a repetição do processo de isolamento e identificação. O processo de identificação rápida de compostos conhecidos em uma mistura e informações suficientes para priorizar o isolamento de outras é usualmente conhecido como “desrepliação” pela comunidade de químicos de produtos naturais¹. Além disso, considerando-se sistemas biológicos complexos e a necessidade de classificação ou identificação de biomarcadores específicos, abordagens holísticas são mais vantajosas em relação a estudos reducionistas usualmente empregados na química de produtos naturais.

Há tempos a cromatografia líquida de alta eficiência tem se mostrado como uma técnica confiável e reprodutível na identificação e quantificação de diversas substâncias, além de exigir um preparo de amostra relativamente simples². Apesar dos recentes avanços em cromatografia líquida unidimensional, incluindo o desenvolvimento de colunas preenchidas com partículas de tamanho inferior a 2 μm ^{3; 4; 5; 6}, emprego de colunas em série e operações a elevadas temperaturas^{7; 8; 9; 10}, o aumento na resolução dessa técnica é restrito ou insuficiente para a análise de misturas tão complexas como extratos vegetais⁷.

Misturas multicomponentes de extrema complexidade requerem técnicas de separação que ofereçam grande resolução. A medida que representa essa capacidade de separação é a capacidade de picos (n_c) que é definida como o número máximo de picos que podem ser ajustados entre o primeiro e o último pico de interesse, com boa resolução entre todos esses picos^{7; 11}. Em separações em gradiente, onde cada pico tem aproximadamente a mesma largura, a capacidade de picos pode ser aproximada em termos do tempo de gradiente como:

$$n_c = \frac{t_g}{W} \quad \text{Equação 1}$$

onde t_g é o tempo do gradiente e W a largura média dos picos. Na prática, a capacidade de separação pode ser definida como o número de picos resolvidos que

podem ser ajustados entre o primeiro e o último picos do cromatograma (e não necessariamente no começo e fim do gradiente). Essa medida é conhecida como capacidade de picos *equivalente*¹¹:

$$n_c = \frac{t_z - t_A}{W} \quad \text{Equação 2}$$

onde t_A e t_z referem-se os tempos de retenção do primeiro e último picos, respectivamente.

Estudos mostram que uma única dimensão cromatográfica é inadequada para a completa separação dos constituintes de matrizes complexas. Por este motivo, o desenvolvimento da cromatografia líquida bidimensional recebeu grande atenção durante os últimos anos. Nesta, a amostra é submetida a dois diferentes mecanismos de separação e o maior benefício desta configuração 2D é o drástico aumento na capacidade de picos, refletida na diminuição da sobreposição destes⁷.

A cromatografia líquida oferece uma grande variedade de mecanismos de separação: modo normal (NP), modo reverso (RP), modo HILIC, exclusão molecular (SEC), troca iônica (IC) ou afinidade (AC). Consequentemente, a cromatografia líquida bidimensional pode ser empregada em diversas combinações gerando um aumento da capacidade de picos, seletividade e resolução¹². Nesse contexto, a *ortogonalidade* entre as duas dimensões é de fundamental importância. Considera-se ortogonal a separação bidimensional que utiliza mecanismos distintos de separação e que apresentem perfis distintos de retenção, o que significa, em outras palavras, possuem seletividades diferentes.

A cromatografia líquida bidimensional pode ser desenvolvida em dois modos: *off-line* e *on-line*. A primeira, embora relativamente mais simples no que diz respeito à incompatibilidade entre fases móveis e estacionárias, é mais demorada, mais suscetível à perda ou contaminação da amostra além de oferecer baixa reprodutibilidade. O modo *on-line* é mais rápido e mais reprodutivo, porém necessita de interfaces específicas e apresenta maior complexidade operacional.

Técnicas cromatográficas bidimensionais abrangentes *online* são relativamente recentes, cuja principal vantagem em relação aos métodos tradicionais é o aumento da capacidade de picos devido a mecanismos de retenção distintos em cada dimensão, que favorece a separação de componentes de amostras muito complexas.

O desenvolvimento e a otimização de métodos cromatográficos desta natureza requerem o ajuste de diversos parâmetros a fim de efetuar separações com êxito. Devem ser avaliados a melhor combinação de colunas, buscando uma maior ortogonalidade^{13; 14; 15}, o uso de métodos em gradiente, com atenção especial à segunda dimensão, que requer pequenos tempos de análise¹⁶, o tempo de modulação¹⁷ dentre outros fatores.

Devido à grande capacidade de resolução, estas técnicas favorecem análises comparativas entre amostras, permitindo a identificação de características químicas (como similaridades ou diferenças na composição). Dentre as aplicações desse tipo de análises, pode-se destacar a classificação de amostras devido à formação de padrões químicos bidimensionais^{18; 19}, obtenção de *fingerprints*²⁰, monitoramento, agrupamento e identificação de marcadores²¹.

Embora a cromatografia líquida multidimensional abrangente apresente-se muito promissora na análise de matrizes complexas, a falta de *softwares* para processamento de dados é o maior obstáculo para sua efetiva aplicação mais ampla²². Devido a elevada eficiência, LC×LC gera uma quantidade de dados significativamente mais complexos quando comparados à cromatografia unidimensional, contendo muitas vezes mais pontos, além da dimensionalidade de dados adicional. A necessidade de métodos mais rápidos e robustos de análise de dados é discutida por diversos autores^{22; 23; 24}.

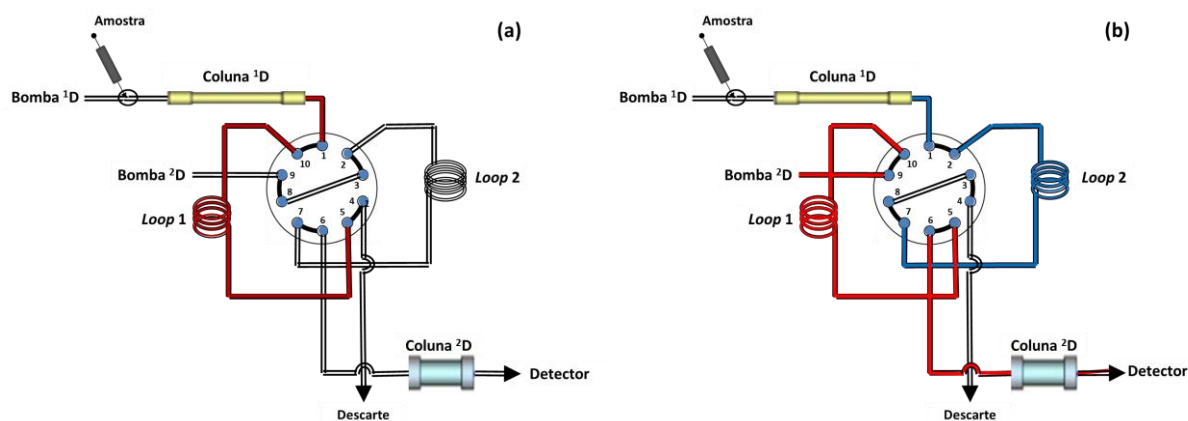
1.1. Cromatografia líquida bidimensional abrangente

Historicamente, a eficiência da cromatografia líquida monodimensional (1DLC) sofreu enormes avanços especialmente pela necessidade de separação de amostras de complexidade cada vez maior. Apesar de todos os avanços, amostras de diferentes origens (alimentos, ambientais, produtos naturais etc) são demasiadamente complexas para serem separadas por métodos monodimensionais usualmente empregados²⁵. Avanços pioneiros promissores^{8; 26} e considerações teóricas²⁷ direcionaram a atenção ao desenvolvimento de técnicas cromatográficas bidimensionais (2DLC). Obviamente, a fim de explorar a total potencialidade da técnica, otimizações são necessárias. Devido a inúmeros parâmetros e processos envolvidos, esta não é uma tarefa trivial.

Guiochon e colaboradores²⁸ revisaram alguns desenvolvimentos em 2DLC. O

foco principal da abordagem foi dado à cromatografia bidimensional abrangente *online* (LC×LC segundo a nomenclatura de Schoenmakers e colaboradores²⁹). Por “*online*” entende-se que a transferência das frações eluídas da primeira para a segunda dimensão é realizada no confinamento do sistema LC×LC, e então uma separação rápida é realizada na segunda dimensão (²D) de modo que, ao final, essa coluna esteja preparada para receber uma próxima fração e realizar uma nova separação. Dessa forma, deve-se garantir que todos os componentes da fração eluída de ¹D para ²D sejam eluídos antes da modulação seguinte, evitando assim a eluição tardia de compostos em modulações consecutivas (*wrap-around*) e que a coluna seja devidamente recondicionada, garantindo a repetibilidade dos tempos de retenção. Por “abrangente” entende-se que durante a análise, todas as frações eluídas de ¹D são transferidas para ²D. Obviamente esta transferência não é contínua e deve ser realizada periodicamente em frações de volume reduzido. Isso requer o uso de uma interface entre as duas dimensões. A Figura 1 apresenta o esquema de uma das possíveis configurações de sistemas LC×LC.

Figura 1. Representação de um sistema LC×LC empregando uma válvula de 10 portas e 2 posições na interface entre ¹D e ²D. (a) *loop 1* sendo preenchido pelo eluente de ¹D; (b) *loop 1* sendo esvaziado pela bomba da ²D e *loop 2* sendo preenchido pelo eluente de ¹D.



Separações LC×LC podem ser realizadas de dois modos. O método mais comum é chamado de *continuous low-flow operation*³⁰; outra opção é conhecida como método *stop-flow*³¹. Apesar de aspectos práticos terem sido abordados por diversos trabalhos^{14; 32; 33; 34}, abordagens dedicadas ao desenvolvimento e otimização de métodos para LC×LC ainda são restritas.

A otimização de métodos cromatográficos monodimensionais foi, por muito

tempo, o principal foco de diversos trabalhos: a predição de configurações ideais a fim de alcançar o maior poder de resolução em um menor tempo de análise possível, ou estimar condições a fim de separar analitos de interesse em determinado tempo de análise. Conhecidamente, *resolução* é resultado da eficiência, retenção e seletividade cromatográfica e diversas teorias foram elaboradas considerando esses parâmetros^{35; 36; 37; 38; 39}. Contrariamente, desenvolver um modelo geral de otimizações em LC×LC é muito mais complexo devido ao número de parâmetros envolvidos, além da dificuldade em considerar o sistema como um sistema único, onde qualquer alteração em uma dimensão pode ter consequências em ambas. Além disso, a diferença de seletividade entre os dois sistemas cromatográficos (fase móvel / fase estacionária) deve ser maximizada e essa questão ainda não é adequadamente discutida por nenhuma teoria. Finalmente, detectabilidade é um fator importantíssimo a ser considerado, uma vez que a diluição da amostra é muito mais significativa em LC×LC do que em LC. Horváth e colaboradores afirmam que a diluição dos analitos durante a migração entre as duas colunas é a maior desvantagem em análises deste tipo⁴⁰.

Devido a todas as dificuldades supracitadas, um modelo único de otimização de métodos LC×LC ainda é inviável. A principal consequência disso é que desenvolvimentos e otimizações são geralmente baseados na experiência do analista ao invés de estratégias teoricamente embasadas.

1.1 Descritores de qualidade na otimização de LC×LC

Refere-se a *otimização*, o processo de seleção de níveis e parâmetros que oferecem os melhores resultados para um ou mais descritores de qualidade. Em LC×LC, o objetivo final, em geral, é maior resolução no menor tempo de análise possível, o que os caracteriza como descritores de qualidade. No entanto, como já descrito anteriormente, a diluição é um fator importante a ser considerado em desenvolvimento de métodos desta natureza⁴¹. Resultados indicam que mesmo em experimentos cuidadosamente otimizados, a diluição dos analitos pode ser de 10 a 50 vezes, sendo ainda maior no caso de condições precariamente selecionada^{40; 42; 43}. Como resultado, a detecção de analitos em baixa concentração é comprometida. Dessa forma, os *limites de detecção* são também considerados como descritores de qualidade em separações LC×LC.

A capacidade de picos (n_C) é o principal descritor de qualidade de qualquer separação cromatográfica. Ela pode ser definida como o maior número de picos que podem ser separados em uma determinada janela de separação⁴⁴, com resolução mínima entre cada par. A capacidade de picos teórica em LC×LC, $n_{C,total}$, é igual ao produto das capacidades de picos de cada sistema monodimensional, conhecida como regra dos produtos^{45; 46}:

$$n_{C,total} = {}^1n_C \times {}^2n_C \quad \text{Equação 3}$$

onde ${}^1n_C \times {}^2n_C$ representam a capacidade de picos da primeira e segunda dimensão, respectivamente. No entanto, a capacidade de picos total (Equação 1) só é real em caso de completa ortogonalidade e quando a resolução de cada coluna independentemente é mantida. Infelizmente, atingir esses dois requisitos é praticamente impossível devido à falta de teorias que discutam a maximização da diferença de seletividades e a manutenção da capacidade de picos pelo chamado *undersampling* em ¹D e alargamento de picos em ²D⁴². Como resultado, $n_{C,total}$ é sempre menor do que o calculado a partir da Equação 1^{42; 47; 48; 49}. Vários autores discutem cálculos mais reais para a capacidade de picos considerando-se fatores de *undersampling* e ortogonalidade^{50; 51}.

O fenômeno chamado de *undersampling* refere-se à perda na capacidade de picos em 1D (1n_C) devido à recombinação de alguns compostos já separados, pela transferência do eluente de ¹D para ²D^{52; 53; 54}. Uma forma simples de minimizar a influência desse fenômeno é reduzir os tempos de amostragem em ¹D (*modulação*), no entanto, esse período determina o tempo de análise em ²D e quanto menor, menor a capacidade de picos que pode ser atingida na segunda dimensão. De fato, um dos fatores mais importantes a se considerar na otimização de métodos LC×LC em modo contínuo a baixas vazões é o compromisso entre *undersampling* e tempo de separação em ²D. Isso não é tão significativo quando se opera em modo *stop-flow*, uma vez que nesse caso, a amostragem em ¹D pode ser interrompida permitindo maiores tempos de análise em ²D. Embora esta possa ser uma alternativa interessante, este modo não tem sido amplamente empregado e/ou discutido devido ao maior tempo total de análise e possibilidade de alargamento de picos devido à dispersão longitudinal das bandas cromatográficas quando a vazão é interrompida. Este fato foi discutido por Kalili e colaboradores, que mostraram que apesar do maior tempo de análise, LC×LC em modo *stop-flow* apresentou

elevada capacidade de picos sem perdas significativas na resolução^{55; 56}.

Outro aspecto relevante a ser considerado na otimização de sistemas bidimensionais é o volume de amostra a ser transferido de ¹D para ²D: volumes muito grandes podem causar alargamento de bandas em ²D e conseqüente diminuição em ² n_c ; volumes muito pequenos oferecem problemas relacionados à detectabilidade. A recomendação geral é que os picos em ¹D devem ser fracionados de 3 a 4 vezes em sua largura^{31; 57; 58; 59}. Para minimizar o alargamento das bandas durante a transferência, a fração em ¹D deve ter uma força de eluição menor que a fase móvel em ²D para que assim, a fração seja concentrada como uma banda estreita no topo da coluna em ²D (*peak focusing*) e só então seja eluída pela fase móvel com maior força de eluição^{42; 60; 61}. Por este motivo, as fases móveis devem ser selecionadas, sempre que possível, de forma a favorecer essa focalização.

Em geral, a fim de contemplar os requisitos de amostragem e transferência de frações entre as dimensões, a separação ¹D deve ser desacelerada e realizada sob condições sub-ótimas de eficiência⁶²; a segunda dimensão deve ser rápida e eficiente^{47; 63}, empregando colunas curtas, porém de alta eficiência como colunas monolíticas^{64; 65} ou partículas parcialmente porosas^{66; 67; 68} em combinação com altas temperaturas^{47; 63}.

A ortogonalidade é um dos parâmetros mais importantes no desenvolvimento de métodos LC×LC e está diretamente relacionada à seletividade. A predição de parâmetros desta natureza requer informações de como a amostra interage com os dois sistemas cromatográficos (FE/FM, ¹D e ²D)⁶⁹.

Quando todo o espaço de separação é empregado, a ortogonalidade possui valor máximo e diz-se que os dois sistemas são “completamente ortogonais”. Esse caso só é possível se os fatores de retenção nas duas dimensões foram completamente independentes. Contrariamente, se os fatores de retenção forem totalmente correlacionados, os picos estarão distribuídos sobre a diagonal da superfície de separação e nesse caso, nenhuma informação adicional é obtida empregando-se sistemas bidimensionais. Separações LC×LC requerem elevado grau de ortogonalidade e elevadas eficiências em ambas as dimensões.

Devido à complexidade das amostras submetidas à LC×LC, extrair informações de seletividade de cromatogramas monodimensionais repletos de picos pode ser uma tarefa difícil. Por este motivo, alguns trabalhos descrevem o emprego de

compostos representativos da amostra para este tipo de avaliação, no entanto, essa alternativa é inviável quando se tem pouca ou nenhuma informação sobre a amostra⁶⁹. Essa alternativa é ainda mais difícil quando a amostra em questão é um produto natural (como extratos de plantas) e o número de padrões cromatográficos disponíveis no mercado é ainda mais limitado.

Nesses casos, a amostra em si é empregada para otimização da ortogonalidade, porém, modelos gerais para este tipo de seleção ainda não existem. Alguns trabalhos avaliam a ortogonalidade de sistemas cromatográficos pela correlação de tempos de retenção e relação m/z , empregando a própria amostra em diferentes condições cromatográficas em experimentos monodimensionais⁷⁰. Quando as propriedades da amostra são conhecidas, o conceito de *dimensionalidade da amostra* pode ser uma boa orientação para a seleção do par cromatográfico⁷¹. Giddings refere-se à dimensionalidade da amostra, pelo “*número de variáveis independentes que devem ser especificadas para identificar os componentes da amostra*”⁷¹. Por exemplo, os tempos de retenção de uma amostra contendo ácidos graxos insaturados são dependentes da massa molar (ou número de carbonos na cadeia) e por essa razão esta amostra é “monodimensional”. Contrariamente, uma mistura de peptídeos possui pelo menos duas “dimensões”, relacionadas ao tamanho molecular e carga. A dimensionalidade da amostra tem sido empregada com sucesso para maximizar condições de ortogonalidade em diferentes aplicações como, por exemplo, na separação de estereoisômeros de oligômeros⁷² e triacilgliceróis em matrizes lipídicas⁷³.

Apesar de inicialmente considerados pouco ortogonais, sistemas RPLC×RPLC têm sido empregados com sucesso otimizando-se as condições de gradiente de cada dimensão^{39; 74; 75}. Esse tipo de combinação apresenta certas vantagens como a ampla variedade de substâncias que podem ser separadas em modo reverso; eficiência e diversidade de seletividades de fases estacionárias comercialmente disponíveis³⁹ que operam nesse modo cromatográfico; compatibilidade entre fases móveis dentre outras.

A seleção do gradiente apropriado na segunda dimensão afeta significativamente a resolução e a distribuição de picos pela superfície de separação (e conseqüentemente, a ortogonalidade). Gradientes em ²D podem cobrir uma variação completa ou limitada de composição de fase móvel em um curto tempo de

separação. Foram classificados por Jandera como *Full in Fraction* (FIF), *Segment in Fraction* (SIF) e *Continuously Shifting* (CS)⁷⁶. Recentemente classificado e discutido por Schmitz, o modo *Shift Gradient* tem sido empregado⁷⁷.

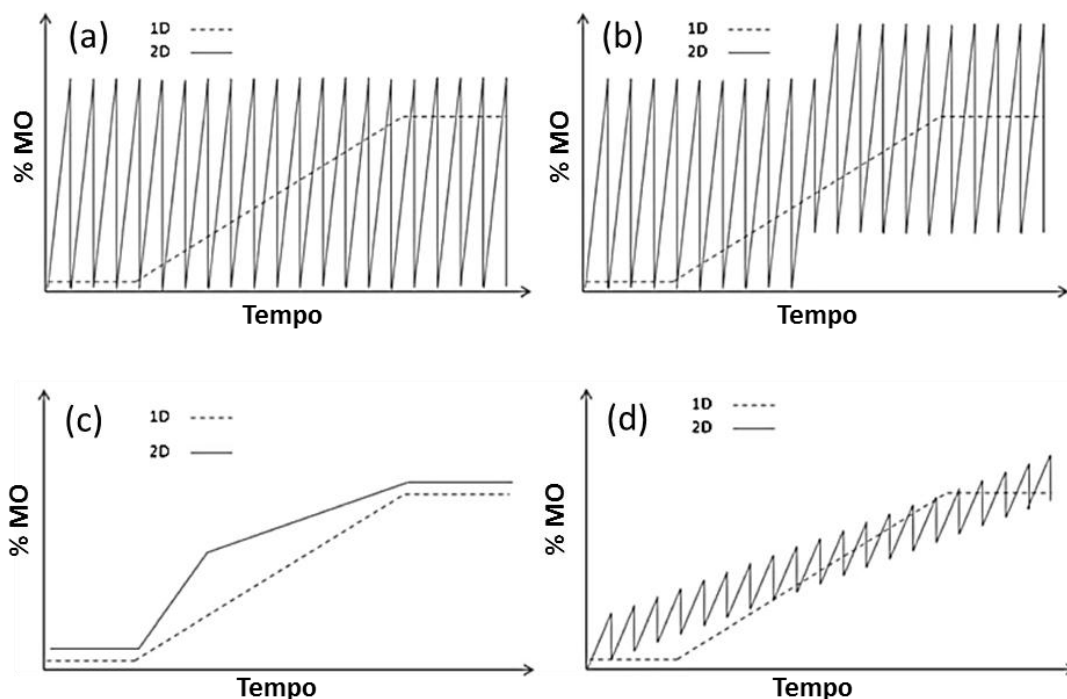
Gradientes *Full in Fraction* são gradientes genéricos com igual e ampla variação da composição da fase móvel, repetidos a cada modulação. Essa configuração oferece picos finos, porém exige uma etapa de condicionamento da coluna após o gradiente, diminuindo a capacidade de picos.

Gradientes do tipo *Segment in Fraction* utilizam diferentes variações na composição da fase móvel em segmentos distintos da primeira dimensão. Em geral, são gradientes menos abrangentes que no modo FIF, porém ainda apresentam considerável supressão na largura dos picos e oferecem uma melhor distribuição de picos pela superfície de separação. Uma etapa de condicionamento da coluna é necessária, diminuindo a capacidade de picos.

Gradientes do tipo *Continuous Shifting* utilizam dois gradientes contínuos abrangendo todo o tempo de separação. Geralmente oferecem picos mais largos, diminuindo a capacidade de picos, porém permite uma melhor utilização da janela de separação por não necessitar da etapa de condicionamento da coluna. Este tipo de abordagem apresenta maiores desafios na seleção dos parâmetros do gradiente da segunda dimensão devido à maior probabilidade de *wrap-around* (eluição tardia de compostos fortemente retidos que deveria ser eluídos em modulações anteriores).

O modo de eluição do tipo *Shift Gradient* emprega gradientes estreitos na segunda dimensão, com contínuas modificações nas condições iniciais e finais de concentração de modificador orgânico. O alargamento de bandas é razoavelmente suprimido e a mudança contínua no gradiente reduz a probabilidade de *wrap-around*. A capacidade de picos na segunda dimensão é geralmente maior quando comparada aos outros modos de eluição⁷⁷. A Figura 1 exemplifica os quatro modos descritos acima.

Figura 2. Formas de gradiente que podem ser empregados em LC×LC: (a) *Full in Fraction*, (b) *Segment in Fraction*, (c) *Continuously Shifting*, (d) *Shift Gradients*.



Fonte:⁷⁸, adaptado.

Em suma, maximizar a ortogonalidade é um dos fatores mais importantes na otimização de métodos LC×LC. Conhecimento prévio das características da amostra pode ajudar na seleção do par cromatográfico, mas isso muitas vezes não é o suficiente e nem disponível. Devido a falta de modelos de predição da ortogonalidade, esta geralmente é obtida a partir de experimentos prévios e avaliação dos cromatogramas, mas ainda assim, esta não é uma tarefa trivial.

1.2. Fingerprints metabólicos

Estima-se que plantas produzam cerca de 100 a 200 mil diferentes metabólitos^{79; 80}. Uma única planta pode produzir de 5 a 25 mil compostos (5 mil compostos são estimados para *Arabidopsis*) em um dado instante⁸¹. O conjunto de metabólitos produzidos e/ou modificados (metaboloma) representa o produto final da expressão genética e define o fenótipo bioquímico de uma célula, tecido, órgão ou indivíduo⁸².

Abordagens metabolômicas favorecem a determinação de uma vasta gama de

metabólitos afim de determinar as condições metabólicas e fornecer subsídios à fenotipagem e análise diagnóstica de plantas⁸³. Devido à complexidade do metaboloma, abordagens *non-targeted* são geralmente empregadas na análise fenotípica. Uma abordagem “sem alvo” (*non-targeted*) pode ser dividida em “perfil metabólico”, o qual se refere à análise de classe de metabólitos, ou “*fingerprint* metabólico”, que pode ser definido como o conjunto de metabólitos ou derivados (identificados ou não) que são detectados por uma técnica analítica específica^{84: 85}.

O *fingerprint* metabólico reflete a complexa composição química da amostra e pode ser obtido através de técnicas cromatográficas, espectroscópicas ou eletroforéticas⁸⁶. A cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) é a técnica analítica mais empregada na análise de produtos naturais⁸⁷. Apesar de suas limitações quando comparada a outras técnicas mais sofisticadas (e de maior custo), HPLC-DAD apresenta diversas vantagens no monitoramento de mudanças metabólicas. De fato, dependendo do cromóforo em questão, a detecção espectroscópica de absorções no UV pode ser mais sensível e precisa do que métodos baseados na espectrometria de massas⁸⁸. A eficiência de um *fingerprint* metabólico é diretamente relacionada ao nível da separação cromatográfica e distribuição de níveis de concentração dos componentes na planta. Portanto, o desenvolvimento e otimização de métodos cromatográficos são de suma importância na obtenção de *fingerprints* metabólicos.

