Gabriela Ribeiro Silva

ESTUDO DE ALCALOIDES DOS FRUTOS DE *Passiflora alata* E DE *Passiflora edulis* POR SBSE, CLAE-Flu E IDENTIFICAÇÃO POR CLUE-EM.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Química Orgânica e Bioquímica

Orientadora: Profa. Dra. Janete Harumi Yariwake

Exemplar revisado

O exemplar original encontra-se em
acervo reservado na Biblioteca do IQSC-USP

São Carlos

2015

Dedico este trabalho aos meus pais, Ronaldo e Inez, que com tanto esforço, amor e vontade educaram a mim e minha irmã, Bárbara. Nos ensinaram o valor do conhecimento, mas também a importância da generosidade e do amor. Obrigada por tudo sempre.

Agradecimentos

À Deus, por tantas bênçãos, pela vida, saúde e força, pelas maravilhosas pessoas que colocou em meu caminho.

Aos meus pais, Ronaldo e Inez, pelo amor, compreensão, apoio e por tantos ensinamentos, que estiveram sempre ao meu lado, sendo meu apoio e meu porto seguro.

À minha irmã, Bárbara, pelo amor, amizade, alegrias e responsabilidades que assumiu tão forte.

Aos meus amigos, Ana Paula, Nati, Ju, Lindo, Dani, pelas conversas, risadas, carinho, ombro amigo e momentos especiais.

Ao meu amigo e namorado, Vinícius, sempre me incentivando a ver além do que se vê. E à sua família, que me acolheu como parte dela.

À minha família de sangue e de coração, sempre tão presentes e amorosos.

À professora Janete, pelos ensinamentos, seu auxílio na construção do meu conhecimento, que como orientadora me concedeu a oportunidade de aprender tanto, e poder crescer acadêmica e pessoalmente.

Ao Bene, pelos ensinamentos práticos, além de sua companhia, ajuda diária, generosidade e amizade.

À Renatinha e a Tanare, por toda atenção, preocupação e disponibilidade quando tive dúvidas e problemas. E também ao Leandro Arriveti, pelo auxílio no LC-MS, sempre tão solícito.

À CNPq pela bolsa concedida e a FAPESP, Processo 2013/21886-7, pelo auxílio financeiro.

Ao IQSC pelo suporte acadêmico e por ser minha outra casa desde 2008.

E à todos que direta ou indiretamente estiveram ao meu lado e me ajudaram nesta caminhada, meu muito obrigada!

“É exatamente disso que a vida é feita, de momentos. Momentos que temos que passar, sendo bons ou ruins, para o nosso próprio aprendizado. Nunca esquecendo do mais importante: nada nessa vida é por acaso. Absolutamente nada. Por isso temos que nos preocupar em fazer a nossa parte, da melhor forma possível. A vida nem sempre segue a nossa vontade, mas ela é perfeita naquilo que tem que ser.”

Chico Xavier

RESUMO

GABRIELA, R. S. **Estudo de alcaloides dos frutos de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis* por SBSE, CLAE-Flu e identificação por CLUE-EM.** 2015. Dissertação (Mestrado) Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

O maracujá, nome popular atribuído ao fruto das diversas espécies do gênero *Passiflora*, da família *Passifloraceae*, é amplamente comercializado e consumido no mundo, sendo o Brasil um dos maiores produtores do fruto. Alguns estudos apontam possível toxicidade relacionada às espécies de *Passiflora*, principalmente *P. incarnata*. No entanto, há pouco conhecimento acerca das espécies *P. edulis* e *P. alata*, sobretudo em relação à polpa e sementes. Os extratos da polpa e das sementes dos frutos dessas duas espécies de “maracujá”, *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, foram estudados com o objetivo de identificar alcaloides harmônicos, pelo preparo das amostras por extração por sorção em barra magnética recoberta com polidimetilsiloxano (SBSE-PDMS) e SBSE recoberta com polietilenoglicol silicone (SBSE-EG Silicone) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por fluorescência (CLAE-Flu) e cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (CLUE-EM/EM). A análise dos alcaloides harmana e harmina nos extratos da polpa de *P. alata* foi feita por meio do método de adição de padrão e mostrou menor quantidade destes alcaloides, em comparação com os resultados da análise dos extratos da polpa dos frutos de *P. edulis*, no trabalho de Pereira e colaboradores. As análises CLUE-EM e CLUE-EM/EM possibilitaram a identificação dos alcaloides nos extratos: nas sementes de *P. alata*, os alcaloides harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina foram identificados, enquanto que na polpa, harmana e harmina tiveram a confirmação da sua presença. Nos extratos da polpa dos frutos de *P. edulis* observou-se os alcaloides harmana, harmina e harmalina. E nas sementes de *P. edulis* harmina foi encontrada, porém há indícios da presença de harmana. A literatura sobre as barras de SBSE-EG Silicone Twister® não relata nenhum estudo relacionado ao seu uso para extração e concentração de alcaloides harmônicos nos extratos de *P. alata* e *P. edulis*. Por isso foi proposto inicialmente a aplicação do planejamento fatorial fracionário para otimização do método de extração, utilizando os padrões comerciais dos alcaloides harmana e harmina. O planejamento

experimental revelou as variáveis principais e seus níveis de importância, e a partir destes resultados foi realizado o estudo cinético dos tempos de extração e de dessorção das barras de SBSE-EG Silicone. Porém, os resultados mostraram que as barras de SBSE-EG Silicone não são adequadas para a extração dos alcaloides harmana e harmina, uma vez que a recuperação obtida foi baixa, na ordem de 30%.

Palavras-chave: *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, alcaloides harmônicos, SBSE/CLAE-Flu, CLUE-EM/EM.

ABSTRACT

GABRIELA, R. S. **Alkaloids studies from *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* fruits analyzed by SBSE, CLAE-Flu, and identified by CLUE-EM.** 2015. (Master of Science) Instituto de Química de São Carlos – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2015.

“Maracujá” is the popular name given to the fruit of several species of *Passiflora* genus, from *Passifloraceae* family, it is widely commercialized and consumed around the world, and Brazil is one of the largest producers of this fruit. Some studies pointed out the possible toxicity related to *Passiflora* species, mainly *P. incarnata*. Although, there is a lack of knowledge about the *P. edulis* and *P. alata* species, especially with regards to the pulp and seeds. The extracts of pulp and seeds from the “maracujá” species *Passiflora alata* and *Passiflora edulis*, were studied in order to identify harman alkaloids. The samples were prepared by extraction with sorptive stir bar coated with polydimethylsiloxane (SBSE-PDMS) and SBSE coated with polyethylene glycol silicon (SBSE-EG Silicone). The samples were analyzed by high performance liquid chromatography with fluorescence detector (HPLC-Flu), and ultra-high pressure liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS). Harmane and harmine alkaloids in *P. alata* pulp extracts were analyzed using the standard addition method and the results showed a lower amount of these alkaloids, compared with the test results for the extracts from the *P. edulis* pulp in the work of Pereira et al. UHPLC-MS and UHPLC-MS/MS analysis enabled to identify the alkaloids amount present in the extracts. In the *P. alata* seeds extract the following alkaloids were identified harmane, harmine, harmol, harmalol and harmaline, while in the pulp extract, harmane and harmine were confirmed. In the extracts of *P. edulis* pulp the alkaloids identified were harmane, harmine and harmaline. And in the *P. edulis* seeds extract the harmine alkaloid was found, some indications of the presence of harmana were observed. The literature about SBSE-EG Silicone Twister® bars reports no study related to their use for extraction and concentration of harman alkaloids in *P. alata* and *P. edulis*. Thus, it was initially proposed the application of fractional factorial design to optimize the extraction method using commercial standards of harmane and harmine alkaloids. The experimental design revealed the main variables and their importance levels, and

from these results kinetic studies were performed for the extraction and desorption times of SBSE-EG Silicone bars. However, the results showed SBSE-EG Silicone bars are not suitable for the extraction of harmine and harmaline alkaloids, since the recovery obtained was low, on the order of 30%.

Keywords: *Passiflora alata*, *Passiflora edulis*, harman alkaloids, SBSE/HPLC-Flu, UHPLC-MS/MS.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - IMAGENS DOS FRUTOS DE (A) <i>P. EDULIS</i> (MARACUJÁ AZEDO) E (B) <i>P. ALATA</i> (MARACUJÁ DOCE).....	19
FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS ALCALOIDES HARMÂNICOS: (A) HARMANA (B) HARMINA (C) HARMALINA (D) HARMALOL E (E) HARMOL.	21
FIGURA 3 - REPRESENTAÇÃO DO MÉTODO DE EXTRAÇÃO POR SORÇÃO, UTILIZANDO BARRAS MAGNÉTICAS RECOBERTAS COM POLIDIMETILSILOXANO (PDMS) (A) E OS PROCESSOS DE DESSORÇÃO LÍQUIDA (B).....	22
FIGURA 4 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DE UMA BARRA COMERCIAL PARA SBSE DE (A) PDMS E (B).....	25
FIGURA 5 - BARRA DE EXTRAÇÃO DE EG-SILICONE TWISTER®”.....	26
FIGURA 6 - ILUSTRAÇÃO DE UM SISTEMA ON-LINE CLAE-EM, COM A SEQUÊNCIA DE ELEMENTOS.	29
FIGURA 7 - CURVA DA EQUAÇÃO DE VAN DEEMTER, PARA PARTÍCULAS DE 10, 5, 3 E $\leq 2\mu\text{m}$	31
FIGURA 8 - FLUXOGRAMA DO FUNCIONAMENTO DO SISTEMA DE DETECÇÃO DE ESPECTROMETRIA DE MASSAS.	33
FIGURA 9 - PROCESSO DE FORMAÇÃO DAS GOTÍCULAS DE ANALITO E SOLVENTE, E COMO SÃO CONDUZIDAS PELO CAMPO ELÉTRICO APLICADO.....	35
FIGURA 10 - INTERFACE DO PROCESSO DE ELETRONEBULIZAÇÃO DOS ANALITOS, ENTRE A SAÍDA DO SISTEMA CROMATOGRÁFICO E A INJEÇÃO NO ESPECTRÔMETRO DE MASSAS..	36
FIGURA 11 - REPRESENTAÇÃO DE UM ESPECTÔMETRO DE MASSAS, PARA MOSTRAR O MODELO DE ANALISADOR DO TIPO QUADRUPOLO.	38
FIGURA 12 - REPRESENTAÇÃO DO ANALISADOR DE MASSAS ORBITRAP, COM SEU ELETRODO EXTERNO (A) E O ELETRODO CENTRAL (B), ONDE, R E Z CORRESPONDEM ÀS COORDENADAS CILÍNDRICAS.....	39
FIGURA 13 - ESQUEMA DO ANALISADOR ORBITRAP.	40
FIGURA 14 - CROMATOGRAMAS DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> OBTIDOS POR SBSE/CLAE-FLU DUAL: (A) DETECÇÃO NO COMPRIMENTO DE ONDA ESPECÍFICO PARA O ALCALOIDE HARMANA E (B) DETECÇÃO NO COMPRIMENTO DE ONDA ESPECÍFICO PARA HARMINA.....	49
FIGURA 15 - COMPARAÇÃO DOS CROMATOGRAMAS DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> COM (A) PADRÃO DE HARMANA $20\mu\text{g L}^{-1}$ E (B) PADRÃO DE HARMINA $20\mu\text{g L}^{-1}$, OBTIDOS POR CLAE-FLU ($\lambda_{\text{EXCITAÇÃO}} = 254\text{ nm}$ E $\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 425\text{ nm}$ PARA HARMANA E $\lambda_{\text{EXCITAÇÃO}} = 254\text{ nm}$ E $\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 410\text{ nm}$ PARA HARMINA.	51
FIGURA 16 - COMPARAÇÃO DOS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS DOS ALCALOIDES (A) HARMINA ($\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 410\text{ nm}$) E (B) HARMANA ($\lambda_{\text{EMIÇÃO}} = 425\text{ nm}$) PRESENTES NO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> , IDENTIFICADOS POR SBSE/CLAE-FLU DUAL, E OS ESPECTROS DE FLUORESCÊNCIA DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE CLAE-FLU DAS SOLUÇÕES DE PADRÕES COMERCIAIS DE (C) HARMINA E (D) HARMANA.	52
FIGURA 17 - CURVAS ANALÍTICAS OBTIDAS PELO MÉTODO SBSE/CLAE-FLU POR ADIÇÃO DE PADRÃO PARA QUANTIFICAÇÃO DE (A) HARMANA E (B) HARMINA NOS EXTRATOS DA POLPA DE <i>P. ALATA</i>	53

FIGURA 18 - (A) CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL E (B) ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 183$ DO PADRÃO HARMANA, $T_R = 2,05$ MIN (SOLUÇÃO 100 MG L^{-1}).	56
FIGURA 19 - ESPECTRO CLUE-EM/EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 183$, $T_R = 2,05$ MIN, DO ALCALOIDE HARMANA.....	57
FIGURA 20 - (A) CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL E (B) ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 213$ DO PADRÃO HARMINA, $T_R = 2,65$ MIN (SOLUÇÃO 100 MGL^{-1}).	58
FIGURA 21 - ESPECTRO CLUE-EM/EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 213$, $T_R = 2,65$ MIN, ALCALOIDE HARMINA.....	59
FIGURA 22 - CAMINHO DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMINA. ..	60
FIGURA 23 - (A) CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL E (B) ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 199$ DO PADRÃO HARMOL, $T_R = 1,81$ MIN (SOLUÇÃO 100 MG L^{-1}).	61
FIGURA 24 - ESPECTRO CLUE-EM/EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: FRAGMENTAÇÃO DO $[M+H]^+$ DO ALCALOIDE HARMOL.	62
FIGURA 25 - CAMINHO DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMOL. ...	62
FIGURA 26 - (A) CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL E (B) ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 201$ DO PADRÃO HARMALOL, $T_R = 1,60$ MIN (SOLUÇÃO 100 MG L^{-1}).....	63
FIGURA 27 - ESPECTRO CLUE-EM/EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: FRAGMENTAÇÃO DO $[M+H]^+$ DO ALCALOIDE HARMALOL.	64
FIGURA 28 - CAMINHOS DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMALOL.	65
FIGURA 29 - (A) CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL E (B) ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: ÍON $[M+H]^+ = 215$ DO PADRÃO HARMALINA, $T_R = 2,44$ MIN (SOLUÇÃO 100 MG L^{-1}).....	66
FIGURA 30 - ESPECTRO CLUE-EM/EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: FRAGMENTAÇÃO DO $[M+H]^+$ DO ALCALOIDE HARMALINA.	67
FIGURA 31 - CAMINHO DE FRAGMENTAÇÃO DO ÍON MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMALINA.	67
FIGURA 32 - CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL DO BRANCO (METANOL), OBTIDO POR CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO.....	69
FIGURA 33 - ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO, DO BRANCO (METANOL).....	69
FIGURA 34 - CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL (TIC) DO EXTRATO TOTAL DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> , OBTIDO POR CLUE-EM, IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY, NO MODO POSITIVO. (A) CROMATOGRAMA DO ÍON MOLECULAR (TIC) E CROMATOGRAMA DO ÍON EXTRAÍDO (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 E (F) m/z 215.	70
FIGURA 35 - ESPECTRO CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: DOS PICOS DO ÍONS (A) m/z 183, (B) m/z 199 E (C) m/z 201, PRESENTES NOS CROMATOGRAMAS DOS ÍONS EXTRAÍDOS DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> FIGURA 34.....	71

