



República Federativa do Brasil
Ministério da Indústria, Comércio Exterior
e Serviços
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 102015021047-7 A2

(22) Data do Depósito: 31/08/2015

(43) Data da Publicação: 07/03/2017



* B R 1 0 2 0 1 5 0 2 1 0 4 7 A

(54) **Título:** APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS E MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO DITO EQUIPAMENTO

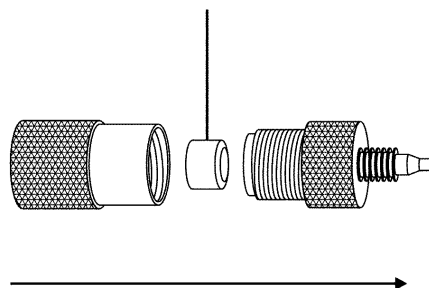
(51) **Int. Cl.:** G01N 30/06; B01D 15/08

(73) **Titular(es):** UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA JULIO DE MESQUITA FILHO

(72) **Inventor(es):** ALBERTO JOSÉ CAVALHEIRO; VINÍCIUS GUIMARÃES FERREIRA; GABRIEL MAZZI LEME; CRISTIANO SOLEO DE FUNARI

(74) **Procurador(es):** FABIÓLA DE MORAES SPIANDORELLO

(57) **Resumo:** RESUMO APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS E MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO DITO EQUIPAMENTO A invenção deste aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido compreende uma câmara de amostra (Cam) instalada na posição da alça de amostra (loop) do módulo injetor, em dita câmara de amostra (Cam) sendo inseridas as alíquotas da matriz sólida (MS), permitindo a extração completa (abrangente) de micromoléculas, facilitando análises metabômicas em tecidos vegetais, animais e outras matrizes sólidas, minimizando a preparação de amostras, uma vez que a extração do material sólido e análise são feitas diretamente no equipamento, utilizando o solvente da própria análise cromatográfica, diminuindo o número de etapas manuais e a geração de erros analíticos, resíduos de solvente e outros consumíveis.



APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS E MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO DITO EQUIPAMENTO

CAMPO DA INVENÇÃO

[01] A presente invenção descreve um dispositivo acoplado em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas e o método de análise cromatográfico utilizando dito equipamento. Mais especificamente compreende um dispositivo acoplado ao módulo injetor do cromatógrafo líquido, permitindo a extração completa (abrangente) de micromoléculas, facilitando análises metabolômicas em tecidos vegetais, animais e outras matrizes sólidas.

ANTECEDENTES DA INVENÇÃO

[02] Estudos metabolômicos são realizados em três etapas principais: preparo de amostras, aquisição e tratamento dos dados [KIM, Hye Kyong; VERPOORTE, Robert. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, v. 21, n. 1, p. 4-13, 2010]. No entanto o primeiro passo é considerado um ponto chave, uma vez que a interpretação biológica dos dados depende da composição da amostra e, conseqüentemente, da capacidade de se extrair a mais ampla faixa de metabólitos e em quantidades detectáveis da matriz [KIM, Hye Kyong; VERPOORTE, Robert. Sample preparation for plant metabolomics. *Phytochemical Analysis*, v. 21, n. 1, p. 4-13, 2010] e [DUPORTET, Xavier *et al.* The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*, v. 8, n. 3, p. 410-421, 2012].

[03] Contudo, os avanços no preparo de amostras não seguiram o progresso observado para as outras duas etapas [VILLAS-BÔAS, Silas G. *et al.* Global metabolite analysis of yeast: evaluation of sample preparation methods. *Yeast*, v. 22, n. 14, p. 1155-1169, 2005.]. Esse fato é facilmente exemplificado pelo avanço de técnicas analíticas empregadas em estudos

metabolômicos, como cromatografia líquida (LC), espectrometria de massa (MS) e ressonância magnética nuclear (RMN), continuamente tornando-se técnicas mais robustas, sensíveis e automatizadas [DUNN, Warwick B.; ELLIS, David I. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, n. 4, p. 285-294, 2005] e [FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Metabolomics, an optimized approach for the rational exploitation of Brazilian biodiversity: state of the art, new scenarios, and challenges. *Química Nova*, v. 36, n. 10, p. 1605-1609, 2013], enquanto o preparo de amostras permanece sendo, na maioria dos casos, uma etapa manual.

[04] O metaboloma de um ser vivo abrange uma vasta gama de compostos com diferentes propriedades físico-químicas e concentrações, de tal maneira que hoje em dia ainda é impossível extrair todos os metabólitos de uma amostra (organismo, órgão ou tecido) em uma única etapa [DUPORTET, Xavier *et al.* The biological interpretation of metabolomic data can be misled by the extraction method used. *Metabolomics*, v. 8, n. 3, p. 410-421, 2012]. Como consequência, a abordagem inicial das investigações metabolômicas, que consiste em análises sem alvo definido, utiliza extrações sucessivas com diferentes solventes e técnicas para extrair a maior parte de um determinado metaboloma.

[05] Os métodos atuais usados para a análise qualitativa ou quantitativa de substâncias contidas em matrizes sólidas (tal como tecidos vegetais, animais, solo, entre outros) requer obrigatoriamente uma etapa de extração através de solventes e eventualmente etapas subsequentes de concentração, diluição e/ou fracionamento do extrato bruto. Esses procedimentos são fontes importantes de erro analítico, possuem risco significativo de produção de artefatos e demandam tempo e uso de solventes, muitas vezes tóxicos tanto do ponto de vista ocupacional quanto ambiental.

[06] Nos últimos 10 anos o crescente interesse por análises metabolômicas, nas quais se pretende monitorar o maior número possível de metabólitos micromoleculares em matrizes biológicas, tem desafiado os cientistas a desenvolverem procedimentos analíticos mais abrangentes e simples, mas que possibilitem essa análise global. Para tanto, o estado da técnica descreve diversas técnicas que visam otimizar as etapas de preparação de amostras e, ao mesmo tempo, torná-las mais abrangentes.

[07] A extração assistida por ultrassom é uma das técnicas de extração comumente utilizadas em estudos envolvendo extração de matrizes biológicas, uma vez que o processo de cavitação, gerado pelas ondas de ultrassom, promove o rompimento das barreiras celulares e facilita o acesso do solvente aos metabólitos. Todavia, para a extração de uma maior faixa de metabólitos, é necessário o uso de solventes com diferentes polaridades e de maneira sequencial, tornando o processo lento e ambientalmente nocivo. Outra desvantagem prática é relacionada à energia fornecida pelas ondas de ultrassom, que pode facilitar reações com analitos lábeis, modificando a composição da amostra.