O rápido crescimento da indústria de fitoterápicos e a falta de regulamentações relacionadas a esta área levaram a uma preocupação crescente em relação à segurança e eficácia destes produtos pelas agências responsáveis. O controle de qualidade de produtos naturais é extremamente importante uma vez que a eficácia e qualidade dependem diretamente da concentração dos ingredientes ativos. Inúmeros fatores como clima, condições de cultivo, período de colheita, secagem, estocagem, condições de extração e adulterações deliberadas ou coincidentes podem causar uma grande variação na composição e conseqüentemente, oferecerem risco aos pacientes⁸⁹.

Através destes trabalhos, a identificação e controle de qualidade de produtos desta natureza podem ser realizados através de técnicas macro e microscópicas, sendo a última realizada principalmente através da identificação de marcadores químicos.

Devido a dificuldade em selecionar um único composto ou efeitos sinérgicos entre constituintes^{90; 91}, a Organização Mundial da Saúde recomenda o uso de *fingerprints* como indicadores de qualidade em produtos naturais⁹².

Devido à grande complexidade das amostras analisadas (produtos naturais, fitoterápicos, etc), novos desafios surgiram com a propagação do emprego de técnicas de *fingerprint*: diferenças minoritárias entre amostras muito semelhantes podem não ser claramente identificadas, no entanto, podem afetar diretamente os resultados finais como, por exemplo, a saúde do paciente. Situações desta natureza podem ser contornadas através do uso de métodos matemáticos de reconhecimento de padrões como Análise de Componentes Principais (PCA) e outros métodos de análise multivariada que favoreçam a visualização de toda a informação contida nos *fingerprints*^{93; 94; 95}.

A identificação ou classificação errônea de espécies vegetais é somente um dos desafios que podem ser superados pelo emprego de análise multivariada de dados cromatográficos. Outros desafios incluem estabilidade e controle de qualidade⁹⁶, desenvolvimento e otimização de condições analíticas, predição de atividades biológicas⁹⁷, correção de sinais analíticos, identificação de picos/substâncias responsáveis por determinada resposta^{98; 99}.

Extratos vegetais podem conter milhares de compostos em uma ampla faixa de polaridade e concentração. Mesmo compostos minoritários podem ser importantes na classificação de amostras bem como na eficácia de fitoterápicos. A cromatografia combinada a técnicas de detecção adequadas é uma poderosa ferramenta capaz de oferecer um perfil característico da amostra. Dependendo do objetivo final, *fingerprints* podem ser desenvolvidos baseados em biomarcadores, classes de compostos ou na amostra como um todo.

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) é a técnica analítica mais popular na análise de produtos naturais^{91; 100; 101}. O emprego desta técnica justifica-se pela facilidade de operação, automação, resolução, seletividade e sensibilidade^{11; 102}. Uma das suas principais vantagens é a possibilidade de acoplamento com diferentes detectores e diversos trabalhos apresentam a aplicação destes na obtenção de *fingerprints* vegetais: UV^{103; 104} e arranjo de diodos (DAD)^{91; 105} para compostos com alguma absorção no UV; detecção de espalhamento de luz (ELSD)^{100; 104}, detecção por quimioluminescência (CL) e detecção baseada na

formação de aerossóis (CAD) para compostos transparentes no UV; ressonância magnética nuclear (NMR) e espectrometria de massas (MS) em perfis metabolômicos^{91; 106; 107}.

Além disso, HPLC pode ser empregado na quantificação simultânea de diversos componentes em amostras biológicas¹⁰⁸. Contrapondo-se às vantagens supracitadas, a técnica apresenta elevado custo instrumental e geralmente emprega grandes quantidades de solventes relativamente tóxicos.

A Cromatografia Líquida de Ultra-Alta Eficiência (UHPLC) vem se popularizando e mostra-se como uma técnica vantajosa em diversas aplicações como no controle de qualidade de fitoterápicos ou medicamentos e produtos naturais. Separações com resolução superior às análises por HPLC são possíveis graças ao emprego de colunas cromatográficas preenchidas com partículas de diâmetro inferior a 2 µm, que refletem em um drástico aumento na pressão de operação do equipamento. A maior eficiência de separação permite o emprego de colunas menores e, conseqüentemente, menores tempos de análise e menor consumo de solventes^{109; 110}. Para garantir a detecção de picos mais estreitos, sistemas UHPLC geralmente requerem o emprego de novas gerações de detectores, com menores volumes de cela e maior frequência de aquisição de dados quando comparados à HPLC⁶⁶.

Avanços recentes no desenvolvimento de fases estacionárias favoreceram enormemente o aumento da resolução cromatográfica. Colunas monolíticas permitiram a execução de análises mais rápidas pelo emprego de vazões elevadas, bem como solventes mais viscosos e o acoplamento de colunas em série afim de aumentar a capacidade de picos^{104; 111; 112}. Colunas preenchidas com partículas superficialmente porosas (*fused core*) aumentaram significativamente a eficiência cromatográfica devido à menor difusão de bandas comparada à que ocorre em partículas totalmente porosas²⁵. O desenvolvimento de fases mais resistentes e termicamente mais estáveis permitiu a realização de separações a elevadas temperaturas (HTLC), favorecendo a redução da viscosidade (e conseqüentemente a pressão) e o emprego de vazões maiores¹¹³.

Apesar dos recentes avanços em cromatografia líquida, muitas vezes a complexidade de determinadas amostras não pode ser claramente representada por separações monodimensionais devido a limitações relacionadas à seletividade de

colunas e capacidade de picos. O surgimento da cromatografia bidimensional abrangente dá início a uma nova era no desenvolvimento de métodos cromatográficos, assim como na obtenção de *fingerprints* cromatográficos.

A rápida evolução das técnicas cromatográficas e instrumentação tornaram não só o desenvolvimento de métodos como a análise dos dados gerados uma tarefa mais árdua. Diferenças sutis podem ser responsáveis, por exemplo, pela diferenciação entre amostras, no entanto, devido a enorme quantidade de dados gerados, essas diferenças podem ser ignoradas quando os dados são avaliados por uma simples inspeção visual, requerendo métodos mais sofisticados de análise^{94; 96; 103}.

2 OBJETIVOS

Tendo em vista a importância da desreplicação na pesquisa de produtos naturais, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um método LC×LC e a implantação de um protocolo de análise para a documentação química de extratos vegetais e estudos metabolômicos. Para este fim, propõe-se o estudo da técnica e desenvolvimento de ferramentas e estratégias relacionadas ao desenvolvimento de métodos por cromatografia líquida bidimensional abrangente (LC×LC) para análise de matrizes complexas.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Estratégia experimental

A estratégia experimental constituiu-se das seguintes etapas:

1. Configuração do sistema bidimensional;
2. Avaliação dos parâmetros relacionados à eficiência, seletividade e estabilização do sistema 2D;
3. Coleta e preparo do material vegetal – diferentes espécies com composição metabólica diversa;
4. Obtenção dos perfis cromatográficos monodimensionais das amostras selecionadas;
5. Estabelecimento de estratégias de desenvolvimento de métodos bidimensionais baseadas em planejamentos experimentais;

6. Desenvolvimento e otimização de um método bidimensional para uma única espécie vegetal (cana-de-açúcar);
7. Aplicação da estratégia de desenvolvimento de método para uma mistura de extratos composta pelos extratos de diferentes espécies vegetais, buscando-se uma amostra extremamente complexa, capaz de oferecer diferentes desafios à separação cromatográfica.

3.2. Reagentes e materiais

A pesagem das amostras foi executada em balança analítica Mettler Toledo[®] modelo AG245, de capacidade máxima de 210 g. Os extratos foram pesados em balança analítica Precisa[®] modelo XR20SSM-DR, de capacidade máxima de 205 g.

As amostras foram trituradas em moinho analítico A11 BASIC (IKA[®]).

Os solventes utilizados na extração e nas análises cromatográficas foram acetonitrila (ACN), etanol (EtOH), isopropanol (IPA) e metanol (MeOH) grau HPLC, marca J.T.Baker[®] e água ultrapura, preparada em purificador Milli-Q – Millipore[®]. As extrações foram auxiliadas por equipamento de ultrassom ELMA[®], modelo TANSSONIC 700, de frequência de 35 kHz. Micropipeta Labpette, marca Labnet[®], de volume variável de 100 a 1000 µL também foi empregada.

Os extratos foram secos em evaporador rotativo *Speed Vac*, marca Thermo[®] equipado com refrigerador Thermo[®] modelo RVT4104 (*Refrigerated Vapor Trap*) e bomba de vácuo.

Derivados de galato de butila e ácido protocatecuico, preparados pela esterificação do ácido gálico⁶⁶ e ácido protocatecuico, previamente isolados, purificados e identificados no NuBBE foram empregados na avaliação do tempo de recondicionamento das colunas destinadas à 2ª dimensão cromatográfica. Soluções de aproximadamente 0,1 mg/mL foram preparadas em uma mistura água/metanol (8:2, v/v)

O pré-tratamento dos extratos foi realizado empregando cartuchos SPE Chromabond[®] C18ec (3 mL/500 mg) e membranas de filtração Chromafil[®] Xtra RC-20/25, de poros de 0,20 µm.

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo líquido de ultra-alta eficiência (UHPLC) *Ultimate3000*, marca Dionex[®] (Sunnyvale, USA) equipado com uma bomba ternária modelo DGP-3600RS (2D), uma bomba quaternária LPG-

3400M (¹D), compartimento termostaticado de coluna TCC-3000RS, detector de arranjo de diodos modelo DAD-3000(RS), detector de aerossol carregado (Corona Ultra RS) e amostrador automático modelo WPS-3000RS. As duas dimensões cromatográficas foram conectadas por uma válvula de 10 portas e 2 posições Rheodyne[®] (Malta, USA) eletronicamente acionada, equipada com dois *loops* idênticos de 20 µL. Todo o sistema cromatográfico foi otimizado a fim de reduzir o *dwell-volume*, empregando tubulações mais curtas e de menor diâmetro interno. Os módulos cromatográficos foram controlados pelo *software* Chromeleon versão 6.80. A frequência de aquisição de dados foi de 25,0 Hz e as análises foram monitoradas na faixa de 200 a 400 nm. Os cromatogramas foram extraídos (DAD, 254 nm e/ou CAD) e os dados foram visualizados em duas e três dimensões empregando o *software* GC Image[®], v.2.4b2 LC×LC (Lincoln, Nebraska).

As separações cromatográficas foram realizadas empregando colunas *microbore* Ascentis C18 (150 x 1 mm, 3 µm) e Ascentis Phenyl (150 x 1 mm, 3 µm), fornecidas por Supelco (Bellefonte, USA), Gemini (150 x 1 mm, 5 µm) e Synergi Hydro (150 x 1 mm, 4 µm) fornecidas pela Phenomenex (Torrance, USA) e colunas convencionais Poreshell BonusRP (50 x 4,6 mm, 2,7 µm) e Poreshell Phenyl-Hexyl (50 x 4,6 mm, 2,7 µm) fornecidas pela Agilent (Santa Clara, USA), Discovery HSF5 (33 x 4,6 mm, 3 µm) fornecida por Supelco, Kinetex PFP (30 x 4,6 mm, 2,6 µm), Kinetex C18 (150 x 4,6 mm, 2,6 µm), fornecidas pela Phenomenex (Torrance, USA).

3.3. Métodos cromatográficos

Separações monodimensionais preliminares foram realizadas empregando-se uma coluna Kinetex C18. A fase móvel consistiu de (A) água e (B) metanol, acidificados com 0,05% de ácido fórmico, eluídos de acordo com o seguinte gradiente: 0 min, 5% B; 30 min, 100% B; 40 min, 100% B, a uma vazão de 1 mL/min. O volume de injeção foi de 4 µL.

As separações bidimensionais foram realizadas empregando (em ¹D) as colunas *microbore* Ascentis C18, Ascentis Phenyl, Synergi Hydro e Gemini a uma vazão de 10 µL/min. A fase móvel consistiu de (A) água e (B) metanol ou acetonitrila, ambas acidificadas com 0,05% de ácido fórmico, eluídas em diferentes condições de gradiente. A válvula de 10 portas e duas posições foi usada para conectar as duas dimensões, com tempos de modulação variáveis entre os

experimentos. Em ²D, as separações foram realizadas empregando colunas convencionais Poreshell Bonus RP, Poreshell Phenyl Hexyl, Kinetex PFP e Discovery HSF5. A fase móvel consistiu de (A) água e (B) metanol ou acetonitrila, ambas acidificadas com 0,05% de ácido fórmico eluídas em diferentes condições de gradiente e vazões em cada experimento. As duas colunas foram mantidas a 30°C durante todas as análises. O volume de injeção empregado variou de acordo com os experimentos.

3.4. Material vegetal

Folhas de *Cryptocaria mandiocana* foram coletadas no Parque Estadual Carlos Botelho em São Miguel Arcanjo/SP. O indivíduo coletado foi identificado pelo Dr. Pedro L. R. Moraes. Exsicatas foram depositadas no Herbário do Instituto de Botânica de São Paulo (IBSP)¹¹⁴.

Folhas, ramos e raízes de *Tocoyena formosa* foram coletados em Araraquara/SP, no mês de Outubro de 2012. O material botânico já havia sido previamente identificado pela Dra. Inês Cordeiro (Instituto Botânico de São Paulo)¹¹⁵.

Folhas, frutos e sementes de *Pterogyne nitens* foram coletados de dois indivíduos em Araraquara/SP, no mês de Outubro de 2012. O material botânico já havia sido previamente identificado como sendo *Pterogyne nitens* (Fabaceae – Caesalpinoideae) pela Dr^a. I. Cordeiro, do Instituto de Botânica, São Paulo/SP. As exsicatas (SP204319-B e SP204319-C) encontram-se depositadas no herbário “Maria Eneida P. Kaufmann” do mesmo instituto¹¹⁶.

Folhas de *Casearia sylvestris* foram coletadas de dois indivíduos em Araraquara/SP. O material botânico foi identificado pela Dra. Roseli Buzanelli Torres, do Instituto Agrônomo de Campinas. As exsicatas encontram-se depositadas no herbário deste instituto¹¹⁷.

Folhas de *Lippia sidoides* foram coletadas em 30 de Junho de 2011 no Horto de Plantas Medicinais do Ceará. A certificação botânica foi realizada pelo Herbarium Prisco Bezerra e a exsicata foi depositada sob o número de inscrição EAE49108¹¹⁸.

Folhas e ramos de *Lippia salviaefolia* foram coletados em 1º de abril de 2006, na Fazenda Campininha, em Mogi-Guaçu/SP. A espécie foi identificada pela Dra. Inês Cordeiro (Instituto Botânico de São Paulo). A exsicata foi depositada no “Herbário Maria Eneida P. Kaufmann”, do Instituto Botânico de São Paulo, sob a

inscrição “Lima 90”. Em 02 de abril de 2008, na mesma localidade, foram coletadas folhas, flores e ramos da mesma espécie, identificada pela Dra. Inês Cordeiro, que depositou a exsicata sob a inscrição “Nascimento 91”. Ainda, uma terceira coleta foi realizada em 11 de março de 2010 e a exsicata preparada foi enviada para Prof^a. Dr. Fátima Salimena (Universidade Federal de Juiz de Fora), que identificou a espécie como *Lippia salviaefolia* Cham. e depositou-a no “Herbário Leopoldo Krieger” (Universidade Federal de Juiz de Fora), sob a inscrição CESJ 55806¹¹⁸.

Folhas de cana-de-açúcar (*Saccharum* spp., cultivar RB3280) foram coletadas próximas a Usina Zanin, na cidade de Araraquara/SP⁹⁹.

Folhas, flores e ramos de *Cassia spectabilis* foram coletados em Araraquara/SP. O material botânico já havia sido previamente identificado pela Prof^a. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica de São Paulo. As exsicatas foram depositadas no mesmo instituto, sob a inscrição SP384109^{119; 120}.

3.5. Preparo das amostras

As amostras foram secas em estufa a 40°C, com circulação de ar por 48h, trituradas em moinho de facas e armazenadas sob refrigeração, ao abrigo da luz.

Os extratos foram preparados a partir do material pulverizado e solvente extrator (1:10, m/v), submetidos a extração acelerada por ultrassom por 15 min (repetida 3 vezes), utilizando uma mistura hidroalcoólica etanol / água (8:2, v/v), exceto para cana-de-açúcar, que foi extraída com uma mistura de etanol / isopropanol / água (45:25:30, v/v)⁹⁹. Os extratos foram secos em evaporador rotativo e armazenados sob refrigeração. Uma parte dos extratos foi pesada, solubilizada em metanol / água (8:2, v/v) e submetida ao procedimento de *clean-up* empregando cartuchos de extração em fase sólida (SPE C18), eluídos com 4 mL de metanol, obtendo-se soluções finais de 25 ou 50 mg/mL. Os extratos foram filtrados em membrana de celulose regenerada de poros de 0,20 µm e armazenadas em frascos de 1,5 mL.

Uma mistura dos extratos (nomeada “mix de extratos” – ME) foi preparada a partir de alíquotas das amostras individuais, obtendo-se uma mistura de extratos contendo cerca de 25 mg/mL de cada extrato. Essa mistura foi seca e ressolubilizada em volume conhecido, obtendo-se uma solução de concentração final de 125 mg/mL (da mistura), solubilizada em metanol / água (6:4, v/v).

3.6. Estudos de acondicionamento do sistema (coluna ²D)

Uma mistura de galato de butila e ácido protocatecuico (0,1 mg/mL, água/metanol, 8:2, v/v) foi eluída diretamente pela bomba ¹D em modo isocrático, a uma vazão de 10 µL/min. A válvula de 10 portas e 2 posições foi acionada a cada dois minutos, transferindo 20 µL da solução para a coluna ²D.

A separação em ²D foi avaliada empregando as colunas Poreshell Bonus RP, Poreshell Phenyl Hexyl, Kinetex PFP ou Discovery HSF5 (todas com 4,6 mm de diâmetro interno). A fase móvel foi composta pelos solventes (A) água e (B) metanol ou acetonitrila, ambos acidificados com 0,05% ácido fórmico. A eluição foi realizada em modo gradiente, de 5% B a 100% B em 1,3 min, à vazão de 2,0 mL/min. Os tempos de acondicionamento das colunas avaliados foram: 0,5 min, 0,4 min, 0,3 min e 0,2 min. Cada condição foi repetida 3 vezes, como esquematizado na Figura 2.

Figura 3. (a) Gradientes empregados nos testes de tempo de acondicionamento (t_e) das colunas ²D: 0,5 min; 0,4 min; 0,3 min; 0,2 min de t_e . (b) em detalhe, etapas de acondicionamento.

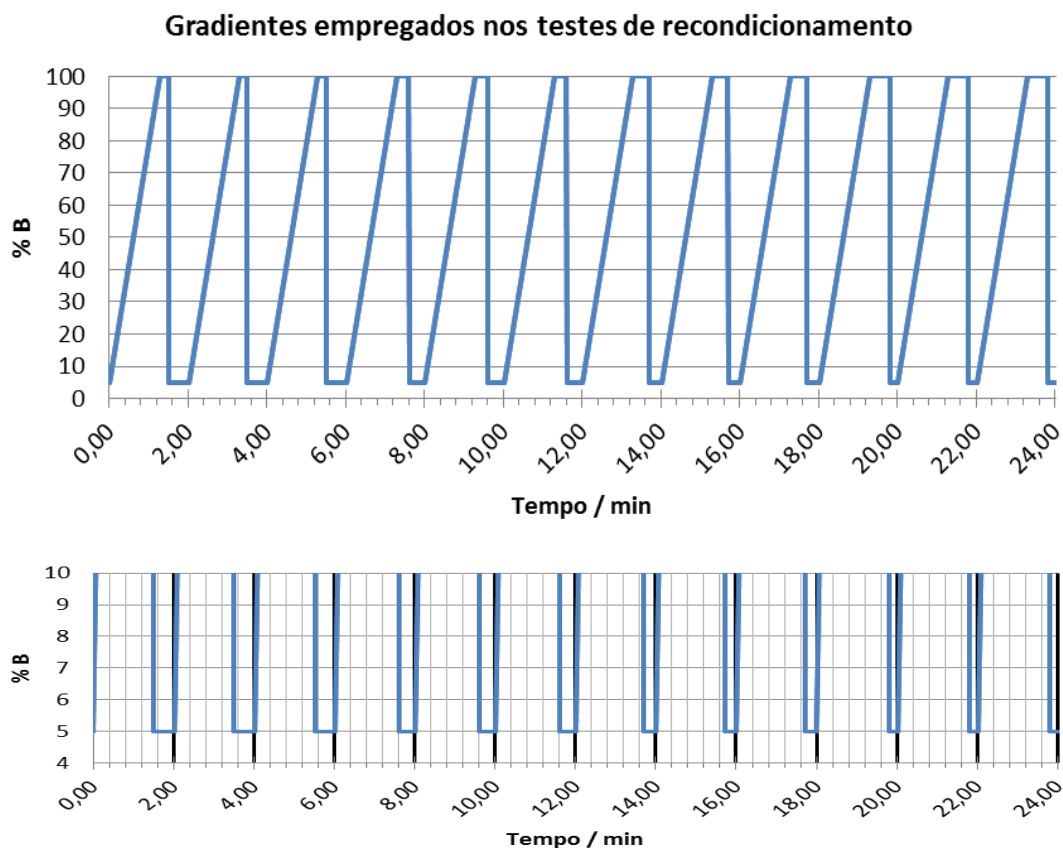


Tabela 1. Gradiente configurado para a determinação do tempo de recondicionamento das colunas avaliadas.

t/min	%B	t _e /min	t/min	%B	t _e /min	t/min	%B	t _e /min	t/min	%B	t _e /min
0,00	5										
0,01	5		6,01	5		12,01	5		18,01	5	
1,30	100		7,30	100		13,30	100		19,30	100	
1,50	100		7,60	100		13,70	100		19,80	100	
1,51	5	0,50	7,61	5	0,40	13,71	5	0,30	19,81	5	0,20
2,01	5		8,01	5		14,01	5		20,01	5	
3,30	100		9,30	100		15,30	100		21,30	100	
3,50	100		9,60	100		15,70	100		21,80	100	
3,51	5	0,50	9,61	5	0,40	15,71	5	0,30	21,81	5	0,20
4,01	5		10,01	5		16,01	5		22,01	5	
5,30	100		11,30	100		17,30	100		23,30	100	
5,50	100		11,60	100		17,70	100		23,80	100	
5,51	5	0,50	11,61	5	0,40	17,71	5	0,30	23,81	5	0,20
6,01	5		12,01	5		18,01	5		24,01	5	

3.7. Desenvolvimento do método cromatográfico

3.7.1 Seleção do par cromatográfico (FE/FM, ¹D,²D)

Três colunas *microbore* e duas colunas convencionais foram previamente selecionadas a partir de um mapa de seletividade disponibilizado pela empresa Waters¹²¹; metanol e acetonitrila foram selecionados como fases móveis a serem avaliadas em ambas as dimensões cromatográficas por serem solventes de grupos de seletividade distintos^{11, 122}, gerando um total de 24 combinações experimentais. Os experimentos foram conduzidos empregando condições abrangentes de eluição.

As separações ¹D foram realizadas empregando as colunas Ascentis C18, Ascentis Phenyl e Synergi Hydro (1 mm d.i.). A fase móvel consistiu de (A) água e (B) metanol ou (C) acetonitrila, ambas acidificadas com 0,05% ácido fórmico, eluída de acordo com o seguinte gradiente: 0 min, 10% B/C, 100min, 100% B/C, 120min, 100% B/C a uma vazão de vazão de 10 µL/min. A válvula de 10 portas e 2 posições foi eletronicamente acionada a cada 2 min, transferindo frações de 20 µL de ¹D para ²D (tempo de modulação: 2,0 min).

As separações ²D foram realizadas empregando as colunas Poreshell Phenyl Hexyl ou Kinetex PFP (4,6 mm d.i.). A fase móvel consistiu de (A) água e (B) metanol ou (C) acetonitrila, ambas acidificadas com 0,05% ácido fórmico, sendo a eluição realizada no modo gradiente: 0-0,1 min, 5% B/C, 0,1-1,3 min, 5-100%

B/C, 1,3-1,5 min, 100% B/C, 1,5-1,51 min, 100-5% B/C, 1,51-2,0 min, 5% B/C, utilizando uma vazão de 3,0 mL/min (“B/C” indica o modificador orgânico empregado, dependendo da condição experimental testada).

As colunas das duas dimensões foram mantidas a temperatura constante de 30°C.

A amostra empregada foi um extrato de folhas de cana-de-açúcar na concentração de 60 mg/mL solubilizada em uma mistura hidroalcoólica água / metanol (6:4, v/v). O volume de injeção empregado foi de 5 µL.

Todas as combinações entre colunas e modificadores orgânicos foram testadas, totalizando 24 experimentos (3 possíveis colunas em 1D; 2 possíveis colunas em 2D, 2 modificadores orgânicos a serem testados em 2 dimensões - Total = $3(^1D) \cdot 2(^2D) \cdot 2(M.O.) \cdot 2(D) = 24$ experimentos).

Tabela 2. Colunas e solventes avaliados na etapa de seleção do par cromatográfico.

Coluna		Modificador Orgânico	
¹ D	² D	¹ D	² D
C18	PFP	MeOH	MeOH
Hydro Phenyl	Phenyl	ACN	ACN

Tabela 3. Combinações experimentais avaliadas na etapa de seleção do par cromatográfico.