FIGURA 36 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CLUE-EM/EM DO PADRÃO DE HARMANA E DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> . (A) SOLUÇÃO PADRÃO DE HARMANA m/z 183, $T_R = 2,05$ MIN E (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> .	72
FIGURA 37 - ESPECTROS DE MASSAS DA ANÁLISE CLUE-EM/EM DO ÍON $[M+H]^+$ DE m/z 183, $T_R = 2,05$ MIN: (A) DO PADRÃO COMERCIAL DE HARMANA E (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> .	73
FIGURA 38 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CLUE-EM/EM DO PADRÃO DE HARMINA E DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> . (A) SOLUÇÃO PADRÃO DE HARMINA m/z 213, $T_R = 2,83$ MIN E (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> .	74
FIGURA 39 - ESPECTROS DE MASSAS DA ANÁLISE CLUE-EM/EM DO ÍON $[M+H]^+$ DE m/z 213, $T_R = 2,85$ MIN: (A) DO PADRÃO COMERCIAL DE HARMINA E (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> .	75
FIGURA 40 - CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL (A) DO EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. ALATA</i> , OBTIDO POR CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO. CROMATOGRAMA DO ÍON EXTRAÍDO (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 E (F) m/z 215.	76
FIGURA 41 - ESPECTROS CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO: DOS PICOS DOS ÍONS $[M+H]^+$ (A) m/z 183 ($T_R = 2,03$ MIN), (B) m/z 199 ($T_R = 1,68$ MIN), (C) m/z 201 ($T_R = 1,38$ MIN), (D) m/z 213 ($T_R = 2,80$ MIN) E (E) m/z 215 ($T_R = 2,54$ MIN), PRESENTES NOS CROMATOGRAMAS DOS ÍONS EXTRAÍDOS DO EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. ALATA</i> .	77
FIGURA 42 - CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL (A) DO EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> , OBTIDO POR CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO. CROMATOGRAMA DO ÍON EXTRAÍDO (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 E (F) m/z 215.	79
FIGURA 43 - CROMATOGRAMA DO ÍON TOTAL (A) DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> , OBTIDO POR CLUE-EM, IONIZAÇÃO ELETROSPRAY, MODO POSITIVO. CROMATOGRAMA DO ÍON EXTRAÍDO (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 E (F) m/z 215.	80
FIGURA 44 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CLUE-EM/EM DO PADRÃO DE HARMALINA m/z 215 ($T_R = 2,60$ MIN) E DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> (A) PADRÃO DE HARMALINA, (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> E (C) EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> .	81
FIGURA 45 - ESPECTROS DE MASSAS DA ANÁLISE CLUE-EM/EM DO ÍON $[M+H]^+$ DE m/z 215, $T_R = 2,60$ MIN: (A) DO PADRÃO COMERCIAL DE HARMALINA E (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> .	82
FIGURA 46 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CLUE-EM/EM DO PADRÃO DE HARMINA m/z 213 ($T_R = 2,85$ MIN) E DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> : (A) PADRÃO DE HARMINA (B) EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> E (C) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> .	83
FIGURA 47 - ESPECTROS DE MASSAS DA ANÁLISE CLUE-EM/EM DO ÍON $[M+H]^+$ DE m/z 213, $T_R = 2,85$ MIN: (A) PADRÃO COMERCIAL DE HARMINA, (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> E (C) EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> .	84
FIGURA 48 - CROMATOGRAMAS OBTIDOS ATRAVÉS DAS ANÁLISES REALIZADAS POR CLUE-EM/EM DO PADRÃO DE HARMANA m/z 183 ($T_R = 2,09$ MIN) E DO EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> : (A) PADRÃO DE HARMANA (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> , (C) EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> E (D) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i> .	85

FIGURA 49 - ESPECTROS DE MASSAS DA ANÁLISE CLUE-EM/EM DO ÍON $[M+H]^+$ DE m/z 183, $T_R = 2,05$ MIN: (A) PADRÃO COMERCIAL DE HARMANA, (B) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> E (C) EXTRATO DAS SEMENTES DE <i>P. EDULIS</i> E (D) EXTRATO DA POLPA DE <i>P. ALATA</i>	86
FIGURA 50 - GRÁFICOS DE PARETO PARA VISUALIZAÇÃO DOS EFEITOS DAS VARIÁVEIS QUÍMICAS (% MeOH, pH, TEMPO DE EXTRAÇÃO (TEXTR), NaCl E TEMPO DE DESSORÇÃO (TDESS)) SOBRE A EXTRAÇÃO POR SBSE-EG SILICONE, PARA OS ALCALOIDES (A) HARMANA E (B) HARMINA.	89
FIGURA 51 - GRÁFICOS DOS EFEITOS PRINCIPAIS PARA VISUALIZAÇÃO DA INFLUÊNCIA DOS NÍVEIS DAS VARIÁVEIS QUÍMICAS (% MeOH, pH, TEMPO DE EXTRAÇÃO (TEXTRAÇ), NaCl E TEMPO DE DESSORÇÃO (TDESSOR)) SOBRE A EXTRAÇÃO POR SBSE-EG SILICONE, PARA OS ALCALOIDES (A) HARMANA E (B) HARMINA.	90
FIGURA 52 – FORMAS IÔNICAS E MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMANA EM SOLUÇÃO AQUOSA.....	91
FIGURA 53 – FORMAS IÔNICAS E MOLECULAR DO ALCALOIDE HARMINA EM SOLUÇÃO AQUOSA.	91
FIGURA 54 - GRÁFICOS DA VARIAÇÃO DA ÁREA DO PICO CROMATOGRÁFICO DOS ALCALOIDES (A) HARMINA E (B) HARMANA EXTRAÍDOS POR SBSE-EG SILICONE, EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES TEMPOS DE EXTRAÇÃO SOB AGITAÇÃO.....	93
FIGURA 55 - GRÁFICOS DA VARIAÇÃO DA ÁREA DO PICO CROMATOGRÁFICO DOS ALCALOIDES (A) HARMINA E (B) HARMANA NA EXTRAÇÃO SBSE-EG SILICONE, EM FUNÇÃO DOS DIFERENTES TEMPOS DE DESSORÇÃO NO ULTRASSOM.	94
FIGURA 56 - CURVA DA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO ALCALOIDE HARMANA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO, POR SBSE COM BARRAS MAGNÉTICAS EG-SILICONE.	96
FIGURA 57 - CURVA DA PORCENTAGEM DE RECUPERAÇÃO DO ALCALOIDE HARMINA EM FUNÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DA SOLUÇÃO DE EXTRAÇÃO, POR SBSE-EG SILICONE.	97

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS ALCALOIDES HARMÂNICOS HARMANA E HARMINA A PARTIR DA POLPA DE <i>P. EDULIS</i> E <i>P. ALATA</i>	43
TABELA 2 - PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO DOS ALCALOIDES HARMÂNICOS HARMANA E HARMINA A PARTIR DAS SEMENTES SECAS DE <i>P. EDULIS</i> E <i>P. ALATA</i>	43
TABELA 3 - NÍVEIS E FATORES AVALIADOS NO PLANEJAMENTO FATORIAL 2^{5-1}	44
TABELA 4 - MATRIZ DE EXPERIMENTOS (FATORES E SEUS RESPECTIVOS NÍVEIS) DO PLANEJAMENTO FATORIAL FRACIONÁRIO 2^{5-1}	45
TABELA 5 - CONDIÇÕES CROMATOGRÁFICAS DE ANÁLISE DOS ALCALOIDES HARMÂNICOS EM CLAE-FLU.	46
TABELA 6 - DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA POR CLAE-FLU DOS ALCALOIDES EM POLPA DE <i>P. ALATA</i>	54
TABELA 7 - ALCALOIDES HARMÂNICOS ESTUDADOS, SEUS RESPECTIVOS TEMPO DE RETENÇÃO, ÍON MOLECULAR E ÍONS FILHOS.	55
TABELA 8 - AVALIAÇÃO DA IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALOIDES HARMÂNICOS NOS EXTRATOS DA POLPA E DAS SEMENTES DE <i>P. ALATA</i> E <i>P. EDULIS</i>	87

LISTA DE ABREVIATURAS

[M+H]⁺ - íon molecular protonado

APCI – *atmospheric pressure chemical ionization* (Ionização Química à Pressão Atmosférica)

CG – Cromatografia Gasosa

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência; em inglês *HPLC – High Pressure Liquid Chromatography*

CLAE-EM – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

CLAE-Flu – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Fluorescência

CLUE – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência; em inglês *UHPLC – Ultra High Pressure Liquid Chromatography*

CLUE-EM – Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

Da – Daltons

EFS – extração em fase sólida

EG-Silicone – silicone modificado com etileno glicol

ELL – extração líquido-líquido

ESI – *electrospray ionization* (Ionização por Eletronebulização)

FE – fase estacionária

FM – fase móvel

H – altura de prato

K_{OW} – coeficiente de partição em octanol/água

K_{PDMS/água} – coeficiente de partição em PDMS e água

LD – *liquid desorption* (Dessorção Líquida)

m/z – relação massa carga

ODS – Octadecil silano

PAHs – *Polycyclic aromatic hydrocarbon* (Hidrocarbonetos Policíclicos aromáticos)

PDA – *Photodiode Array* (Arranjo de diodos)

PDMS – polidimetilsiloxano

SBSE – *stir bar sorptive extraction* (Extração Sortiva em Barra de Agitação)

SPME – *solid phase micro extraction* (Microextração por Fase Sólida)

TD – *thermal desorption* (Dessorção Térmica)

UV-Vis – Ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Análise Fitoquímica: Importância e Aplicações	17
1.2 <i>Passiflora</i>	18
1.2.1 Alcaloides harmônicos.....	20
1.3 Stir Bar Sorption Extraction – SBSE.....	21
1.3.1 Otimização do Método de Extração por SBSE	27
1.4 Técnicas Cromatográficas de Análise.....	28
1.4.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	28
1.4.2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas	32
2 OBJETIVOS.....	41
3 PARTE EXPERIMENTAL	41
3.1 Material Vegetal.....	41
3.2 Extração dos analitos do material vegetal	42
3.2.1 Materiais utilizados:.....	42
3.2.2 Procedimento de extração:	42
3.2.2.1 SBSE – PDMS.....	42
3.2.2.2 Desenvolvimento SBSE – EG Silicone.....	44
3.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência.....	46
3.3.1 Análise quantitativa dos alcaloides em <i>P. alata</i>	46
3.4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas.....	47
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4.1 Análise quantitativa dos alcaloides em polpa de <i>P. alata</i>	48
4.2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas.....	55
4.2.1 Análise dos extratos de <i>Passiflora alata</i> e <i>Passiflora edulis</i>	68
4.2.1.1 Análise dos extratos de <i>Passiflora alata</i>	70
4.2.1.2 Análise dos extratos de <i>Passiflora edulis</i>	79
4.3 Extração de alcaloides harmônicos por SBSE-EG Silicone.	88
5 CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS.....	99

1 INTRODUÇÃO

1.1 Análise Fitoquímica: Importância e Aplicações

A biodiversidade tem oferecido aos seres humanos saúde e bem estar, por oferecer elementos essenciais para a vida. A profusão de componentes genéticos e bioquímicos presentes nos vegetais têm sido aproveitados na garantia de fonte de alimentos e medicamentos (SHARMA *et al.*, 2013).

A fitoquímica, tem grande importância na identificação dos compostos químicos presentes nas estruturas dos vegetais. Compostos fitoquímicos são moléculas produzidas pelos tecidos das plantas, durante o metabolismo primário ou secundário, e estão associados ao mecanismo de proteção contra insetos, doenças, radiação ultravioleta, contaminantes ambientais e ameaças que estes organismos possam sofrer. Os metabólitos das plantas também apresentam características de proteção para os consumidores humanos, por exemplo os flavonoides que possuem atividade antioxidante (HAJNOS; SHERMA, 2011).

A área de aplicação mais importante dos métodos de investigação fitoquímicos é a farmacognosia, campo de estudos de medicamentos derivados de fontes naturais. Embora a maioria dos estudos estejam direcionados às plantas, outros tipos de organismos também são de interesse, principalmente microrganismos. A farmacognosia tem seus estudos divididos em: etnobotânica, que estuda as plantas tradicionalmente utilizadas para tratamentos medicamentosos; etnofarmacologia, que estuda as propriedades farmacológicas de substâncias medicinais; fitoterapia, que estuda o uso medicinal de extratos vegetais; e fitoquímica, que estuda os compostos químicos obtidos das plantas (HAJNOS; SHERMA, 2011).

As plantas têm sido extensivamente estudadas, como fonte de substâncias com propriedades medicinais, pela produção de moléculas bioativas, na grande maioria envolvidas no sistema de defesa química contra predadores e infecções (RIPA *et al.*, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, ou WHO, sigla em inglês), as plantas medicinais são a matriz para obtenção de uma variedade de medicamentos (YADAV *et al.*, 2011).

Os compostos fitoquímicos responsáveis por ação fisiológica específica no organismo humano, são produzidos no organismo vegetal pelo metabolismo primário e, mais comumente, secundário. Estes compostos estão associados a grande

variedade de terapias, humanas e veterinárias, à agricultura e pesquisas científicas. Alguns destes compostos biologicamente ativos são taninos, alcaloides, carboidratos, terpenoides, esteroides e flavonoides. Os compostos encontrados nas raízes, sementes, frutos, folhas, flores, galhos, hastes, dentre outras partes das plantas, são utilizados como princípio ativo nos medicamentos fitoterápicos há muitos anos. Assim, o conhecimento da estrutura e função destas substâncias é de grande valor para a síntese de produtos químicos mais complexos e mais efetivos (YADAV *et al.*, 2011).

Os extratos de plantas medicinais constituem-se de uma mistura complexa de substâncias fitoquímicas, em que suas características diferem consideravelmente entre as diferentes espécies. Até mesmo os extratos de uma mesma planta podem diferir em sua composição de acordo com as condições climáticas durante o crescimento, a origem, o processo de desidratação, entre outros fatores (YANG *et al.*, 2009).

Muitos medicamentos, provenientes de plantas, são utilizados e preferidos por sua alta efetividade e baixa toxicidade, e estão presentes em produtos comerciais. Materiais vegetais são obtidos de fontes naturais e cultivados para utilização como fontes de substâncias medicinais, utilizados na indústria farmacêutica. Devido a esses fatores há uma necessidade crescente do controle de pureza do material vegetal, e pesquisas complementares para identificação e determinação da composição química destes vegetais, para a obtenção do efeito terapêutico desejado (HAJNOS; SHERMA, 2011).

1. 2 *Passiflora*

O gênero *Passiflora* compreende aproximadamente 500 espécies de plantas da família *Passifloraceae* e é o de maior importância, com um maior número de espécies cultivadas e consumidas. Encontradas na área que corresponde à América Latina, principalmente América do Sul, as plantas são conhecidas como maracujá, e em inglês denominadas “passion fruit” ou “passion flower” (ZUCOLOTTO *et al.*, 2012). Existem inúmeras formas de consumo do “maracujá”, onde a polpa do seu fruto pode ser utilizada na produção de sucos e chás, e suas folhas têm aplicação na produção de medicamentos.

Dentre todas as espécies conhecidas desse gênero, apenas 30 são descritas como próprias para o consumo, e as mais comumente cultivadas e comercializadas

são o maracujá-azedo ou amarelo (Figura 1 a) (*Passiflora edulis* Sims, f. *flavicarpa* Degener) e o maracujá-doce (Figura 1 b) (*Passiflora alata* Dryander). O Brasil é o maior produtor de maracujá do mundo, com uma distribuição geográfica principalmente localizada no Centro-Norte, e as principais formas de ingestão deste fruto são por meio de chás, sucos e preparações alimentícias. Na Farmacopéia Brasileira há relatos acerca das propriedades ansiolíticas atribuídas às folhas de *P. alata*. Entretanto, estudos apontam possível toxicidade relacionada às espécies de *Passiflora*, principalmente *P. incarnata*. Contudo, pouco conhecimento se tem das espécies *P. edulis* e *P. alata*, sobretudo em relação à polpa e sementes (PEREIRA *et al.*, 2012).

Figura 1 - Imagens dos frutos de (a) *P. edulis* (maracujá azedo) e (b) *P. alata* (maracujá doce).

A medicina popular usa, desde muito tempo, as folhas de várias espécies de *Passiflora* como medicamento ansiolítico, sedativo e tranquilizante. Mesmo possuindo registros na Farmacopéia Brasileira, como é o caso das folhas de *Passiflora alata* Curtis, existem poucos estudos no que se refere à química dos compostos ativos, tornando difícil a padronização do uso deste material vegetal para produção de medicamentos. Experimentos *in vivo* foram realizados com o objetivo de definir precisamente a atividade farmacológica relacionada às espécies de *Passiflora*; contudo, seus efeitos não puderam ser atribuídos a somente um composto, tendo sido apresentados dados que os conferem aos alcaloides e flavonoides presentes em sua matriz (MACHADO *et al.*, 2010).

