

HPLC E ELECTROFORESE CAPILAR NA DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES: VALIDAÇÃO E COMPARAÇÃO DE MÉTODOS

DUTHOIT, Margarida; VITAL, Ana; OLIVEIRA, Diana; *ROSEIRO, Luísa.

INETI - DTIA - UIL - Unidade de Indústrias Lácteas. Estrada do Paço do Lumiar, 22 - 1649-038 Lisboa, Portugal *(luisa.roseiro@mail2.ineti.pt)

Flavonóides são compostos fenólicos que se encontram naturalmente presentes nas plantas e vegetais. A sua importância deve-se ao facto de se saber que muitos possuem actividade biológica, nomeadamente actividade anti-hepatotóxica, anti-inflamatória, anti-osteoporose, anti-tumoral, anti-microbiana, anti-viral e antioxidante.

Sendo uma família com cerca de 8000 compostos, divididos basicamente em seis classes (flavanonas, flavonas, isoflavonas, flavonóis, antocianinas e flavanas), não tem sido fácil encontrar metodologias analíticas consensuais que permitam separar, identificar e/ou quantificar flavonóides, nas diferentes matrizes onde se encontram presentes.

A aplicação da metodologia de HPLC na separação de compostos fenólicos foi iniciada em 1976 por Fisher e Wheaton. Desde então, muitos têm sido os métodos descritos, nos quais se utilizam quase exclusivamente colunas de fase reversa e eluentes polares (acetonitrilo, metanol e água acidificados), em sistema de gradientes. A detecção é feita com detectores de UV/VIS ou de fotodíodos (DAD), dado que estes compostos apresentam duas bandas de absorção típicas no UV, uma com máximo entre 240-285 nm e a outra com máximo entre 300-550 nm.

A electroforese capilar (CE), associada a detectores UV/VIS e DAD, é também uma técnica separativa muito poderosa sendo, em inúmeras situações, uma excelente alternativa à utilização de sistemas de HPLC. A sua aplicação na separação de compostos fenólicos foi iniciada em 1992, não havendo porém ainda uma utilização sistemática e alargada.

O presente trabalho teve por objectivo implementar, validar e comparar dois métodos analíticos (HPLC¹ e CE²) para a quantificação de cinco flavonas, (apigenina, rhoifolina, isorhoifolina, biochanina A e formononetina),

constituintes de algumas das principais forragens nacionais, como a tremocilha e o trevo-violeta.

Para a validação dos métodos³, a gama de trabalho utilizada situou-se entre 10 a 100 µg/ml, verificando-se para as 10 rectas de calibração obtidas (5 padrões por 2 técnicas distintas), a existência de linearidade, comprovada através da obtenção de r^2 iguais ou superiores a 0,995 e através do teste PG de comparação do modelo linear com um modelo polinomial de 2º grau.

A tabela 1 apresenta os valores obtidos em ambos os métodos para os restantes parâmetros de validação.

Tabela 1 - Parâmetros de validação: HPLC vs. CE

	HPLC				CE			
	L _D	L _Q	CV	T. Recup.	L _D	L _Q	CV	T. Recup.
	(µg/ml)	(µg/ml)	(%)	(%)	(µg/ml)	(µg/ml)	(%)	(%)
Apigenina	4	13	4	102	6	17	20	102
Rhoifolina	6	17	6	93	8	26	17	107
Isorhoifolina	3	10	4	98	3	10	12	101
Biochanina A	5	14	7	95	12	37	10	99
Formononetina	2	7	7	103	7	20	16	100

L_D - limite de detecção; L_Q - limite de quantificação; CV - coeficiente de variação; T. Recup. - taxa de recuperação

Observando a tabela verifica-se que, para as condições estudadas, o HPLC permite obter limites de detecção e quantificação ligeiramente mais baixos que a CE, assim como uma melhor precisão entre os ensaios, embora o método da CE possa ainda ser melhorado. Porém, a CE apresenta também grandes vantagens em relação ao HPLC, nomeadamente menor tempo de análise (cerca de metade), menores volumes de amostra e reagentes e a utilização de solventes menos tóxicos. Quanto à exactidão, avaliada através da taxa de recuperação, não se observaram diferenças significativas entre os valores obtidos para ambos os métodos.

Referências:

- 1 - Roseiro, L. B. et al. 2005. International Dairy Journal, 15, pp. 579-584.
- 2 - Roseiro, L. B. 2003. Characterisation of Serpa Cheese. PhD Thesis. School of Food Biosciences, University of Reading, UK.
- 3 - Castro, A. F. R. 2000. Guia RELACRE 13. Validação de Métodos Internos de Ensaio em Análise Química. RELACRE, Lisboa.