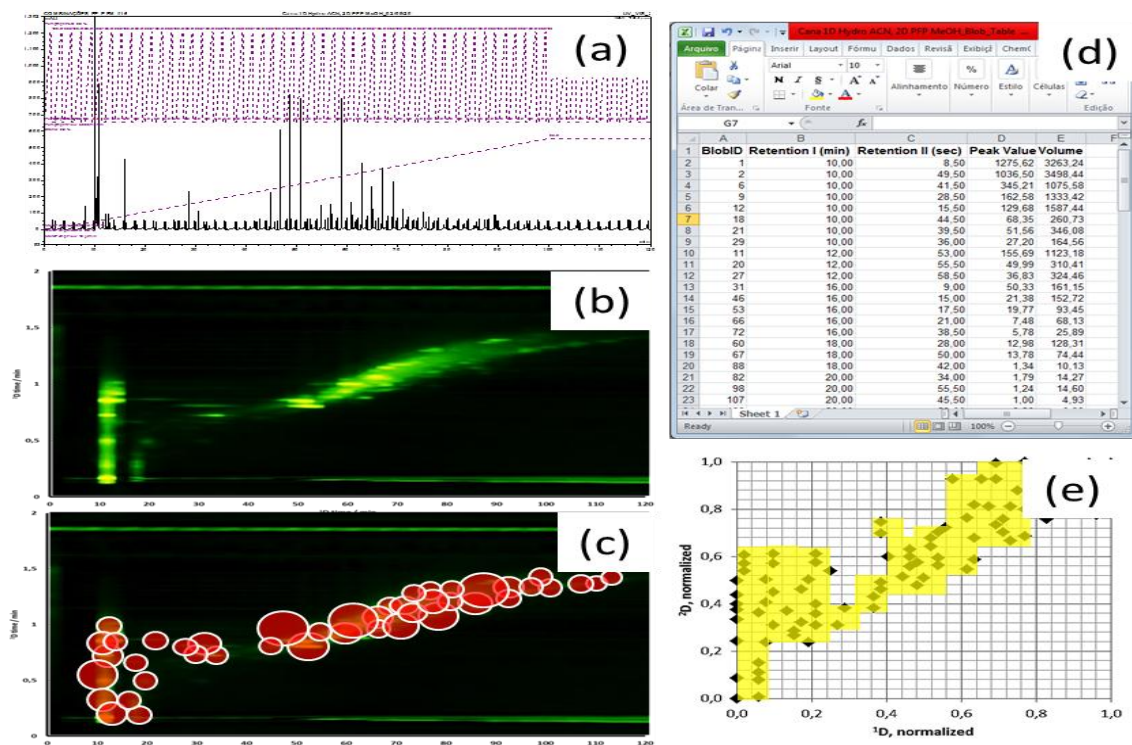
# Exp.	Coluna		Mod. Org.		A _{ocupada} (%)
	¹ D	² D	¹ D	² D	
1	C18	PFP	MeOH	MeOH	26
2	C18	PFP	MeOH	ACN	14
3	C18	PFP	ACN	MeOH	24
4	C18	PFP	ACN	ACN	17
5	Hydro	PFP	MeOH	MeOH	21
6	Hydro	PFP	MeOH	ACN	20
7*	Hydro	PFP	ACN	MeOH	30
8	Hydro	PFP	ACN	ACN	17
9	C18	Phenyl	MeOH	MeOH	19
10	C18	Phenyl	MeOH	ACN	17
11	C18	Phenyl	ACN	MeOH	18
12*	C18	Phenyl	ACN	ACN	10
13	Hydro	Phenyl	MeOH	MeOH	17
14	Hydro	Phenyl	MeOH	ACN	18
15	Hydro	Phenyl	ACN	MeOH	22
16	Hydro	Phenyl	ACN	ACN	13
17	Phenyl	PFP	MeOH	MeOH	23
18	Phenyl	PFP	MeOH	ACN	21
19	Phenyl	PFP	ACN	MeOH	20
20	Phenyl	PFP	ACN	ACN	14
21	Phenyl	Phenyl	MeOH	MeOH	11
22	Phenyl	Phenyl	MeOH	ACN	14
23	Phenyl	Phenyl	ACN	MeOH	13
24	Phenyl	Phenyl	ACN	ACN	12

Os cromatogramas bidimensionais obtidos foram avaliados considerando-se a fração da área de separação 2D ocupada, de acordo com o método proposto por Gilar e colaboradores^{70; 123}, adaptado. Este método consiste na normalização dos dados adquiridos, de acordo com o primeiro e último componentes eluídos nas duas dimensões (Equação 4), fazendo com que os valores de tempos de retenção fiquem entre 0 e 1. Estes valores são então representados graficamente em uma superfície de separação virtual, dividido em espaços quadriculados de mesma área. O valor de ocupação da superfície é obtido pela área acumulada de todos os quadrados ocupados por pelo menos um componente, dividido pelo espaço total disponível (Equação 5). O procedimento descrito é exemplificado graficamente na Figura 4.

$$t_{i,norm} = \frac{t_i - t_{min}}{(t_{max} - t_{min})} \quad \text{Equação 4}$$

$$SC = \frac{bins_{occup}}{Y_{bins} \times X_{bins}} \quad \text{Equação 5}$$

Figura 4. Procedimento para obtenção do valor de ocupação da superfície bidimensional **(a)** obtenção do cromatograma bruto; **(b)** conversão em cromatograma bidimensional (usando o *software* LCIImage); **(c)** detecção automática dos picos pelo *software*; **(d)** dados exportados no formato de uma tabela de picos com tempos de retenção em ¹D e ²D; **(e)** normalização dos dados e geração de um cromatograma 2D “virtual” empregando a planilha desenvolvida por Gilar e colaboradores^{70, 123}.



4.2.2 Seleção das variáveis relevantes na otimização – Planejamento Fatorial Fracionário

Um planejamento do tipo Fatorial Fracionário foi empregado para seleção de variáveis relevantes para a otimização cromatográfica. O par cromatográfico (FE/FM, ¹D,²D) selecionado anteriormente foi utilizado na otimização das separações bidimensionais subsequentes. Seis fatores foram avaliados em dois níveis cada (Tabela 4).

Tabela 4. Fatores e níveis avaliados na etapa de seleção de variáveis.

Fatores	Unidades	-	+	0
X1 . Tempo de análise ¹ D ^a	min	90	120	105
X2. Modulação (= tempo de análise em ² D ^b)	min	1	2	1.5
X3. Volume de injeção	µL	5	10	7,5
X4. Vazão em ² D ^c	mL/min	3	4	3.5
X5. Concentração de ácido na fase móvel	%	0,025	0,075	0,05
X6. Concentração final de B em ¹ D	%	80	100	90

a) %B_{inicial} foi fixada em 10%.

b) A vazão em ¹D foi fixada em 10 µL/min a fim de garantir análises de até 2 min em ²D.

c) A vazão máxima foi selecionada considerando-se o limite de pressão de operação das colunas (600 bar, especificado pelo fabricante).

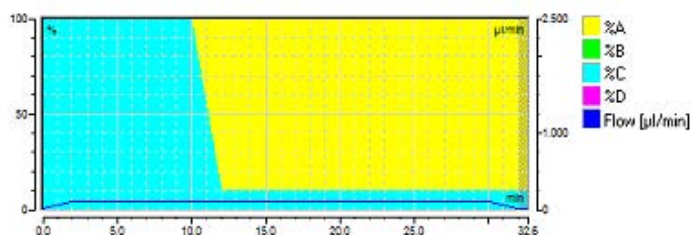
Durante esta etapa, o número de picos e a fração de recobrimento da superfície bidimensional foram usados como resposta. Foram considerados picos, aqueles automaticamente detectados pelo *software* LC Image usando os parâmetros de detecção (área mínima e volume mínimo) tais quais onde nenhum pico fosse detectado em uma análise sob as mesmas condições, sem a injeção da amostra (“branco”). A fração de recobrimento da superfície foi obtida como descrito anteriormente no item “*Seleção do par cromatográfico*”.

O sistema bidimensional foi limpo e recondicionado automaticamente após cada análise, empregando em ¹D: 0 min, 100% B/C (10 µL/min); 2 min, 100% B/C (100 µL/min); 10 min, 100% B/C (100 µL/min); 12 min, 10% B/C (100 µL/min); 30 min, 10% B/C (100 µL/min); 32 min, 10% B/C (10 µL/min). “B/C” indica o modificador orgânico empregado (B, MeOH ou C, ACN), dependendo da condição experimental testada (Tabela 5, Figura 5).

Tabela 5. Condição de limpeza e recondicionamento de ¹D.

Tempo (min)	% M.O. (B ou C)	Vazão (µL/min)
0	100	10
2,0	100	100
10,0	100	100
12,0	10	100
30,0	10	100
32,0	10	10

Figura 5. Método de limpeza e recondicionamento em ¹D, empregado entre as análises.



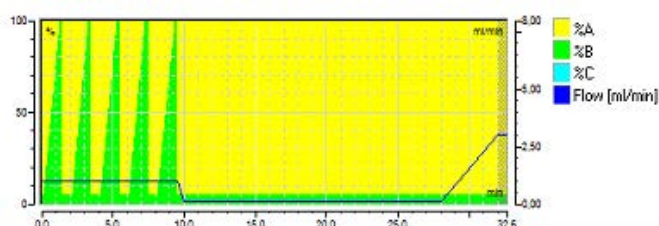
Fonte: software Chromeleon CDS, v. 6.8.

Em ²D, a limpeza foi feita empregando-se um gradiente abrangente de 5% B/C a 100% B/C, repetido 5 vezes: 5% B/C em 0,1 min; 5-100% B/C em 1,2 min; 100% B/C em 0,2 min; 100-5% B/C em 0,01 min; 5% B/C em 0,49 min, com vazão de 1 mL/min e modulação a cada 2 min, durante 10 min. Após esse tempo, a vazão foi reduzida a 0,1 mL/min até 28 min, quando retornava lentamente até a vazão empregada na análise (3 mL/min) (Tabela 6, Figura 6).

Tabela 6. Condição de limpeza e recondicionamento de ²D.

Tempo (min)	% M.O. (B ou C)	Vazão (mL/min)
0	5	1
0,1	5	
1,3	100	
1,5	100	
1,51	5	
2,0	5	
Repetido 5 vezes; modulação de 2 min.		
11	5	0,1
28	5	
30	5	

Figura 6. Método de limpeza e recondicionamento em ²D, empregado entre as análises.



Fonte: software Chromeleon CDS, v. 6.8.

3.7.3 Otimização (Planejamento Composto Central)

Após a identificação das variáveis relevantes, um planejamento composto central (CCD) foi empregado na otimização das condições cromatográficas (Tabela 7). As variáveis que se mostraram estatisticamente irrelevantes na etapa anterior foram fixadas.

Tabela 6. Fatores e níveis empregados no planejamento composto central.

Fatores	Unidades	Níveis				
		-1,5	-1	0	1	1,5
X_1 . Tempo de análise $^1D^a$	min	90	95	105	115	120
X_2 . Modulação (tempo de análise em $^2D^b$)	min	1	1,2	1,5	1,8	2
X_3 . Volume de injeção	μL	5	5,8	7,5	9,2	10
X_4 . Vazão em 2D (mL/min) ^{c)}	mL/min	3	3,2	3,5	3,8	4

a) % $B_{inicial}$ foi fixada em 10%.

b) A vazão em 1D foi fixada em 10 $\mu L/min$ a fim de garantir análises de até 2 min em 2D .

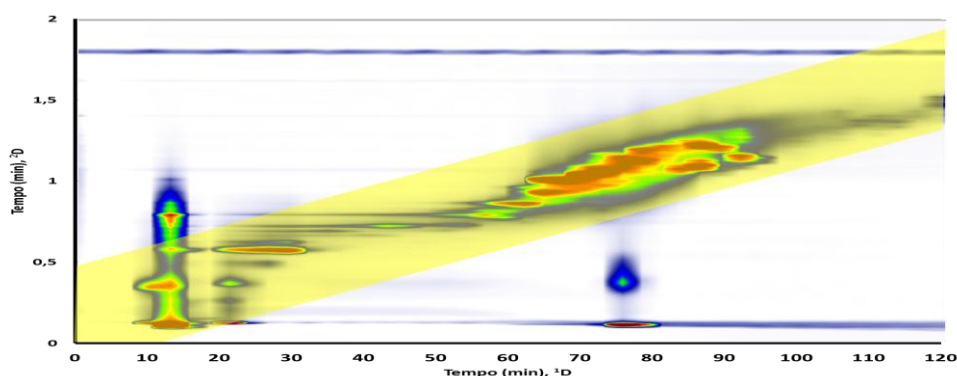
c) A vazão máxima foi selecionada considerando-se o limite de pressão de operação das colunas (600 bar, especificado pelo fabricante).

Durante o processo de otimização, as respostas avaliadas foram o número de picos e a fração do recobrimento da superfície.

3.7.4 Otimização do gradiente em 2D

Após a seleção do par cromatográfico e das condições experimentais que forneciam a melhor separação bidimensional em condições genéricas de eluição em gradiente, foram avaliadas estratégias de otimização do recobrimento da superfície bidimensional empregando diferentes condições de gradientes em 2D (*SIF*, *SG*).

Figura 7. Cromatograma bidimensional obtido com as condições otimizadas e modo de eluição *Full in Fraction* em 2D . Em destaque, a área efetivamente ocupada pelos picos. Amostra: extrato de folhas de cana-de-açúcar; detecção no UV a 254 nm.



Segmentação (*Segment in Fraction*)

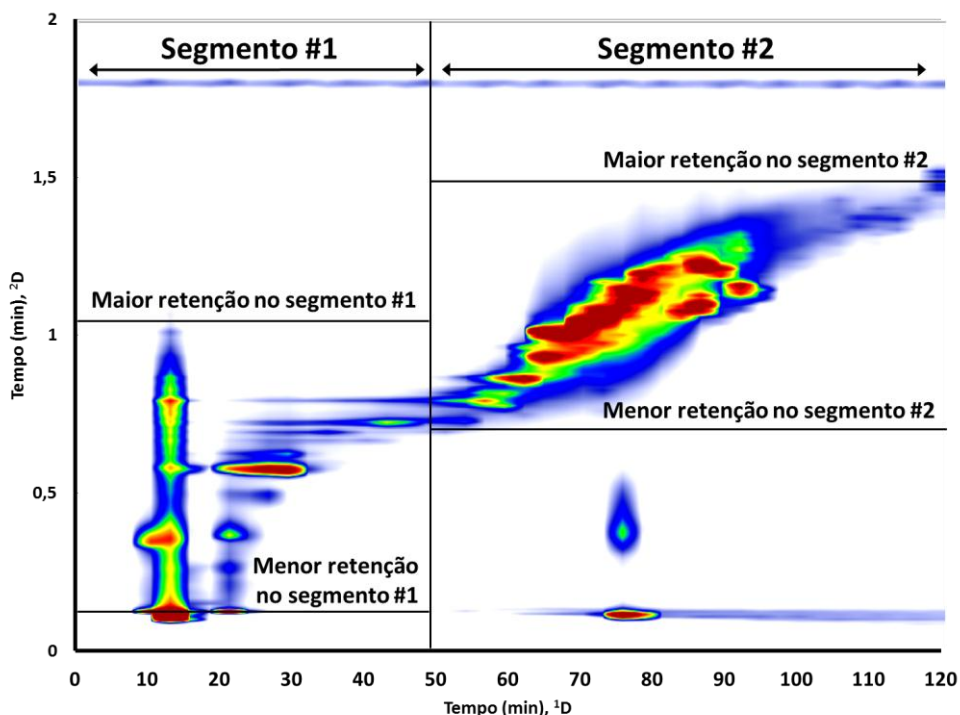
Os valores iniciais e finais de M.O. em 2D nesta etapa foram selecionados a partir da análise do *plot* bidimensional otimizado nas etapas anteriores.

A otimização das condições em 2D (condição inicial e final do gradiente) em cada segmento é feita, geralmente, empiricamente¹³². Neste trabalho, apresentamos uma proposta de otimização da janela de separação a partir de experimentos monodimensionais.

A otimização das condições em 2D (condição inicial e final do gradiente) em cada segmento é feita, geralmente, empiricamente¹³². Neste trabalho, apresentamos uma proposta de otimização da janela de separação a partir de experimentos monodimensionais.

A partir deste cromatograma, é possível avaliar a faixa de concentração de M.O. na qual os compostos são eluídos na segunda dimensão, permitindo um melhor aproveitamento da janela de separação através do uso de gradientes menos abrangentes que no modo genérico *Full in Fraction*.

Figura 8. Proposta de segmentação (2 segmentos) a partir da visualização do cromatograma bidimensional.



Por se tratar de uma amostra muito complexa com picos distribuídos por toda a extensão de 1D , a maior dificuldade está em selecionar os intervalos de tempo de cada segmento.

A otimização das condições em 2D (condição inicial e final do gradiente) em cada segmento é feita, geralmente, empiricamente¹³². Neste trabalho, apresentamos uma proposta de otimização da janela de separação a partir de experimentos monodimensionais.

Proposta de otimização da janela de separação a partir de experimentos monodimensionais

Uma mistura de sete derivados esterificados do ácido protocatecuico (protocatecuato de etila, propila, butila, pentila, hexila, tetradecila e dodecila, 0,1 mg/mL cada) foi empregada para testes de otimização da janela de separação. A mistura foi submetida a uma separação preliminar, empregando uma coluna Kinetex PFP (4,6 mm x 30 mm, 2,6 μ m), fase móvel (A) água e (C) acetonitrila, acidificadas com 0,05% ácido fórmico, eluídas em um gradiente linear 5-100% C (10 min), permanecendo em modo isocrático (5 min), retornando à condição inicial e permanecendo em modo isocrático (5 min), utilizando uma vazão de 2,0 mL/min. O volume de injeção empregado foi de 5 μ L. A otimização da separação foi realizada a partir dos tempos de retenção dos picos menos e mais retidos (protocatecuato de etila e dodecila, respectivamente).

Gradientes deslocados (*Shift Gradients*)

O emprego de gradientes deslocados tem se mostrado bastante interessante, especialmente quando dois modos cromatográficos semelhantes são empregados em 1D e 2D .

Os valores iniciais e finais de M.O. em 2D nesta etapa foram selecionados a partir da análise do *plot* bidimensional obtido da condição otimizada anteriormente, empregando o modo *Full in Fraction*.

3.8. Estudo da repetibilidade do método

A proposta de validação do método cromatográfico desenvolvido baseou-se no estudo da repetibilidade além de análises de precisão do equipamento e de

brancos de amostra.

O desvio padrão relativo (*RSD*) do número de picos observados no cromatograma bidimensional e da fração de recobrimento da superfície foi usado para avaliar a qualidade do método proposto.

3.9. Aplicação da proposta de otimização a diferentes amostras

As etapas de otimização foram aplicadas a uma amostra de maior complexidade, preparada através da mistura de partes iguais de diferentes extratos vegetais (“mix de extratos” – ME), como descritos anteriormente (item *Preparo das amostras*), a fim de avaliar a aplicabilidade da proposta.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Seleção das amostras vegetais e preparo das amostras

A seleção das espécies vegetais buscou contemplar uma variedade de classes de metabólitos micromoleculares, visando uma grande diversidade estrutural e desafios a serem superados nas separações cromatográficas. Dentre eles, podem-se destacar os flavonóides, alcalóides e estirilpironas em *Cryptocaria mandiocana*¹²⁴; iridóides glicosilados, não glicosilados e saponinas triterpênicas em *Tocoyena formosa*^{115; 125}; derivados fenólicos e alcalóides guanidínicos encontrados em *Pterogyne nitens*^{116; 126}; diterpenos clerodânicos descritos em *Casearia sylvestris*¹²⁷, diversos derivados fenólicos encontrados em plantas do gênero *Lippia* (*sidoides* e *salviaefolia*)¹¹⁸; flavonóides O e C-glicosilados em cana-de-açúcar¹²⁸ e alcalóides piperidínicos em *Cassia spectabilis*^{119; 120}. Algumas espécies tiveram diferentes partes coletadas (raízes, ramos, folhas e sementes). Todas as amostras analisadas e respectivos rendimentos de extração são apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Espécies vegetais selecionadas e respectivos valores de rendimento de extração empregando as condições descritas em 3.5 *Preparo das amostras*.

Espécie	Órgão	Rend. de Extração (%)	Recup. após clean-up (%)*	Conc. final.
Cana (RB3280)	Folhas	10	87	25mg/mL
<i>Casearia sylvestris</i>	Folhas	19	76	50 mg/mL
<i>Cassia spectabilis</i>	Folhas	25	82	25mg/mL
<i>Cassia spectabilis</i>	Flores	27	90	50 mg/mL

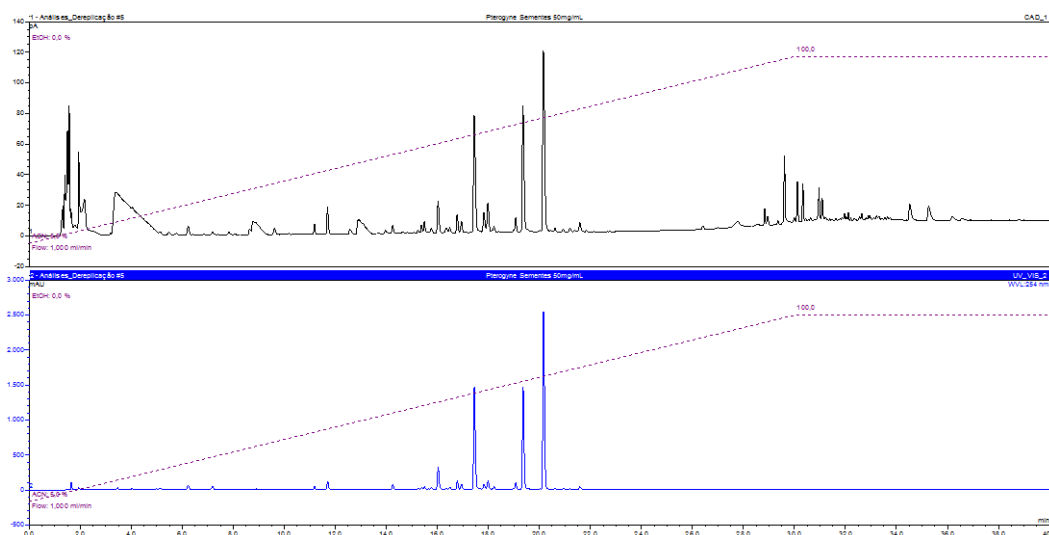
<i>Cryptocaria mandiocanna</i>	Folhas	22	61	25mg/mL
<i>Lippia sidoides</i>	Folhas	30	76	50 mg/mL
<i>Pterogyne nitens</i>	Folhas	26	93	25mg/mL
<i>Pterogyne nitens</i>	Sementes	14	90	50 mg/mL
<i>Tocoyena formosa</i>	Raízes	10	94	25mg/mL
<i>Tocoyena formosa</i>	Folhas	20	93	25mg/mL

*Razão entre a massa obtida após *clean-up* e a massa de extrato bruto obtido inicialmente.

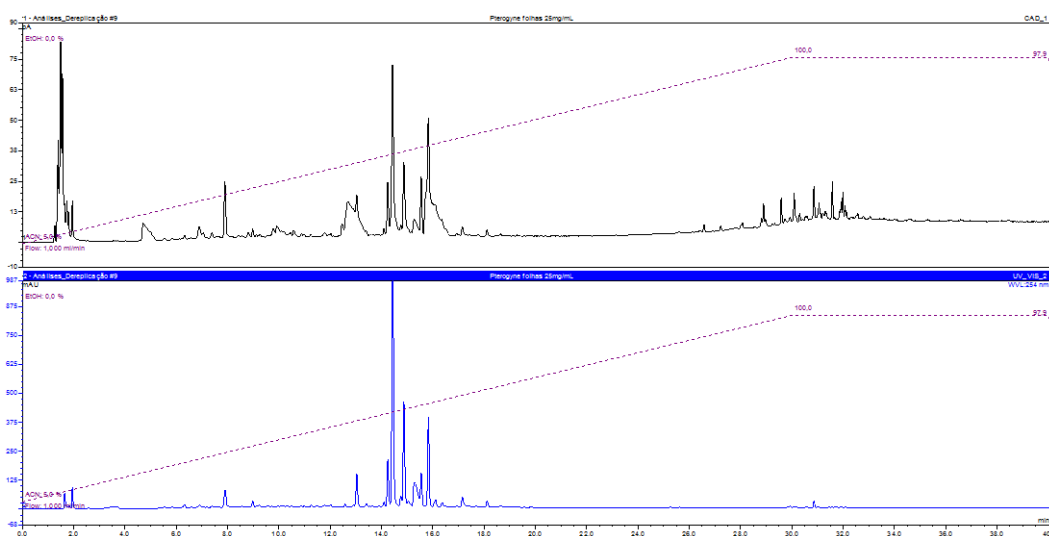
A Figura 9 apresenta os cromatogramas monodimensionais das amostras.

Figura 9. Cromatogramas monodimensionais das amostras vegetais selecionadas (coluna Kinetex C18, 150 x 4,6 mm, 2,6 µm; fase móvel (A) água e (B) metanol, acidificados com 0,05% de ácido fórmico; gradiente: 0 min, 5% B; 30 min, 100% B; 40 min, 100% B; vazão: 1 mL/min; detecção CAD e UV a 254 nm, respectivamente).