Apesar do extensivo consumo, faltam informações acerca das reais aplicações medicinais que apresentam. Os diversos estudos apontam que os compostos majoritários destas espécies são alcaloides, flavonoides, glicosídeos,

fenóis, além de compostos voláteis (DHAWAN *et al.*, 2004). Os extratos das espécies *P. incarnata*, *P. edulis* e *P. alata* têm sido os de maior interesse e alvo de pesquisas, que revelaram a presença de flavonoides C-glicosídicos, saponinas e alcaloides. Sendo as duas primeiras espécies as que possuem maior número de informações sobre sua constituição fitoquímica (ZUCOLOTTO *et al.*, 2012).

1. 2. 1. Alcaloides harmânicos

A atividade antioxidante, correlacionada aos flavonoides, dos frutos de maracujá já foi objeto de pesquisa de vários trabalhos. Contudo, poucos apresentaram a relação dos seus constituintes com o efeito ansiolítico do suco de maracujá, sendo atribuído à presença de pequenas quantidades dos alcaloides harmânicos. Estes alcaloides são do tipo indólico, caracterizados como o segundo maior grupo de alcaloides conhecidos (ZERAİK *et al.*, 2010).

Encontrados em extratos de *Passiflora*, os alcaloides harmânicos são um grupo de alcaloides β -carbolínicos presentes em diversas famílias de plantas e, em menor concentração, em alimentos cozidos. Inúmeras atividades farmacológicas têm sido atribuídas a estes alcaloides, o que os torna alvo de intensa pesquisa (ABOURASHED *et al.*, 2003).

Em *Passiflora edulis*, foram identificados os alcaloides: harmana, harmina, harmalina e harmalol (Figura 2), e a maior concentração apresenta-se nas folhas da planta (DHAWAN *et al.*, 2004). Estudos apontam que a harmina (Figura 2b) é o principal constituinte da classe dos alcaloides harmânicos que apresenta efeitos farmacológicos (ONISHI *et al.*, 2012).

Os alcaloides harmânicos estão descritos como constituintes em diversos tipos de alimentos de fonte vegetal, sendo encontrados também em carnes muito cozidas e substâncias provenientes de fumaças de queima de vegetais, além de possuir atividade psicotrópica - podem interagir de forma irreversível com as enzimas monoamina oxidase A e inibição da enzima acetilcolinesterase -, apresentam ação antitumoral, efeitos analgésicos, atividade vasorrelaxante e antimicrobiana. Alguns estudos, ainda, relatam que os alcaloides β -carbolínicos atuam como substâncias co-mutagênicas na presença de aminas aromáticas, por exemplo, anilina e toluidina (ZHAO *et al.*, 2012; ONISHI *et al.*, 2012).

Figura 2 - Estrutura dos alcaloides harmônicos: (a) Harmana (b) Harmina (c) Harmalina (d) Harmalol e (e) Harmol.

As espécies de maracujá *P. edulis* e *P. alata* apresentam os alcaloides harmônicos e devido à sua atividade inibidora sobre as enzimas monoamina oxidases, têm sido considerados como as principais substâncias bioativas presentes nas espécies de *Passiflora* (DHAWAN *et al.*, 2004).

1. 3 Stir Bar Sorption Extraction – SBSE

Anteriormente à análise e detecção dos compostos orgânicos presentes em amostras alimentares e vegetais, é necessária uma etapa de extração. A técnica de preparação da amostra, composta pela extração, “clean up” e concentração de analitos, reduz os efeitos de matriz, que podem influenciar na exatidão, precisão e robustez do método bioanalítico (WU *et al.*, 2013). A partir de matrizes aquosas de alimentos, o processo de extração pode ser realizado por meio de técnicas tradicionais como extração líquido-líquido (ELL) e extração em fase sólida (EFS), as quais demandam, principalmente a primeira, o uso de grandes quantidades de solvente, uma quantidade relativamente grande de amostra, e ainda pode ser necessária a realização de uma etapa de “clean up” (ZUIN *et al.*, 2005).

O tipo de extração que se deseja realizar é o critério mais importante na comparação e seleção da técnica de extração. O processo de extração pode ser baseado no equilíbrio entre líquido-gás, extração dinâmica líquido-gás, partição ou adsorção líquido-líquido, e extração por sorção. Esta última tem sido vista como uma alternativa ecologicamente favorável, principalmente à extração líquido-líquido. Na extração por sorção os analitos da fase líquida ou gasosa entram na matriz de uma fase líquida imiscível (fase extratora), ao invés de se aderirem a um sítio específico ou à superfície do adsorvente (DAVIS *et al.*, 2007).

O cenário atual, dentro das análises químicas, busca à simplificação, miniaturização, fácil manipulação dos aparelhos analíticos, redução ou extinção do uso de solventes orgânicos, além de baixos volumes de amostra, de acordo com os princípios da “química verde” (NOGUEIRA, 2012). Assim, novas técnicas para preparação de amostras têm se tornado um dos enfoques da química analítica, oferecendo a possibilidade de automação, seletividade, boa eficiência e rapidez. Além de serem consideradas “limpas” ou “ambientalmente corretas”, deseja-se que tenham custo reduzido, fácil manipulação e utilizem pouco ou nenhum solvente (VIÑAS *et al.*, 2008).

Um exemplo desse tipo de técnica é a microextração em fase sólida, SPME (*solid phase micro extraction*), que promove a concentração de compostos voláteis ou não voláteis em amostras líquidas simplesmente por imersão direta ou “headspace”. Outra técnica, que utiliza pouquíssima quantidade de solvente para a extração de compostos orgânicos, é conhecida como extração por sorção em barra magnética, SBSE (*stir bar sorptive extraction*). Constitui-se de uma barra magnética recoberta por um polímero, em resumo (VIÑAS *et al.*, 2008). A SBSE é considerada uma técnica “verde” de preparação de amostra, pois sua aplicação é capaz de eliminar ou reduzir a utilização de solventes, por dessorção térmica e dessorção líquida, respectivamente (PLOTKA *et al.*, 2013). A figura 3 mostra como ocorre o processo de sorção dos analitos de interesse durante a etapa de extração (a), seguida pela etapa de dessorção líquida (b).

Figura 3 - Representação do método de extração por sorção, utilizando barras magnéticas recobertas com polidimetilsiloxano (PDMS) (a) e o processo de dessorção líquida (b).

(Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ *et al.*, 2013).

Na SBSE, o líquido imiscível no qual os analitos se difundem é conhecido como fase extratora. O material mais amplamente utilizado nesta função é o polidimetilsiloxano (PDMS), que também tem grande aplicação como fase estacionária na técnica de cromatografia gasosa; é termoestável, podendo ser utilizado dentro de uma larga faixa de temperaturas. Ainda, o PDMS como fase

extratora garante o enriquecimento da amostra, ausência dos efeitos de deslocamento, inércia e a rápida dessorção térmica em temperaturas amenas. Após a extração, o analito pode ser dessorvido por dessorção térmica (TD, *thermal desorption*) ou por dessorção líquida (LD, *liquid desorption*), usando um solvente orgânico (DAVIS *et al.*, 2007).

Arthur e Pawliszyn propuseram o método de microextração por sorção em PDMS, denominado SPME, no qual a fase estacionária sortiva de polidimetilsiloxano, aderido à uma fibra, é colocada em contato com a amostra. No entanto, algumas complicações com relação ao baixo volume de fase extratora (aproximadamente 0,5 μL) recobrimo a fibra e a polaridade dos analitos levaram os pesquisadores a procurar por outros métodos que fossem mais eficientes. Desta forma, desenvolveram-se as barras de agitação recobertas de uma fina camada de polidimetilsiloxano, que em agitação na amostra aquosa possibilitava a extração e o enriquecimento dos solutos na cobertura de PDMS. Esta técnica recebeu o nome de extração por sorção em barra magnética, SBSE em inglês. A técnica de SBSE emprega o mesmo princípio de extração por sorção que a técnica de SPME, no entanto possui um volume de polidimetilsiloxano entre 25 e 125 μL , que é 50 a 250 vezes maior na SPME (DAVIS *et al.*, 2007; CALDAS *et al.*, 2011).

O processo de extração por sorção ocorre por equilíbrio: em amostras aquosas, o controle dos analitos que são extraídos do meio ocorre por meio do coeficiente de partição dos solutos entre a fase extratora e a fase aquosa. Este coeficiente de partição está relacionado ao coeficiente de distribuição octanol-água, por meio do qual se pode prever se, e quão bem, um determinado soluto poderá ser extraído pela técnica de SPME ou SBSE (DAVIS *et al.*, 2007).

O coeficiente de partição do analito entre a fase extratora e a fase aquosa corresponde à razão entre a concentração deste soluto na fase de polidimetilsiloxano e a concentração em água, quando em equilíbrio. Este valor corresponde à massa de analito presente na fase extratora dividida pela massa na fase aquosa, multiplicada pela razão de fase β , conforme mostra a equação [1] a seguir.

$$K_{\text{octanol/água}} \approx K_{\text{PDMS/água}} = \frac{C_{\text{PDMS}}}{C_{\text{água}}} = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{água}}} \frac{V_{\text{água}}}{V_{\text{PDMS}}} = \frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{água}}} \beta \quad [1]$$

C_{PDMS} = concentração do analito no PDMS

$C_{\text{água}}$ = concentração do analito em água

m_{PDMS} = massa do analito no PDMS

$m_{\text{água}}$ = massa do analito na água

$V_{\text{água}}$ = volume de água

V_{PDMS} = volume de PDMS

$\beta = V_{\text{água}}/V_{\text{PDMS}}$

A quantidade de analito que pode ser recuperada é calculada pela razão entre a massa de soluto na fase de polidimetilsiloxano e a massa inicial

$$(m_0 = m_{\text{água}} + m_{\text{PDMS}}), \text{ que correspondente a } \frac{K_{\text{PDMS/água}}/\beta}{1+(K_{\text{PDMS/água}}/\beta)}.$$

Quanto maior o valor do coeficiente de partição do analito ($K_{\text{PDMS/água}}$), mais eficiente será a extração, ou seja, maior será a recuperação do analito. Então, analitos mais polares serão menos retidos pelo polidimetilsiloxano. Além disso, a razão de fase β é outro parâmetro importante: maiores quantidades de PDMS levam a menores valores de β , e maior será a eficiência da extração. Estudos realizados com PAHs (Hidrocarbonetos Aromáticos Policíclicos) e pesticidas, extraídos de soluções aquosas usando SBSE e SPME, mostraram a maior recuperação obtida pela aplicação da técnica de extração por SBSE (DAVIS *et al.*, 2007).

Na análise de quantidades muito pequenas, a recuperação teórica - que pode ser calculada a partir do volume de amostra, das dimensões da barra de extração e das características do soluto por meio de um programa de software - é tão importante quanto o fator de enriquecimento e o total de analito que pode ser introduzido e detectado (DAVIS *et al.*, 2007).

Além dos parâmetros termodinâmicos, os critérios que afetam a cinética do processo de extração são de extrema importância e devem ser analisados e utilizados de forma a obter-se uma extração eficiente. A quantidade de soluto que migra para a cobertura de polidimetilsiloxano é determinada pela constante de difusão, pela condição de agitação, volume de amostra, entre outros. No entanto, quanto maior o volume de amostra e de PDMS, mais tempo é necessário para que a extração seja eficiente como se espera. Então, uma boa correlação entre o volume de amostra e o volume de fase extratora pode ser alcançada, resultando em um

tempo aplicável de análise. Após a etapa de dessorção dos analitos presentes na fase extratora, as barras de agitação poderão ser novamente utilizadas (DAVIS *et al.*, 2007).

Os compostos retidos na fase extratora podem ser dessorvidos termicamente, antes da análise em cromatógrafo gasoso, por meio de uma unidade de dessorção térmica; ou por dessorção líquida, quando o método de análise aplicado for cromatografia líquida (CACHO *et al.*, 2013). A técnica LD é considerada menos onerosa e fácil de trabalhar, já que não é necessário um dispositivo no equipamento de cromatografia para dessorção dos analitos (MAGI *et al.*, 2012).

As barras de extração de PDMS comercializadas possuem comprimento entre 1 e 2 cm, recobertas com uma camada entre 0,5 ou 1 mm de polímero. O bastão magnético deve estar protegido com uma camada de vidro, onde a cobertura de polidimetilsiloxano é aderida, uma vez que o contato direto com a barra pode levar à rápida degradação do polímero, como pode ser visto na figura 4 (a) (DAVIS *et al.*, 2007).

Figura 4 - Representação esquemática de uma barra comercial para SBSE de (a) PDMS e (b) de uma barra do tipo “dual phase”.

Fonte: Adaptado de BICCHI *et al.*, 2005.

As barras de extração recobertas com PDMS apresentam algumas limitações, assim novos materiais poliméricos têm sido estudados e utilizados com o objetivo de melhorar a flexibilidade e seletividade das barras, de forma que sua capacidade de concentração seja mantida e suas aplicações possam ser expandidas (NOGUEIRA, 2012). Barras de extração de duas fases foram propostas experimentalmente, e consistem em uma cobertura de PDMS do lado de fora com um material de carbono adsorvente recobrindo a parte interna (figura 4 b). Esta estrutura possibilita o aumento de recuperação de analitos polares em amostras aquosas (DAVIS *et al.*, 2007).

Recentemente foram lançadas barras de extração recobertas por fase extratora mais polar, de silicone modificado com etileno glicol, comercializadas como “*Ethylene Glycol (EG)-Silicone Twister®*” (Figura 5). Por serem mais polares que o PDMS, extraem compostos polares, com menores valores de $\log K_{o/w}$, mais eficientemente, como, por exemplo, os alcaloides harmônicos harmalina ($\log K_{o/w} = 2.57$), harmol ($\log K_{o/w} = 1.82$) e harmalol ($\log K_{o/w} = 2.19$). A base de silicone garante também a extração eficiente de compostos não polares, com valores de $\log K_{o/w}$ altos.

Figura 5 - Barra de extração de EG-Silicone Twister®.

(Fonte: Gerstel, 2011).

O estudo comparativo entre as barras magnéticas recobertas por EG-Silicone e PDMS concluiu que a primeira é capaz de realizar uma extração mais eficiente de compostos polares. Na extração de fenóis, furanos, alcoóis e ácidos as barras *EG-Silicone Twister* apresentam extração mais eficiente. Já para espécies não polares como terpenos e ésteres etílicos, as barras *EG-Silicone Twister* fornecem uma extração similar às das barras recobertas com PDMS (NIE *et al.*, 2011).

A técnica de SBSE é influenciada fortemente pela complexidade da matriz, que afeta a recuperação dos analitos alvo. Entretanto, seguindo os métodos analíticos desenvolvidos, a técnica de SBSE tem sido amplamente utilizada na análise de substâncias presentes em concentrações muito baixas, em diferentes áreas relacionadas à sociedade, tais como: ambiental, alimentar e sensorial, biomédica, forense e farmacêutica (NOGUEIRA, 2012).

Uma vez que a concentração dos alcaloides harmônicos harmana e harmina, presentes nas sementes secas de maracujá azedo (*P. edulis*), é muito pequena, na ordem de nanogramas (RODRIGUES, 2013), a técnica de pré-concentração é adequada para a preparação das amostras de sementes e polpas de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*. A técnica de SBSE, desde o seu desenvolvimento em 1999, é

uma das mais populares técnicas de pré-concentração, por sua simplicidade e robustez (CACHO *et al.*, 2013).

As aplicações da técnica de SBSE em análises alimentares são classificadas dentro de três grupos: análise de compostos minoritários (compostos voláteis e aditivos), determinação de compostos de aroma não desejados (*off-flavours*) e determinação de compostos de contaminantes em baixas concentrações (DAVIS *et al.*, 2007). Matrizes alimentares foram analisadas utilizando a técnica de SBSE, como por exemplo, análise de compostos voláteis ou semi-voláteis de pesticidas em frutas e vegetais, contaminantes e compostos de aroma em bebidas (DAVIS *et al.*, 2007; NOGUEIRA, 2012). Barras de SBSE são submetidas a diferentes tratamentos de forma a comparar sua eficiência de extração para compostos de diferentes polaridades. Em um estudo realizado por Xu e colaboradores, diferentes métodos de SBSE foram desenvolvidos para a extração de conservantes com diferentes polaridades de amostras alimentares (XU *et al.*, 2013).