[08] A extração assistida por micro-ondas, assim como a extração por ultrassom, promove o rompimento das barreiras celulares, facilitando o acesso do solvente aos metabólitos. Todavia, as micro-ondas geram o aquecimento do sistema, possibilitando a degradação de compostos termolábeis e inviabilizando a utilização desta técnica quando os analitos são desconhecidos (geralmente o caso de estudos metabolômicos).

[09] A extração por solvente pressurizado é uma alternativa encontrada para minimizar o volume de solvente utilizado para a extração, fazendo uso de altas temperaturas e pressões para aumentar o rendimento de extração. Porém, uma vez que faz uso de elevadas temperaturas, pode facilitar reações, comprometendo a integridade da amostra. Existem trabalhos que relatam o acoplamento entre esta técnica de extração e análise cromatográfica em linha, porém, nestes trabalhos a extração e análise são

focadas apenas em alguns poucos analitos de interesse, ou seja, a extração e análise não são promovidas de maneira abrangente.

[010] A extração por fluido supercrítico também é uma técnica que minimiza o uso de solventes, uma vez que utiliza como extratores gases no estado supercrítico (acima de seus pontos de pressão e temperatura críticos), possibilitando um processo menos poluente e simplificando a etapa de secagem da amostra. O gás mais utilizado é o dióxido de carbono, uma vez que é de baixo custo e possui temperatura crítica próxima da temperatura ambiente, o que torna o processo menos nocivo à integridade da amostra. Todavia, para uma extração abrangente, ainda é necessário a adição de alíquotas de solventes que modifiquem a polaridade do CO₂ supercrítico.

[011] No entanto, em geral, estas técnicas não são acopladas a equipamentos analíticos [PAN, Jialiang *et al.* Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, v. 815, p. 1-15, 2014] e empregam uma quantidade relativamente grande de solventes [TOBISZEWSKI, Marek *et al.* Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009], além de facilitarem reações que podem modificar a composição da amostra [LUQUE DE CASTRO, M. D.; DELGADO-POVEDANO, M. M. Ultrasound: A subexploited tool for sample preparation in metabolomics. *Analytica chimica acta*, v. 806, p. 74-84, 2014]. De acordo com Tobiszewsky [TOBISZEWSKI, Marek *et al.* Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 28, n. 8, p. 943-951, 2009], o preparo de amostra é a etapa mais poluente em uma análise, assim a eliminação deste passo foi incluída como um dos 12 princípios de química analítica verde (GAP) [GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the

SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78-84, 2013.].

[012] Ainda, estes métodos do estado da técnica não fazem extração abrangente, seja por dificuldade de solubilização de metabólitos de polaridade muito diversa presentes nas matrizes biológicas, o que limita a gama de metabólitos analisáveis por um método específico, ou por não acoplar em linha a cela de extração ao sistema de separação. Geralmente estes métodos são propostos para análise de grupos específicos de substâncias e, na grande maioria deles, demandam obrigatoriamente a solubilização da amostra em solvente adequado.

[013] Mais recentemente, foram descritos alguns exemplos de extração acoplada ao cromatógrafo. Resumidamente, os sistemas funcionam com uma bomba descarregando uma solução extrativa, passando pela matriz e seguindo diretamente para um cartucho de extração em fase sólida (SPE), onde os analitos de interesse ficam retidos. Em seguida, os analitos são extraídos do cartucho SPE por um solvente (ou solução), até uma alça de amostra (*loop*), localizada em uma válvula de LC (em posição *Load*). Finalmente, a válvula é girada para a posição *inject*, dando início à análise cromatográfica.

[014] Tais metodologias têm sido aplicadas para investigações com alvo e requerem na maioria das vezes, bombas e/ou válvulas adicionais além daquelas já inseridas na configuração usual dos instrumentos. Outra desvantagem é que algumas configurações, como a descrita por Murakami [MURAKAMI, Tomonori *et al.* Identification of degradation products in loxoprofen sodium adhesive tapes by liquid chromatography–mass spectrometry and dynamic pressurized liquid extraction–solid-phase extraction coupled to liquid chromatography–nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of Chromatography A*, v. 1208, n. 1, p. 164-174, 2008], requerem uma quantidade de solvente dedicada exclusivamente à etapa de extração, indo na contra mão dos princípios de preparo de

amostra em química verde [GAŁUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 50, p. 78-84, 2013].

[015] Existem ainda outras técnicas que, a princípio, podem ser acopladas ao cromatógrafo, como por exemplo, MSPD (*Matrix Solid Phase Dispersion*) e PLE (*Pressurized Liquid Extraction*). A primeira técnica é, na maioria das vezes, um processo manual, consistindo da adição de uma dispersão de amostra com adsorvente, seguido de extração [KRISTENSON, E. Maria; BRINKMAN, Udo A. Th; RAMOS, Lourdes. Recent advances in matrix solid-phase dispersion. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 25, n. 2, p. 96-111, 2006]. Existem duas possibilidades para a extração por MSPD, a primeira quando os analitos de interesse são extraídos e coletados em seguida, e a segunda quando os analitos de interesse permanecem retidos no adsorvente e extraídos do mesmo em uma etapa seguinte.

[016] As técnicas de PLE consistem por sua vez na extração de matrizes sólidas utilizando altas temperaturas (até 200 °C) e, com a finalidade de manter o solvente no estado líquido, altas pressões (até 20.000 kPa). Esta técnica gera um elevado rendimento de extração, uma vez que facilita a entrada de solvente na matriz e conseqüentemente a extração dos analitos [HYÖTYLÄINEN, Tuulia. Principles, developments and applications of on-line coupling of extraction with chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 1153, n. 1, p. 14-28, 2007.]. Uma vertente das técnicas de PLE é a PHWE (*Pressurized Hot Water Extraction*), que abre mão do uso de solventes orgânicos e trabalha com temperatura e pressão para alterar a constante dielétrica (polaridade) da água. Esta estratégia foi convenientemente acoplada à SWC (*Superheated Water Chromatography*).