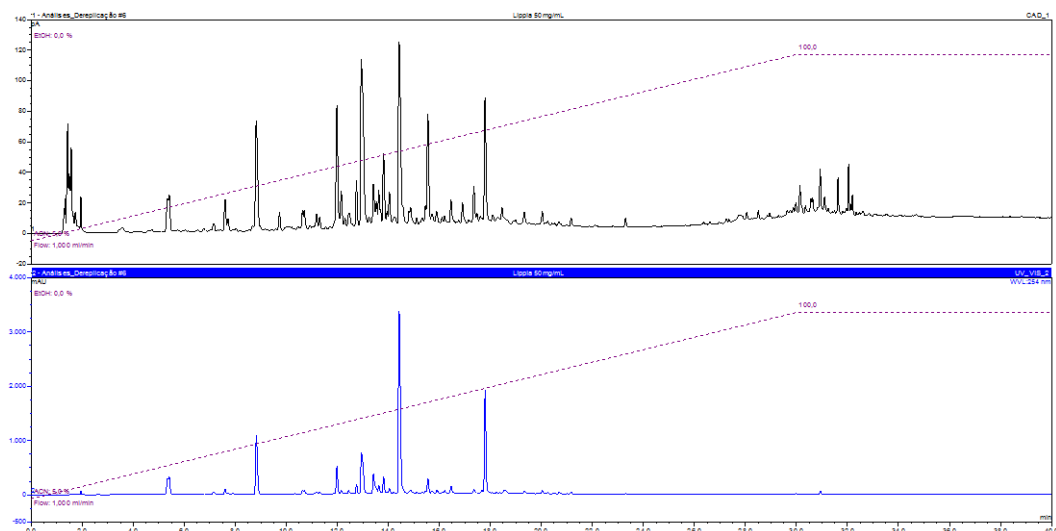
Pterogyne nitens (sementes) – 50mg/mL



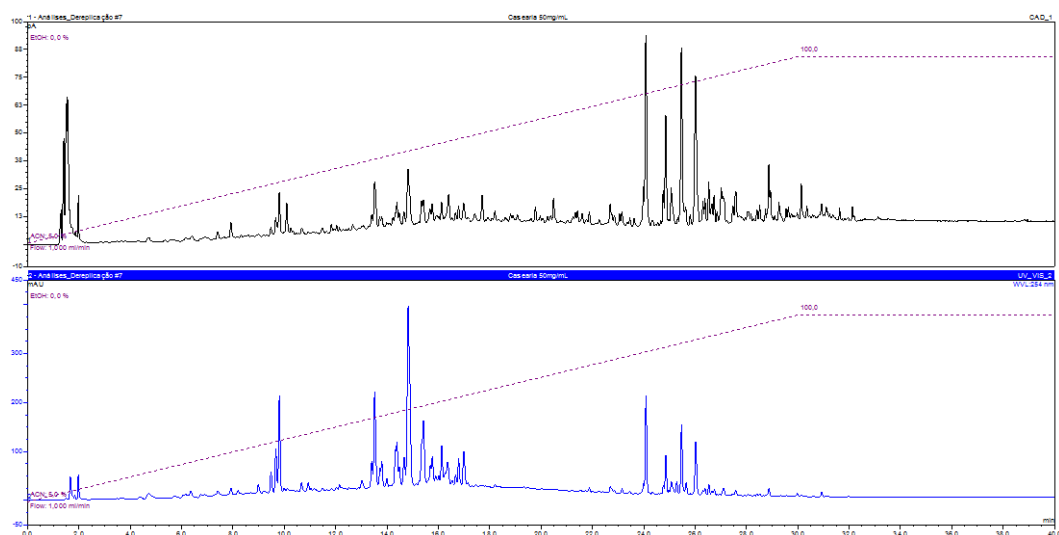
Pterogyne nitens (folhas) – 25mg/mL



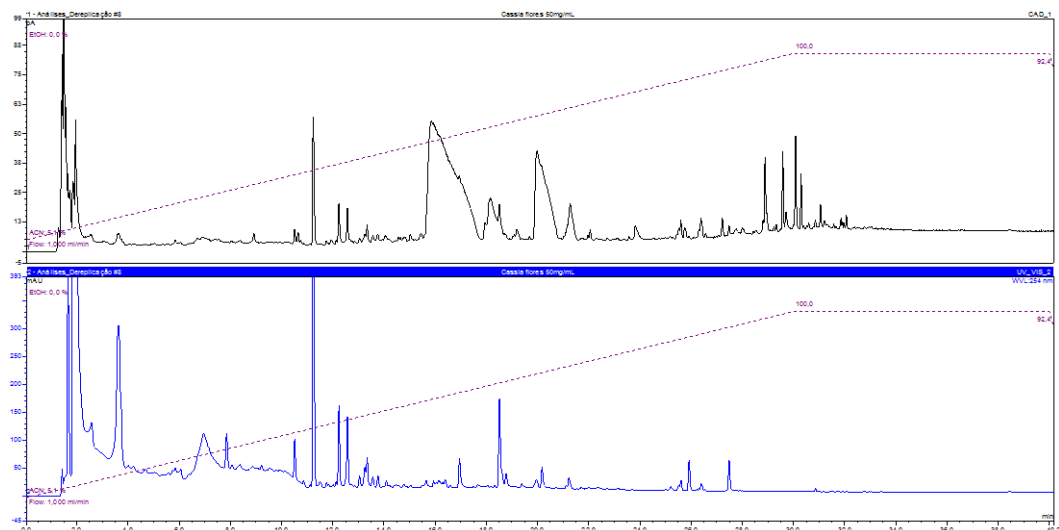
Lippia sidoides – 50mg/mL



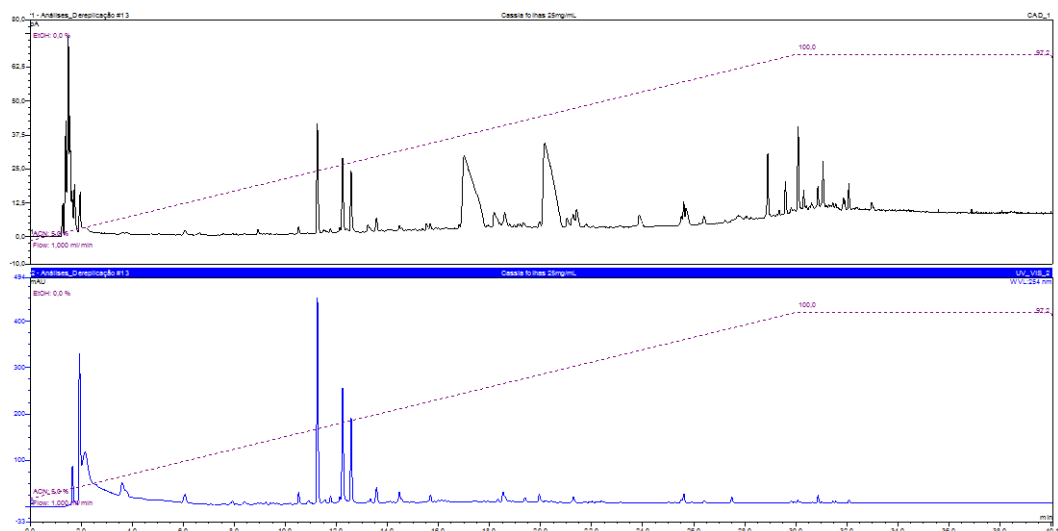
Casearia sylvestris – 50mg/mL



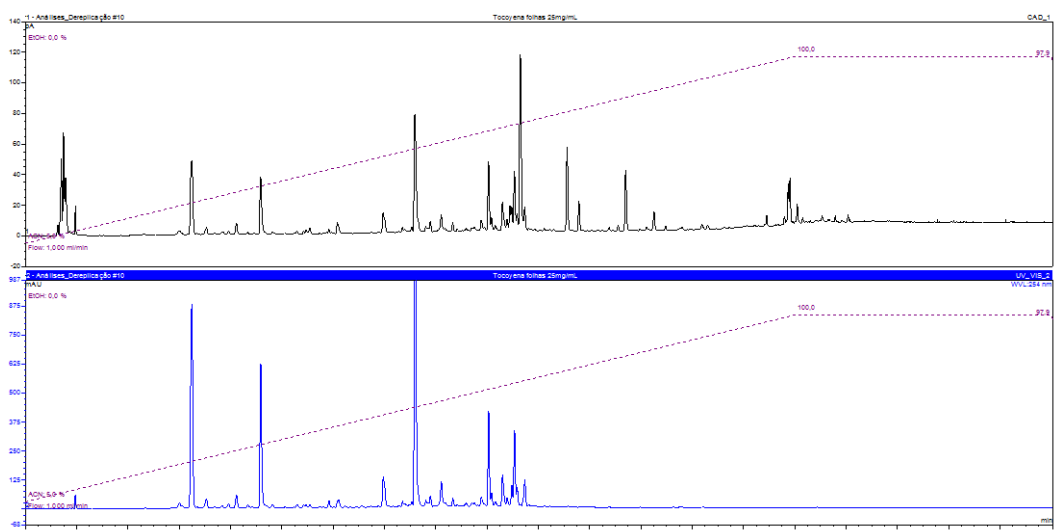
Cassia spectabilis (flores) - 50mg/mL



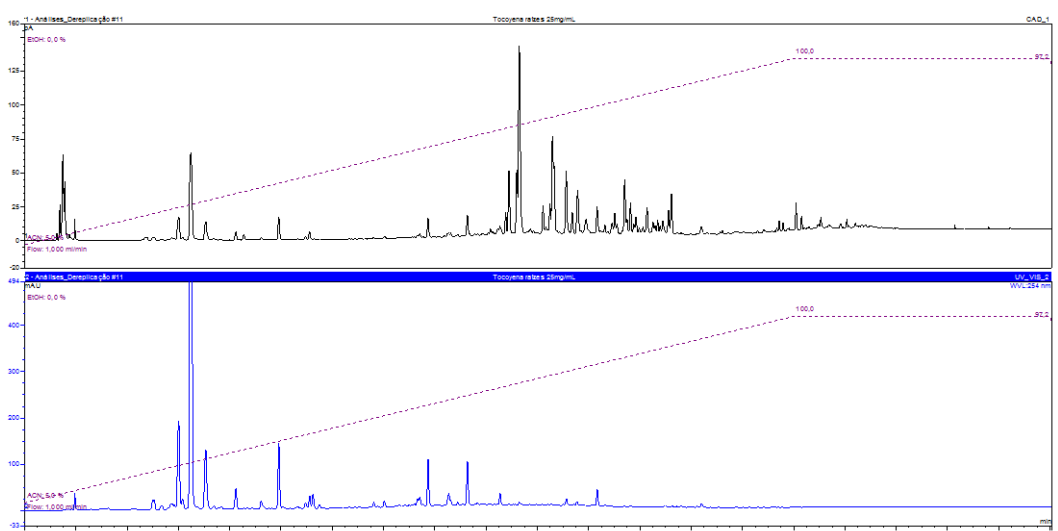
Cassia spectabilis (folhas) - 25mg/mL



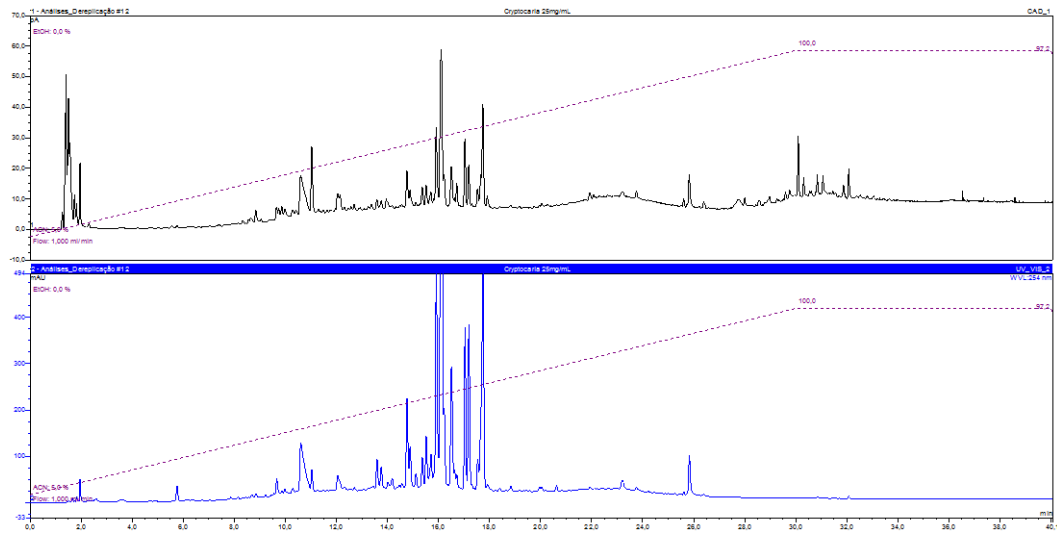
Tocoyena formosa (folhas) – 25mg/mL



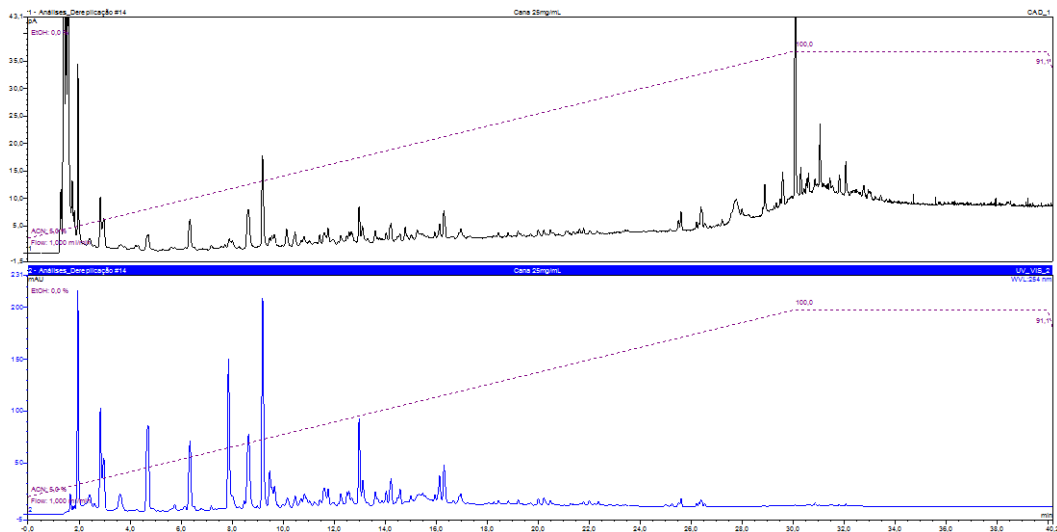
Tocoyena formosa (raízes) – 25mg/mL



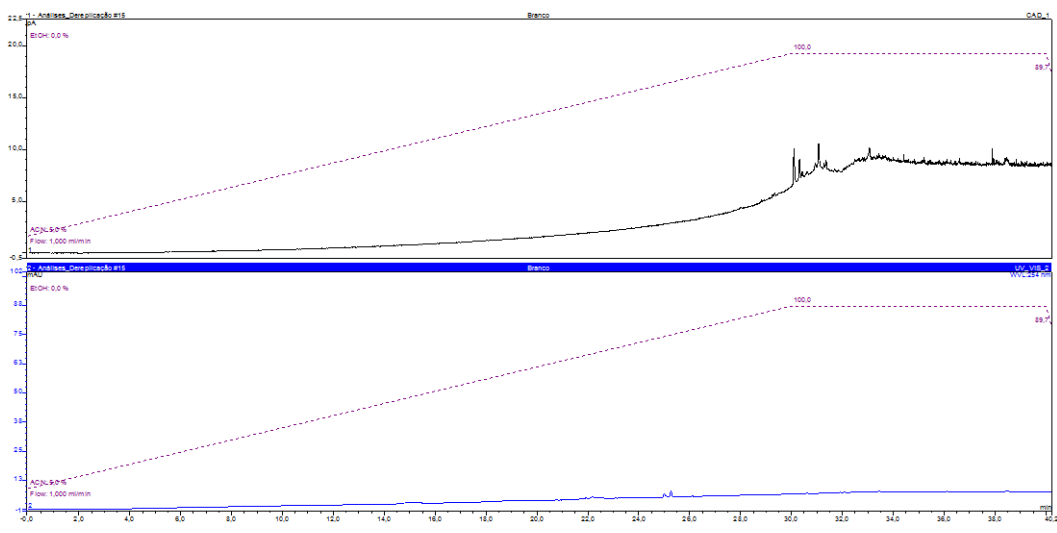
Cryptocaria mandioccana – 25mg/mL



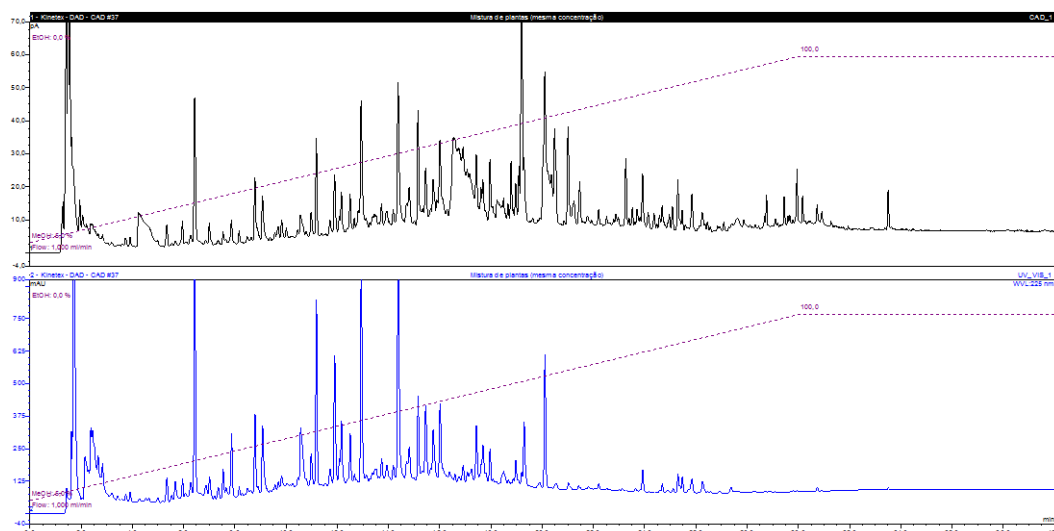
Cana-de-açúcar (cultivar RB3280) – 25mg/mL



Branco



Mistura de extratos (ME)



Os cromatogramas apresentados mostram claramente a complexidade dos extratos selecionados. Existem picos distribuídos por diferentes faixas dos cromatogramas, indicando uma composição metabólica de ampla faixa de polaridade, em diferentes concentrações.

O uso dos dois detectores em série permitiu a detecção simultânea de substâncias contendo grupos cromofóricos no UV, além de substâncias transparentes à esta faixa de radiação. Além disso, o uso do CAD permitiu uma quantificação relativa (com restrições, devido à diferença de volatilidade do solvente que compõe a fase móvel), visto que a resposta do detector é diretamente proporcional à concentração dos analitos na amostra.

Em alguns cromatogramas é possível observar a ocorrência de picos alargados (principalmente nos extratos de *Pterogyne nitens* e *Cassia spectabilis*). Estes picos são, provavelmente, referentes a alcalóides guanidínicos já descritos em *P. nitens*^{116, 126} e alcalóides piperidínicos, já descritos para *C. spectabilis*^{129, 120}. Esses metabólitos possuem caráter básico e são fortemente adsorvidos nas fases estacionárias empregadas. A ocorrência deste alargamento sugere a necessidade de um segundo modificador na fase móvel (além do ácido fórmico), como por exemplo modificadores amínicos, capazes de “mascarar” compostos de caráter ácido presentes na fase estacionária, evitando a forte adsorção de compostos básicos.

A complexidade da mistura de extratos é claramente observada em seu cromatograma, que apresenta picos distribuídos desde o volume morto até a

condição final do gradiente (100% B). Este fato é melhor observado quando o detector de aerossol carregado é empregado, indicando a presença de compostos com pouca ou sem absorção no UV, principalmente em regiões mais apolares do cromatograma.

4.2. Estudos de recondicionamento do sistema (coluna ²D)

Em casos onde se emprega modos de eluição em gradiente em ²D, a etapa de recondicionamento da coluna é de fundamental importância para garantir a repetibilidade dos tempos de retenção nas diferentes modulações. Considerando-se isso e o fato de que as análises são geralmente muito rápidas (1 ou 2 minutos), o objetivo destes testes foi determinar o volume mínimo de FM que deveria ser eluído através da coluna para garantir o recondicionamento ideal, permitindo o emprego de maior parte do tempo da análise na separação em si.

Neste teste, o sistema foi configurado a fim de mimetizar um sistema cromatográfico bidimensional onde a solução de padrões eluiu diretamente para a coluna em ²D, impulsionada pela bomba ¹D. Essa solução preenchia o *loop* de amostra acoplado à válvula de 10 portas e 2 posições que por sua vez era eletronicamente acionada a cada 2 minutos, fazendo com que a amostra fosse eluída para a coluna em ²D pelo fluxo de solvente da bomba ²D. A partir dos cromatogramas obtidos foi possível verificar o tempo / volume mínimo de recondicionamento da coluna através da repetibilidade do tempo de retenção dos compostos. Foi possível avaliar ainda, se os tempos / volumes de recondicionamento variavam de acordo com o solvente empregado.

A Figura 10 exemplifica os dados obtidos. Observa-se que os tempos de retenção na ²D se mantêm constantes até a 7^a modulação, referente a uma análise empregando 0,4 min de recondicionamento. Além disso, é possível observar nas duas últimas modulações (análises com 0,2 min de recondicionamento) que a separação é completamente comprometida e os dois compostos são eluídos praticamente juntos no volume morto da coluna. A Tabela 8 reúne os resultados para as diferentes colunas avaliadas.

Figura 10. Cromatograma obtido utilizando a configuração adotada nos testes de tempo de recondicionamento (t_e) da coluna Discovery HSF5 (4,6 mm x 33 mm, 3 μ m), com MeOH (cores separando os diferentes tempos de equilíbrio, sendo, da esquerda para a direita, de 0,5; 0,4; 0,3 e 0,2 min).

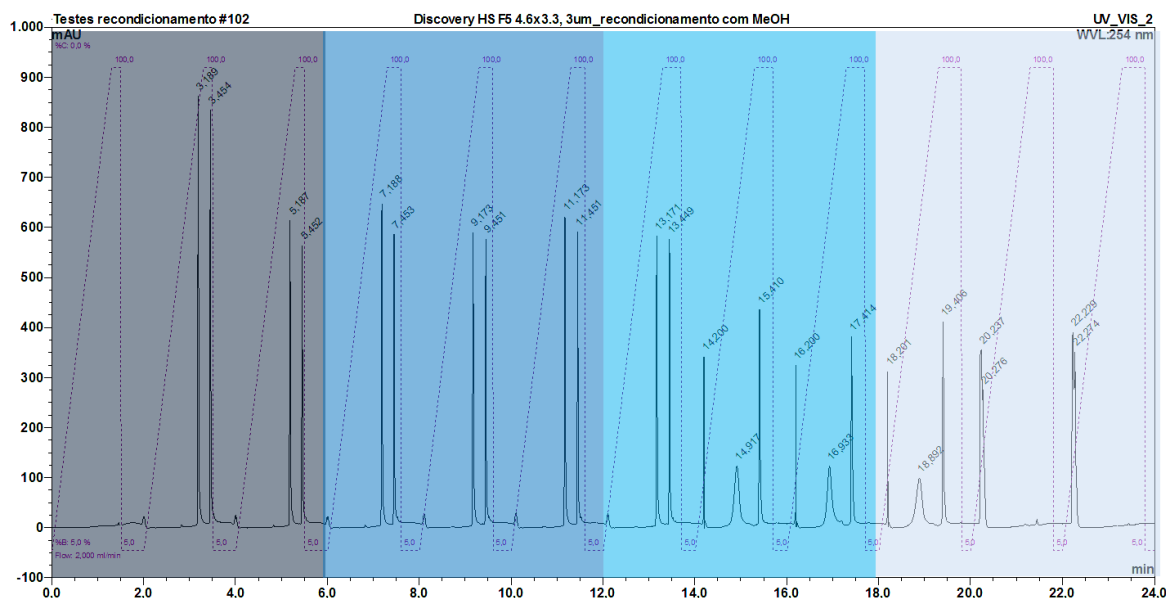


Tabela 8. Valores mínimos ideais de volume de recondicionamento obtidos para diferentes colunas destinadas à 2D .

Coluna (2D)	V_{morto} (mL)	V_{recond} (mL)	
		ACN	MeOH
Poroshell 120 Phenyl-Hexyl 4,6x50 mm, 2,7 μ m	0,5	1,0	0,8
Poroshell 120 Bonus RP 4,6x50 mm, 2,7 μ m	0,5	0,8	0,8
Discovery HS F5 4,6x33 mm, 3 μ m	0,4	1,0	0,8
Kinetex PFP 4,6x30 mm, 2,6 μ m	0,3	1,0	0,8

Os resultados obtidos corroboram com dados da literatura que afirmam a necessidade de cerca de $2V_m$ para o completo recondicionamento da coluna: um volume de coluna para remover o solvente mais forte (MeOH ou ACN) do sistema e outro volume de coluna necessário para o reequilíbrio efetivo da coluna, garantindo a repetibilidade dos tempos de retenção nas modulações subsequentes¹²⁹.

4.3. Transformação e visualização dos dados

Dentre as dificuldades relacionadas ao desenvolvimento de métodos em LC \times LC está a limitada oferta de *softwares* comerciais para transformação e análise de dados bidimensionais.

Dados bidimensionais brutos são semelhantes a cromatogramas monodimensionais, porém, repetidos em intervalos de tempo que correspondem às modulações e conseqüentemente, às separações realizadas na segunda dimensão. O tempo de modulação é um parâmetro cromatográfico dependente das condições em 1D e 2D e a frequência de aquisição de dados é um parâmetro eletrônico relacionado diretamente à resolução digital do detector, selecionado pelo analista, geralmente estabelecido de acordo com a largura média dos picos.

Dados cromatográficos podem ser exportados no formato ASCII (*American Standard Code for Information Interchange*) e desta forma um cromatograma pode ser apresentado na forma de uma matriz de dados $X_{a,i}$, composta por m linhas e n colunas onde a primeira coluna representa o tempo de aquisição de dados (dependente de frequência de aquisição do detector) e as colunas consecutivas representam a intensidade da resposta do detector.