A técnica de extração por SBSE é recente, mas o número de artigos e trabalhos publicados mostrando sua aplicação principalmente na análise de compostos orgânicos contidos em pequenas concentrações indicam as vantagens em comparação às outras técnicas de extração por sorção. Além disso, artigos de revisão apontam as possibilidades de métodos e aplicações da técnica de SBSE (NOGUEIRA, 2012).

1. 3. 1 Otimização do Método de Extração por SBSE

Para que o método de extração por SBSE seja eficiente e reprodutível é necessária uma etapa de otimização do método. A SBSE envolve diversas variáveis que interferem simultaneamente no método. A avaliação da influência dessas diversas variáveis (fatores) que determinam a resposta de um processo químico é uma das tarefas de indústrias e laboratórios de pesquisa, com o objetivo de reconhecer valores (níveis) para esses fatores de forma que a resposta seja maximizada ou minimizada, dependendo da proposta do procedimento (ZERAUK, 2010).

Os sistemas de planejamento fatorial, com análise multivariada, permitem avaliar simultaneamente o efeito de um grande número de variáveis, com menor número de ensaios experimentais, comparativamente aos métodos de otimização

univariada, pois investiga a influência de todas as variáveis de interesse e os efeitos que as interações têm sobre a resposta ou respostas (TEOFILO; FERREIRA, 2006).

Quando a combinação de k fatores é analisada em dois níveis, por exemplo, o planejamento fatorial consiste de 2^k ensaios. Os níveis são designados por (-), para o nível mais baixo, e (+), para o nível mais alto. Um nível zero pode ser inserido no centro dos ensaios, e neste ponto todas as variáveis estão em seu valor médio. Os pontos centrais (nível zero, sendo a média dos níveis superior e inferior) dos planejamentos permitem identificar relações não lineares no intervalo, e a estimativa do erro experimental, sem a necessidade de replicatas em todos os pontos do planejamento.

Utiliza-se os planejamentos fatoriais fracionários, quando o $k > 4$, pois os efeitos podem ser não significativos, desse modo a realização de todos os ensaios para estimar tais efeitos de interação pode ser irrelevante. Assim, é necessário um número menor de experimentos, mas sem perder informações importantes sobre os efeitos no sistema (TEOFILO; FERREIRA, 2006).

1. 4 Técnicas Cromatográficas de Análise

1. 4. 1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A análise de alcaloides β -carbolínicos nas diversas matrizes complexas (alimentos de origem animal e vegetal) exige, como primeira etapa, sua extração, seguido pela identificação, anteriormente às análises quantitativas. No entanto, como estas substâncias estão presentes em pequenas concentrações, as técnicas analíticas que têm apresentado melhores resultados são a cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). A utilização de cromatografia gasosa apresenta a desvantagem de requerer a derivatização química da amostra, na geração de β -carbolinas voláteis. O detector ultravioleta e sistemas eletroquímicos de detecção podem ser utilizados para a técnica de CLAE, mas os detectores por fluorescência (Flu) e espectrômetro de massas (EM) são preferidos, devido à seletividade e sensibilidade de detecção (HERRAIZ, 2000).

A utilização de detectores de fluorescência, para quantificação de alcaloides harmônicos, está fundamentada na sua emissão fluorescente. Uma vez que estes alcaloides contêm um grupo β -carbolínico, alguns estudos relatam a intensa fluorescência na região do azul (entre 400 e 500 nm) (AMJADI *et al.*, 2014).

Estudos na área de análise de produtos naturais, que aplicam a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas, são cada vez mais comuns, uma vez que a capacidade de detecção e separação dos analitos têm sido aumentadas e melhoradas nos equipamentos de CLAE-EM. Para a análise de compostos fitoquímicos a técnica de CLAE de fase reversa, utilizando colunas C18 ou ODS (Octadecil silano), é a mais aplicada. De acordo com o propósito da separação, as características químicas do material de empacotamento e os aspectos físicos da coluna devem ser levados em consideração para a definição da melhor alternativa (WU *et al.*, 2013).

O sistema analítico de CLAE-EM é composto pelo sistema de injeção de amostras (*autosampler*), o sistema de CLAE de bombas e coluna cromatográfica, detector UV e o espectrômetro de massas (Figura 6), estando todos os elementos conectados a um sistema computacional, que permite a coleta e análise dos resultados obtidos.

Figura 6 - Ilustração de um sistema on-line CLAE-EM, com a sequência de elementos.

(Fonte: Adaptado de CASS; BARREIRO, 2011).

A cromatografia líquida instrumental tem seu início nos anos 50, e os desenvolvimentos significativos que ocorreram desde então são resultado do intenso uso da CLAE, que tornou-se a técnica analítica mais desenvolvida e amplamente utilizada em laboratórios químicos, farmacêuticos e médicos. Uma história que começou com colunas recheadas com partículas irregulares de 100-200 μm e hoje em dia utiliza partículas de fase estacionária com diâmetros inferiores a 2 μm . A busca por análises mais rápidas e com melhor rendimento cromatográfico impulsionaram as pesquisas. Inicialmente, a alternativa mais simples, visando a diminuição do tempo de análise, seria a aplicação de colunas de menor

comprimento e vazões elevadas de fase móvel (FM). Entretanto, apesar desta estratégia ter sido utilizada com colunas contendo partículas de 3-3,5 μm , as separações não apresentavam melhor desempenho cromatográfico, além de perderem resolução (MALDANER *et al.*, 2009).

A eficiência do sistema de separação da CLAE pode ser observada pela equação [2] a seguir, conhecida como equação de van Deemter:

$$H = Ad_p + \frac{BD_M}{\mu} + \frac{Cd_p^2\mu}{D_M} \quad [2]$$

H = altura de prato

μ = velocidade linear da fase móvel

d_p = tamanho da partícula de empacotamento

D_M = coeficiente de difusão do analito

A = constante dos diferentes caminhos seguidos pelas moléculas do analito.

B = constante da difusão longitudinal ou difusão do soluto na FM.

C = constante da transferência de massa do analito entre FM e fase estacionária (FE).

A base da evolução da CLAE está no constante desenvolvimento de colunas com partículas cada vez menores, como explicado pela análise da equação de van Deemter. O termo A está relacionado ao alargamento dos picos cromatográficos devido aos diferentes percursos que as moléculas do analito podem seguir dentro da coluna. Assim, a influência deste termo pode ser reduzida utilizando colunas com diâmetros menores, partículas menores e mais uniformes. O termo B corresponde à difusão longitudinal ou difusão do analito na FM, a partir da aplicação de velocidades lineares mais altas da FM, a contribuição deste termo pode ser minimizada. E o termo C é atribuído à transferência de massa do analito entre a FM e a FE (MALDANER *et al.*, 2009).

Uma coluna mais eficiente terá uma altura de prato menor e, conseqüentemente, maior número de pratos por comprimento. O valor mais baixo de H na curva de van Deemter, representada na figura 7, corresponde à vazão ótima da FM que resultará na máxima eficiência da coluna. Partículas menores, principalmente <2 μm , apresentam valor de H menor a uma vazão maior, e esse resultado está relacionado aos termos A, B e C. As partículas com tamanhos inferiores possibilitam troca mais rápida do soluto entre a FM e os poros das partículas, já que os poros possuem menor profundidade, e este comportamento é

descrito pelo termo C, além de permitirem um empacotamento mais compacto, que tem reflexo no termo A (MALDANER *et al.*, 2009).

Figura 7 - Curva da equação de van Deemter, para partículas de 10, 5, 3 e $\leq 2\mu\text{m}$.

Fonte: MALDANER *et al.*, 2009.

Da aplicação de colunas empacotadas com partículas cada vez menores, surge a necessidade de otimizar outros parâmetros experimentais do sistema da CLAE. Partículas menores levam a um aumento da pressão dentro do sistema, como pode-se constatar pela equação [3]:

$$P = \phi \frac{L\eta\mu}{100d_p^2} \quad [3]$$

P = pressão;

ϕ = resistência à vazão;

L = comprimento da coluna (mm);

η = viscosidade da FM (mPa/s);

μ = velocidade linear (mm/s);

d_p = tamanho da partícula.

Assim, uma redução de metade no tamanho da partícula leva ao aumento da pressão por um fator de 4. Contudo, a redução no tamanho da coluna gera um aumento da pressão menor que 4 vezes, mas ainda assim superior ao que os sistemas convencionais da CLAE podem suportar (MALDANER *et al.*, 2009).

As colunas cromatográficas “eXtented Performance *XP*”, da Waters, são empacotadas com partículas de fase estacionária com 2,5 µm de diâmetro. Foram desenvolvidas para atuar na transição do sistema CLAE para o sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE - UHPLC, *Ultrahigh performance liquid chromatography*, em inglês), e são compatíveis com ambos os sistemas de cromatografia líquida, com o objetivo de aumentar a produtividade do sistema submetido a contra-pressões intermediárias. A possibilidade de aplicação de colunas com partículas menores aumenta a qualidade das separações cromatográficas, aumenta a velocidade de análise, o que diminui o tempo e os custos relativos, pois utiliza quantidades menores de FM. A coluna BEH Shield RP18 *XP* 2.5 µm, é da linha XBridge, desenvolvida para suportar grandes diferenças de pH, aumentando o tempo de uso (WATERS, 2012, 2014).

1. 4. 2 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

Para análises quantitativas, a CLAE utiliza detectores como índice de refração, ultravioleta, espalhamento de luz e fluorescência, entre outros, por meio de softwares dedicados, que permitem a quantificação de substâncias em concentrações muito baixas. Apesar do uso do tempo de retenção na tentativa de identificar compostos, uma vez que estes possuem tempos de retenção característicos, esta é uma prática que pode levar a resultados errôneos. Diferentes compostos podem apresentar o mesmo tempo de retenção numa mesma condição cromatográfica. Mesmo depois da aplicação de sistemas de detecção fotométrica, com detectores UV-VIS de comprimento de onda variável e com arranjos de diodos (PDA, *Photodiode Array*), a identificação dos compostos presentes nos picos cromatográficos não é tarefa fácil. O desenvolvimento de sistemas que permitiram o acoplamento da CLAE e o espectrômetro de massas trouxe uma nova forma de identificação de compostos (LANÇAS, 2009). A figura 8 apresenta um fluxograma das etapas do sistema de detecção usando espectrômetro de massas. Quando o objetivo é a identificação dos compostos, um espectrômetro de massas acoplado ao cromatógrafo líquido de alta eficiência é considerado o melhor sistema hifenado, uma vez que geram análises altamente seletivas e específicas (HERRAIZ, 2000).

Figura 8 - Fluxograma do funcionamento do sistema de detecção de espectrometria de massas.

Fonte: Adaptado de LANÇAS, 2009.

No fim dos anos 90, dentro de laboratórios acadêmicos, utilizando sistemas de fabricação própria para cromatografia líquida de ultra alta eficiência (CLUAE), como era denominado anteriormente, surgiram os primeiros estudos com resultados relevantes. Então, o potencial de separação em um sistema de CLUAE despertou o interesse em pesquisas para o desenvolvimento de instrumentação adequada, com pressões elevadas, partículas com diâmetro inferior a 2 μm e colunas semelhantes às de CLAE. O sistema CLUE, desenvolvido comercialmente, possui capacidade de trabalhar sob altas pressões (100 Mpa), os volumes internos têm de ser muito menores (conexões, alça de amostragem, cela de detector, bombas) com celas de detector que não tenham dispersão e alta taxa de aquisição, e melhoramento no sistema de controle e de dados, enquanto que as colunas têm de ser resistentes às altas pressões e com menor volume morto, bem como injetores capazes de trabalhar com faixa de volumes muito pequenos (de 0,1 a 50 μL) (MALDANER *et al.*, 2009).

A cromatografia líquida de ultra eficiência é uma técnica versátil e pode ser usada para aumentar o rendimento de análises, principalmente correspondentes a amostras complexas, como extratos vegetais e seus metabólitos, utilizando colunas empacotadas com partículas de tamanho inferior a 2 μm , operando sob altas pressões, separações eficientes e superiores podem ser obtidas em menores tempos (WU *et al.*, 2013).

Estudos revelam que a aplicação da CLUE gera análises mais rápidas, com menor consumo de solventes e maior detectabilidade. Além disso, há a possibilidade de transferência de um método CLAE para CLUE, e seu menor volume de eluição é adequado à utilização do espectrômetro de massas como detector. Para essa transferência, alguns parâmetros devem ser observados, as fases estacionárias das colunas devem ser similares, enquanto o volume de injeção e a vazão da fase móvel deverão ser otimizados (MALDANER *et al.*, 2009).

O desenvolvimento de métodos de ionização sob pressão atmosférica permitiram a conexão da cromatografia líquida de alta eficiência ao espectrômetro de massas, e são capazes de transferir a amostra que sai da coluna cromatográfica para a fase gasosa e a ionização desta. Os modos de ionização química sob pressão atmosférica (APCI, *atmospheric pressure chemical ionization*, em inglês) e ionização por eletronebulização (ESI, *electrospray ionization*, em inglês) são as técnicas mais aplicadas no acoplamento entre CLAE e EM. Na técnica de APCI, o eluente da coluna cromatográfica, solventes e analitos, são submetidos à vaporização e em seguida sofrem o processo de ionização. Este ocorre pela aplicação de uma descarga elétrica sob o fluido que está em contato com um condutor energizado eletricamente. É considerada uma técnica adequada para análise de compostos neutros, além disso, requer menos “clean-up” da amostra e comporta facilmente o fluxo típico (1 mL min^{-1}) das colunas cromatográficas. A sensibilidade do método é dependente da volatilidade dos compostos eluídos (YOU DIM *et al.*, 2010).

A técnica de ionização mais comumente utilizada, no acoplamento entre CLAE e EM, é a ESI. O processo ocorre, inicialmente, pela dissolução da amostra em um solvente, geralmente não polar, que é pressurizado em um tubo capilar de aço inox. Uma voltagem entre 3000 e 5000 V é aplicada sob esse tubo capilar, fazendo o líquido emergir do capilar à pressão atmosférica, como um aerossol. Estas gotículas, formadas pela aspersão do líquido, são dessolvatadas continuamente dentro do ambiente sob vácuo. À medida que as gotículas perdem solvente, aumentam as forças repulsivas resultantes da carga imposta, ocorrendo “explosões” coulômbicas, gerando íons dos analitos. Estes íons migram para o analisador de massas, induzidos pela atração eletrostática. Estes fenômenos estão representados na figura 9, ilustrando o caminho do analito. A eletronebulização pode ser operada no modo positivo ou negativo, controlando-se apenas o sinal da tensão

aplicada, então as gotículas terão carga positiva no primeiro modo e negativa no segundo (LANÇAS, 2009).

Figura 9 - Processo de formação das gotículas de analito e solvente, e como são conduzidas pelo campo elétrico aplicado.

Fonte: LANÇAS, 2009.

A figura 10 ilustra a interface no acoplamento do sistema de CLAE e o espectrômetro de massas, quando a ionização da amostra é feita por ESI.

Figura 10 - Interface do processo de eletronebulização dos analitos, entre a saída do sistema cromatográfico e a injeção no espectrômetro de massas.

Fonte: Adaptado de ZERAUK, 2010.

A ionização por eletronebulização é utilizada para compostos polares e termicamente sensíveis, os quais são ionizados em solução antes de serem introduzidos na fonte de íons. É amplamente utilizada nas pesquisas envolvendo fármacos, devido às propriedades físico-químicas destas substâncias, às quais a técnica é adequada. A solução contendo os íons é emitida para a fase gasosa, sem aplicação de calor. A possibilidade de utilizar essa técnica em análises de macromoléculas biológicas é uma vantagem para a ionização por eletronebulização, uma vez que os compostos não são fragmentados (YOUDIM *et al.*, 2010).

A ionização por eletronebulização gera três tipos de íons: 1) os íons moleculares, a partir de reações redox, ($M^{+•}$) ou ($M^{-•}$); 2) moléculas protonadas/desprotonadas (íons *quase*-moleculares), provenientes de reações ácido/base, $[M+H]^+$ - moléculas protonadas ou $[M-H]^-$ - moléculas desprotonadas; e 3) moléculas cationizadas ou anionizadas, resultado da coordenação dos fragmentos com cátions (geralmente, família 1A) ou ânions (principalmente cloretos), $[M+Na]^+$, $[M+K]^+$, $[M+Cl]^-$ (CROTTI *et al.*, 2006).