[017] Entretanto, cada uma dessas técnicas possui suas vantagens e suas desvantagens. No caso de MSPD a principal vantagem é a união de maneira simples entre extração e *clean-up*, e a maior desvantagem é o uso

de grande quantidade de solvente, ocasionando volumes elevados de extrato e tornando necessária uma etapa posterior de concentração dos analitos. Para PLE, o uso de altas temperaturas e pressões faz com que o processo de extração seja acelerado, porém altas temperaturas podem catalisar reações que irão alterar a constituição inicial da amostra, comprometendo todo o trabalho. Em situações em que a amostra é conhecida, as desvantagens são facilmente remediadas, uma vez que é possível ajustar o processo para temperaturas que não degradem a amostra e utilizar adsorventes e condições de extração para extrair os analitos de interesse. Porém, geralmente não é o caso dos estudos metabolômicos, quando a constituição da amostra é ainda desconhecida.

[018] Tecnologia recentemente apresentada pela Empresa Shimadzu compreende um equipamento que acopla extração por fluido supercrítico à análise cromatográfica. Este equipamento é previsto um primeiro módulo específico para a extração por fluido supercrítico e utilização de solventes (CO₂ supercrítico e modificadores) com a única função de extração. Neste equipamento, no entanto, a extração é feita por uma alíquota específica, o que gera resíduos químicos.

[019] O documento CN201876444 descreve um dispositivo que possibilita a análise de amostras sólidas para uso em cromatografia gasosa, onde a coluna cromatográfica não permite a troca de amostras antes do término da análise, bem como o controle de tempo de extração e encerramento do fluxo de gás/solvente sem a necessidade de parar a análise cromatográfica.

[020] O documento CN1085319 descreve um dispositivo para extração em fase sólida e uso em cromatografia líquida, onde previamente à análise se faz necessário uma pré-concentração de analitos.

[021] No entanto, a fim de diminuir a quantidade de solventes utilizados nas análises cromatográficas e reduzir o tempo do processo, é objeto da presente invenção um dispositivo acoplado ao módulo injetor de cromatógrafo líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas

que utiliza os princípios do acoplamento entre extração e *clean-up* de MSPD (*Matrix Solid Phase Dispersion*) e com pressões elevadas como em PLE (*Pressurized Liquid Extraction*), sendo promovido o acoplamento das etapas de extração abrangente, *clean-up*, separação e detecção, enquanto mantém o procedimento analítico ecologicamente amigável, eliminando o uso de solventes extratores, além daqueles já utilizados na análise cromatográfica.

SUMÁRIO

[022] A invenção descreve aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas que permite a extração completa (abrangente) de micromoléculas, facilitando análises metabolômicas em tecidos vegetais (folhas, frutos, raízes, sementes, entre outros), tecidos animais e outras matrizes sólidas (solo, fármacos, amostras biológicas).

[023] A invenção descreve um aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas que atende vários preceitos da química verde.

[024] A invenção descreve um aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas que minimiza a preparação de amostras, uma vez que a extração do material sólido e análise são feitas diretamente no equipamento, utilizando o solvente da própria análise cromatográfica, diminuindo o número de etapas manuais e a geração de erros analíticos, resíduos de solvente e outros consumíveis.

[025] A invenção descreve um aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas que possibilita a extração de uma diversidade maior de analitos da matriz a partir da modificação de parâmetros simples da análise, como temperatura e polaridade do solvente, uma vez que a extração é feita no modo gradiente e a variação da temperatura modificando as propriedades extrativas do solvente.

[026] A invenção descreve um aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas potencialmente útil para análises metabolômicas e controle de qualidade de fitoterápicos.

[027] A invenção descreve um aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas que não necessita de grandes modificações nos equipamentos de cromatografia líquida convencionais, sendo possível a introdução do dispositivo extrator no lugar do *loop* de injeção.

BREVE DESCRIÇÃO DAS FIGURAS

[028] A figura 1 apresenta a representação esquemática do aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas objeto da presente invenção, a figura 1A apresenta a vista em perspectiva da câmara de amostra e a figura 1B apresenta a câmara de amostra com a matriz sólida na região interna.

[029] A figura 2A apresenta o cromatograma representativo obtido diretamente a partir de folhas secas de *C. sylvestris* utilizando o aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido objeto da presente invenção e a figura 2B apresenta o cromatograma obtido a partir do extrato *sylvestris_L* utilizando um cromatógrafo a líquido convencional.

[030] A figura 3A apresenta o cromatograma representativo obtido diretamente a partir de folhas secas de *C. mandioccana* utilizando o aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido objeto da presente invenção e a figura 2B apresenta o cromatograma obtido a partir do extrato *Mandioccana_L* utilizando um cromatógrafo a líquido convencional.

[031] A figura 4A mostra os cromatogramas do extrato de *Mandioccana_L* passando pela pré coluna e a figura 4B os cromatogramas do extrato de *Mandioccana_L* sem passar pela pré coluna.

[032] A figura 5A apresenta a curva analítica do extrato *Cryptocaria_L* em uma primeira extração, a figura 5B apresenta a curva analítica de uma segunda extração, a figura 5C apresenta a curva analítica de uma terceira

extração e a figura 5D apresenta a curva analítica branco.

[033] A figura 6 apresenta a curva analítica para extratos de *Cryptocaria mandioccana*, considerando a concentração do extrato na solução a analisar X absorvância total, onde os pontos representam a média de triplicatas.

DESCRIÇÃO DETALHADA DA INVENÇÃO

[034] O aperfeiçoamento em cromatógrafo líquido para extração de micromoléculas de matrizes sólidas, objeto da presente invenção, compreende um cromatógrafo líquido convencional dotado de uma câmara de amostra (C_{am}) instalada na posição da alça de amostra (*loop*) do sistema injetor manual (Inj) que tem a função de introduzir a amostra na fase móvel.

[035] A câmara de amostra (C_{am}) apresenta extremidades vazadas cobertas por uma membrana porosa, em dita câmara de amostra (C_{am}) sendo inseridas as alíquotas da matriz sólida (MS), com a membrana porosa evitando o arraste das partículas pela fase móvel.

[036] As alíquotas da matriz sólida são inseridas na câmara de amostra (C_{am}) misturadas ou não com adsorvente adequado, tal como C18, silício, Celite, entre outros.

[037] Preferentemente, para completar o preenchimento da câmara de amostra (C_{am}), é utilizada sílica modificada com grupos octadesilsilano (C18), com partículas não maiores que 40 μm .