Cada x linhas (dependente da frequência de aquisição de dados) representa um cromatograma da segunda dimensão. A função básica dos *softwares* de conversão de dados é transpor linhas em novas colunas, gerando uma nova dimensão, convertendo a matriz inicial em um vetor de dados. Isso pode ser feito manualmente, convertendo as linhas referentes a cada cromatograma da segunda dimensão em uma nova coluna, porém esta tarefa é bastante tediosa.

Os cromatogramas brutos obtidos preliminarmente neste trabalho foram convertidos em cromatogramas bidimensionais empregando um algoritmo *home made* (Microsoft Excel[®]) e então representados como gráficos bi ou tridimensionais em *software* estatísticos (Origin[®], Statistica[®], Matlab[®]).

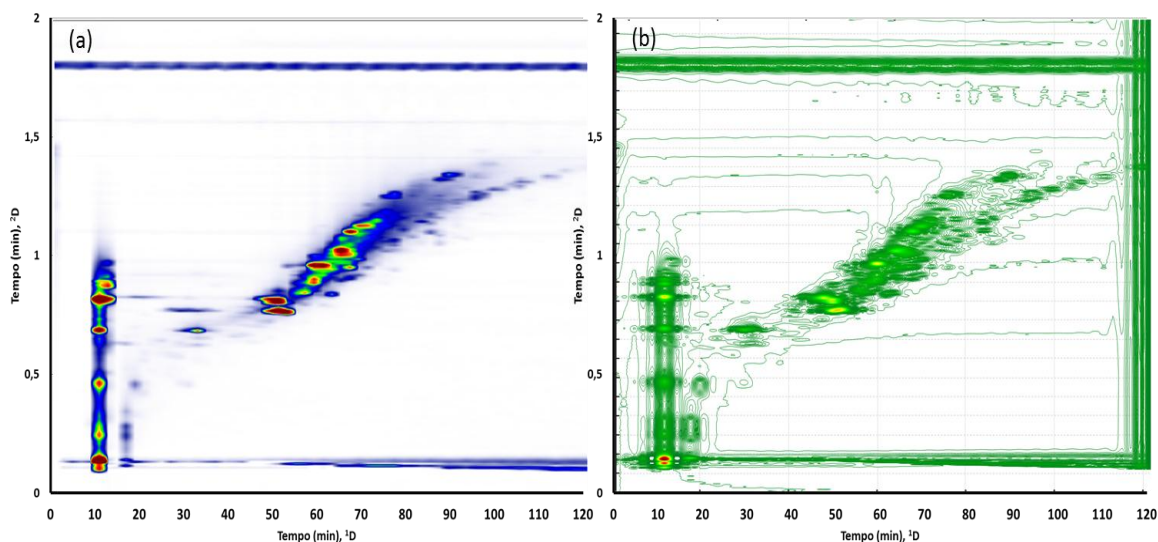
A função do algoritmo é unicamente converter as linhas referentes a cada cromatograma em 2D em uma nova coluna, o que poderia ser feito manualmente através das funções *Recortar/Colar*. A planilha de dados reorganizados é então utilizada para obter um gráfico tridimensional.

Dentre as vantagens deste procedimento estão o baixo custo, por se tratarem de *softwares* comumente empregados, e a possibilidade de representação de dados cromatográficos bidimensionais obtidos em modo *offline*, que não é suportada por nenhum *software* comercial atualmente disponível.

O procedimento descrito é uma alternativa quando *softwares* comerciais não estão disponíveis. Devido à enorme quantidade de dados gerados e número de

cromatogramas a serem convertidos, todas as análises descritas a seguir foram analisadas empregado o *software* LC Image.

Figura 11. Comparação entre os plots bidimensionais obtidos empregando (a) software comercial LC Image e (b) conversão *home-made* (Excel / Statística).



4.4. Desenvolvimento do método cromatográfico

4.2.1 Seleção do par cromatográfico (para cana-de-açúcar)

Não há na literatura nenhuma proposta de avaliação da ortogonalidade de sistemas cromatográficos bidimensionais considerando-os como sistemas únicos e empregando amostras reais. Por este motivo, propôs-se o emprego da amostra e a avaliação dos sistemas cromatográficos (FE/FM) concomitantemente, uma vez que um fator mais importante que a correlação entre as colunas é a fração do espaço 2D ocupado por picos.

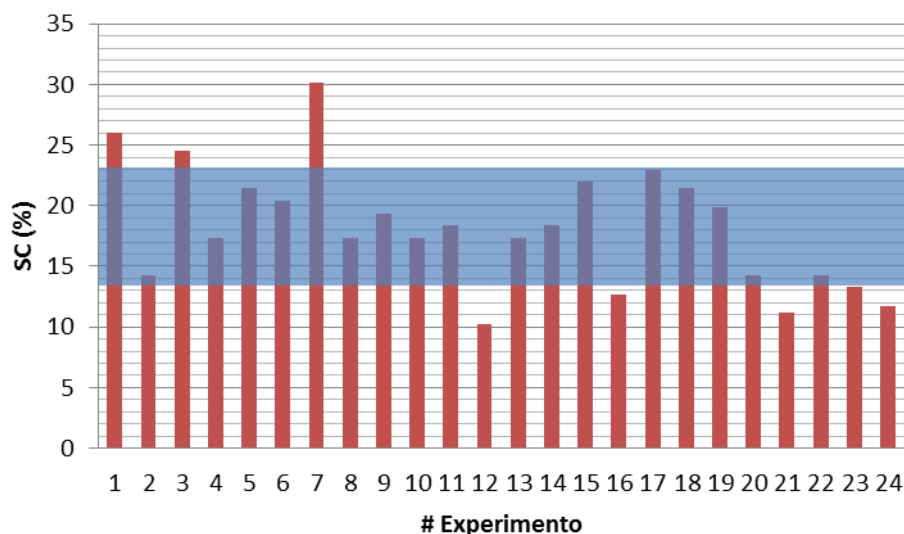
Os resultados são apresentados na Tabela 9 e Figura 12.

Tabela 9. Combinações experimentais empregadas na etapa de seleção dos sistemas cromatográficos e respectivas áreas relativas ocupadas (amostra: extrato de folhas de cana-de-açúcar).

# Exp.	Coluna		Mod. Org.		A _{ocupada} (%)
	¹ D	² D	¹ D	² D	
1	C18	PFP	MeOH	MeOH	26
2	C18	PFP	MeOH	ACN	14
3	C18	PFP	ACN	MeOH	24
4	C18	PFP	ACN	ACN	17
5	Hydro	PFP	MeOH	MeOH	21
6	Hydro	PFP	MeOH	ACN	20
7*	Hydro	PFP	ACN	MeOH	30
8	Hydro	PFP	ACN	ACN	17
9	C18	Phenyl	MeOH	MeOH	19
10	C18	Phenyl	MeOH	ACN	17
11	C18	Phenyl	ACN	MeOH	18
12*	C18	Phenyl	ACN	ACN	10
13	Hydro	Phenyl	MeOH	MeOH	17
14	Hydro	Phenyl	MeOH	ACN	18
15	Hydro	Phenyl	ACN	MeOH	22
16	Hydro	Phenyl	ACN	ACN	13
17	Phenyl	PFP	MeOH	MeOH	23
18	Phenyl	PFP	MeOH	ACN	21
19	Phenyl	PFP	ACN	MeOH	20
20	Phenyl	PFP	ACN	ACN	14
21	Phenyl	Phenyl	MeOH	MeOH	11
22	Phenyl	Phenyl	MeOH	ACN	14
23	Phenyl	Phenyl	ACN	MeOH	13
24	Phenyl	Phenyl	ACN	ACN	12

*Por razões práticas, os nomes das colunas foram codificados. A descrição detalhada das mesmas é apresentada em *Materiais e Métodos, Reagentes e Materiais*.

Figura 12. Ocupação relativa do espaço de separação das 24 combinações experimentais avaliadas (em azul, intervalo entre a média \pm desvio padrão) para o extrato de folhas de cana-de-açúcar.

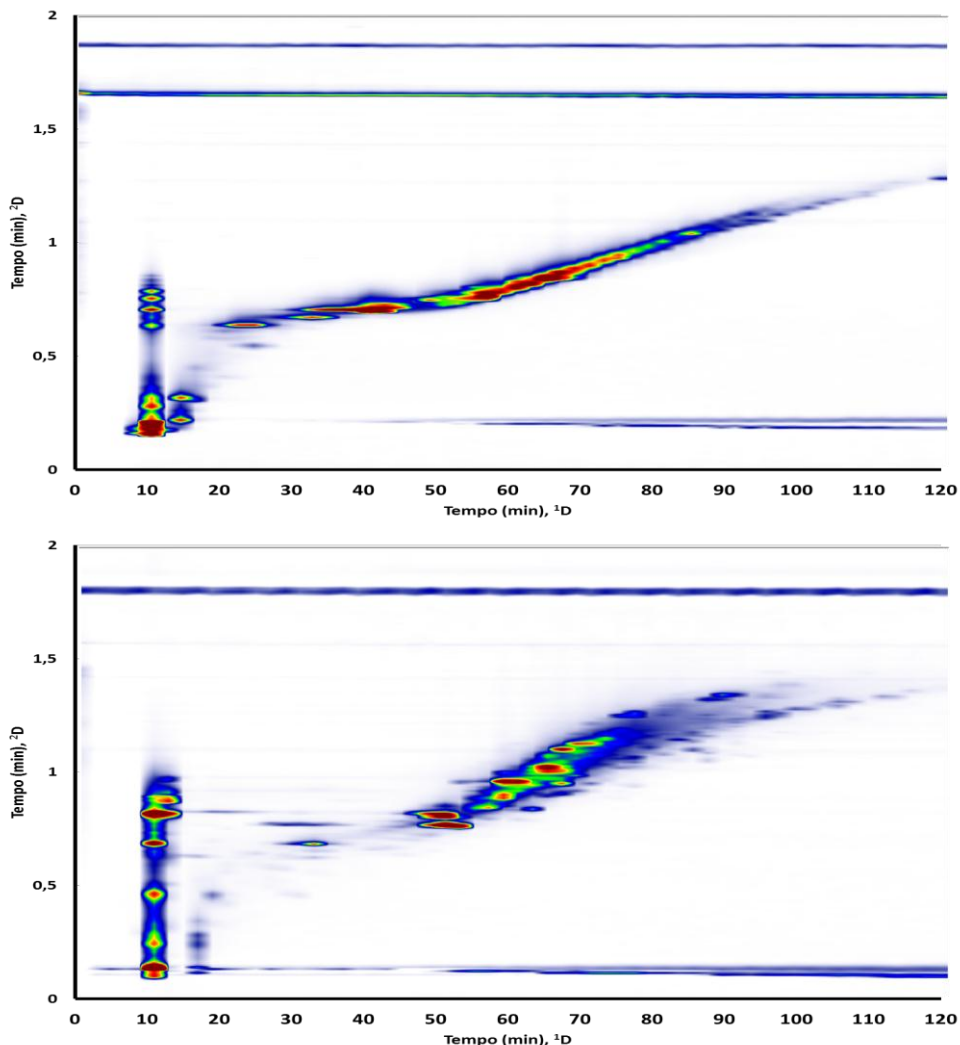


Como esperado, os valores de ocupação da superfície são pequenos devido ao emprego de mecanismos de separação muito semelhantes nas duas dimensões e ao uso de condições de eluição não otimizadas. Este fato é ainda mais notável quando o mesmo solvente é empregado nas duas dimensões, oferecendo praticamente nenhuma diferença de seletividade. Por exemplo, quando a coluna *Phenyl* é empregada em ¹D, combinada com a coluna *Phenyl-Hexyl* em ²D, um sistema pouco ortogonal é observado, principalmente nos experimentos onde o mesmo solvente foi empregado em ¹D e ²D (#21 e #24), no entanto, quando os solventes são diferentes, o valor de ocupação da superfície é maior (#22 e #23).

É importante ressaltar que apesar da seleção prévia das colunas ter sido feita através do catálogo de seletividade da Waters^{®121}, buscando-se colunas de seletividade distintas, todas elas são muito similares e não oferecem diferenças significativas nos perfis de separação da amostra analisada, porque a classificação é feita em relação ao comportamento cromatográfico da coluna frente a compostos com características muito específicas (seletividade em relação a amitriptilina e acenaftaleno e hidrofobicidade em relação a acenaftaleno).

Apesar dos baixos valores de ocupação da superfície, as diferenças entre os experimentos são claras. A Figura 13 apresenta os cromatogramas com a menor e maior distribuição de picos, respectivamente experimentos #7 e #12). As linhas horizontais observadas próximas a 0,1 min e 1,7 min no eixo y (tempo de separação em ²D) são referentes à oscilação da linha de base devido à modulação.

Figura 13. Cromatogramas bidimensionais das condições 7 e 12; (a) ¹D C18/ACN, ²D Phenyl/ACN; (b) ¹D Hydro/ACN, ²D PFP/MeOH. Condições cromatográficas: ¹D: 0 min, 10% B/C, 100min, 100% B/C, 120min, 100% B/C a uma vazão de 10 µL/min. ²D: 0-0,1 min, 5% B/C, 0,1-1,3 min, 5-100% B/C, 1,3-1,5 min, 100% B/C, 1,5-1,51 min, 100-5% B/C, 1,51-2,0 min, 5% B/C, vazão de 3,0 mL/min. Modulações de 2,0 min. Detecção: UV a 254 nm.



4.2.2 Seleção das variáveis relevantes na otimização – Planejamento Fatorial Fracionário (2^{n-2})

Planejamentos do tipo “fatorial fracionário” consistem em uma fração estatisticamente selecionada dos experimentos de um planejamento fatorial completo¹³⁰.

Eles são úteis na identificação de variáveis relevantes ou irrelevantes empregando um número reduzido de experimentos quando comparado a um planejamento fatorial completo.

Seis fatores foram avaliados empregando-se um planejamento fatorial fracionário em dois níveis (2_{IV}^{6-2}), a partir de 16 experimentos. Durante esta

triagem inicial, o número de picos obtidos nos cromatogramas bidimensionais a 254 nm e a fração de recobrimento da superfície foram usados como respostas.

Os fatores avaliados foram selecionados a fim de contemplar diferentes *descritores de qualidade*⁴¹: tempo de análise, resolução e limite de detecção. A variável X_1 (tempo de análise em ¹D tem influência direta no descritor *tempo*, além de influenciar indiretamente na seletividade, uma vez que mudanças no tempo de gradiente podem afetar a seletividade¹³¹ e, conseqüentemente, a resolução. A variável X_2 (tempo de modulação) relaciona-se diretamente com a *resolução* enquanto que X_3 (volume de injeção) influi diretamente nos *limites de detecção*. X_4 (vazão em ²D) pode influenciar a resolução e os limites de detecção, uma vez que vazões maiores favorecem a diluição da fração eluída em ¹D e submetida à separação em ²D. As variáveis X_5 e X_6 (concentração de ácido na fase móvel e concentração final de modificador orgânico em ¹D, respectivamente) foram consideradas por oferecerem influências na seletividade e resolução.

No intervalo avaliado, X_1 , X_2 , X_3 e X_2X_4 (Tabela 4) (tempo de análise em ¹D, tempo de modulação, volume de injeção e a interação entre tempo de modulação e vazão, respectivamente) mostraram-se estatisticamente significantes em um intervalo de 95% de confiança, apresentando um R^2 de 0,88 e variância explicada de 88%, considerando-se somente o número de picos como resposta. Quando a superfície de recobrimento é considerada, as variáveis X_2 e X_2X_4 geram um R^2 de 0,91, ou seja, somente esses dois coeficientes são responsáveis por 91% da variância explicada dos resultados.

4.2.3 Otimização (Planejamento Composto Central)

Após a determinação das variáveis relevantes na otimização cromatográfica, um planejamento composto central (CCD) foi aplicado (Tabela 5). O CCD é uma alternativa muito utilizada na literatura devido à característica de englobar cinco níveis para cada variável mantendo um número razoável de experimentos¹³⁰. As variáveis que se mostraram irrelevantes na etapa anterior foram fixadas: X_5 (concentração de ácido fórmico na fase móvel) e X_6 (concentração final de modificador orgânico no gradiente em ¹D) em 0,025% e 100% respectivamente.

Durante esta etapa de otimização, o número de picos observados nos cromatogramas a 254 nm e CAD e a fração do recobrimento de cada um

foram empregados como respostas.

A partir dos experimentos realizados foi possível obter diferentes modelos matemáticos para as diferentes respostas e detectores empregados, que permitiu identificar os valores ótimos das variáveis independentes a fim de obter a melhor resposta.

Os valores ótimos preditos mostraram-se fora do domínio experimental avaliado, indicando uma tendência de crescimento das respostas quando os valores das variáveis se distanciavam do ponto central. Novas condições foram testadas e os valores ótimos para as variáveis estudadas, nos níveis avaliados, foram: a) considerando-se o detector de aerossol carregado (CAD), X_1 , X_2 e X_3 em seus níveis mais altos e X_4 em seu nível mais baixo, isto é, 120 min, 2 min, 10 μ L e 3 mL/min respectivamente; b) considerando-se o detector de arranjo de diodos (DAD), X_2 e X_4 em seus níveis mais altos e X_1 e X_3 em níveis altos ou baixos, desde que ambos estivessem em mesmos níveis (ambos em níveis altos ou ambos em níveis baixos), isto é, X_2 e X_4 iguais a 2 min e 4 mL/min respectivamente e X_1 e X_3 iguais a 120 min e 10 μ L ou 90 min e 5 μ L, respectivamente.

O modelo matemático obtido apresenta baixos valores de R^2 e falta de ajuste que, porém, se justificam pela complexidade do sistema em questão, no entanto, os valores ótimos obtidos são muito próximos daqueles obtidos empiricamente.

4.2.4 Otimização do gradiente em 2D

Segmentação (*Segment in Fraction*)

Diversos trabalhos discutem o uso de modos de eluição diferenciados na segunda dimensão cromatográfica buscando um melhor aproveitamento da superfície de separação^{76; 99; 132}. O uso de diferentes gradientes em diferentes segmentos da primeira dimensão se mostra como uma alternativa interessante para o aumento da capacidade de picos em 2D ⁷⁶ e da ortogonalidade, especialmente quando dois sistemas pouco ortogonais são empregados (RP-LC \times RP-LC). Nestes casos, compostos de elevada hidrofobicidade e pouco retidos na 1D também o serão na 2D . O mesmo acontece com compostos hidrofóbicos com grande retenção em 1D e também em 2D . Em situações desta natureza, gradientes idênticos em 2D (FIF) não oferecem vantagens na separação bidimensional e o resultado esperado é um cromatograma onde a maioria dos picos ocupa a área próxima à diagonal da

superfície.

Abordagens do tipo *Segment in Fraction* empregam diferentes variações na concentração de modificador orgânico em segmentos subsequentes de 1D, menores do que as empregadas no tipo *Full in Fraction (FIF)* e favorecem um melhor aproveitamento do espaço de separação.

Não existe na literatura nenhuma proposta de otimização dos gradientes quando este tipo de abordagem é empregado. Uma proposta foi feita a partir de estudos monodimensionais preliminares empregando padrões homólogos de derivados esterificados de ácido protocatecuico (Figura 14) - protocatecuato de etila, propila, butila, pentila, hexila, tetradecila e dodecila. A escolha deste grupo de substâncias justifica-se pelo comportamento previsível da retenção em modo reverso (quanto maior a cadeia lateral, maior a retenção). Os derivados foram selecionados buscando-se uma ocupação parcial da janela de separação cromatográfica, na qual o primeiro composto apresentasse alguma retenção no sistema empregado ($k^* \neq 0$) quando um gradiente amplo fosse empregado (5-100%B/C), como apresentado na Figura 15.

Figura 14. Derivado esterificado do ácido protocatecuico..

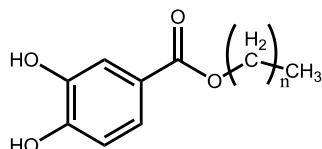
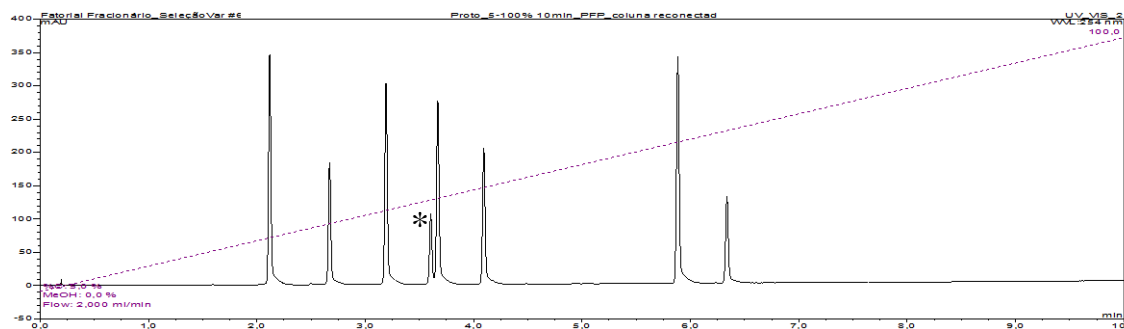


Figura 15. Separação cromatográfica dos 7 padrões selecionados. Coluna Kinetex PFP (4,6 x 3,0 cm; 2,6 μ m), gradiente linear, 0 min, 5% C; 10 min, 100% C, 2 mL/min. ((C) ACN + 0,05% ácido fórmico).

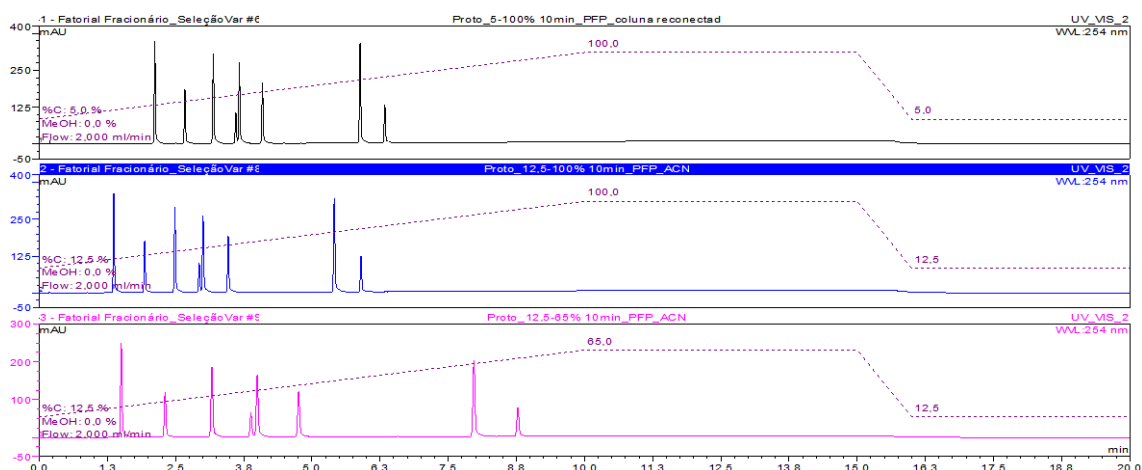


*contaminante.

A partir das condições preliminares (1D) um novo gradiente foi planejado,

mantendo-se o tempo do gradiente constante (10 min). O valor final de modificador orgânico empregado deveria ser aquele no qual o último pico fosse eluído, isso é, o incremento de modificador orgânico por unidade de tempo, multiplicado pelo tempo de retenção do composto mais retido. O valor inicial deveria ser um valor tal que não prejudicasse a separação obtida anteriormente, porém, adiantando o tempo de retenção do composto menos retido. Diferentes condições foram empregadas e os resultados mostraram que, de forma geral, a metade da concentração de modificador orgânico no qual o primeiro composto é eluído parece ser uma boa aproximação para o valor inicial do gradiente (Figura 16).

Figura 16. Separação cromatográfica dos 7 padrões selecionados. Coluna Kinetex PFP (4,6 x 3,0 cm; 2,6 µm). Gradiente linear (a) 0 min, 5% B; 10 min, 100% B; (b) 0 min, 12,5% C; 10 min, 100% C; (c) 0 min, 12,5% C; 10 min, 65% C; 2 mL/min. ((C) ACN + 0,05% ácido fórmico).



- (a) Condição inicial: 5-100 %B em 10 min ($\Delta=95\%B$; 9,5 %B/min)
- (b) Concentração M.O. inicial modificada:
%B na qual o composto menos retido elui, nesse caso:
 $[(2,1 \text{ min} \times (9,5\%/min))] + 5\% (\text{inicial})/2 = 12,5\%$
- (c) Concentração M.O. final modificada:
%B na qual o composto mais retido, nesse caso:
 $[6,3 \text{ min} \times (9,5\%/min)] + 5\%(\text{inicial}) = 65\%$

Tal abordagem pode ser empregada na otimização de ²D em sistemas bidimensionais a partir do cromatograma preliminar e os valores de concentração de modificador orgânico dos picos menos e mais retidos de cada segmento. As Figuras 17 e 18 apresentam uma aplicação prática desta proposta.

Figura 17. Separação LC×LC de extrato de folhas de cana-de-açúcar. ¹D coluna Synergi Hydro (150 x 1 mm, 4 μm), gradiente linear 0 min, 5% B, 120 min, 100%B, 10 μL/min ; ²D coluna Kinetex PFP (4,6 x 30 mm, 2,6 μm), (a) FIF, 0 min, 5%B; 1,3 min, 100%B, (b) SIF, 1º segmento (0-40 min) 0 min, 5% B, 1,3 min, 55% B; 2º segmento (42-80 min) 0 min, 16% B, 1,3 min, 71% B; 3º segmento (82-120 min) 0 min, 51% B, 1,3 min, 80% B. Detecção: UV a 254 nm.