Ainda, no processo de detecção dos analitos pelo espectrômetro de massas, uma de suas partes fundamentais é o analisador, responsável pela seleção e/ou separação dos íons, levando em consideração a relação massa/carga (m/z) de cada íon. Diante de tantos equipamentos disponíveis, deve-se observar os objetivos da análise, qual a faixa de massas desejada, a resolução que se espera dos espectros e o preço que se pode pagar. O analisador de massas do tipo quadrupolo é o mais popular, pela sua simplicidade, preço relativamente baixo, boa linearidade em análises quantitativas e de fácil utilização. Sua resolução pode variar de 1000 a 4000, dependendo das condições aplicadas, com exatidão na faixa de 0,1 e 0,2 Da e faixa de massas entre 10 e 4000 Da (LANÇAS, 2013).

O analisador de quadrupolo constitui-se de quatro barras, geralmente confeccionadas em metal e cilíndricas, dispostas em dois pares. Um dos pares é mantido em um potencial elétrico positivo e outro a um potencial negativo. Às barras é aplicada uma combinação de corrente contínua (DC) e radiofrequência (Rf). O par de barras com potencial positivo irá filtrar as maiores massas, enquanto que as de potencial negativo filtram as massas menores. A razão entre Rf e DC é mantida constante na operação do quadrupolo, resultando em uma resolução constante. Determinando-se uma amplitude para as voltagens de Rf e DC, apenas os íons com uma razão m/z definida (íons ressonantes), em ressonância com o campo aplicado, passarão pelas barras e atingirão o detector. Os que divergirem da relação m/z escolhida (íons não ressonantes) não passarão pelas barras, atingindo-as, sendo descartados pela bomba de vácuo. A figura 11 apresenta a disposição do quadrupolo e sua inserção no sistema do espectrômetro de massas, bem como ilustra o comportamento dos íons (LANÇAS, 2013).

Figura 11 - Representação de um espectômetro de massas, para mostrar o modelo de analisador do tipo quadrupolo.

Fonte: LANÇAS, 2013.

Outro tipo de analisador utilizado no espectrômetro de massas, acoplado à cromatografia líquida, é o orbitrap. Já por volta de 1923, Kingdon propôs o princípio do aprisionamento orbital. Depois de algumas décadas de estudos, demonstrou-se que partículas carregadas poderiam ficar aprisionadas sob campos eletrostáticos (LANÇAS, 2013).

A representação do equipamento é apresentada na figura 12, e o dispositivo efetua aprisionamento orbital em um campo eletrostático com distribuição potencial. O analisador de massas orbitrap é construído a partir de um eletrodo externo, similar a uma barra (a) e um eletrodo central que é posicionado ao longo do eixo (b) (LANÇAS, 2013).

Figura 12 - Representação do analisador de massas orbitrap, com seu eletrodo externo (a) e o eletrodo central (b), onde, r e z correspondem às coordenadas cilíndricas.

Fonte: LANÇAS, 2013.

No orbitrap, os íons são submetidos a um laser pulsado de nitrogênio, na direção da ponta da sonda de aço inox, são introduzidos em um acelerador de lentes eletrostático, constituído de duas aberturas definidas e uma abertura entre elas. Estas lentes focalizam o feixe de íons em um restritor de condutividade de 1 mm de diâmetro interno e 10 mm de comprimento, separando o volume de aprisionamento interno do exterior. Uma miniatura de defletor está posicionado na saída do restritor, para otimizar o ângulo de entrada do feixe de íons. Os íons, então, são inseridos na armadilha por um estreito canal de injeção, tangencialmente ao eletrodo externo. Um eletrodo adicional, com voltagem ajustável, é utilizado como um transformador de campo, a fim de minimizar a distorção do campo tridimensional formado pela injeção de íons (MAKAROV, 2000). Este processo é esquematizado na figura 13, onde estão representados os componentes do analisador orbitrap.

Figura 13 - Esquema do analisador orbitrap.

Fonte: Adaptado de MAKAROV, 2000.

No analisador orbitrap, a relação m/z é obtida da frequência das oscilações harmônicas dos íons, ao longo do eixo do campo. As vantagens do orbitrap são sua alta resolução de massas (acima de 100000-200000) e eficiência na determinação da massa, faixa dinâmica e superior limite de massas (MAKAROV, 2000).

Estudos relacionados à identificação e quantificação de alcaloides β -carbolínicos em amostras complexas (com muitos compostos numa mesma matriz) mostram resultados satisfatórios na aplicação da técnica de CLUE-EM (MCLLHENNY et al., 2010; BUSQUETS et al., 2006). Ainda, utilizando a mesma técnica, as aminas heterocíclicas aromáticas, cuja estrutura molecular é similar à dos alcaloides β -carbolínicos, foram analisadas, identificadas e quantificadas com sucesso (ZHANG et al., 2012). Segundo Lumbreras e colaboradores, a CLUE-EM é um método adequado para a análise de aminas heterocíclicas aromáticas, incluindo o alcaloide harmana, melhorando o tempo de análise, a resolução dos picos e o limite de detecção. Além disso, a baixa taxa de fluxo leva ao uso de menor quantidade de solventes orgânicos, produzindo volumes baixos de resíduos, fazendo-a uma técnica ecologicamente correta, de custo reduzido e mais adequada ao acoplamento com detecção por espectrômetro de massas (LUMBRERAS et al., 2010).

2 OBJETIVOS

Identificação dos alcaloides presentes no extrato da polpa e das sementes dos frutos de duas espécies de “maracujá”, *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, comumente consumidos pela população brasileira, aplicando a técnica de extração por sorção utilizando barras de extração recobertas por polidimetilsiloxano (PDMS) e o desenvolvimento da metodologia para extração com as barras de polietilenoglicol (EG Silicone Twister®), SBSE.

Analisar os extratos de alcaloides presentes na polpa e sementes dos frutos de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*, por meio da técnica cromatográfica de CLUE-EM e por CLAE-Flu (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector de Fluorescência), utilizando metodologia desenvolvida por Pereira; Santos; Yariwake, (2013), SBSE/CLAE-Flu dual, quantificar os alcaloides harmana e harmina nas polpas de *P. alata*.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3. 1. Material Vegetal

Os frutos dos maracujás azedo (*Passiflora edulis* Sims f. *Flavicarpa* Degener) e doce (*Passiflora alata* Curtis), dos quais foram utilizadas as sementes e a polpa neste trabalho, foram comprados no comércio local de São Carlos e São Paulo, no estado de São Paulo, Brasil.

Após aquisição do material vegetal, os frutos foram separados, lavados e cortados. Para separação da polpa das sementes utilizou-se peneira comum, com abertura de 1,4 mm. Posterior à separação, as sementes foram espalhadas sobre fôrma de alumínio, devidamente coberta com folha de papel alumínio, e levada à estufa, sob temperatura de 40 – 45 °C por 72 horas, aproximadamente. E a polpa, sem sementes, fora acondicionada em recipiente com tampa e levada ao refrigerador.

As sementes secas foram processadas em liquidificador doméstico e posteriormente fracionadas utilizando jogo de peneiras para determinação de granulometria. As peneiras possuíam as seguintes características: 16 – 32 mesh, ou ABNT 18 = 1,0 mm de abertura; 32 – 65 mesh, ou ABNT 35 = 0,25 a 0,59 mm de abertura. As frações foram acondicionadas em diferentes recipientes plásticos com tampa e estocadas ao abrigo de luz, umidade e calor.

A fração de sementes processadas, utilizadas para preparação das amostras analisadas neste trabalho, possui granulometria de 1,0 – 0,5 mm, 16 mesh.

3. 2 Extração dos analitos do material vegetal

3. 2. 1 Materiais utilizados:

SOLVENTES E REAGENTES: Foram utilizados acetonitrila e metanol grau CLAE (Tedia, Fairfield, OH, EUA), ácido fórmico grau p.a. (Merck, Darmstadt, Alemanha), cloreto de sódio grau analítico (Spectrum, Gardena, CA, EUA), água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, EUA) e padrões analíticos dos alcaloides harmônicos: harmana, harmina, harmalina, harmol e harmalol, com 98% de pureza Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany).

BARRAS DE AGITAÇÃO PARA SBSE: as barras de agitação utilizadas neste trabalho, barras comerciais (Twister™), para extração sortiva da Gerstel (Mulheim an der Ruhr, Germany). As de PDMS têm 20 mm de comprimento com 0.5 mm de filme de PDMS, volume de 55 µL – LOTE 0101071110 – e as de EG-Silicone têm 10 mm de comprimento com 32 µL de volume de fase de PDMS e Etileno Glicol – LOTE 01690400100.

3. 2. 2 Procedimento de extração:

3. 2. 2. 1 SBSE – PDMS

Utilizando o método desenvolvido e otimizado por Pereira e colaboradores para as barras magnéticas de PDMS, o procedimento de extração dos alcaloides harmônicos, a partir da polpa de *P. alata* e *P. edulis* seguiu os seguintes passos: para extração de harmana - 1 mL de polpa de maracujá, 2 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ (pH 13), 5 g de NaCl e 7 mL de água Milli-Q foram colocados em um frasco de 10 mL juntamente com a barra de extração. O alcaloide harmina foi extraído pela adição de 1 mL de polpa de maracujá, 0,250 mL de NH₄OH 6 mol L⁻¹ (pH 10), 5 g de NaCl e 8,750 mL de água Milli-Q e adicionados em um recipiente de 10 mL contendo a barra de extração (Tabela 1) (PEREIRA *et al.*, 2012).

Para extração dos alcaloides a partir das sementes foi usado o seguinte procedimento: extração de harmana - 1 g de sementes trituradas de maracujá, 1 mL de NaOH 1 mol L⁻¹ (pH 13), 5 g de NaCl e 9 mL de água Milli-Q foram colocados em um frasco de 10 mL juntamente com a barra de extração. O alcaloide harmina foi

extraído pela adição de 1 g de sementes de maracujá, 0,100 mL de NH_4OH 6 mol L^{-1} (pH 10), 5 g de NaCl e 9,9 mL de água Milli-Q e adicionados em um recipiente de 10 mL contendo a barra de extração (Tabela 2) (RODRIGUES, 2013).

As amostras foram colocadas simultaneamente (em paralelo) sob agitação durante 120 minutos, a 1000 rpm à temperatura ambiente. Após a agitação as barras de SBSE, foram retiradas da solução e colocadas em um mesmo “vial” com 150 μL e sob sonicação por 60 minutos (PEREIRA *et al.*, 2012).

Tabela 1 - Procedimento de extração dos alcaloides harmânicos Harmana e Harmina a partir da polpa de *P. edulis* e *P. alata*.

Extração dos alcaloides a partir da Polpa	Harmana	Harmina
Material vegetal	1mL de polpa	1 mL de polpa
pH	13 (2 mL NaOH 1M)	10 (0,250 mL NH_4OH 6M)
NaCl	5 g	5 g
Volume de H_2O Milli-Q	7 mL	8,750 mL
Tempo de extração	120 min	
Dessorção	150 μL de MeOH – 60 min	
Análise	Injeção de 10 μL – CLAE-Flu/CLUE-EM	

Tabela 2 - Procedimento de extração dos alcaloides harmânicos Harmana e Harmina a partir das sementes secas de *P. edulis* e *P. alata*.

Extração dos alcaloides a partir das Sementes Secas	Harmana	Harmina
Material vegetal	1 g de sementes	1 g de sementes
pH	13 (1 mL NaOH 1M)	10 (0,1 mL NH_4OH 6M)
NaCl	5 g	5 g
Volume de H_2O Milli-Q	9 mL	9,9 mL
Tempo de extração	120 min	
Dessorção	150 μL de MeOH – 60 min	
Análise	Injeção de 10 μL – CLAE-Flu/CLUE-EM	

Então, o “vial” com o metanol contendo os compostos dessorvidos das barras de extração é utilizado diretamente para análise no equipamento de CLAE-Flu ou CLUE-EM (PEREIRA *et al.*, 2012).

Após cada etapa de extração e dessorção líquida, as barras magnéticas de PDMS foram submetidas a um procedimento de limpeza, para garantir a remoção de analitos restantes e evitar interferência destes nas extrações posteriores. A limpeza das barras foi feita utilizando uma mistura de metanol e acetonitrila (50:50 v/v), as

barras eram colocadas individualmente sob agitação por 3 h, em 30,0 mL desta solução em um béquer.

3. 2. 2. 2 Desenvolvimento SBSE – EG Silicone

A metodologia de extração aplicada para as barras magnéticas de EG-Silicone foi definida utilizando-se um planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} . Com o objetivo de selecionar os fatores e suas interações que interferem significativamente na resposta final (PEREIRA *et al.*, 2014).

O planejamento experimental possui cinco variáveis independentes (fatores), que são: tempo de extração, quantidade de NaCl, pH da solução, tempo de dessorção e porcentagem de metanol (MeOH) para dessorção. A variável dependente (resposta) foi a área relativa do pico dos padrões dos alcalóides harmana e harmina. As respostas foram obtidas analisando cromatogramas por meio do programa Empower (Waters Associates, Milford, MA, EUA) (PEREIRA *et al.*, 2014).

No planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} , de dois níveis, cinco fatores e um ponto central. Cada fator possui um nível inferior e superior, representados pelos sinais (-) e (+), respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 - Níveis e fatores avaliados no planejamento fatorial 2^{5-1} .

Fatores	Níveis	
	Inferior (-)	Superior (+)
Tempo de Extração (min)	10	120
NaCl (g)	0	3,5
pH	2	12
Tempo de Dessorção (min)	5	60
MeOH (%)	0	100

O planejamento fatorial fracionário foi elaborado utilizando o software MiniTab® (Minitab Inc, USA), versão 13, resultando em 19 experimentos (16 ensaios e 1 ponto central em triplicata) (Tabela 4). O mesmo software foi usado para o cálculo dos efeitos e suas interações, bem com a construção do gráfico de Pareto. Para execução dos experimentos do planejamento fatorial fracionário, uma alíquota de 10 µL de cada um dos padrões de harmana e harmina (solução de 20 µg L⁻¹ em metanol 100%) foi diluída com volume adequado de água Milli-Q, para concentração final de 20 ng L⁻¹ em 10 mL de solução. Em seguida, para o teste do nível máximo

da quantidade de NaCl, adicionou-se 3,5 g do sal, e o pH foi ajustado entre 2, 7 e 12 (com 10 μL de solução de ácido clorídrico (6 mol L^{-1}) para pH 2 e solução de hidróxido de sódio (1 mol L^{-1}) 50 μL para pH 7 e 100 μL pH 12).

Tabela 4 - Matriz de experimentos (fatores e seus respectivos níveis) do planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} .

Ordem Experimental	pH	Tempo de Extração	NaCl (g)	Tempo de Dessorção	% MeOH
19	7	65	1,75	32,5	50
7	2	120	3,50	5,0	100
10	12	10	1,00	60,0	100
8	12	120	3,50	5,0	0
2	12	10	0,00	5,0	0
13	2	10	3,50	60,0	100
5	2	10	3,50	5,0	0
6	12	10	3,50	5,0	100
18	7	65	1,75	32,5	50
14	12	10	3,50	60,0	0
15	2	120	3,50	60,0	0
4	12	120	0,00	5,0	100
1	2	10	0,00	5,0	100
16	12	120	3,50	60,0	100
9	2	10	0,00	60,0	0
17	7	65	1,75	32,5	50
11	2	120	0,00	60,0	100
3	2	120	0,00	5,0	0
12	12	120	0,00	60,0	0

O processo de extração foi realizado como no item 3. 2. 2. 1., com a diferença dos tempos de extração e dessorção que foram seguidos pela definição do planejamento fatorial fracionário.

A partir dos resultados obtidos, mantendo-se os valores definidos significativos pelo planejamento experimental, pH 12, 3,5 g de NaCl e 100% de metanol para dessorção, foi determinada a curva cinética dos tempos de extração e dessorção das amostras.