[038] A câmara de amostra (C_{am}) é hermeticamente fechada mediante uma carcaça bipartida com fechamento por roscagem, dita câmara de amostra (C_{am}) instalada na posição da alça de amostra (*loop*) do sistema injetor (Inj) manual do cromatógrafo a líquido.

[039] A coluna cromatográfica (Col), responsável por separar os componentes da amostra, é previamente condicionada, sendo mantida a válvula injetora na posição de carga (*load*). Após o condicionamento da coluna cromatográfica (tempo de equilíbrio), a válvula é alterada para a posição de injeção de amostra (*inject*), de modo que a fase móvel passa

primeiramente na câmara de amostra (C_{am}), e a seguir para a coluna cromatográfica (Col). Dessa forma, os metabolitos são extraídos e imediatamente conduzidos para o sistema de separação (Sep).

[040] Para finalizar ou interromper a análise cromatográfica, a válvula é retornada para a posição de carga (*load*). Nesta posição, a fase móvel não flui através da câmara de amostra (C_{am}).

TESTES:

[041] Testes foram realizados para o estabelecimento de *fingerprints* cromatográficos para folhas de *Casearia sylvestris* e *Cryptocaria mandioccana*.

[042] Folhas moídas de *C. sylvestris* e *C. mandioccana* foram extraídas e concentradas de acordo com Funari *et al.* [FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. *Journal of separation science*, v. 37, n. 1-2, p. 37-44, 2014.] e Bandeira *et al.* [BANDEIRA, Karin F.; CAVALHEIRO, Alberto José. An LC–DAD Fingerprinting Method for Alkaloids, Flavonoids and Styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. *Chromatographia*, v. 70, n. 9-10, p. 1455-1460, 2009], respectivamente. Os extratos secos finais foram identificados como *sylvestris_L* e *madioccana_L*, respectivamente.

[043] Os extratos *Sylvestris_L* e *madioccana_L* foram analisados por HPLC, utilizando os métodos cromatográficos descritos por Funari *et al.* e Bandeira *et al.*

[044] As alíquotas do material vegetal seco e moído foram inseridas em uma pré-coluna como uma câmara de amostra. Para completar o preenchimento da câmara de amostra foi utilizada sílica modificada com grupos ODS (C18) (40 μ m, JT Baker Bakerbond [®], do México). Uma membrana de nylon (0,2 μ m de diâmetro de poro, Schleicher & Schuell [®], EUA) foi colocada em ambos os lados da câmara de amostra para evitar o arraste de partículas pela fase móvel. Em seguida a câmara foi

hermeticamente fechada e instalada na posição da alça de amostra (*loop*) do sistema injetor manual (válvula de 6 portas) do cromatógrafo. A coluna foi condicionada mantendo a válvula injetora na posição "*Load*". Após o condicionamento da coluna cromatográfica (tempo de equilíbrio), a válvula foi alterada para a posição "*inject*", de modo que a fase móvel passasse primeiramente através da câmara extratora contendo o material a ser extraído, e a seguir para a coluna cromatográfica, sendo os metabólitos extraídos e conduzidos diretamente para o sistema de separação.

[045] Os resultados das análises por extração utilizando a câmara de amostra foram comparados com os obtidos utilizando os procedimentos convencionais de preparação de amostra em que o material vegetal é primeiramente extraído e o extrato resultante analisado por HPLC.

[046] Para realizar a comparação, folhas de duas plantas (*Casearia sylvestris* e *Cryptocaria mandioccana*) com métodos bem estabelecidos de extração e separação foram selecionados. De modo a representar uma ampla gama de classes de metabólitos secundários, a seleção baseou-se também na complexidade química. Na *C. sylvestris* estão presentes principalmente flavonóides e diterpenos clerodânicos [RASLAN, D. S. *et al.* Anti-PLA2 action test of *Casearia sylvestris* Sw. *Bollettino chimico farmaceutico*, v. 141, n. 6, p. 457-460, 2001] e [FERREIRA, Paulo Michel P. *et al.* Folk uses and pharmacological properties of *Casearia sylvestris*: a medicinal review. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 83, n. 4, p. 1373-1384, 2011], enquanto a *C. mandioccana* geralmente apresenta flavonóides, estilpironas e alcalóides na mesma parte da planta [CAVALHEIRO, Alberto José; YOSHIDA, Massayoshi. 6-[ω -arylalkenyl]-5,6-dihydro- α -pyrones from *Cryptocarya moschata* (Lauraceae). *Phytochemistry*, v. 53, n. 7, p. 811-819, 2000].

[047] As condições cromatográficas e métodos de extração utilizados para a etapa de comparação foram baseados nos descritos por Funari *et al.* para a análise de *C. sylvestris* e Bandeira *et al.* para a análise de *C.*

mandioccana. O equipamento utilizado para esta etapa foi um Dionex® Ultimate 3000, controlado pelo software Chromeleon, versão 6.80.

[048] Um cromatograma representativo obtido diretamente a partir de folhas secas de *C. sylvestris* é mostrado na Figura 2A, ao passo que o cromatograma correspondente obtido a partir do extrato *sylvestris_L* é mostrado na Figura 2B.

[049] Perfis cromatográficos semelhantes foram observados na segunda metade dos cromatogramas (40 a 80 min), entretanto para a primeira metade os perfis foram visivelmente diferentes. Um número maior de compostos com tempo de retenção menor ou igual a 35 minutos foi observado para a extração *utilizando o equipamento objeto da presente invenção em comparação com a observada para o extrato analisado na forma convencional*, conduzindo a um número total de picos de $108 \pm 8,2$ e $89 \pm 4,2$ ($n = 5$) para análises por extração *utilizando o equipamento objeto da presente invenção e na forma convencional*, respectivamente. Em relação à área total de pico, os valores médios observados foram $2.894,4 \pm 548,2$ e $1.927,5 \pm 199,7$ UA, respectivamente.

[050] O processo de extração utilizando o equipamento objeto da presente invenção é um processo contínuo, que inclui um gradiente de polaridade no solvente extrator, conforme o programa de gradiente do método cromatográfico. Essa estratégia permite a extração e análise subsequente de metabólitos polares a apolares. Na metodologia empregada por Funari *et al.* [FUNARI, Cristiano Soleo *et al.* Green chromatographic fingerprinting: An environmentally friendly approach for the development of separation methods for fingerprinting complex matrices. *Journal of separation science*, v. 37, n. 1-2, p. 37-44, 2014] para obtenção do extrato de folhas de *C. sylvestris* é usado etanol puro. Durante o processo de utilizando o equipamento objeto da presente invenção foi possível extrair compostos mais polares, que não seriam extraídos apenas com etanol, explicando assim a maior quantidade de picos.