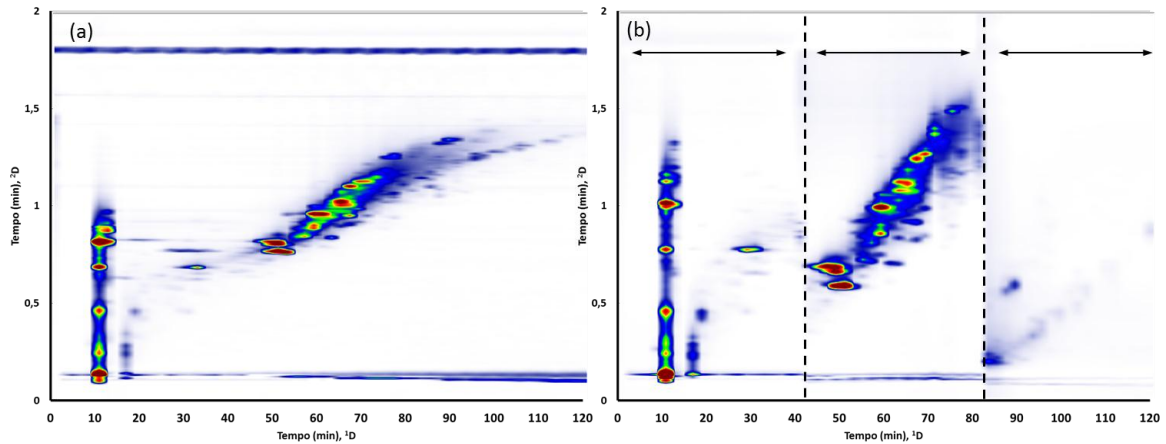
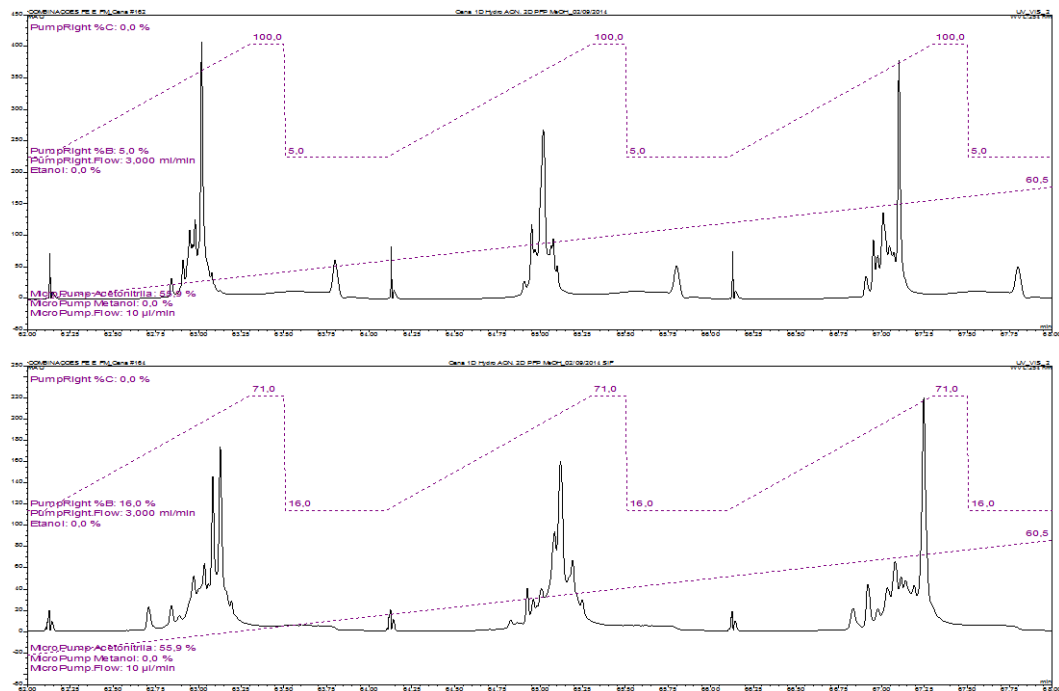


Figura 18. Região compreendida entre 62 e 68 min (referente a três modulações consecutivas), dos cromatogramas apresentados anteriormente. (a) FIF, (b) SIF.



Apesar de bastante simples, o cálculo dos valores iniciais e finais dos segmentos pode levar algum tempo e ser suscetível a erros. Por este motivo, uma planilha Excel[®] foi criada a fim de facilitar os cálculos. A partir de um cromatograma obtido em condições abrangentes de gradiente (FIF), obtém-se os *inputs*: o número de segmentos desejado, as porcentagens iniciais e finais e tempo do

gradiente empregado e tempos de retenção dos picos menos e mais retidos de cada segmento. A planilha retorna automaticamente os valores iniciais e finais do gradiente “otimizado”.

Apesar de favorecer a distribuição de picos na superfície, essa abordagem parece não ser adequada uma vez que a amostra analisada apresenta picos distribuídos por toda a extensão de 1D , não permitindo a segmentação sem eventuais “danos” ao cromatograma: gradientes muito distintos são empregados na interface dos segmentos, fazendo com que picos em processo de modulação em 1D tenham diferentes tempos de retenção em 2D , duplicando picos de uma mesma substância no *plot* final. É interessante observar que a maioria dos trabalhos onde essa abordagem é empregada apresenta separações bidimensionais de misturas de padrões e que existem regiões “vazias” no cromatograma, permitindo a segmentação sem causar danos ao cromatograma final¹³².

Buscando evitar esta situação, diferentes abordagens de segmentação foram empregadas.

Quando o número de segmentos empregados tende ao número de modulações, o recobrimento da superfície tende a ser maior. Nesses casos, pequenas variações entre as condições de gradiente de modulações sequenciais são suficientemente baixas para não duplicar picos em processo de modulação. Assim, sugere-se que em situações onde a distribuição de picos em 1D é praticamente uniforme, sejam empregados gradientes segmentados com pequenas modificações na força de eluição inicial em 2D , ou seja, gradientes continuamente deslocados (*Shift Gradients*).

4.5. Estudo da repetibilidade do método

A validação do método proposto foi baseada na estimativa da precisão instrumental a partir de cinco análises consecutivas da mesma amostra (extrato de folhas de cana-de-açúcar) e do número de picos detectados (UV a 254 nm) e da fração do recobrimento da superfície. Os resultados são apresentados na Tabela 11.

Tabela 10. Dados referentes à avaliação da repetibilidade do método proposto.

Exp. #	Número de picos	% de recobrimento
1	41	17
2	43	18
3	43	19
4	43	19
5	41	18
Média	42,2	18,2
Desv.Pad.	1,1	0,7
CV(%)	2	3,9

Os valores apresentados indicam uma boa repetibilidade do método proposto.

4.6. Aplicação da proposta de otimização a diferentes amostras

O processo de otimização apresentado anteriormente foi aplicado a uma mistura de extratos vegetais, de espécies previamente selecionadas de acordo com suas composições micromoleculares diversas.

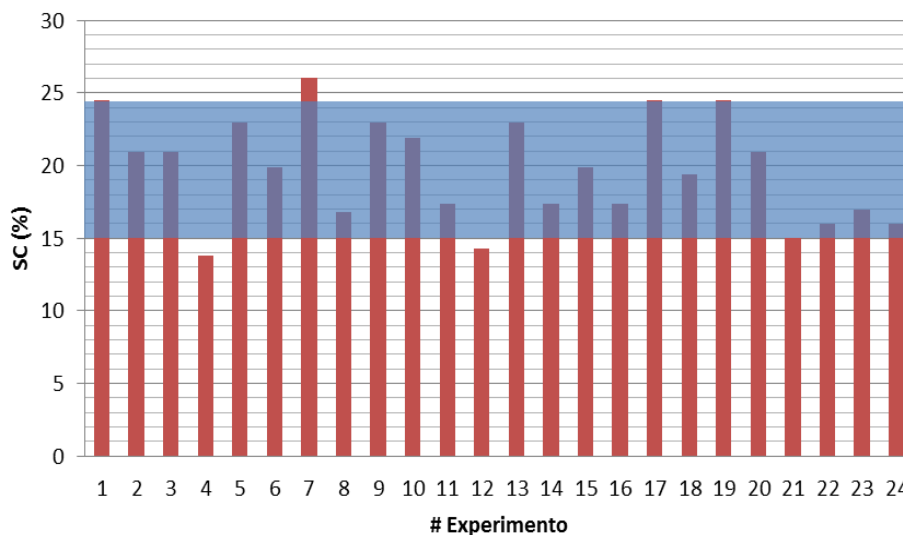
A seleção do par cromatográfico foi realizada empregando a amostra real (ME) e todas as 24 combinações experimentais descritas anteriormente, empregando condições genéricas de separação. A qualidade da separação foi avaliada pela ocupação do espaço bidimensional, empregando o método proposto por Gilar e colaboradores^{70; 123} (adaptado), discutido anteriormente.

Os resultados são apresentados na Tabela 11 e Figura 19.

Tabela 11. Combinações experimentais empregadas na etapa de seleção dos sistemas cromatográficos e respectivas áreas relativas ocupadas (amostra: mistura de extratos).

# Exp.	Coluna		Mod. Org.		A _{ocupada} (%)
	¹ D	² D	¹ D	² D	
1	C18	PFP	MeOH	MeOH	24
2	C18	PFP	MeOH	ACN	21
3	C18	PFP	ACN	MeOH	21
4	C18	PFP	ACN	ACN	14
5	Hydro	PFP	MeOH	MeOH	23
6	Hydro	PFP	MeOH	ACN	20
7*	Hydro	PFP	ACN	MeOH	26
8	Hydro	PFP	ACN	ACN	17
9	C18	Phenyl	MeOH	MeOH	23
10	C18	Phenyl	MeOH	ACN	22
11	C18	Phenyl	ACN	MeOH	17
12*	C18	Phenyl	ACN	ACN	14
13	Hydro	Phenyl	MeOH	MeOH	23
14	Hydro	Phenyl	MeOH	ACN	17
15	Hydro	Phenyl	ACN	MeOH	20
16	Hydro	Phenyl	ACN	ACN	17
17	Phenyl	PFP	MeOH	MeOH	24
18	Phenyl	PFP	MeOH	ACN	19
19	Phenyl	PFP	ACN	MeOH	24
20	Phenyl	PFP	ACN	ACN	21
21	Phenyl	Phenyl	MeOH	MeOH	12
22	Phenyl	Phenyl	MeOH	ACN	15
23	Phenyl	Phenyl	ACN	MeOH	13
24	Phenyl	Phenyl	ACN	ACN	11

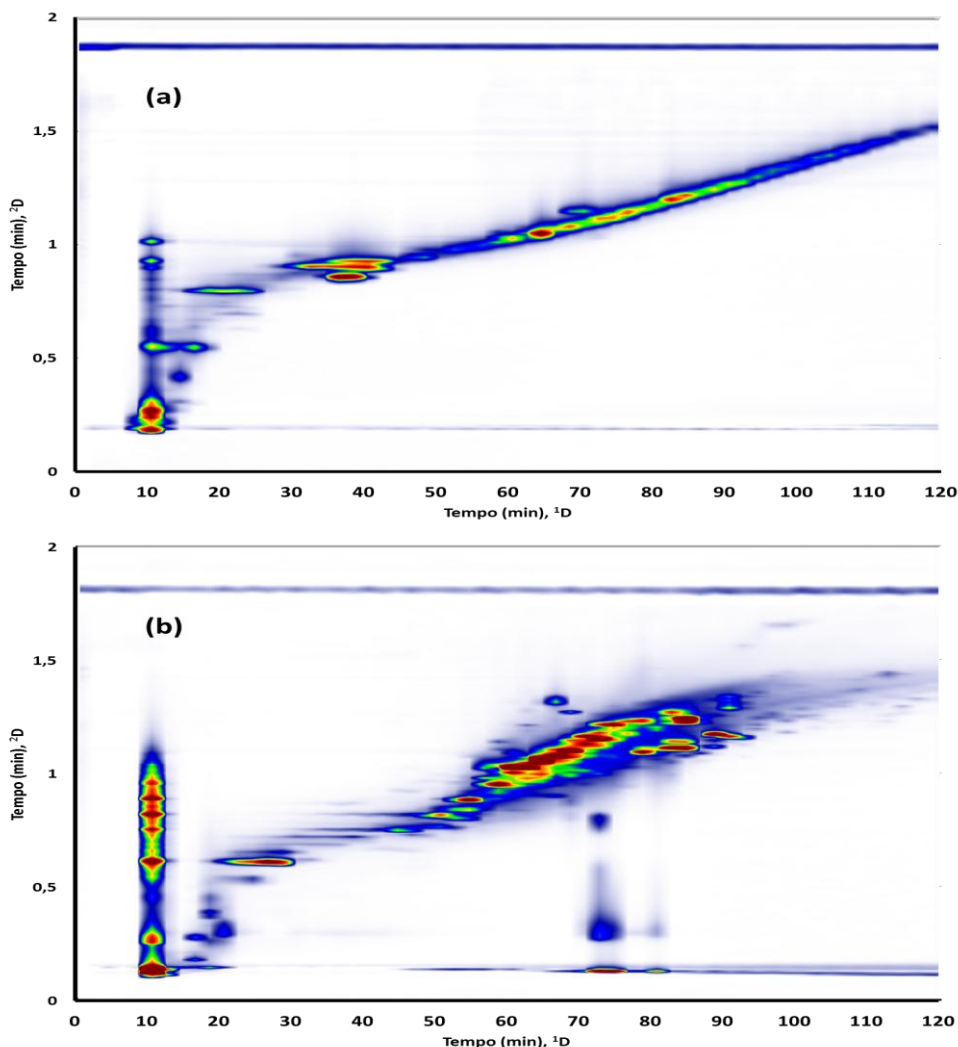
Figura 19. Ocupação relativa do espaço de separação das 16 combinações experimentais avaliadas (em azul, intervalo entre a média \pm desvio padrão) para a mistura de extratos.



Os resultados apresentados são bastante semelhantes aos obtidos anteriormente para o extrato de folhas de cana-de-açúcar. Foi possível obter um nível razoável de ortogonalidade mesmo empregando dois modos cromatográficos semelhantes (RPLC×RPLC). A relativamente recente fase ligada pentafluorofenil-propil apresenta-se como uma alternativa interessante em aplicações desta natureza por apresentar seletividade bastante distinta das fases octadecilsilil devido às múltiplas formas de interação como interações hidrofóbicas, eletrostáticas, aromáticas, estéricas e ligações de hidrogênio. Essa diferença de seletividade é particularmente destacada para compostos mais polares, com baixa retenção coluna do tipo C18.

Apesar do resultado semelhante obtido para as combinações Hydro×PFP e Phenyl×PFP, a escolha da coluna Phenyl na primeira dimensão deve-se à maior simetria de picos observada experimentalmente.

Figura 20. Cromatogramas 2D das condições 12 e 7; (a) ¹D C18/ACN, ²D Phenyl/ACN; (b) ¹D Hydro/ACN, ²D PFP/MeOH. Condições cromatográficas: ¹D: 0 min, 10% B/C, 100min, 100% B/C, 120min, 100% B/C a uma vazão de 10 µL/min. ²D: 0-0,1 min, 5% B/C, 0,1-1,3 min, 5-100% B/C, 1,3-1,5 min, 100% B/C, 1,5-1,51 min, 100-5% B/C, 1,51-2,0 min, 5% B/C, vazão de 3,0 mL/min. Modulações de 2,0 min. Detecção a 254 nm.

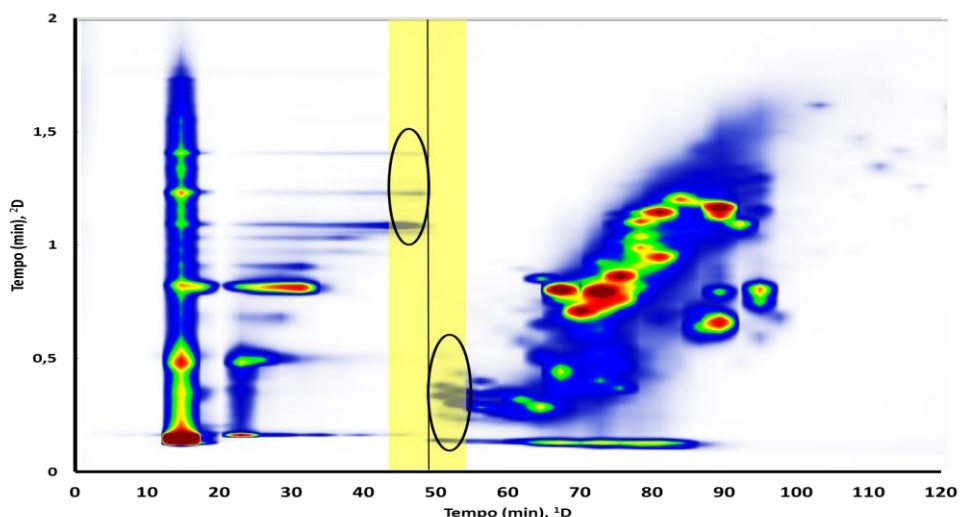


Uma vez que as dimensões das colunas selecionadas para esta amostra eram idênticas às empregadas na do extrato de folhas de cana-de-açúcar, a otimização de parâmetros como *tempo de modulação* (X_2), *vazão em ²D* (X_4) não foram realizadas e os níveis ótimos obtidos anteriormente foram empregados. Os fatores *tempo de análise ¹D* (X_1) e *volume de injeção* (X_3) não foram reavaliados e os níveis empregados foram aqueles obtidos como ótimos no planejamento composto central; as variáveis que se mostraram estatisticamente irrelevantes na etapa de seleção de variáveis foram fixadas. As condições experimentais empregadas foram: ¹D coluna Synergi Hydro (150 x 1 mm, 4 µm), gradiente linear 0 min, 5% B, 120 min, 100%B, 10 µL/min ; ²D coluna Kinetex PFP (4,6 x 30 mm, 2,6 µm), gradiente linear₅₁

FIF, 0 min, 5%B; 1,3 min, 100%B; modulação a cada 2 min.

A fim de otimizar a separação e aumentar a distribuição de picos pela superfície bidimensional, diferentes estratégias de eluição em 2^D foram adotadas. Inicialmente, a mesma proposta de segmentação aplicada ao extrato de folhas de cana-de-açúcar foi avaliada. Por se tratar de uma amostra ainda mais complexa que a anterior, a segmentação por faixas apresentou resultados não satisfatórios pelo mesmo motivo apresentado anteriormente: picos em processo de modulação na interface dos segmentos são submetidos a condições de eluição diferentes, gerando picos duplicados no cromatograma final. A Figura 21 mostra o resultado de tal abordagem.

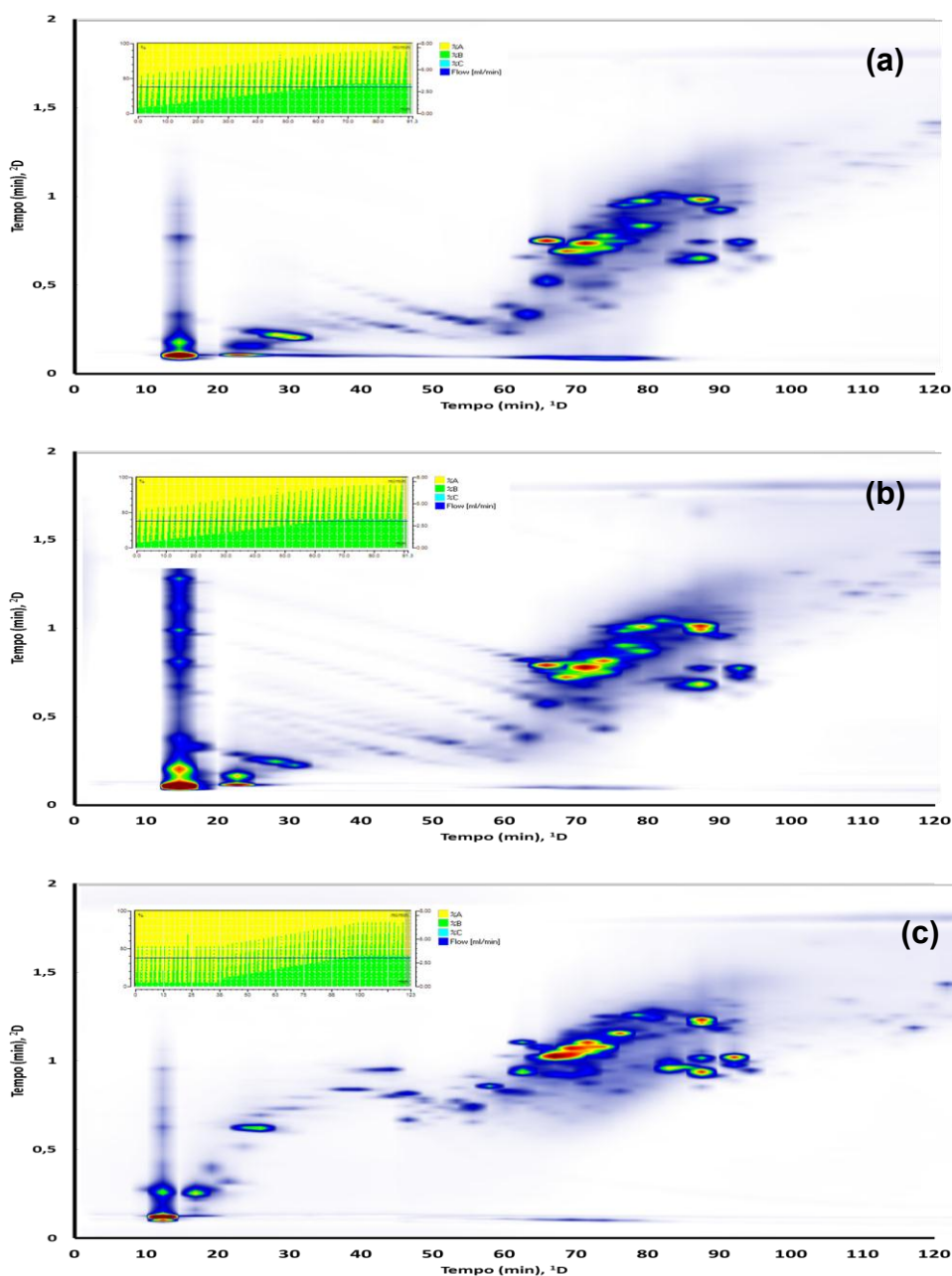
Figura 21. Cromatograma 2D da mistura de extratos, empregando gradiente segmentado (SIF). Em destaque, região de interface entre diferentes segmentos e picos possivelmente duplicados.



Nas condições empregadas, a melhor distribuição de picos só seria possível pelo emprego de diferentes métodos de eluição em 2^D . A abordagem SIF não ofereceu grandes melhorias na separação, além de ocasionar “falhas” no *plot* final. Uma vez que essa falha é ocasionada pela diferença abrupta entre as concentrações iniciais dos gradientes de cada segmento, o uso de gradientes continuamente (e suavemente) modificados pode oferecer vantagens.

A seleção das condições para tal abordagem ainda é pouco discutida na literatura e é geralmente realizada empiricamente. Neste trabalho, diferentes condições foram avaliadas, dentre elas, gradientes continuamente deslocados (SG) ou ainda, segmentos empregando diferentes abordagens (SIF + SG).

Figura 22. Condições avaliadas e cromatogramas bidimensionais obtidos. Detecção: UV a 254 nm.



O uso de gradientes deslocados tem sido descrito como a alternativa mais interessante quando modos cromatográficos semelhantes são empregados nas duas dimensões, no entanto, não há na literatura nenhuma discussão sobre o principal problema desta abordagem, relacionado à diferença nos tempos de retenção de uma mesma substância submetida consecutivamente a diferentes gradientes. Casos como esse podem ocasionar picos “falsos” no plot 2D, como pode ser visualizado na Figura 22 (a) e (b). Nesses casos, o incremento entre os gradientes consecutivos foi de 2%, o que aparentemente é uma mudança razoavelmente grande, capaz

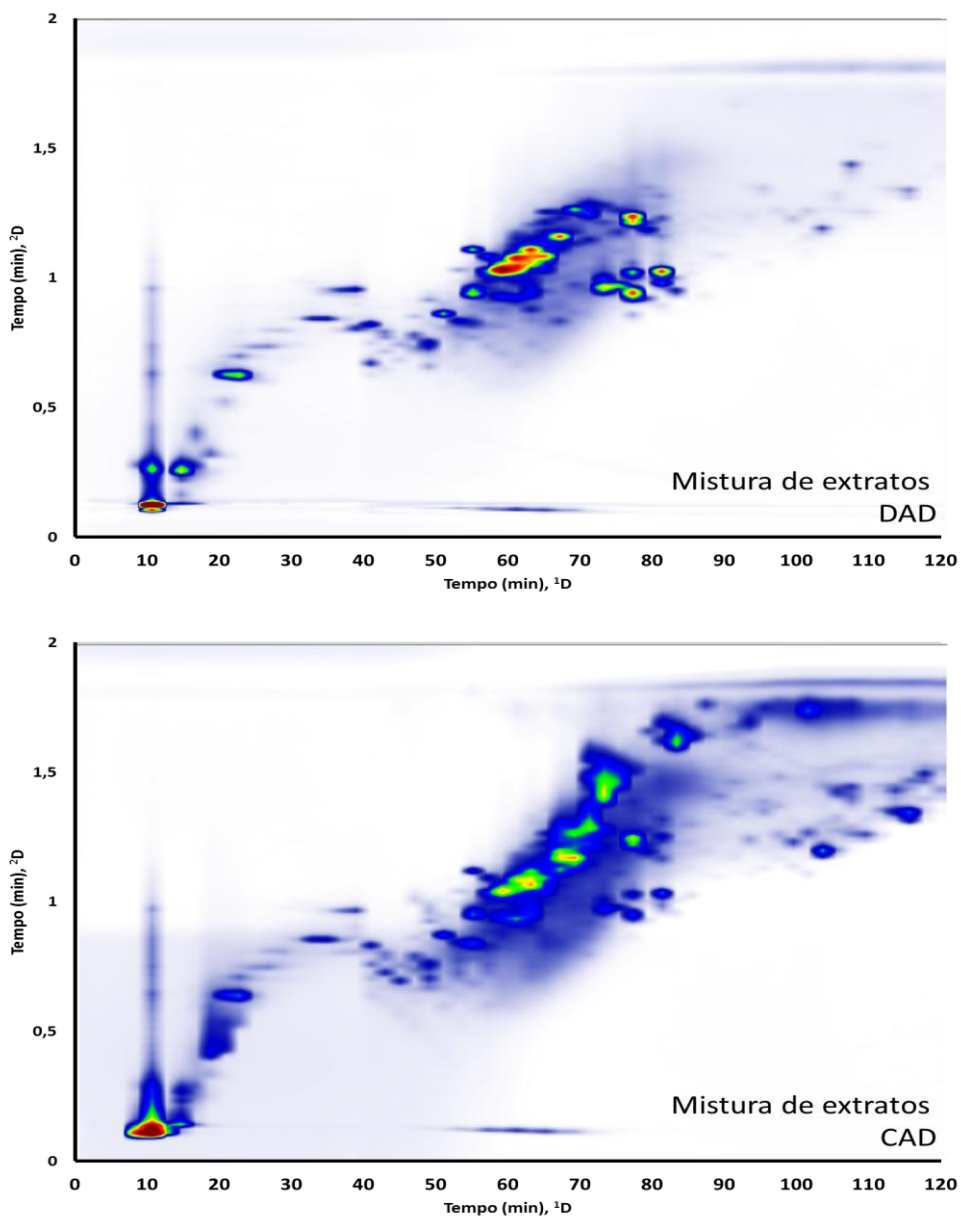
de alterar o tempo de retenção no cromatograma bruto, o que, quando convertido ao *plot* bidimensional, pode ser interpretado pelo *software* como picos diferentes. Na Figura 22 (c) o incremento empregado foi de 1% e esse efeito não foi observado. Dessa forma, reforça-se a vantagem da abordagem denominada *Shift Gradients*, porém destaca-se a desvantagem deste modo quando gradientes muito diferentes são empregados.