Para a limpeza das barras magnéticas de EG-Silicone foram estudadas alternativas com metanol 100% e metanol e água (50:50 v/v), sob agitação e sonicação. Assim, o procedimento de limpeza que apresentou melhores resultados,

20,0 mL de metanol 100% sob sonicação por 30 min, foi utilizado para assegurar que não restassem analitos na matriz da barra magnética entre uma extração e outra.

3. 3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com Detector de Fluorescência

Foi feita a análise qualitativa (“perfil cromatográfico”) para avaliar o perfil cromatográfico da amostra, em cromatógrafo líquido (Waters Alliance 2695) conectado a um detector UV/DAD (Waters, PDA 2996) e a detector de fluorescência (Waters 2475). A coluna cromatográfica utilizada, X-Terra® C₁₈ (250 mm x 4,6 mm i. d., 5µm) e coluna de guarda X -Terra® C₁₈ (20 mm x 4,6 mm i. d., 5µm), ambas da Waters (Waters Associates, Milford, MA, EUA).

A tabela 5 apresenta as condições cromatográficas utilizadas para as análises das amostras vegetais e os padrões comerciais. A detecção, utilizando detector de fluorescência, operou na faixa de varredura $\lambda_{\text{emissão}} = 390 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$.

Tabela 5 - Condições cromatográficas de análise dos alcaloides harmânicos em CLAE-Flu.

Condições Cromatográficas		Especificações
Fase Estacionária	Pré-Coluna	X-Terra® C ₁₈ (20 mm x 4,6 mm i. d., 5µm)
	Coluna Cromatográfica	X-Terra® C ₁₈ (250 mm x 4,6 mm i. d., 5µm)
	Temperatura	25°C
Fase Móvel	Solventes	Água Milli-Q (solvente A) e Acetonitrila (solvente B), acidificadas com 0,5% de ácido fórmico
	Eluição	Modo gradiente: - 80 – 66% de A até 10 minutos; - 66 – 80% de A até 18 minutos.
	Fluxo	1 mL/min
	Volume de Injeção da Amostra	10 µL

3. 3. 1 Análise quantitativa dos alcaloides em *P. alata*

A quantificação dos alcaloides harmana e harmina na polpa do fruto de *P. alata* foi realizada por meio do método de adição de padrão. À cada amostra de extração (realizada em triplicata) foi adicionada uma alíquota da solução-estoque de cada um dos padrões dos alcaloides harmana e harmina (20 µg L⁻¹ em metanol 100%) a fim de obter as concentrações finais: 0,1; 1,25; 2,5; 3,75 e 5 µg L⁻¹, as

curvas analíticas de adição de padrão foram construídas em triplicata (RODRIGUES, 2013).

3. 4 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada a Espectrometria de Massas

A identificação foi realizada em espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) equipado com interface de ionização por eletrospray, nanoeletrospray (nanoESI) e ionização química à pressão atmosférica. O espectrômetro de massas está hifenado a um cromatógrafo líquido de ultra eficiência Accela High Speed LC (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA). Foi utilizada uma coluna cromatográfica X-BridgeTM BEH Shield RP₁₈ (150 mm x 2,1 mm x 2,5 µm) com pré coluna (12 mm x 2,1 mm x 2,5 µm), ambas da Waters. Das condições cromatográficas utilizadas para as análises em CLAE-Flu (item 4.3), os solventes e o gradiente da fase móvel foram mantidos, contudo o fluxo de solvente utilizado foi 0,3 mL min⁻¹ e o volume de injeção de 10 µL.

As condições do espectrômetro de massas foram definidas a partir de estudos de ZHAO, T. e colaboradores, para análises de alcaloides harmônicos: voltagem do eletrospray + 3,7 kV, o fluxo de gás (N₂) de nebulização 35 (unidades arbitrárias), fluxo de gás auxiliar (N₂) 10 (unidades arbitrárias) e temperatura do capilar aquecido a 300 °C (ZHAO, *et al.* 2012). A aquisição de dados no modo positivo, foi feita em *full-scan*, dentro do intervalo de *m/z* 50-250, bem como a seleção de íons (SIM, *selective ions monitoring*) e o modo de EM/EM. Todas as operações foram controladas pelo software XcaliburTM (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. 1 Análise quantitativa dos alcaloides em polpa de *P. alata*

Trabalhos anteriores mostram a presença dos alcaloides harmana e harmina nos extratos da polpa e das sementes dos frutos de *P. edulis*. Assim, foi proposto o estudo analítico do extrato da polpa dos frutos de *P. alata*, utilizando a metodologia de extração por SBSE com barra magnética recoberta com PDMS, desenvolvida por Pereira e colaboradores. Os extratos foram analisados por CLAE-Flu, com método adequado para a detecção dos alcaloides, com $\lambda_{\text{excitação}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 425 \text{ nm}$ para harmana e $\lambda_{\text{excitação}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 410 \text{ nm}$ para harmina; a partir destas informações, para a detecção destes alcaloides na polpa de *P. alata* foram mantidas estas condições (PEREIRA *et al.*, 2013).

A figura 14 apresenta os cromatogramas obtidos pela análise SBSE/CLAE-Flu dual nas condições cromatográficas definidas pela metodologia desenvolvida para o estudo de alcaloides harmônicos.

Figura 14 - Cromatogramas do extrato da polpa de *P. alata* obtidos por SBSE/CLAE-Flu dual: (A) detecção no comprimento de onda específico para o alcaloide harmana e (B) detecção no comprimento de onda específico para harmina.

Foram analisadas soluções dos padrões comerciais dos alcaloides harmana e harmina, dentro das mesmas condições cromatográficas. A figura 15 mostra o cromatograma do extrato da polpa de *P. alata* sobreposto ao cromatograma da solução padrão de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ da harmana (Figura 15 A) e da harmina (Figura 15 B) e observa-se a similaridade dos tempos de retenção dos picos cromatográficos, atribuídos à harmana ($t_R = 4,757$ min) e à harmina ($t_R = 5,985$ min), no cromatograma do extrato da polpa, com os picos dos cromatogramas das soluções padrões de harmana ($t_R = 4,772$ min) e harmina ($t_R = 5,845$ min).

Figura 15 - Comparação dos cromatogramas do extrato da polpa de *P. alata* com (A) padrão de harmana $20 \mu\text{g L}^{-1}$ e (B) padrão de harmina $20 \mu\text{g L}^{-1}$, obtidos por CLAE-Flu ($\lambda_{\text{excitação}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 425 \text{ nm}$ para harmana e $\lambda_{\text{excitação}} = 254 \text{ nm}$ e $\lambda_{\text{emissão}} = 410 \text{ nm}$ para harmina).

Comparando os espectros de fluorescência (Figura 16) dos picos cromatográficos do extrato da polpa, nos tempos de retenção semelhantes aos dos picos dos padrões harmana e harmina, observa-se a semelhança com os espectros dos picos cromatográficos das soluções dos padrões harmana ($t_R = 4,772 \text{ min}$) e harmina ($t_R = 5,845 \text{ min}$), confirmando a atribuição dos picos no cromatograma da amostra aos alcaloides harmânicos estudados.

Figura 16 - Comparação dos espectros de fluorescência dos picos cromatográficos dos alcaloides (a) harmina ($\lambda_{\text{emissão}} = 410 \text{ nm}$) e (b) harmana ($\lambda_{\text{emissão}} = 425 \text{ nm}$) presentes no extrato da polpa de *P. alata*, identificados por SBSE/CLAE-Flu dual, e os espectros de fluorescência dos picos cromatográficos obtidos pela análise CLAE-Flu das soluções de padrões comerciais de (c) harmina e (d) harmana.

Utilizando a metodologia de extração por SBSE com barra magnética recoberta com PDMS, desenvolvida por Pereira e colaboradores, foi realizada a análise quantitativa dos alcaloides harmana e harmina no extrato da polpa de *P. alata*. Sendo a polpa dos frutos do maracujá doce uma amostra complexa (com muitos compostos presentes), com o objetivo de diminuir o efeito de matriz sobre a análise, a concentração dos alcaloides harmana e harmina nos extratos foi obtida pelo método da adição de padrão (PEREIRA, *et al.* 2013).

Por meio da curva analítica definida pela relação de concentração dos alcaloides *versus* a área do pico cromatográfico, obteve-se as retas apresentadas na figura 17.

Figura 17 - Curvas analíticas obtidas pelo método SBSE/CLAE-Flu por adição de padrão para quantificação de (A) harmana e (B) harmina nos extratos da polpa de *P. alata*.

A partir da equação das retas (Tabela 6), por extrapolação define-se no eixo das abcissas a concentração do alcaloide na amostra sem a adição da solução dos padrões. Então, pode-se calcular a concentração de alcaloides presentes no extrato da polpa dos frutos de *P. alata* obtidos pelo método SBSE/CLAE-Flu dual.

A concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$) dos alcaloides resultante da curva de adição de padrão, é referente à quantidade de harmana e harmina contidos nos 150,0 μL de metanol (volume de solvente para dessorção líquida). Para determinar a quantidade

dos alcaloides em 1 mL de polpa do fruto de *P. alata* foram realizados os seguintes cálculos:

Intercepto da curva de adição de padrão (μg) – 1000 mL

X (μg) – 150 μL

Considerando a concentração de alcaloides definida pelo intercepto das curvas de adição de padrão para a harmana = $0,97032 \mu\text{g L}^{-1}$ e para a harmina = $0,03609 \mu\text{g L}^{-1}$, a tabela 6 apresenta os valores de massa dos alcaloides por 1 mL de polpa.

Tabela 6 - Determinação quantitativa por CLAE-Flu dos alcaloides em polpa de *P. alata*.

Alcaloides	Equação da Reta	Coeficiente de Correlação (r^2)	Massa de alcaloide/ volume de polpa ($\mu\text{g mL}^{-1}$) $\pm$ d.p.*
Harmana	$y = 2,24687 \cdot 10^6 x + 2,18019 \cdot 10^6$	0,99884	$145,54500 \pm 0,00085$
Harmina	$y = 1,35385 \cdot 10^6 x + 4,88652 \cdot 10^4$	0,99855	$5,41350 \pm 0,00006$

*d.p. = desvio padrão.

De acordo com Pereira e colaboradores, na polpa de *P. edulis* foram encontrados $(3,00 \pm 0,04) \mu\text{g L}^{-1}$ do alcaloide harmana e $(2,72 \pm 0,02) \mu\text{g L}^{-1}$ do alcaloide harmina (Pereira *et al.*, 2014). A partir desses resultados, pode-se constatar que os frutos de *P. alata* possuem menor quantidade dos alcaloides harmana e harmina em sua polpa, comparada às concentrações determinadas em extratos da polpa de *P. edulis*.

4. 2 Análise por Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas

A fim de identificar os alcaloides harmânicos, presentes na polpa e sementes dos maracujás doce e azedo, bem como confirmar a presença destes compostos, foram realizadas análises por CLUE-EM e CLUE-EM/EM. As aminas heterocíclicas apresentam grupos básicos, assim o modo de ionização positiva é o mais utilizado pela facilidade de protonação dessas estruturas, com a formação de íons moleculares protonados $[M+H]^+$ (CROTTI *et al.*, 2006).

Inicialmente foram feitas análises de soluções dos padrões comerciais destes alcaloides, harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina. Utilizando CLUE-EM, no modo de ionização positivo, foram gerados os cromatogramas do íon total (TIC – *total ion chromatogram*). Os alcaloides harmânicos apresentam um espectro de massas simples, com o pico principal do $[M+H]^+$, e por serem compostos estáveis frente a ionização por eletrospray, não apresentam fragmentos significativos (GALCERAN *et al.*, 1996). Por meio da análise CLUE-EM/EM, foram gerados os espectros de massas dos padrões, com os íons moleculares e seus fragmentos (tabela 7), aos quais foram atribuídas as estruturas moleculares relativas de acordo com a literatura da fragmentação dos mesmos padrões de alcaloides harmânicos. (LI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012).

Tabela 7 - Alcaloides harmânicos estudados, seus respectivos tempo de retenção, íon molecular e íons filhos (ZHAO *et al.*, 2012¹; LI *et al.*, 2014²).

Alcaloides	Tempo de retenção (min)	$[M+H]^+$ m/z	Íons filhos m/z
Harmana	2,05	183 ^{1,2}	-
Harmina	2,65	213 ¹	198
Harmol	1,81	199 ^{1,2}	171
Harmalol	1,60	201 ¹	184 / 160
Harmalina	2,44	213 ¹	200 / 174

A seguir são apresentados nas figuras de 18 a 31 os cromatogramas dos íons totais, os espectros de massas (EM e EM/EM) dos padrões de alcaloides harmânicos e os caminhos de fragmentação dos íons moleculares dos alcaloides, com base na literatura (LI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 18 - (A) Cromatograma do íon total e (B) Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+$ = 183 do padrão harmana, t_R = 2,05 min (solução 100 mg L⁻¹).

A espectrometria de massas em sequência foi escolhida para analisar os íons “filhos” dos íons principais. Contudo, a energia de colisão utilizada na análise EM/EM não foi suficiente para o alcaloide harmana fragmentar-se, no seu espectro de EM/EM (figura 19) observa-se somente o íon principal, m/z 183. O pico de m/z 66 é atribuído ao solvente utilizado.

Figura 19 - Espectro CLUE-EM/EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 183$, $t_R = 2,05$ min, do alcaloide harmana.

A solução de padrão do alcaloide harmina possui tempo de retenção de 2,65 min, dentro das condições cromatográficas utilizadas, e seu espectro de massas apresenta um íon molecular de m/z 213, como é mostrado na figura 20. Este comportamento foi levado em consideração quando na análise dos extratos da polpa e das sementes dos maracujás estudados.

Figura 20 - (A) Cromatograma do íon total e (B) Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 213$ do padrão harmina, $t_R = 2,65$ min (solução 100 mg L^{-1}).

A literatura sobre espectrometria de massas traz a “regra do nitrogênio”, onde afirma que uma molécula de peso molecular par ou não contém nitrogênio ou contém um número par de átomos de nitrogênio, e moléculas com peso molecular ímpar contém número ímpar de átomos de nitrogênio; uma consequência dessa regra explica a fragmentação dos íons moleculares, onde a quebra de uma ligação simples gera um fragmento iônico par a partir de um íon molecular ímpar, desde que o fragmento mantenha todos os átomos de nitrogênio do íon molecular (SILVERSTEIN *et al.*, 2010).

O espectro de massas do alcaloide harmina apresenta os picos $[M+H]^+$ m/z 213 e o íon “filho” m/z 198 (Figura 21). Zhao e colaboradores atribuíram o pico m/z 198 à desmetilação do íon molecular da harmina – no carbono 7 -, com eliminação de 15 Da, correspondendo ao $[M+H-15]^+ = 198$ observado na figura 22, o que pela “regra do nitrogênio” se justifica, pois o $[M+H]^+$ m/z 213 (ímpar) gera um fragmento iônico de m/z 198 (par). Ainda, a fórmula molecular do íon “filho”, atribuído pelo software Xcallibur, é correspondente à estrutura elucidada, figura 22 (ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 21 - Espectro CLUE-EM/EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 213$, $t_R = 2,65$ min, alcaloide harmina.

Figura 22 - Caminho de fragmentação do íon molecular do alcaloide harmina.

Fonte: Adaptado de ZHAO *et al.*, 2012.

A figura 23 apresenta o cromatograma da solução do padrão de harmol, cujo tempo de retenção é 1,81 min, e seu respectivo espectro de massas, com íon molecular com m/z 199.

Figura 23 - (A) Cromatograma do íon total e (B) Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 199$ do padrão harmol, $t_R = 1,81$ min (solução 100 mg L^{-1}).

A figura 24 mostra o espectro de massa/massa do harmol, no $t_R = 1,81$ min. Li e colaboradores e Zhao e colaboradores, propuseram que o íon molecular do alcaloide harmol fragmenta-se, eliminando uma molécula de CO, com massa igual a 28 Da, resultando no pico m/z 171 $[M+H-28]^+$ (Figura 25). Observa-se o rearranjo do anel aromático, pela saída do carbono 7 e o oxigênio, e a geração de um fragmento iônico de m/z 171 (ímpar) a partir do $[M+H]^+$ m/z 201 (ímpar), resultado de duas quebras levando ao rearranjo e a incorporação do hidrogênio da hidroxila (Li *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 24 - Espectro CLUE-EM/EM, ionização eletrospray, modo positivo: fragmentação do $[M+H]^+$ do alcaloide harmol.