[051] Um cromatograma representativo obtido a partir de extração de folhas secas de *C. mandioccana* utilizando o equipamento objeto da presente invenção é mostrado na figura 3A, enquanto o cromatograma correspondente obtido a partir do processo de referência com *Mandioccana_L* é mostrado na figura 3B. Grande semelhança qualitativa entre os cromatogramas pode ser observada nessa figura. Os tempos de retenção correspondente aos compostos principais foram muito semelhantes. Os números médios de picos também foram estatisticamente semelhantes: $44,4 \pm 8,4$ e $57,2 \pm 2,9$ ($n = 5$) para as extrações utilizando o equipamento objeto da presente invenção e o cromatógrafo convencional, respectivamente. Os valores médios observados para a área total dos cromatogramas foram $1.252,7 \pm 74,4$ e $792,6 \pm 60,3$ UA, respectivamente, indicando melhor rendimento para o procedimento de extração *on-line*. Entretanto, os picos observados no cromatograma utilizando o equipamento e método objeto da presente invenção estão alargados em relação aos observados no cromatograma da extração convencional, especialmente na primeira metade dos cromatogramas, quando os alcalóides e flavonóides glicosilados foram eluídos.

[052] O processo de extração utilizando o equipamento e método objeto da presente invenção teve início com uma solução hidrometanólica acidificada, o mesmo aplicado para a metodologia descrita por Bandeira *et al.* [BANDEIRA, Karin F.; CAVALHEIRO, Alberto José. An LC–DAD Fingerprinting Method for Alkaloids, Flavonoids and Styrylpyrones from *Cryptocarya mandioccana*. *Chromatographia*, v. 70, n. 9-10, p. 1455-1460, 2009] na extração convencional, resultando em uma extração semelhante. Contudo, o número de picos no cromatograma do extrato foi superior ao número de picos no cromatograma da extração objeto da presente invenção, que pode ser explicado pela sobreposição dos picos menores pela cauda dos picos maiores.

[053] Para avaliar eventual alargamento dos picos cromatográficos

causado pela câmara de amostra, análises do extrato obtido através do cromatógrafo convencional feitas da forma usual foram comparadas com análises desse mesmo extrato passando pela câmara de amostra sólida preenchida apenas com C18. Dessa forma foram obtidos um número médio de picos de $44 \pm 2,9$ e área total média de $713,7 \pm 20,3$ UA (n=4), isto é, estatisticamente iguais aos resultados obtidos para a extração obtida utilizando o equipamento objeto da presente invenção. A figura 4A mostra os cromatogramas do extrato passando pela pré coluna e sem passar pela pré coluna (4B).

[054] Os dados indicam que utilizando o mesmo sistema, o número de picos nas análises do extrato é muito mais semelhante ao observado nas análises utilizando extração através do equipamento objeto da presente invenção (figura 3A), comprovando que a diversidade de compostos extraídos no método objeto da presente invenção é no mínimo semelhante aos extraídos na metodologia usual.

[055] Pode ser observado, ainda, que ocorre o alargamento dos picos cromatográficos na análise passando pela câmara de amostra, indicando que o alargamento observado no cromatograma da extração objeto da presente invenção é devido à câmara de amostra, e não ao processo de extração propriamente dito.

[056] Outro parâmetro avaliado foi a eficiência de extração, uma vez que em casos onde os materiais são escassos ou difíceis de obter, é de grande importância o aprimoramento das metodologias de extração e análise [PAN, Jialiang *et al.* Review of online coupling of sample preparation techniques with liquid chromatography. *Analytica chimica acta*, v. 815, p. 1-15, 2014].

[057] Buscando avaliar a eficiência de extração na metodologia *on-line*, uma amostra de folhas de *C. sylvestris* foi submetida a três análises consecutivas (Figuras 5A-5D). Os resultados mostram uma área total de 2428,5 para a primeira análise, 87,3 e 44,4 UA para a segunda e terceira análise respectivamente. Considerando-se como 100% a área total das três

análises, 95% do material foi extraído na primeira extração (Figura 5A).

[058] Para ilustrar melhor o ganho na eficiência, foi calculada a quantidade de material vegetal necessária para promover uma única análise cromatográfica utilizando a metodologia convencional. Considerando um extrato de concentração 20 mg/mL e volume de injeção de 20 µL, em cada análise são injetados 0,4 mg de extrato. Utilizando as metodologias convencionais, foram necessários 250 mg de folhas de *C. sylvestris* e 100 mg de folhas de *C. mandioccana* para obter-se 33,3 mg e 21,9 mg de extrato, respectivamente. Assim, seriam necessários 3,0 mg de folhas de *C. sylvestris* e 1,8 mg de folhas de *C. mandioccana* para obter extrato suficiente para uma única análise (0,4 mg de extrato).

[059] Utilizando-se a metodologia convencional, a quantidade de material necessária de *C. mandioccana* (1,8 mg) é menor do que utilizando-se OLE-LC (2,0 mg), porém a área total do cromatograma utilizando-se a metodologia convencional é menor do que a observada em OLE, indicando um maior rendimento da última em relação a primeira.

[060] Para comprovar este fato, a figura 6 apresenta a curva analítica com análises de diferentes concentrações do extrato *Cryptocaria_L*, com a finalidade de obter uma equação que define a área do cromatograma em função da concentração.

[061] Considerando a equação gerada pela regressão linear ($\text{Área} = 71,74 + 36,58 \cdot \text{Conc.}$) e a área total obtida no cromatograma da extração obtida através do equipamento e método da presente invenção (1.252,7 UA), pode-se inferir que, para obter um cromatograma de extrato utilizando os cromatógrafos convencionais, com área total de picos equivalente à área total obtida no cromatograma de extrato *on-line* (2 mg de material vegetal), seria necessária a injeção de 20 µL de extrato a uma concentração de 32,3 mg.mL⁻¹ (0,65 mg de extrato por injeção). Isso equivaleria, segundo Bandeira *et al* [BANDEIRA, Karin F.; CAVALHEIRO, Alberto José. An LC–DAD Fingerprinting Method for Alkaloids, Flavonoids and Styrylpyrones from

Cryptocarya mandioccana. *Chromatographia*, v. 70, n. 9-10, p. 1455-1460, 2009], à extração de 2,96 mg de material vegetal. Em outras palavras, o rendimento da extração realizada utilizando o equipamento e método da presente invenção é cerca de 50% melhor que da extração convencional.