Dentre as condições avaliadas, a condição apresentada na Tabela 13 foi adotada como ideal. O cromatograma bidimensional resultante da análise empregando essas condições é apresentado na Figura 23.

Tabela 12. Condições experimentais otimizadas, empregando gradientes deslocados (*Shift Gradients*) em ²D.

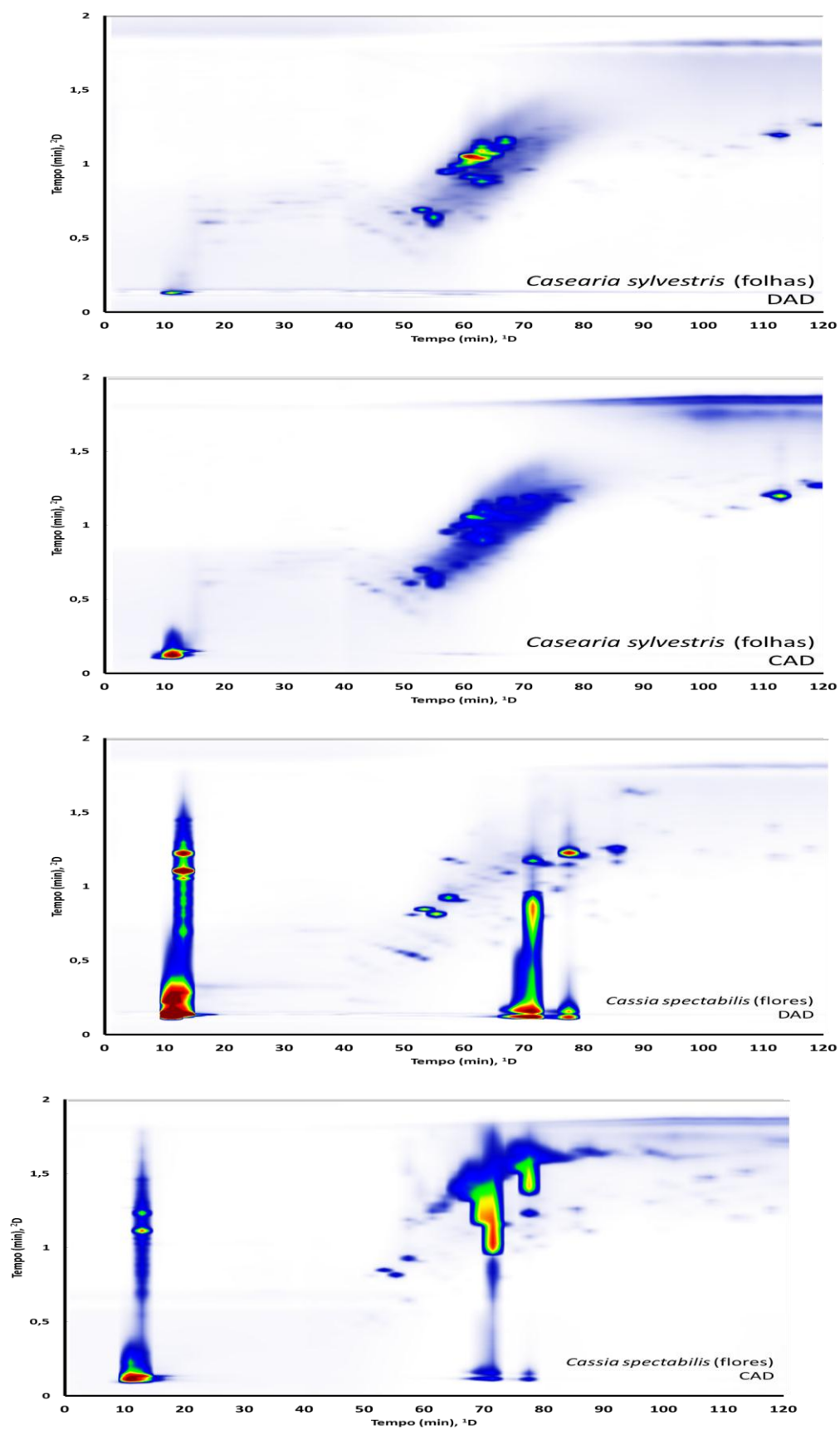
FE	FM	Vazão	Temp.	Gradiente
¹ D Synergi Hydro (150 x 1 mm, 4 µm)		10 µL/min		0 min, 10% C; 100 min, 100% C; 120 min, 100% C.
				(0-40 min) 0-0,1 min, 5% B, 0,1-1,3 min, 5-69% B, 1,3-1,5 min, 69% B, 1,5-1,51 min, 69-5% B, 1,51-2,0 min, 5% B
² D Kinetex PFP (30 x 4,6 mm, 2,6 µm)	(A) H ₂ O (B) MeOH (C) ACN (acidificados com 0,05% Ác.Fórmico)	3 mL/min	40 °C	(40-100 min) 0-0,1 min, 11% B, 0,1-1,3 min, 11-70% B, 1,3-1,5 min, 70% B, 1,5-1,51 min, 70-11% B, 1,51-2,0 min, 11% B Incrementos de 1%/modulação, até 0-0,1 min, 41% B, 0,1-1,3 min, 41-100% B, 1,3-1,5 min, 100% B, 1,5-1,51 min, 41% B, 1,51-2,0 min, 41% B
				(100-120 min) 0-0,1 min, 42% B, 0,1-1,3 min, 42-100% B, 1,3-1,5 min, 100% B, 1,5-1,51 min, 100-42% B, 1,51-2,0 min, 42% B

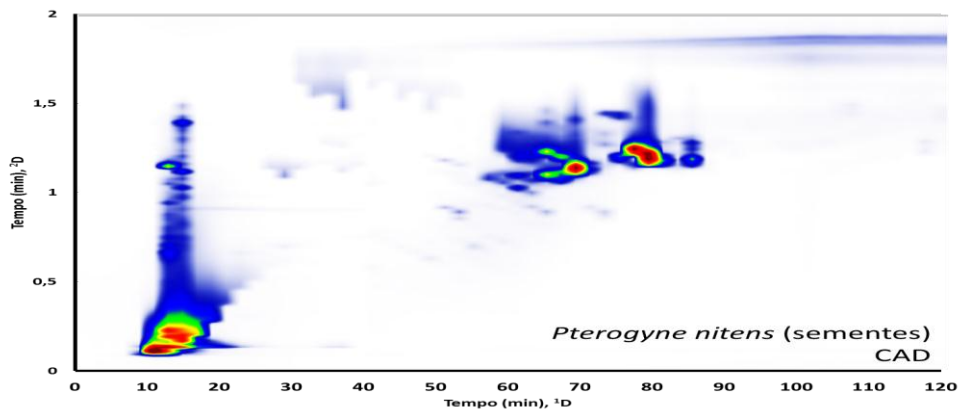
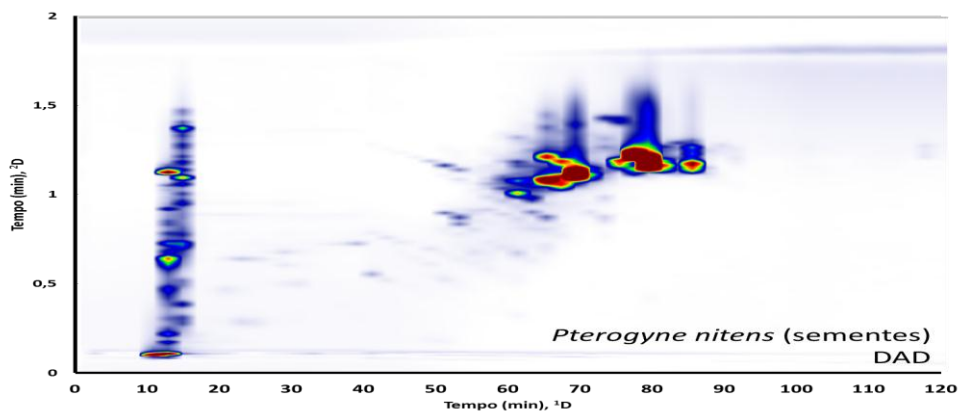
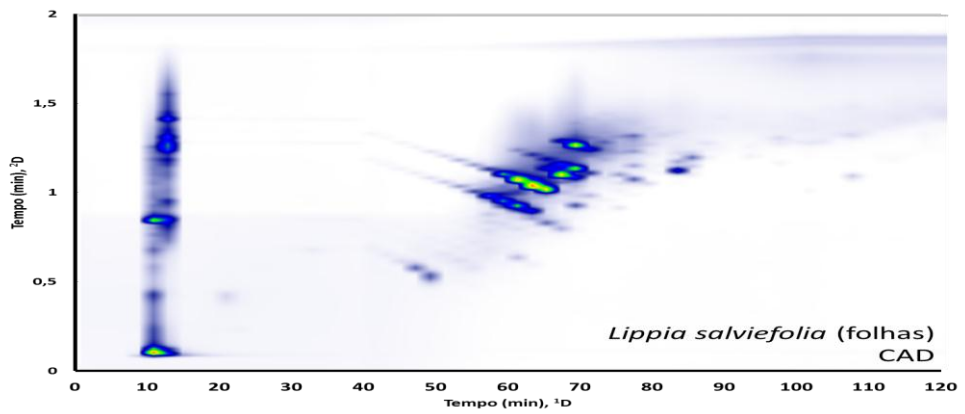
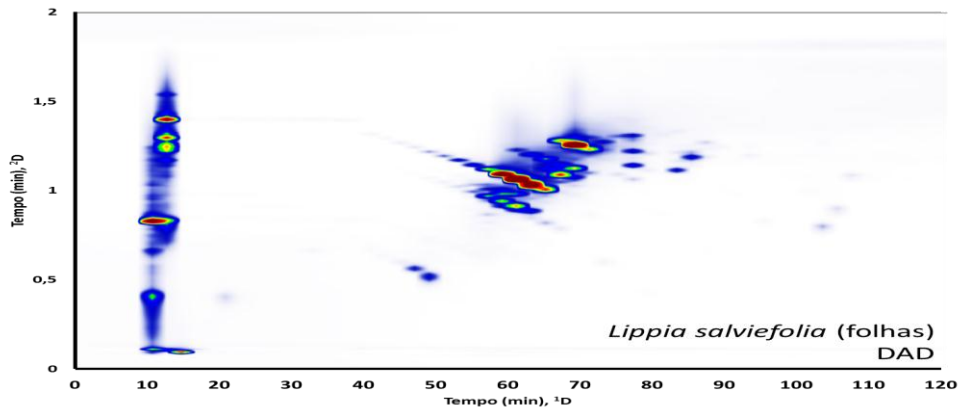
Figura 23. Cromatograma 2D da mistura de extratos, empregando modo de eluição *Shift Gradients* (detecção no UV a 254 nm e CAD, respectivamente).

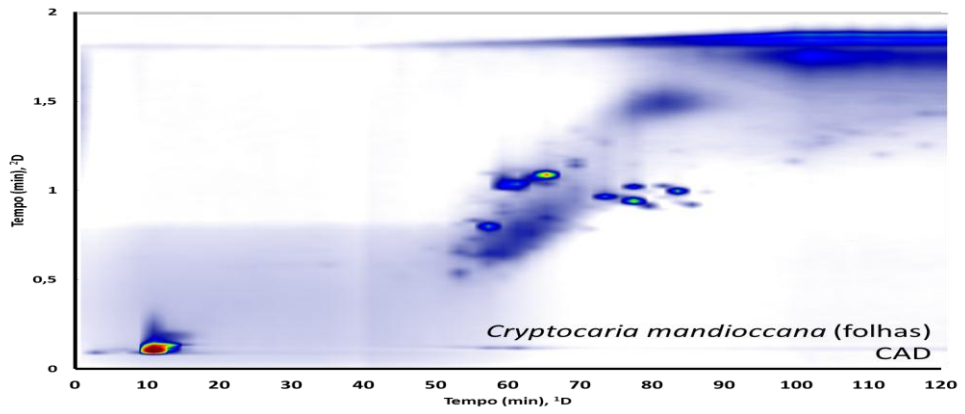
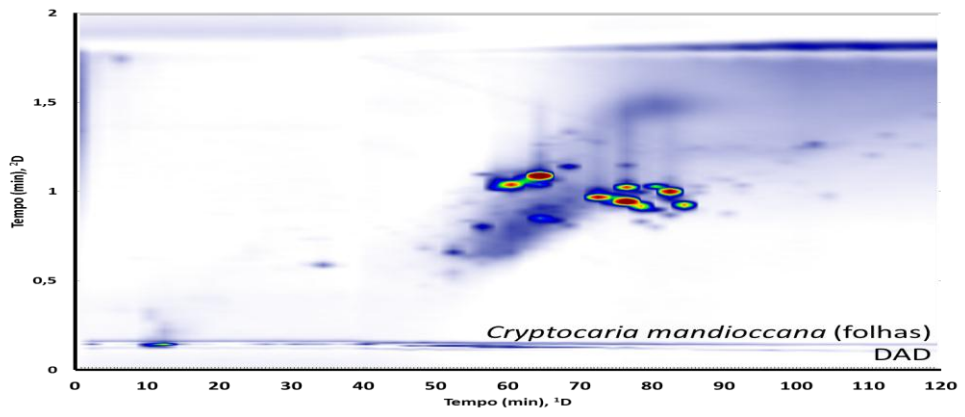
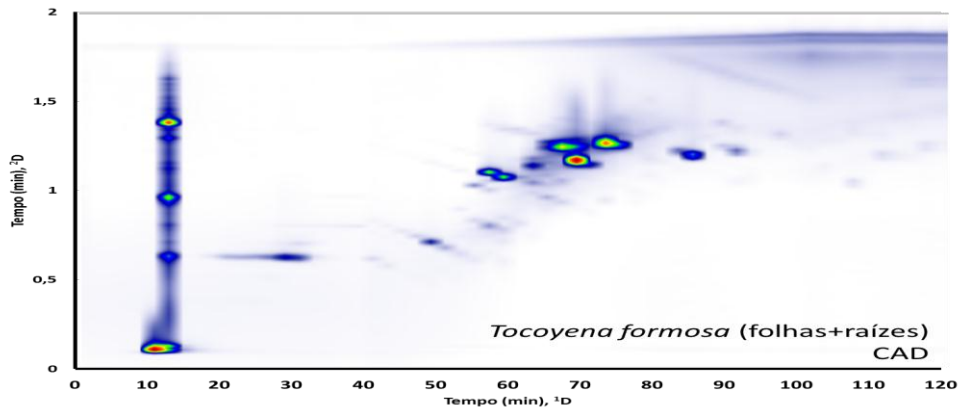
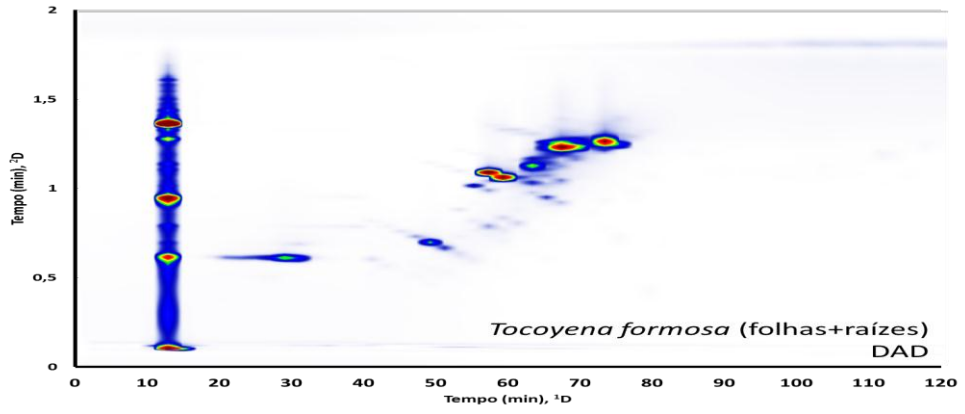


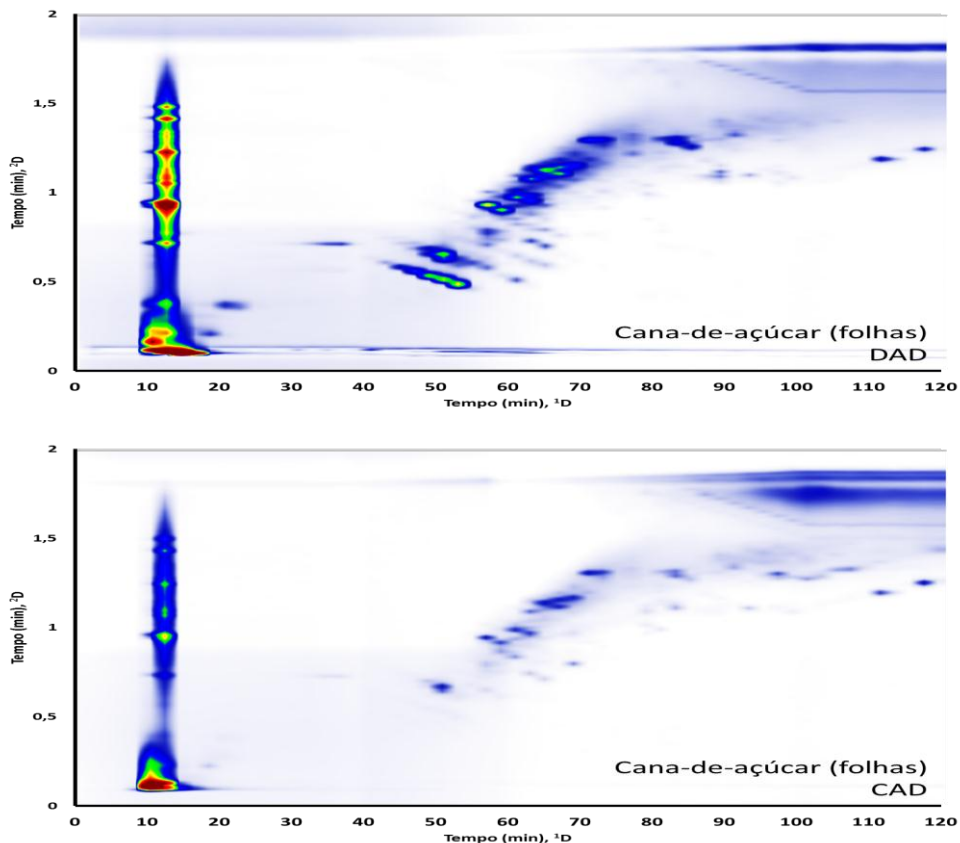
As diferentes espécies vegetais empregadas no desenvolvimento do método cromatográfico foram analisadas separadamente empregando as condições adotadas como ideais e os resultados obtidos são apresentados na Figura 24.

Figura 24. Cromatogramas bidimensionais de diferentes espécies vegetais. Condições experimentais apresentadas na Tabela 10 (detecção no UV a 254 nm e CAD, respectivamente).









Os cromatogramas LC×LC-DAD-CAD apresentados confirmam a possibilidade do emprego da técnica e do método apresentado na obtenção de *fingerprints* metabólicos para classificação e comparação de amostras.

A presença de picos bastante encaudados (principalmente em *P. nitens* e *C. spectabilis*) deve-se, novamente, à presença de compostos de caráter básico, fortemente adsorvidos nas fases estacionárias empregadas (assim como observado anteriormente nos cromatogramas 1D).

É interessante ressaltar que a separação bidimensional dos amostras apresentou algumas vantagens, principalmente na região de eluição de compostos de alta polaridade (como na região de volume morto de ¹D). Estes compostos, que provavelmente teriam pouca separação em uma única dimensão, foram razoavelmente separados pela fase pentafluorofenil empregada em ²D.

5 CONCLUSÕES

O sistema cromatográfico bidimensional foi devidamente configurado e otimizado. Todas as colunas foram testadas e parâmetros importantes como V_m e comportamento frente ao recondicionamento foram avaliados. Os resultados₅₉

mostraram que pelo menos $2V_m$ são necessários para o adequado acondicionamento das colunas da segunda dimensão.

Um novo método de avaliação da ortogonalidade empregando amostras reais e condições bidimensionais foi proposto empregando cálculos de recobrimento da área de separação. O conceito de empregar sistemas bidimensionais diretamente na etapa de seleção dos pares de colunas e solventes é novo, vantajoso e mais realista frente aos métodos usualmente empregados, porque (1) considera o sistema LC×LC como único, diferentemente daqueles que iniciam o desenvolvimento do método através do desenvolvimento monodimensional; (2) considera a influência de parâmetros entre as duas dimensões; (3) desvincula o desenvolvimento do método de detectores espectrométricos e (4) não exige conhecimento prévio da amostra e/ou padrões “representativos”.

A partir de diferentes combinações de FE e FM e condições genéricas de eluição em gradiente foi possível selecionar o par cromatográfico que oferece a maior ortogonalidade para a amostra em questão. Usando esse par, etapas de otimização foram racionalmente planejadas empregando planejamentos experimentais.

Diferentes formas de gradiente foram avaliadas na segunda dimensão. O gradiente genérico e abrangente - *Full in Fraction* - apresenta pouca vantagem na separação bidimensional quando dois modos semelhantes de separação são empregados, porém é uma alternativa interessante para o início do desenvolvimento de métodos cromatográficos desta natureza. Gradientes segmentados - *Segment in Fraction* - favorecem uma melhor ocupação da superfície de separação cromatográfica, porém, apresentam desvantagens quando a distribuição de picos em 1D é praticamente uniforme, uma vez que a interface entre os segmentos pode apresentar picos duplicados devido à grande diferença nos tempos de retenção, ocasionado pelos diferentes gradientes. Quando amostras muito complexas são submetidas à separação bidimensional, gradientes deslocados - *Shift Gradients* - favorecem uma melhor separação, no entanto, o incremento entre os sucessivos gradientes deve ser razoavelmente brando, afim de não influenciar demais no deslocamento dos tempos de retenção de uma mesma substância em modulações sucessivas, o que implicaria em uma falsa identificação de pico quando o *plot* bidimensional é gerado.

A escassez e/ou alto custo dos *softwares* comerciais destinados à cromatografia bidimensional ainda é um desafio a ser superado. O entendimento do mecanismo de conversão de dados brutos a dados bidimensionais permitiu o desenvolvimento de métodos alternativos para esta finalidade. O algoritmo desenvolvido e a proposta de visualização de dados empregando *softwares* matemáticos permite que outros pesquisadores se aventurem na laboriosa tarefa de desenvolver métodos em cromatografia líquida bidimensional abrangente mesmo sem os *softwares* comerciais disponíveis para esta finalidade.

A detectabilidade em métodos LC×LC também é um desafio a ser superado. Este desafio pode ser contornado empregando maiores concentrações de amostra a ser analisada ou ainda pelo uso de detectores mais sensíveis.

A possibilidade do uso de diferentes detectores também é pouco explorada em 2DLC. O emprego de detectores baseados na absorbância em comprimentos de onda no UV ou espectrômetros de massas já é relatado na literatura, porém é a primeira vez que um detector baseado na formação de aerossóis como o Detector de Aerossol Carregado (CAD) é empregado em sistemas multidimensionais abrangentes. Apesar de não oferecer nenhuma informação estrutural dos analitos detectados, este tipo de detecção possui grande aplicabilidade na análise de produtos naturais, devido à sua capacidade de detectar qualquer composto não volátil em uma amostra mesmo na ausência de grupos cromofóricos ou dificilmente ionizáveis (pré-requisitos essenciais para a detecção por UV ou MS, respectivamente).

Finalmente, o método desenvolvido e otimizado foi aplicado a diferentes espécies vegetais, comprovando a possibilidade do uso desta técnica na obtenção de *fingerprints* metabólicos e na comparação e classificação de amostras.

O surgimento de técnicas cromatográficas bidimensionais revelou novos horizontes no desenvolvimento de métodos analíticos. Apesar de ainda em desenvolvimento e cheia de desafios a serem superados, a cromatografia líquida bidimensional abrangente apresenta-se como uma alternativa à análise de amostras complexas, porém não como uma “panaceia” analítica.