Figura 25 - Caminho de fragmentação do íon molecular do alcaloide harmol.

Fonte: Adaptado de LI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012.

O alcaloide harmalol foi analisado por CLUE-EM a fim de se conhecer seu comportamento cromatográfico e frente a espectrometria de massas (Figura 26), com tempo de retenção de 1,60 min e íon molecular de m/z 201, essas informações foram utilizadas para comparar com os cromatogramas e espectro dos extratos.

Figura 26 - (A) Cromatograma do íon total e (B) Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 201$ do padrão harmalol, $t_R = 1,60$ min (solução 100 mg L^{-1}).

A análise CLUE-EM/EM do alcaloide harmalol resultou no espectro da figura 27, com os picos do íon molecular m/z 201 e os seus fragmentos m/z 184 e m/z 160. Na geração do fragmento m/z 184, o íon molecular do harmalol m/z 201 perde um

fragmento de massa 17 Da. Zhao e colaboradores atribuíram a perda de OH para este pico ($C_{12}H_{12}N_2$) (ZHAO *et al.*, 2012) (Figura 28 a), que obedece a “regra do nitrogênio”, pois um íon molecular ímpar sofrendo uma quebra simples resulta em um íon “filho” par, mas apresenta um erro de -25 ppm entre a massa teórica e a massa experimental. A fórmula molecular atribuída ao pico m/z 184 ($C_{12}H_{10}ON$), pelo software utilizado, possui um átomo de O e um só átomo de N, com um erro de -8,9 ppm, com base nessa informação a estrutura da figura 28 (b) foi proposta, considerando então a eliminação de NH_3 , com massa de 17 Da, e rearranjo do anel aromático.

O íon “filho” m/z 160 possui fórmula molecular $C_{10}H_{10}ON$, com a diferença de C_2H_3N em comparação com o íon principal, assim, ocorre a perda de 41 Da e rearranjo. Zhao e colaboradores propuseram a estrutura do íon m/z 160 $[M+H-41]^+$, como apresentado na figura 28 (c) (ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 27 - Espectro CLUE-EM/EM, ionização eletrospray, modo positivo: fragmentação do $[M+H]^+$ do alcaloide harmalol.

Figura 28 - Caminhos de fragmentação do íon molecular do alcaloide harmalol.

Fonte: Adaptado de LI *et al.*, 2014; ZHAO *et al.*, 2012.

O alcaloide harmânico harmalina também foi submetido a análise cromatográfica acoplada a espectrometria de massas (Figura 29), a fim de se conhecer seu tempo de retenção e m/z do íon molecular, sendo $t_R = 2,44$ min e m/z 215.

Figura 29 - (A) Cromatograma do íon total e (B) Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: íon $[M+H]^+ = 215$ do padrão harmalina, $t_R = 2,44$ min (solução 100 mg L^{-1}).

O íon molecular m/z 215 do alcaloide harmalina, pela análise de EM/EM gera dois íons “filhos”, m/z 200 e m/z 174, como pode-se observar na figura 30. A literatura propõe os fragmentos apresentados na figura 31: para o pico m/z 200, com uma diferença de 15 Da do íon molecular, considera-se a desmetilação do oxigênio no carbono 7; e para o pico m/z 174, propõe-se a saída de C_2H_3N (41 Da) e rearranjo da estrutura, resultando no íon $[M+H-41]^+$ (ZHAO *et al.*, 2012).

Figura 30 - Espectro CLUE-EM/EM, ionização eletrospray, modo positivo: fragmentação do $[M+H]^+$ do alcaloide harmalina.

Figura 31 - Caminho de fragmentação do íon molecular do alcaloide harmalina.

Fonte: Adaptado de ZHAO *et al.*, 2012.

4. 2. 1 Análise dos extratos de *Passiflora alata* e *Passiflora edulis*

O cromatograma do íon total e o espectro de massas do solvente (metanol) utilizado para preparação das soluções de padrões e dos extratos, apresentados nas figuras 32 e 33, foram obtidos nas mesmas condições CLUE-EM, para comparação com os espectros dos padrões e extratos. Uma vez que os espectros dos extratos apresentavam alguns picos desconhecidos, o espectro do branco (metanol) auxiliou na detecção dos picos que pertenciam às amostras estudadas.

Figura 32 - Cromatograma do íon total do branco (metanol), obtido por CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo.

Figura 33 - Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo, do branco (metanol).

4. 2. 1. 1 Análise dos extratos de *Passiflora alata*

As análises dos extratos da polpa de *P. alata* por CLUE-EM, realizadas no modo de ionização positivo, geraram o cromatograma do íon total (figura 34), bem como os cromatogramas dos íons extraídos, determinados pela relação m/z dos $[M+H]^+$ dos padrões dos alcaloides.

Figura 34 - (A) Cromatograma do íon total (TIC) do extrato total da polpa de *P. alata*, obtido por CLUE-EM, ionização por eletrospray, no modo positivo. E cromatograma do íon extraído (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 e (F) m/z 215.

A identificação dos alcaloides foi atribuída levando em consideração o tempo de retenção no cromatograma, em comparação com o dos padrões, e os espectros de massas, pelo estabelecimento da relação m/z dos íons moleculares protonados $[M+H]^+$ dos padrões dos alcaloides. Os picos de $t_R = 2,03$ min, $t_R = 1,59$ min e $t_R = 1,47$ min foram selecionados por coincidirem com os tempos de retenção dos padrões comerciais. Observa-se a correspondência do tempo de retenção de alguns picos dos extratos com os tempos de retenção dos padrões harmana ($t_R = 2,03$ min), harmol ($t_R = 1,59$ min) e harmalol ($t_R = 1,42$ min), respectivamente. Na figura 35 são apresentados os espectros de massas dos picos (A) m/z 183, correspondente à harmana, (B) m/z 199, correspondente ao harmol e (C) m/z 201, correspondente ao harmalol, no extrato da polpa de *P. alata*. Uma vez que a intensidade dos picos de harmol e harmalol é muito baixa decidiu-se realizar a análise por CLUE-EM/EM, em

que é possível a seleção do íon molecular que se deseja estudar e avaliar a sua presença no espectro, bem como seus fragmentos (íons “filhos”).

Figura 35 - Espectro CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: dos picos do íons (A) m/z 183, (B) m/z 199 e (C) m/z 201, presentes nos cromatogramas dos íons extraídos do extrato da polpa de *P. alata* figura 34.

As análises do extrato da polpa de *P. alata* por CLUE-EM/EM, realizadas no modo de ionização positivo, geraram os cromatogramas e os espectros de massas de cada alcaloide harmânico presente no extrato. A identificação dos alcaloides foi atribuída levando em consideração o tempo de retenção no cromatograma, em comparação com o dos padrões, e as medidas de alta precisão das massas, por comparação dos espectros de massas dos padrões e do extrato.

Pode-se observar a correspondência do tempo de retenção do pico do padrão de harmana ($t_R = 2,09$ min) (Figura 36 A) com o tempo de retenção ($t_R = 2,18$ min) do pico no cromatograma do extrato da polpa de *P. alata* (Figura 36 B).

Figura 36 - Cromatogramas obtidos através das análises realizadas por CLUE-EM/EM do padrão de harmana e do extrato da polpa de *P. alata*. (A) solução padrão de harmana m/z 183, $t_R = 2,05$ min e (B) extrato da polpa de *P. alata*.

Ainda, há correspondência do íon molecular presente no espectro de EM/EM do extrato, m/z 183 (Figura 37 B), com o pico do íon molecular apresentado pelo espectro do padrão (Figura 37 A).

Figura 37 - Espectros de massas da análise CLUE-EM/EM do íon $[M+H]^+$ de m/z 183, $t_R = 2,05$ min: (A) do padrão comercial de harmana e (B) extrato da polpa de *P. alata*.

A presença dos picos m/z 141 e m/z 165 nos espectros do extrato da polpa de *P. alata* foi questionada como possível fragmentação do íon molecular. Contudo, os dados da literatura mostraram que não há semelhança entre os picos do extrato e os identificados em outros trabalhos: Li e colaboradores realizaram CLUE-EM/EM para avaliação do comportamento da harmana. O método utilizado (ESI, no modo positivo de ionização e EM/EM) resultou no $[M+H]^+$ com m/z 183,0955 e os fragmentos de m/z 168,0719 ($[M+H-15]^+$), m/z 142,0679 ($[M+H-41]^+$) e m/z 115,0570 ($[M+H-68]^+$). O pico m/z 141,95766 do espectro de massas do extrato da polpa apresenta um erro de -107 ppm com relação à fórmula molecular proposta ($C_{10}H_8N^+$), sendo assim não foi possível a determinação da origem dos outros picos presentes no espectro do extrato da polpa de *P. alata*, pela aplicação de CLUE-EM/EM (Li *et al.*, 2014).

Por comparação do pico cromatográfico do padrão harmina ($t_R = 2,85$ min) (Figura 38 A) com o cromatograma do extrato da polpa de *P. alata* (Figura 38 B), observa-se tempo de retenção semelhante ao do pico $t_R = 2,90$ min, além da correspondência do $[M+H]^+$ m/z 213 e seu fragmento $[M+H-15]^+$ m/z 198 – relativo a perda de uma metila – presentes no espectro de massa/massa do extrato da polpa (Figura 39 B).

Figura 38 - Cromatogramas obtidos através das análises realizadas por CLUE-EM/EM do padrão de harmina e do extrato da polpa de *P. alata*. (A) solução padrão de harmina m/z 213, $t_R = 2,83$ min e (B) extrato da polpa de *P. alata*.

Figura 39 - Espectros de massas da análise CLUE-EM/EM do íon $[M+H]^+$ de m/z 213, $t_R = 2,85$ min: (A) do padrão comercial de harmina e (B) extrato da polpa de *P. alata*.

Pela análise CLUE-EM/EM não foi possível a identificação dos alcaloides harmol e harmalol nos extratos da polpa de *P. alata*.

Os extratos das sementes de *P. alata* também foram submetidos à análise por CLUE-EM, e a figura 40 apresenta o cromatograma dos íons totais e os cromatogramas dos íons extraídos de cada íon molecular protonado referente a cada um dos alcaloides harmânicos investigados.

Figura 40 - Cromatograma do íon total (A) do extrato das sementes de *P. alata*, obtido por CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo. Cromatograma do íon extraído (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 e (F) m/z 215.

A identificação dos alcaloides foi atribuída levando em consideração o tempo de retenção no cromatograma do extrato das sementes de *P. alata*, em comparação com o dos padrões, e os espectros de massas respectivos. A relação m/z dos íons extraídos foi definida pelos espectros apresentados nas análises dos padrões comerciais dos alcaloides harmânicos. Os picos com tempo de retenção: $t_R = 2,03$, $t_R = 1,68$, $t_R = 1,38$, $t_R = 2,80$ e $t_R = 2,54$ minutos correspondem aos tempos de retenção dos padrões harmana ($t_R = 2,03$ min), harmol ($t_R = 1,68$ min), harmalol ($t_R = 1,60$ min), harmina ($t_R = 2,60$ min) e harmalina ($t_R = 2,50$ min), respectivamente.

A figura 41 mostra a presença dos íons $[M+H]^+$ m/z 183, correspondente ao alcaloide harmana, m/z 199 harmol, m/z 201 harmalol, m/z 213 harmina e m/z 215 harmalina nos picos cromatográficos dos íons extraídos do TIC do extrato das sementes de *P. alata* (Figura 40).

Figura 41 - Espectros CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo: dos picos dos íons $[M+H]^+$ (A) m/z 183 ($t_R = 2,03$ min), (B) m/z 199 ($t_R = 1,68$ min), (C) m/z 201 ($t_R = 1,38$ min), (D) m/z 213 ($t_R = 2,80$ min) e (E) m/z 215 ($t_R = 2,54$ min), presentes nos cromatogramas dos íons extraídos do extrato das sementes de *P. alata*.

ext_samente1 #65-67 RT: 2.76-2.84 AV: 3 SB: 464 0.01-2.72, 2.84-20.00 NL: 2.13E7
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-250.00]

ext_samente1 #60 RT: 2.54 AV: 1 NL: 3.95E8
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-250.00]

4. 2. 1. 2 Análise dos extratos de *Passiflora edulis*

Inicialmente os extratos da polpa e das sementes dos frutos de *P. edulis* foram analisados por CLUE-EM, com ionização por eletronebulização e no modo positivo. No entanto, os cromatogramas dos íons extraídos não apresentavam nenhum pico bem definido, como é mostrado nos cromatogramas do extrato das sementes (Figura 42) e no cromatograma do extrato da polpa (Figura 43).

Figura 42 - Cromatograma do íon total (A) do extrato das sementes de *P. edulis*, obtido por CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo. Cromatograma do íon extraído (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 e (F) m/z 215.

Figura 43 - Cromatograma do íon total (A) do extrato da polpa de *P. edulis*, obtido por CLUE-EM, ionização eletrospray, modo positivo. Cromatograma do íon extraído (B) m/z 183, (C) m/z 199, (D) m/z 201, (E) m/z 213 e (F) m/z 215.

Então, a fim de obter melhores resultados para a identificação dos alcaloides harmônicos nos extratos da polpa e das sementes de *P. edulis*, foram realizadas análises por CLUE-EM/EM, realizadas no modo de ionização positivo, que geraram o cromatograma e o espectro de massas de cada alcaloide harmônico presente no extrato referente a cada íon molecular $[M+H]^+$ com a relação m/z dos padrões dos alcaloides.

Os extratos da polpa de *P. edulis* submetidos a EM/EM para o íon molecular m/z 215, harmalina, resultaram nos cromatogramas da figura 44. Por comparação do cromatograma do padrão comercial, $t_R = 2,60$ min (Figura 44 A), com os cromatogramas dos extratos (da polpa, figura 44 B e das sementes, 44 C), pode-se afirmar que somente a polpa dos frutos de *P. edulis* contém o alcaloide harmalina.

Figura 44 - Cromatogramas obtidos através das análises realizadas por CLUE-EM/EM do padrão de harmalina m/z 215 ($t_R = 2,60$ min) e do extrato da polpa de *P. edulis* (A) padrão de harmalina, (B) extrato da polpa de *P. edulis* e (C) extrato das sementes de *P. edulis*.

Na figura 45, é possível observar que os espectros de massas do padrão (Figura 45 A) e do extrato (Figura 45 B), no tempo de retenção do alcaloide ($t_R = 2,60$ min), são semelhantes, onde podem ser observados os íons de m/z 215 ($[M+H]^+$), o fragmento iônico m/z 200, uma quebra simples com a saída de uma metila ($[M+H-15]^+$), e o fragmento iônico m/z 174, eliminação de C_2H_3N ($[M+H-41]^+$).

Figura 45 - Espectros de massas da análise CLUE-EM/EM do íon $[M+H]^+$ de m/z 215, $t_R = 2,60$ min: (A) do padrão comercial de harmalina e (B) extrato da polpa de *P. edulis*.

Observando o cromatograma do padrão comercial de harmina, com $t_R = 2,85$ min (Figura 46 A) e os cromatogramas dos extratos (Figura 46 B e C), pode-se afirmar que a polpa e as sementes dos frutos de *P. edulis* contêm o alcaloide harmina, por apresentarem pico cromatográfico no mesmo tempo de retenção.

Figura 46 - Cromatogramas obtidos através das análises realizadas por CLUE-EM/EM do padrão de harmina m/z 213 ($t_R = 2,85$ min) e do extrato da polpa de *P. edulis*: (A) padrão de harmina (B) extrato das sementes de *P. edulis* e (C) extrato da polpa de *P. edulis*.

A comparação dos espectros de massas do padrão e dos extratos (Figura 47), no tempo de retenção do alcaloide ($t_R = 2,85$ min), indica que estão presentes os sinais referentes ao $[M+H]^+$ (m/z 213) e o fragmento referente à perda de uma metila, $[M+H-15]^+$ (m/z 198), confirmando a presença do alcaloide harmina no extrato da polpa e das sementes de *P. edulis*.

Figura 47 - Espectros de massas da análise CLUE-EM/EM do íon $[M+H]^+$ de m/z 213, $t_R = 2,85$ min: (A) padrão comercial de harmina, (B) extrato da polpa de *P. edulis* e (C) extrato das sementes de *P. edulis*.