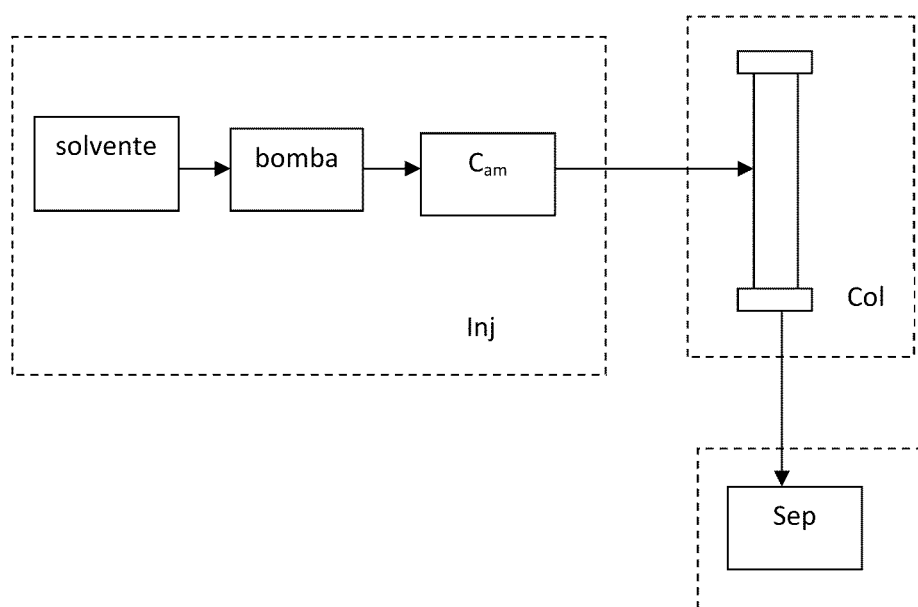
[062] Este ganho na eficiência de extração está relacionado à alta pressão na câmara de amostra, visto que ela fica posicionada na região de maior pressão do cromatógrafo, isto é, entre a coluna e a bomba. Nessa condição, é obtida melhor penetração do solvente na matriz, facilitando o acesso do solvente extrator aos metabólitos presentes na matriz sólida, bem como aumentando a taxa de transferência de massa entre a matriz e o solvente [PRASAD, K. Nagendra *et al.* Effects of high pressure extraction on the extraction yield, total phenolic content and antioxidant activity of longan fruit pericarp. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 10, n. 2, p. 155-159, 2009].

REIVINDICAÇÕES

1. APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS que apresenta um sistema injetor manual (Inj) que direciona a fase móvel, mediante uma bomba e uma válvula injetora, para a coluna cromatográfica (Col) onde os metabolitos são extraídos e imediatamente conduzidos para o sistema de separação (Sep), **caracterizado por** dito sistema injetor (Inj) apresentar uma câmara de amostra (C_{am}) instalada na posição da alça de amostra (*loop*), dita câmara de amostra (C_{am}) dotada de extremidades vazadas cobertas por uma membrana porosa, em dita câmara de amostra (C_{am}) sendo inseridas as alíquotas da matriz sólida (MS).
2. MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO O APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS **caracterizado por** compreender as etapas de:
 - a) alíquotas da matriz sólida (MS) inseridas na câmara de amostra (C_{am});
 - b) câmara de amostra (C_{am}) hermeticamente fechada;
 - c) coluna cromatográfica (Col) previamente condicionada, sendo mantida a válvula injetora na posição de carga (*load*) e após o condicionamento, a válvula é alterada para a posição de injeção de amostra (*inject*);
 - d) fase móvel passa na câmara de amostra (C_{am}), e a seguir para a coluna cromatográfica (Col).
3. MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO O APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato das alíquotas da matriz sólida serem inseridas na câmara de amostra (C_{am})

misturadas com adsorvente.

4. MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO O APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS, de acordo com a reivindicação 1, **caracterizado pelo** fato da câmara de amostra (C_{am}) ter o preenchimento completado com sílica modificada com grupos octadesilsilano (C18), com partículas não maiores que $40\mu\text{m}$.