REFERÊNCIAS

- 1 VANMIDDLESWORTH, F.; CANNELL, R. P. Dereplication and partial identification of natural products. In: CANNELL, R. P. (Ed.). **Natural products isolation**. Totowa: Humana Press, 1998. Chap. 10, p. 279-327. (Methods in biotechnology, v. 4).
- 2 HERZLER, M.; HERRE, S.; PRAGST, F. Selectivity of substance identification by HPLC-DAD in toxicological analysis using a UV spectra library of 2682 compounds. **Journal of Analytical Toxicology**, v. 27, n. 4, p. 233-242, 2003.
- 3 MacNAIR, J. E.; PATEL, K. D.; JORGENSON, J. W. Ultrahigh-pressure reversed-phase capillary liquid chromatography: isocratic and gradient elution using columns packed with 1.0-micron particles. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 3, p. 700-708, 1999.
- 4 SHEN, Y. et al. Automated 20 kpsi RPLC-MS and MS/MS with chromatographic peak capacities of 1000-1500 and capabilities in proteomics and metabolomics. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 10, p. 3090-3100, 2005.
- 5 PLUMB, R. S. et al. Generation of ultrahigh peak capacity LC separations via elevated temperatures and high linear mobile-phase velocities. **Analytical Chemistry**, v. 78, n. 20, p. 7278-7283, 2006.
- 6 DE VILLIERS, A. et al. Evaluation of ultra performance liquid chromatography. Part I. Possibilities and limitations. **Journal of Chromatography A**, v. 1127, n. 1/2, p. 60-69, 2006.
- 7 FRANCOIS, I.; SANDRA, K.; SANDRA, P. Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations - a review. **Analytical Chimica Acta**, v. 641, n. 1/2, p. 14-31, 2009.
- 8 ERNI, F.; FREI, R. W. Two-dimensional column liquid chromatographic technique for resolution of complex mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 149, p. 561-569, 1978.
- 9 BUSHEY, M. M.; JORGENSON, J. W. Automated instrumentation for comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography of proteins. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 2, p. 161-167, 1990.
- 10 LIU, C.; ZHANG, X. Multidimensional capillary array liquid chromatography and matrix-assisted laser desorption/ionization tandem mass spectrometry for high-throughput proteomic analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1139, n. 2, p. 191-198, 2007.
- 11 SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd ed. Hoboken: Wiley, 2010. 912 p.

- 12 BLAHOVÁ, E. et al. Two-dimensional and serial column reversed-phase separation of phenolic antioxidants on octadecyl-, polyethyleneglycol-, and pentafluorophenylpropyl-silica columns. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 4, p. 555-566, 2006.
- 13 GU, H. et al. Effect of first dimension phase selectivity in online comprehensive two dimensional liquid chromatography (LC×LC). **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 38, p. 6675-6687, 2011.
- 14 DUGO, P. et al. Comprehensive multidimensional liquid chromatography: theory and applications. **Journal of Chromatography A**, v. 1184, n. 1/2, p. 353-368, 2008.
- 15 IKEGAMI, T. et al. Two-dimensional reversed-phase liquid chromatography using two monolithic silica C18 columns and different mobile phase modifiers in the two dimensions. **Journal of Chromatography A**, v. 1106, n. 1/2, p. 112-117, 2006.
- 16 JANDERA, P.; HÁJEK, T.; ČESLA, P. Effects of the gradient profile, sample volume and solvent on the separation in very fast gradients, with special attention to the second-dimension gradient in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 15, p. 1995-2006, 2011.
- 17 FILGUEIRA, M. R. et al. Improving peak capacity in fast online comprehensive two-dimensional liquid chromatography with post-first-dimension flow splitting. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 24, p. 9531-9539, 2011.
- 18 GIDDINGS, J. C.; CALDWELL, K. D. Field-flow fractionation: choices in programmed and nonprogrammed operation. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 2093-2099, 1984.
- 19 GIDDINGS, J. C. Concepts and comparisons in multidimensional separation. **Journal of High Resolution Chromatography**, v. 10, n. 5, p. 319-323, 1987.
- 20 BANKEFORS, J.; NORD, L. I.; KENNE, L. Multidimensional profiling of components in complex mixtures of natural products for metabolic analysis, proof of concept: application to *Quillaja* saponins. **Journal of Chromatography B**, v. 878, n. 3/4, p. 471-476, 2010.
- 21 REICHENBACH, S. E. et al. Features for non-targeted cross-sample analysis with comprehensive two-dimensional chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1226, p. 140-148, 2012.
- 22 REICHENBACH, S. E. et al. smart templates for peak pattern matching with comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 16, p. 3458-3466, 2009.
- 23 CONANT, G. C.; WAGNER, A. A fast algorithm for determining the best combination of local alignments to a query sequence. **BMC Bioinformatics**, v. 5, 2004. doi: 10.1186/1471-2105-5-62

- 24 ULINTZ, P. J. et al. Improved classification of mass spectrometry database search results using newer machine learning approaches. **Molecular Cell Proteomics**, v. 5, n. 3, p. 497-509, 2006.
- 25 GUIOCHON, G. The limits of the separation power of unidimensional column liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1/2, p. 6-49, 2006.
- 26 ZAKARIA, M.; GONNORD, M.-F.; GUIOCHON, G. Applications of two-dimensional thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 271, n. 2, p. 127-192, 1983.
- 27 CORTES, H. J. M. **Multidimensional chromatography: techniques and applications**. New York: CRC Press, 2004.
- 28 GUIOCHON, G. et al. Implementations of two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1/2, p. 109-168, 2008.
- 29 MARRIOTT, P. J.; WU, Z. Y.; SCHOENMAKERS, P. Nomenclature and conventions in comprehensive multidimensional chromatography – an update. **LCGC Europe**, v. 25, n. 5, p. 335-339, 2003.
- 30 van der HORST, A.; SCHOENMAKERS, P. J. Comprehensive two-dimensional liquid chromatography of polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, n. 1/2, p. 693-709, 2003.
- 31 BEDANI, F.; KOK, W. T.; JANSSEN, H.-G. A theoretical basis for parameter selection and instrument design in comprehensive size-exclusion chromatography × liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1133, n. 1/2, p. 126-134, 2006.
- 32 FRANÇOIS, I.; SANDRA, K.; SANDRA, P. Comprehensive liquid chromatography: fundamental aspects and practical considerations – a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 641, n. 1/2, p. 14-31, 2009.
- 33 STOLL, D. R. et al. Fast, comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1/2, p. 3-43, 2007.
- 34 STOLL, D. R. Recent progress in online, comprehensive two-dimensional high-performance liquid chromatography for non-proteomic applications. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 397, n. 3, p. 979-986, 2010.
- 35 VITHA, M.; CARR, P. W. The chemical interpretation and practice of linear solvation energy relationships in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1126, n. 1/2, p. 143-194, 2006.
- 36 DESMET, G. Comparison techniques for HPLC column performance. **LCGC Europe**, v. 21, p. 310-320, 2008.

37 POPPE, H. Some reflections on speed and efficiency of modern chromatographic methods. **Journal of Chromatography A**, v. 778, n. 1/2, p. 3-21, 1997.

38 BROECKHOVEN, K. et al. The kinetic plot method applied to gradient chromatography: theoretical framework and experimental validation. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 17, p. 2787-2795, 2010.

39 ZHANG, Y.; CARR, P. W. A visual approach to stationary phase selectivity classification based on the Snyder–Dolan hydrophobic-subtraction model. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 39, p. 6685-6694, 2009.

40 HORVATH, K.; FAIRCHILD, J.; GUIOCHON, G. Optimization strategies for off-line two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 12, p. 2511-2518, 2009.

41 BEDANI, F.; SCHOENMAKERS, P. J.; JANSSEN, H.-G. Theories to support method development in comprehensive two-dimensional liquid chromatography - a review. **Journal of Separation Science**, v. 35, n. 14, p. 1697-1711, 2012.

42 VIVO-TRUYOLS, G.; van der WAL, S.; SCHOENMAKERS, P. J. Comprehensive study on the optimization of online two-dimensional liquid chromatographic systems considering losses in theoretical peak capacity in first- and second-dimensions: a Pareto-optimality approach. **Analytical Chemistry**, v. 82, n. 20, p. 8525-8536, 2010.

43 SCHURE, M. R. Limit of detection, dilution factors, and technique compatibility in multidimensional separations utilizing chromatography, capillary electrophoresis, and field-flow fractionation. **Analytical Chemistry**, v. 71, n. 8, p. 1645-1657, 1999.

44 GIDDINGS, J. C. Maximum number of components resolvable by gel filtration and other elution chromatographic methods. **Analytical Chemistry**, v. 39, n. 8, p. 1027-1028, 1967.

45 GIDDINGS, J. C. Two-dimensional separations: concept and promise. **Analytical Chemistry**, v. 56, n. 12, p. 1258A-1270A, 1984.

46 GUIOCHON, G. et al. Theoretical investigation of the potentialities of the use of a multidimensional column in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 255, p. 415-437, 1983.

47 LI, X.; STOLL, D. R.; CARR, P. W. A simple and accurate equation for peak capacity estimation in two dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 2, p. 845-850, 2009.

48 DAVIS, J. M.; GIDDINGS, J. C. Statistical theory of component overlap in multicomponent chromatograms. **Analytical Chemistry**, v. 55, n. 3, p. 418-424, 1983.

49 HORVÁTH, K.; FAIRCHILD, J. N.; GUIOCHON, G. Generation and limitations of peak capacity in online two-dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 10, p. 3879-3888, 2009.

- 50 GU, H.; HUANG, Y.; CARR, P. W. Peak capacity optimization in comprehensive two dimensional liquid chromatography: a practical approach. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 1, p. 64-73, 2011.
- 51 LIU, Z.; PATTERSON, D. G.; LEE, M. L. Geometric approach to factor analysis for the estimation of orthogonality and practical peak capacity in comprehensive two-dimensional separations. **Analytical Chemistry**, v. 67, n. 21, p. 3840-3845, 1995.
- 52 MALEROD, H.; LUNDANES, E.; GREIBROKK, T. Recent advances in on-line multidimensional liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 2, p. 110-122, 2010.
- 53 MURPHY, R. E.; SCHURE, M. R.; FOLEY, J. P. Effect of sampling rate on resolution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 70, n. 8, p. 1585-1594, 1998.
- 54 SEELEY, J. V. Theoretical study of incomplete sampling of the first dimension in comprehensive two-dimensional chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 962, n. 1/2, p. 21-27, 2002.
- 55 KALILI, K. M.; de VILLIERS, A. Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins. Part I: theoretical considerations. **Journal of Chromatography A**, v. 1289, p. 58-68, 2013.
- 56 KALILI, K. M.; de VILLIERS, A. Systematic optimisation and evaluation of on-line, off-line and stop-flow comprehensive hydrophilic interaction chromatography x reversed phase liquid chromatographic analysis of procyanidins. Part II: application to cocoa procyanidins. **Journal of Chromatography A**, v. 1289, p. 69-79, 2013.
- 57 SCHOENMAKERS, P. J.; VIVÓ-TRUYOLS, G.; DECROP, W. M. C. A protocol for designing comprehensive two-dimensional liquid chromatography separation systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1120, n. 1/2, p. 282-290, 2006.
- 58 FAIRCHILD, J. N.; HORVÁTH, K.; GUIOCHON, G. Approaches to comprehensive multidimensional liquid chromatography systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 9, p. 1363-1371, 2009.
- 59 STOLL, D. R.; CARR, P. W. Fast, comprehensive two-dimensional HPLC separation of tryptic peptides based on high-temperature HPLC. **Journal of the American Chemical Society**, v. 127, n. 14, p. 5034-5035, 2005.
- 60 LANKELMA, J.; POPPE, H. Determination of methotrexate in plasma by on-column concentration and ion-exchange chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 149, p. 587-598, 1978.
- 61 MILLS, M. J.; MALTAS, J.; LOUGH, W. J. Assessment of injection volume limits when using on-column focusing with microbore liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 759, n. 1/2, p. 1-11, 1997.

62 OPITECK, G. J.; JORGENSON, J. W.; ANDEREGG, R. J. Two-dimensional SEC/RPLC coupled to mass spectrometry for the analysis of peptides. **Analytical Chemistry**, v. 69, n. 13, p. 2283-2291, 1997.

63 HUANG, Y. et al. An experimental study of sampling time effects on the resolving power of on-line two-dimensional high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 20, p. 2984-2994, 2011.

64 TANAKA, N. et al. Simple and comprehensive two-dimensional reversed-phase hplc using monolithic silica columns. **Analytical Chemistry**, v. 76, n. 5, p. 1273-1281, 2004.

65 KIMURA, H. et al. Simple 2D-HPLC using a monolithic silica column for peptide separation. **Journal of Separation Science**, v. 27, n. 10/11, p. 897-904, 2004.

66 NGUYEN, D. T. et al. Fast analysis in liquid chromatography using small particle size and high pressure. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 12, p. 1836-1848, 2006.

67 GRITTI, F.; GUIOCHON, G. On the extra-column band-broadening contributions of modern, very high pressure liquid chromatographs using 2.1 mm I.D. columns packed with sub-2 μ m particles. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 49, p. 7677-7689, 2010.

68 PLUMB, R. et al. The application of small porous particles, high temperatures, and high pressures to generate very high resolution LC and LC/MS separations. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 8, p. 1158-1166, 2007.

69 STEVENSON, P. G. et al. A discussion on the process of defining 2-D separation selectivity. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 10, p. 1405-1413, 2010.

70 GILAR, M. et al. Comparison of orthogonality estimation methods for the two-dimensional separations of peptides. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 20, p. 8722-8732, 2012.

71 GIDDINGS, J. C. Sample dimensionality: a predictor of order-disorder in component peak distribution in multidimensional separation. **Journal of Chromatography A**, v. 703, n. 1/2, p. 3-15, 1995.

72 SWEENEY, A. P.; WYLLIE, S. G.; SHALLIKER, R. A. The separation of stereoisomers from oligomers of low molecular weight polystyrene on a carbon clad zirconia column using a reversed phase multidimensional hplc system. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 24, n. 17, p. 2559-2581, 2001.

73 DUGO, P. et al. Separation of triacylglycerols in a complex lipidic matrix by using comprehensive two-dimensional liquid chromatography coupled with atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric detection. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 8, p. 1146-1154, 2006.

- 74 JANDERA, P. et al. Optimization of separation in two-dimensional high-performance liquid chromatography by adjusting phase system selectivity and using programmed elution techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1189, n. 1/2, p. 207-220, 2008.
- 75 HÁJEK, T. et al. Multidimensional LC×LC analysis of phenolic and flavone natural antioxidants with UV-electrochemical coulometric and MS detection. **Journal of Separation Science**, v. 31, n. 19, p. 3309-3328, 2008.
- 76 JANDERA, P. Programmed elution in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1255, p. 112-129, 2012.
- 77 LI, D.; SCHMITZ, O. J. Use of shift gradient in the second dimension to improve the separation space in comprehensive two-dimensional liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 405, n. 20, p. 6511-6517, 2013.
- 78 LI, D.; JAKOB, C.; SCHMITZ, O. Practical considerations in comprehensive two-dimensional liquid chromatography systems (LCxLC) with reversed-phases in both dimensions. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 1, p. 153-167, 2015.
- 79 ALLWOOD, J. W.; GOODACRE, R. An introduction to liquid chromatography-mass spectrometry instrumentation applied in plant metabolomic analyses. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 33-47, 2010.
- 80 OKSMAN-CALDENTY, K. M.; INZE, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites. **Trends in Plant Science**, v. 9, n. 9, p. 433-440, 2004.
- 81 BECKLES, D. M.; ROESSNER, U. Plant metabolomics: applications and opportunities for agricultural biotechnology. In: ALTMAN, A.; HASEGAWA, P. (Ed.). **Plant biotechnology and agriculture**. Oxford: Elsevier, 2012. Chap. 5, p. 67-81.
- 82 SUMNER, L. W.; MENDES, P.; DIXON, R. A. Plant metabolomics: large-scale phytochemistry in the functional genomics era. **Phytochemistry**, v. 62, n. 6, p. 817-836, 2003.
- 83 FERNIE, A. R.; SCHAUER, N. Metabolomics-assisted breeding: a viable option for crop improvement? **Trends in Genetics**, v. 25, n. 1, p. 39-48, 2009.
- 84 VILLAS-BÔAS, S. G.; RASMUSSEN, S.; LANE, G. A. Metabolomics or metabolite profiles? **Trends in Biotechnology**, v. 23, n. 8, p. 385-386, 2005.
- 85 IBÁÑEZ, C. et al. Novel MS-based approaches and applications in food metabolomics. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 52, p. 100-111, 2013.
- 86 TISTAERT, C. et al. Multivariate data analysis to evaluate the fingerprint peaks responsible for the cytotoxic activity of *Mallotus species*. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 103-113, 2012.

- 87 TISTAERT, C.; DEJAEGHER, B.; HEYDEN, Y. V. Chromatographic separation techniques and data handling methods for herbal fingerprints: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 690, n. 2, p. 148-161, 2011.
- 88 ISHIHARA, A. et al. Metabolomics for metabolically manipulated plants: effects of tryptophan overproduction. **Metabolomics**, v. 3, n. 3, p. 319-334, 2007.
- 89 GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.
- 90 WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, v. 16, n. 2/3, p. 97-110, 2009.
- 91 LU, G. H. et al. Development of high-performance liquid chromatographic fingerprints for distinguishing Chinese *Angelica* from related umbelliferae herbs. **Journal of Chromatography A**, v. 1073, n. 1/2, p. 383-392, 2005.
- 92 PRODUCT assessment and registration: guidelines for the assessment of herbal medicines. In: QUALITY assurance of pharmaceuticals: a compendium of guidelines and related materials. Geneve: World Health Organization, 1997. v. 1. p. 31-62. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Jh1813e/3.html>>. Acesso em: 26 ago. 2015.
- 93 HUBERT, M.; ROUSSEUW, P. J.; VERBOVEN, S. A fast method for robust principal components with applications to chemometrics. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 60, n. 1/2, p. 101-111, 2002.
- 94 LI, Y. et al. Characteristic fingerprint based on low polar constituents for discrimination of *Wolfiporia extensa* according to geographical origin using UV spectroscopy and chemometrics methods. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2014, 2014. doi:10.1155/2014/519424.
- 95 RAZMOVSKI-NAUMOVSKI, V. et al. Multiple chromatographic and chemometric methods for quality standardisation of chinese herbal medicines. **World Science and Technology**, v. 12, n. 1, p. 99-106, 2010.
- 96 XIE, P. et al. Chromatographic fingerprint analysis—a rational approach for quality assessment of traditional Chinese herbal medicine. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1/2, p. 171-180, 2006.
- 97 DUMAREY, M. et al. Exploration of linear multivariate calibration techniques to predict the total antioxidant capacity of green tea from chromatographic fingerprints. **Journal of Chromatography A**, v. 1192, n. 1, p. 81-88, 2008.
- 98 TISTAERT, C. et al. Dissimilar chromatographic systems to indicate and identify antioxidants from *Mallotus* species. **Talanta**, v. 83, n. 4, p. 1198-1208, 2011.
- 99 LEME, G. M. et al. HPLC-DAD method for metabolic fingerprinting of the phenotyping of sugarcane genotypes. **Analytical Methods**, v. 6, n. 19, p. 7781-7788, 2014.

100 van NEDERKASSEL, A. M. et al. Development of a *Ginkgo biloba* fingerprint chromatogram with UV and evaporative light scattering detection and optimization of the evaporative light scattering detector operating conditions. **Journal of Chromatography A**, v. 1085, n. 2, p. 230-239, 2005.

101 WEI, H. et al. A simple and sensitive HPLC method for the simultaneous determination of eight bioactive components and fingerprint analysis of *Schisandra sphenanthera*. **Analytica Chimica Acta**, v. 662, n. 1, p. 97-104, 2010.

102 HARRIS, D. C. **Quantitative chemical analysis**. 6th ed. New York: W. H. Freeman, 2003. Paginação irregular.

103 LI, Y. et al. Combinative method using HPLC fingerprint and quantitative analyses for quality consistency evaluation of an herbal medicinal preparation produced by different manufacturers. **Journal of Pharmaceutical Biomedical Analysis**, v. 52, n. 4, p. 597-602, 2010.

104 ALAERTS, G. et al. Chromatographic fingerprint development for herbal extracts: a screening and optimization methodology on monolithic columns. **Journal of Chromatography A**, v. 1172, n. 1, p. 1-8, 2007.

105 TONG, L. et al. Selection and fingerprints of the control substances for plant drug *Eucommia ulmoides* Oliver by HPLC and LC-MS. **Talanta**, v. 76, n. 1, p. 80-84, 2008.

106 AGNOLET, S. et al. H NMR-based metabolomics combined with HPLC-PDA-MS-SPE-NMR for investigation of standardized *Ginkgo biloba* preparations. **Metabolomics**, v. 6, n. 2, p. 292-302, 2010.

107 KUMAR, V. et al. Pattern profiling of the herbal preparation picroliv using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1045, n. 1/2, p. 145-152, 2004.

108 ZHAO, Z. et al. Simultaneous characterization and quantification of flavonoids in *Euonymus alatus* (Thunb.) Siebold from different origins by HPLC-PAD–MS. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 6, n. 2, p. 205-209, 2013.

109 NOVAKOVA, L.; MATYSOVA, L.; SOLICH, P. Advantages of application of UPLC in pharmaceutical analysis. **Talanta**, v. 68, n. 3, p. 908-918, 2006.

110, JIN, Y. et al. HPLC and UPLC switch for TCM analysis. **World Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 80-84, 2008.

111 TANAKA, N.; KOBAYASHI, H. Monolithic columns for liquid chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 376, n. 3, p. 298-301, 2003.

112 GUIOCHON, G. Monolithic columns in high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1168, n. 1/2, p. 101-168, 2007.

113 NOVÁKOVÁ, L.; VLČKOVÁ, H. A review of current trends and advances in modern bio-analytical methods: chromatography and sample preparation. **Analytica Chimica Acta**, v. 656, n. 1/2, p. 8-35, 2009.

114 CAMARGO, K. F. B. **Variabilidade intraespecífica de estirilpironas em quimiotipos de *Cryptocarya mandioccana***: avaliação da produção em diferentes órgãos e em extratos enzimáticos. 2008. 245 f. (Tese em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008.

115 HAMERSKI, L. et al. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 601-604, 2005.

116 REGASINI, L. O. et al. Constituintes químicos das flores de *Pterogyne nitens* (Caesalpinioideae). **Química Nova**, v. 31, n. 4, p. 802-806, 2008.

117 BUENO, P. C. P. et al. Development of a comprehensive method for analyzing clerodane-type diterpenes and phenolic compounds from *Casearia sylvestris* Swartz (Salicaceae) based on ultra high performance liquid chromatography combined with chemometric tools. **Journal of Separation Science**, v. 38, n. 10, p. 1649-1656, 2015.

118 FUNARI, C. S. D. **Estudos químicos e biológicos de espécies do gênero *Lippia* (Verbenaceae) nativas no Cerrado paulista**. 2010. 197 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2010.

119 PIVATTO, M. **Estudo fitoquímico dos frutos de *Senna spectabilis* e análise comparativa do perfil alcaloídico de *Senna spectabilis* e *Cassia leptophylla***. 2005. 135 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2005.

120 VIEGAS JUNIOR, C. et al. (-)-7-hydroxycassine: a new 2,6-dialkylpiperidin-3-ol alkaloid and other constituents isolated from flowers and fruits of *Senna spectabilis* (Fabaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, p. 230-235, 2013.

121 WATERS. **Waters reversed-phase columns selectivity chart**. Disponível em: <http://www.waters.com/waters/promotionDetail.htm?id=10048475&locale=pt_BR>. Acesso em: 26 ago. 2015.

122 SADEK, P. C. **The HPLC solvent**. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons, 2002. 664 p.

123 GILAR, M. et al. Orthogonality of separation in two-dimensional liquid chromatography. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 19, p. 6426-6434, 2005.

124 BANDEIRA, K.; CAVALHEIRO, A. An LC-DAD fingerprinting method for alkaloids, flavonoids and styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. **Chromatographia**, v. 70, n. 9/10, p. 1455-1460, 2009.

- 125 BOLZANI, V. S. et al. Antifungal iridoids from the stems of *Tocoyena formosa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 7, n. 3, p. 157-160, 1996.
- 126 REGASINI, L. O. et al. Cytotoxic guanidine alkaloids from *Pterogyne nitens*. **Journal of Natural Products**, v. 72, n. 3, p. 473-476, 2009.
- 127 WANG, W. et al. Diterpenoids from *Casearia sylvestris*. **Planta Medica**, v. 75, n. 13, p. 1436-1441, 2009.
- 128 CAVALHEIRO, A. J. C. et al. Metabolômica de cana-de-açúcar e sua relação com a produção de biomassa vegetal para bioenergia. In: LEMOS, E. G. de M.; STRADIOTTO, N. R. **Bioenergia**: desenvolvimento, pesquisa e inovação. São Paulo: Cultura Acadêmica, 2012. Cap. 1, p. 15-34.
- 129 LI, X.; CARR, P. W. Effects of first dimension eluent composition in two-dimensional liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 16, p. 2214-2221, 2011.
- 130 FERREIRA, S. L. et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, v. 1158, n. 1/2, p. 2-14, 2007.
- 131 SNYDER, L. R.; DOLAN, J. W. Gradient elution fundamentals. In: _____. **High-performance gradient elution**: the practical application of the linear-solvent-strength model. Hoboken: John Wiley & Sons, 2006. Chap. 2, p. 94-96.
- 132 CACCIOLA, F. et al. Development of different comprehensive two dimensional systems for the separation of phenolic antioxidants. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 16, p. 2500-2513, 2006.