**Fig. 1**

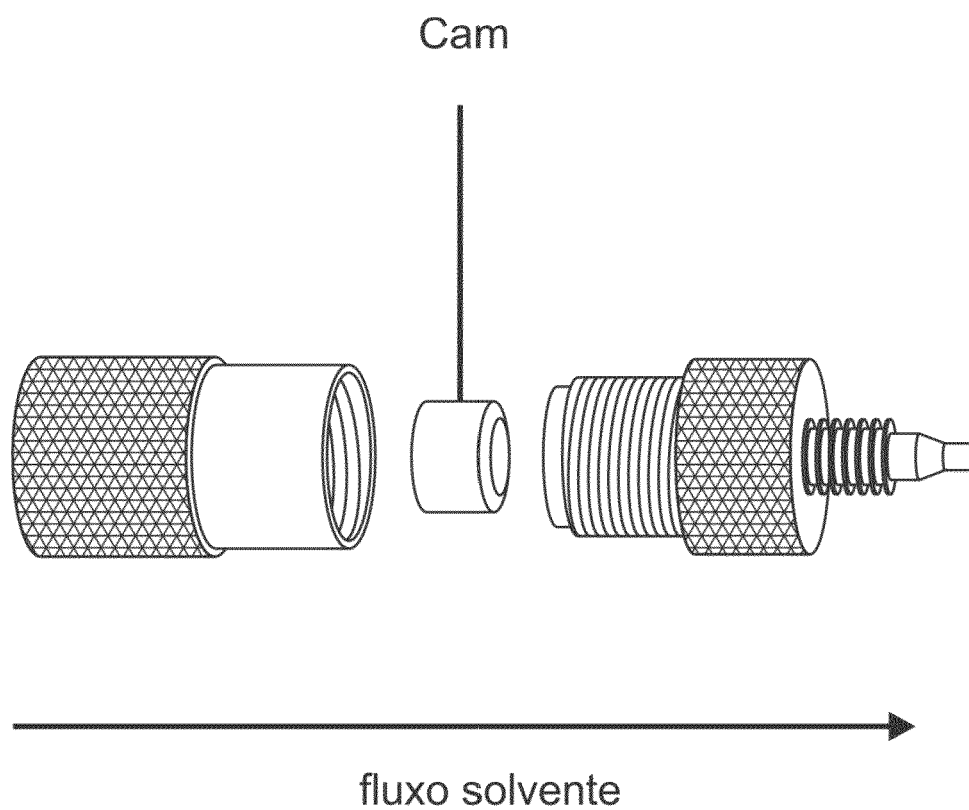


Fig. 1A

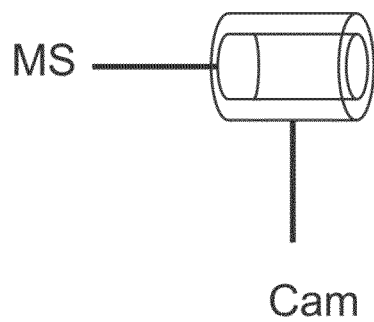


Fig. 1B

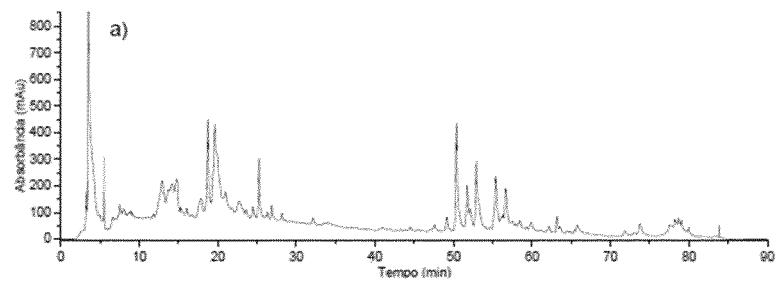


Fig. 2A

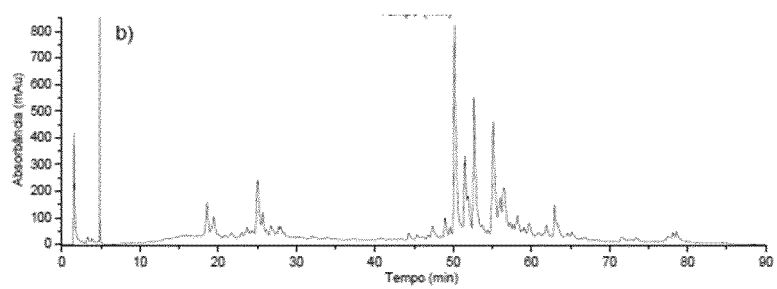


Fig. 2B

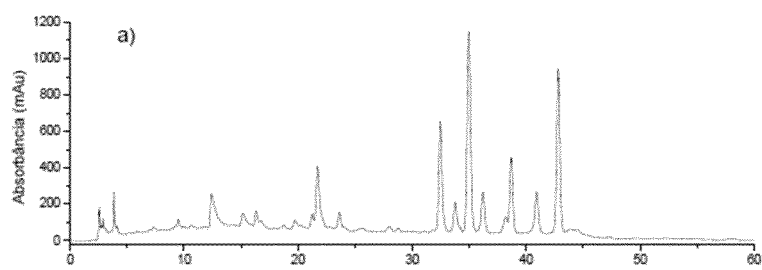


Fig. 3A

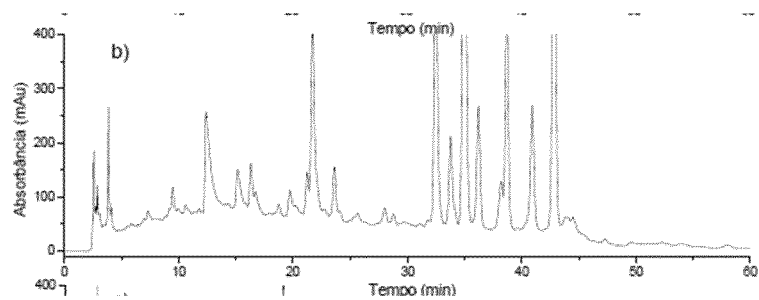


Fig. 3B

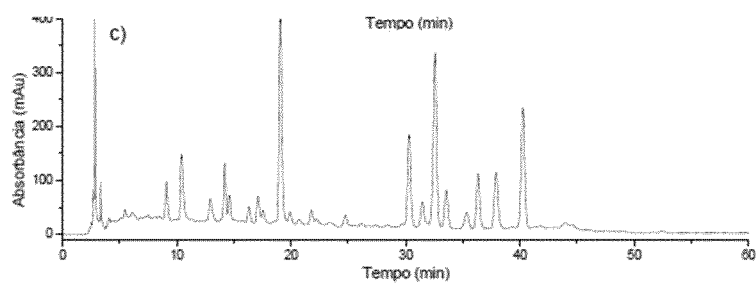


Fig. 3C

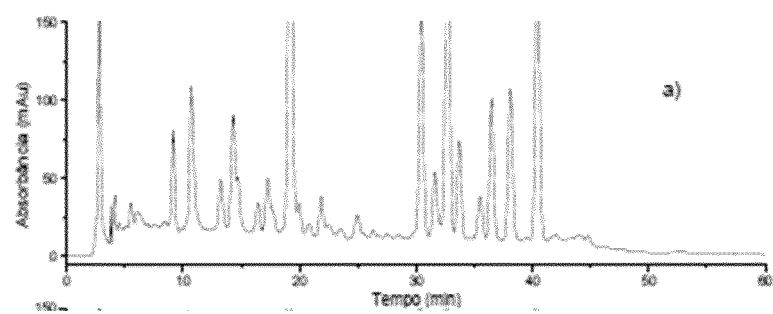


Fig. 4A

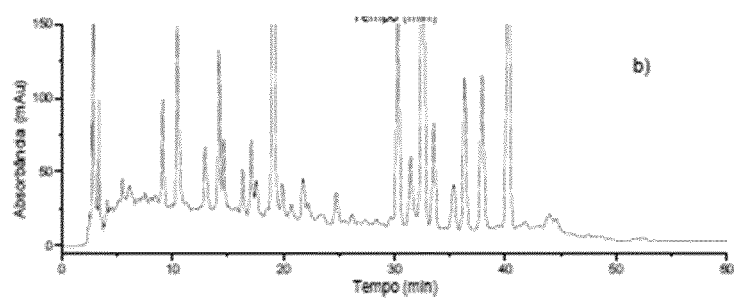


Fig. 4B

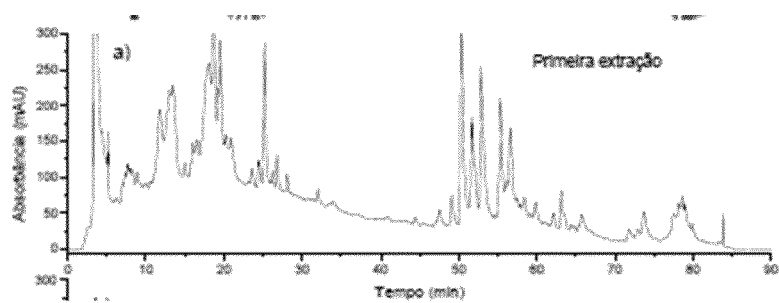


Fig. 5A

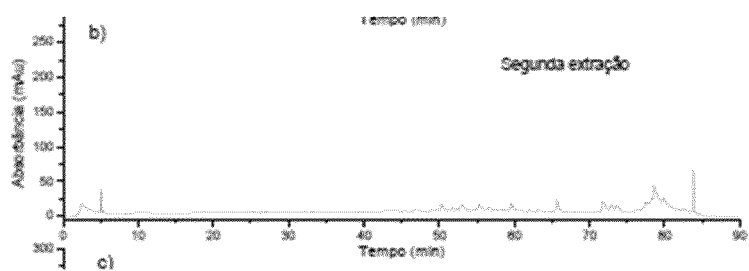


Fig. 5B

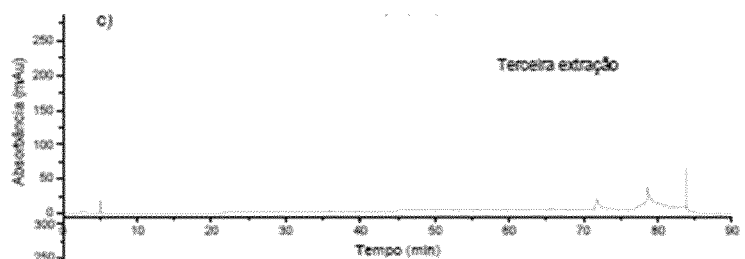


Fig. 5C

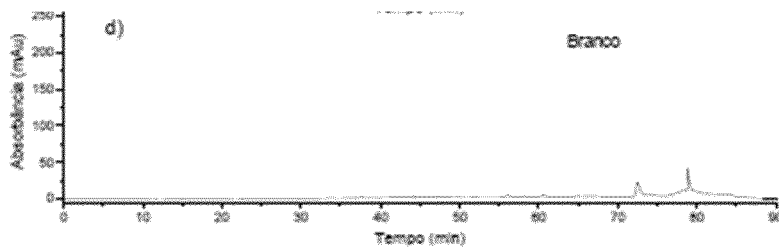


Fig. 5D

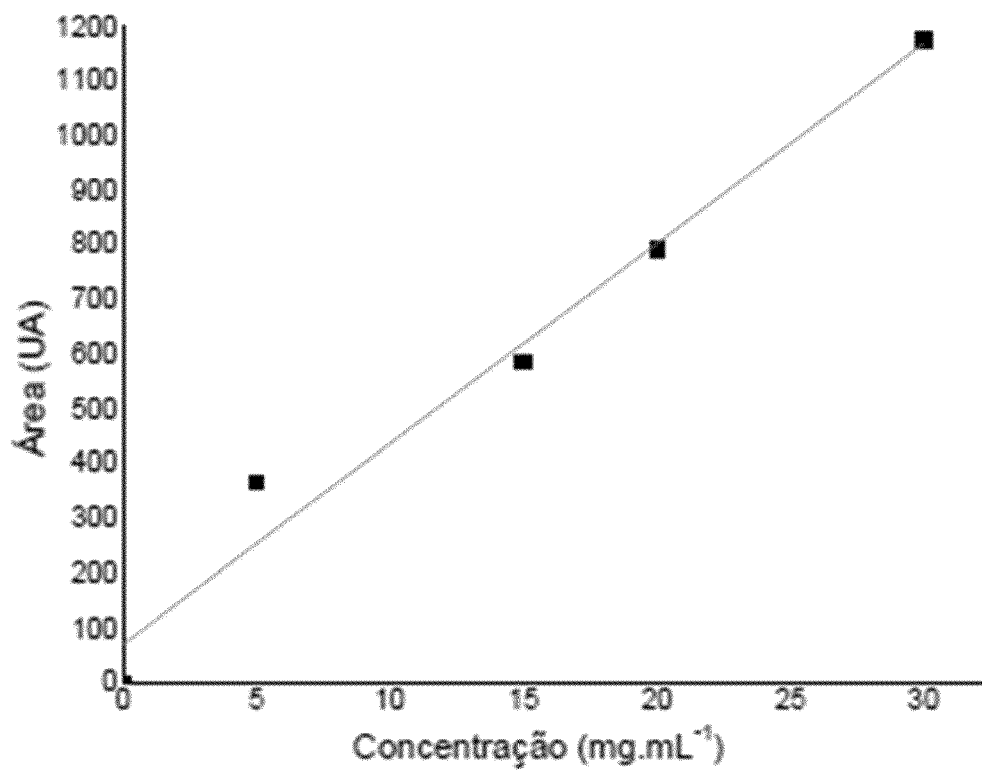


Fig. 6

RESUMO

APERFEIÇOAMENTO EM CROMATÓGRAFO A LÍQUIDO PARA EXTRAÇÃO DE MICROMOLÉCULAS DE MATRIZES SÓLIDAS E MÉTODO DE ANÁLISE CROMATOGRÁFICA UTILIZANDO DITO EQUIPAMENTO

A invenção deste aperfeiçoamento em cromatógrafo a líquido compreende uma câmara de amostra (C_{am}) instalada na posição da alça de amostra (*loop*) do módulo injetor, em dita câmara de amostra (C_{am}) sendo inseridas as alíquotas da matriz sólida (MS), permitindo a extração completa (abrangente) de micromoléculas, facilitando análises metabolômicas em tecidos vegetais, animais e outras matrizes sólidas, minimizando a preparação de amostras, uma vez que a extração do material sólido e análise são feitas diretamente no equipamento, utilizando o solvente da própria análise cromatográfica, diminuindo o número de etapas manuais e a geração de erros analíticos, resíduos de solvente e outros consumíveis.