O alcaloide harmana possui um tempo de retenção de aproximadamente 2,1 min, e a comparação do cromatograma do padrão comercial (Figura 48 A) com os cromatogramas dos extratos da polpa dos frutos de *P. edulis* (Figura 48 B) e *P. alata* (Figura 48 D) revela a presença do alcaloide harmana nos referidos extratos. Quanto ao pico cromatográfico da figura 48 C, por ser pouco definido exige outras análises para a confirmação da presença de harmana.

Figura 48 - Cromatogramas obtidos através das análises realizadas por CLUE-EM/EM do padrão de harmana m/z 183 ($t_R = 2,09$ min) e do extrato da polpa de *P. edulis*: (A) padrão de harmana (B) extrato da polpa de *P. edulis*, (C) extrato das sementes de *P. edulis* e (D) extrato da polpa de *P. alata*.

O espectro de massa/massa do padrão de harmana no $t_R = 2,10$ min (Figura 49 A) mostra o pico do íon $[M+H]^+$ m/z 183. Comparado com os espectros EM/EM dos extratos (Figura 49 B, C e D), estes também possuem o pico m/z 183, referente ao íon $[M+H]^+$. Como nas análises do extrato da polpa de *P. alata* discutidas anteriormente neste trabalho (página 73), não foi possível a identificação dos picos m/z 141, m/z 137 e m/z 165, presentes nos espectros dos extratos das sementes e da polpa de *P. edulis*.

Figura 49 - Espectros de massas da análise CLUE-EM/EM do íon $[M+H]^+$ de m/z 183, $t_R = 2,05$ min: (A) padrão comercial de harmana, (B) extrato da polpa de *P. edulis* e (C) extrato das sementes de *P. edulis* e (D) extrato da polpa de *P. alata*.

A Tabela 8 apresenta, de forma resumida, a identificação dos alcaloides estudados neste trabalho. Os alcaloides harmalol e harmol só foram identificados nos extratos das sementes de *P. alata* analisadas por SBSE/CLUE-EM, não sendo detectados nos outros extratos, analisados por SBSE/CLUE-EM/EM. A harmina está presente nas sementes e na polpa de ambas as espécies estudadas, enquanto a harmana foi identificada nos extratos da polpa e das sementes de *P. alata* e nos extratos da polpa de *P. edulis*. O alcaloide harmalina foi encontrado nos extratos da polpa de *P. edulis* e nas sementes de *P. alata*.

Ainda, os extratos das sementes de *P. edulis* necessitam de futuras análises, pois suspeita-se da presença da harmana, pois o cromatograma da análise CLUE-EM/EM apresentou um pico cromatográfico pouco definido no $t_R = 2,09$ min, referente ao alcaloide, ainda que o espectro de EM/EM mostre a presença do sinal do íon $[M+H]^+$ de m/z 183.

Tabela 8 - Avaliação da identificação dos alcaloides harmânicos nos extratos da polpa e das sementes de *P. alata* e *P. edulis*.

Extratos	<i>P. edulis</i> (sementes)	<i>P. edulis</i> (polpa)	<i>P. alata</i> (sementes)	<i>P. alata</i> (polpa)
Alcaloides				
Harmana	Sim	Sim	Sim	Sim
Harmina	Sim	Sim	Sim	Sim
Harmol	Não	Não	Sim	Não
Harmalol	Não	Não	Sim	Não
Harmalina	Não	Sim	Sim	Não

4. 3 Extração de alcaloides harmônicos por SBSE-EG Silicone.

O planejamento experimental é considerado uma ferramenta conveniente para determinar as condições ótimas de procedimentos envolvendo um número razoável de análises. Uma vez que as barras para SBSE recobertas com EG-Silicone não haviam sido utilizadas por outros pesquisadores para a extração de alcaloides harmônicos, o processo de planejamento fatorial fracionário foi realizado, a fim de se avaliar os fatores mais relevantes, e assim definir os valores dos seus níveis correspondentes às melhores condições de extração e dessorção.

O planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} foi escolhido com base no trabalho de Pereira e colaboradores, para a extração de alcaloides da polpa e das sementes de maracujá azedo, utilizando barras SBSE revestidas de PDMS. Os mesmos fatores foram mantidos, uma vez que são cinco as variáveis que podem afetar a eficiência de uma extração por SBSE: quantidade de NaCl, pH, tempo de extração, tempo de dessorção e porcentagem de metanol como solvente de dessorção (PEREIRA, *et al.* 2014).

Após os experimentos do planejamento fatorial fracionário, foram utilizadas as áreas dos picos cromatográficos de cada alcaloide como resposta, e os resultados das análises quimiométricas podem ser observados nos gráficos de Pareto e dos Efeitos Principais nas figuras 50 e 51. O Gráfico de Pareto é representado por barras horizontais, e o comprimento dessas são proporcionais ao valor absoluto do seu efeito estimado associado ou do efeito padronizado. A linha vertical, que corta as barras, indica a significância estatística e que, neste estudo, corresponde ao limite de 95%. Desta forma, os fatores avaliados são significativos se a barra correspondente cruzar a linha vertical. Para o alcaloide harmana (Figura 50 a), todos as variáveis são importantes, e em seus valores máximos. O Gráfico de Pareto referente ao alcaloide harmina (Figura 50 b), observa-se que somente a porcentagem de metanol é significativa, no nível máximo e no nível de confiança de 95%.

Figura 50 - Gráficos de Pareto para visualização dos efeitos das variáveis químicas (% MeOH, pH, Tempo de Extração (Textr), NaCl e Tempo de Dessorção (Tdess)) sobre a extração por SBSE-EG silicone, para os alcaloides (a) harmana e (b) harmina.

A partir dos gráficos dos Efeitos Principais (Figura 51) tem-se que quase todos os fatores são significativos, e em seus níveis superiores, enquanto que o pH e a % de metanol apresentam maior influência nos resultados, pois o rendimento da extração dos alcaloides harmana e harmina aumenta consideravelmente com 100% de metanol e em pH 12. Para o alcaloide harmina (Figura 51 b), no entanto, somente o tempo de dessorção apresenta ser pouco significativo, com uma pequena variação no rendimento da extração.

Figura 51 - Gráficos dos Efeitos Principais para visualização da influência dos níveis das variáveis químicas (% MeOH, pH, Tempo de Extração (Textraç), NaCl e Tempo de Dessorção (Tdessor)) sobre a extração por SBSE-EG silicone, para os alcaloides (a) harmana e (b) harmina.

O efeito do pH da solução na eficiência de extração está relacionado com o rendimento de extração por SBSE, que é dependente das constantes de dissociação dos analitos em soluções aquosas. Os alcaloides harmana e harmina, em solução aquosa são encontradas em três formas (respectivamente figuras 52 e 53), o equilíbrio é definido pelos valores de pKa (harmana: 14,5 e 8,6; e harmina: 14,43 e 8,0).

Assim, em soluções com alto valor de pH (pH 12, no caso desse trabalho), mas abaixo do valor de pKa, são esperadas espécies neutras, com baixa solubilidade em água, sendo mais facilmente extraídos pela matriz extratora.

Figura 52 – Formas iônicas e molecular do alcaloide harmana em solução aquosa.

Figura 53 – Formas iônicas e molecular do alcaloide harmina em solução aquosa.

Os resultados significativos obtidos para a quantidade de NaCl adicionado, correspondentes ao nível superior, estão relacionados à força iônica do meio de extração, que devido ao efeito de *salting-out* e as interações eletrostáticas entre moléculas polares e os íons de NaCl aumenta a quantidade de analitos extraídos.

Para a determinação do melhor tempo de extração e de dessorção, foi realizado um estudo da cinética do processo de extração e de dessorção, mantendo o pH 12, 3,5 g de NaCl e com 100% de metanol como solvente de dessorção. Os resultados avaliados foram o aumento da área do pico cromatográfico referente ao alcaloide extraído por SBSE usando as barras recobertas com EG-Silicone, com o aumento do tempo de extração (Figura 54) e dessorção (Figura 55).

O comportamento dos alcaloides harmana e harmina frente aos processos de extração e dessorção é semelhante, e com base nos resultados dos estudos cinéticos, utilizando as barras recobertas com EG-Silicone, o melhor tempo de extração são 30 minutos sob agitação, com o tempo de dessorção de 15 minutos no ultrassom. A partir destes tempos o ganho de massa tende a estabilizar e o aumento não é considerável em relação ao aumento do tempo de extração e dessorção.

Figura 54 - Gráficos da variação da área do pico cromatográfico dos alcaloides (A) harmina e (B) harmana extraídos por SBSE-EG Silicone, em função dos diferentes tempos de extração sob agitação.

Figura 55 - Gráficos da variação da área do pico cromatográfico dos alcaloides (A) harmina e (B) harmana na extração SBSE-EG Silicone, em função dos diferentes tempos de dessorção no ultrassom.

O estudo da recuperação do procedimento de extração e dessorção definido pelo planejamento experimental e pelo estudo cinético foi realizado a partir da análise prévia, por CLAE-Flu, de alíquotas da amostra a ser submetida ao processo de extração por SBSE com as barras recobertas por EG-Silicone, determinando-se a porcentagem inicial dos alcaloides contidos em cada solução. A área dos picos cromatográficos de cada um dos alcaloides foi considerada como 100% para o cálculo da recuperação. Após a dessorção das barras magnéticas, os alcaloides dessorvidos foram analisados por CLAE-Flu, obtendo-se a área do pico cromatográfico referente à porcentagem final dos alcaloides presentes.

O valor da área do pico que corresponde a 100% de recuperação foi calculado a partir dos resultados obtidos pela análise das alíquotas da amostra antes de ser submetida ao processo de extração:

Área₁ (obtida antes da extração)10 mL

X (área_{teórica} correspondente a extração)150 µL

$X_{\text{área teórica}} = \text{Área}_1 \times 10 \text{ mL} / 150 \text{ µL}$

Então, a porcentagem de recuperação real foi calculada, após a extração dos alcaloides por SBSE/CLAE-Flu:

$[\text{Área}_2 \text{ (obtida após extração por SBSE/CLAE-Flu)} / X_{\text{área teórica}}] \times 100\%$

As concentrações das soluções dos padrões dos alcaloides harmana e harmina utilizados para o estudo da recuperação foram: 20, 250, 500, 1000, 1500 e 2000 ng L⁻¹. O perfil da curva da porcentagem de recuperação em função da concentração pode ser observado nas figuras 56 e 57.

A curva de recuperação para a harmana (Figura 56 A) mostra inicialmente um comportamento crescente, onde a recuperação aumenta com o aumento da concentração de alcaloides na solução extraída. Uma concentração maior que 500 ng L⁻¹ leva a uma recuperação porcentual menor, que diminui gradativamente. No intervalo entre 20, 250 e 500 ng L⁻¹, a recuperação do alcaloide harmana é linear (Figura 56 B).

Figura 56 - Curva da porcentagem de recuperação do alcaloide harmana em função das concentrações da solução de extração, por SBSE com barras magnéticas EG-Silicone.

A curva de porcentagem de recuperação da harmina (Figura 57) possui um comportamento senoidal, com um máximo de recuperação em 250 ng L⁻¹, diminui em 500 ng L⁻¹, volta a aumentar em 1000 ng L⁻¹, e por fim diminui gradativamente.

Figura 57 - Curva da porcentagem de recuperação do alcaloide harmina em função das concentrações da solução de extração, por SBSE-EG Silicone.

As agências de regulamentação dos métodos de extração, como por exemplo a Anvisa, exigem recuperação de analitos entre 80 e 120% (RIBANI, 2004). Assim as barras de EG-Silicone não são adequadas para a extração de harmana e harmina, uma vez que o máximo de recuperação alcançado chegou a 26% para a harmana e 38% para a harmina.

A literatura aponta a utilização das barras de EG-Silicone com recuperações entre 84 e 116% para análises de compostos (clorofenóis e cloroanisóis) que interagem por ligações de hidrogênio com a matriz extratora (CACHO *et al.*, 2014). Os alcaloides harmana e harmina possuem sítios de ligação de hidrogênio, no entanto apresentaram uma baixa recuperação – considerando os valores exigidos para métodos quantitativos -, e como perspectivas futuras para estudo da extração de alcaloides harmânicos pelas barras de SBSE-EG Silicone está o estudo dos alcaloides harmol e harmalol, que possuem valor de log K_{o/w} menores, sendo mais polares.

5 CONCLUSÕES

Pereira e colaboradores e Rodrigues analisaram os alcaloides harmana e harmina por SBSE/CLAE-Flu dos extratos da polpa e das sementes de *P. edulis*, determinando as quantidades de cada um nestes extratos. Nos estudos deste trabalho verificou-se que a quantidade dos alcaloides harmana e harmina encontrada nos extratos da polpa de *P. alata*, por SBSE/CLAE-Flu é pequena, em comparação com a polpa de *P. edulis*, de acordo com o trabalho de Pereira e colaboradores (PEREIRA *et al.*, 2014; RODRIGUES, 2013). Para complementar o estudo dos alcaloides harmana e harmina em maracujá doce é necessário realizar a quantificação nos extratos das sementes desta espécie.

A técnica de extração por SBSE-PDMS aplicada no estudo dos alcaloides harmônicos nos extratos da polpa e das sementes de *P. alata* e *P. edulis* por SBSE/CLUE-EM/EM mostrou-se vantajosa por ser rápida, fácil de realizar, e exige menor quantidade de amostra e solvente, quando comparada a técnica de extração líquido-líquido, por exemplo.

Os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento da composição fitoquímica da polpa e das sementes das espécies de maracujá estudados, quanto aos alcaloides harmônicos, especialmente nas sementes do maracujá doce (*P. alata*), em que foram identificados os alcaloides harmana, harmina, harmol, harmalol e harmalina, sem outros relatos na literatura sobre estes alcaloides nesta espécie. Os alcaloides identificados em *P. edulis*, harmana, harmina e harmalina foram detectados nos extratos das folhas desta espécie, por cromatografia em papel, utilizando o reagente de Dragendorff (LUTOMONSKI *et al.*, 1975). Este trabalho utilizou técnicas mais modernas e confirma a presença destes alcaloides.

A extração dos alcaloides harmana e harmina com as barras de SBSE-EG Silicone mostrou uma baixa recuperação, em torno de 30 %, sugerindo que a interação dessas moléculas com a fase extratora, dentro das condições estudadas, não foi significativa. Assim, outros alcaloides harmônicos precisam ser testados, e/ou a metodologia deve ser estudada, para otimizações.

REFERÊNCIAS

- ABOURASHED, E. A., VANDERPLANK, J., KHAN, I. A. *High-Speed Extraction and CLAE Fingerprinting of Medicinal Plants – II. Application to Harman Alkaloids of Genus Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, No. 2, pp. 100-106 (2003).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução RDC 48 de 16 de março de 2004*. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. D.O.U., Brasília, 18 mar. 2004.
- BUSQUETS, R., PUIGNOU, L., GALCERAN, M. T., SKOG, K. *Effect of Red Wine Marinades on the Formation of Heterocyclic Amines in Fried Chicken Breast*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, pp. 8376-8384 (2006).
- BICCHI, C., CORDERO, C., LIBERTO, E., RUBIOLO, P., SGORBINI, B., DAVID, F., SANDRA, P. *Dual-Phase Twisters: A New Approach to Headspace Sorptive Extraction and Stir Bar Sorptive Extraction*. **Journal of Chromatography A**, v. 1094, pp. 9-16 (2005).
- CACHO, J. I., CAMPILLO, N., VIÑAS, P., CÓRDOBA, M. H. *Stir Bar Sorptive Extraction with EG-Silicone Coating for Bisphenols Determination in Personal Care Products by GC-MS*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 78-79, pp 255-260 (2013).
- CACHO, J. I., CAMPILLO, N., VIÑAS, P., CÓRDOBA, M. H. *Stir Bar Sorptive Extraction Polar Coatings for the Determination of Chlorophenols and Chloroanisoles in Wines Using Gas Chromatography and Mass Spectrometry*. **Talanta**, v. 118, pp. 30-36 (2014).
- CAICEDO, N. H., KUMIRSKA, J., NEUMANN, J., STOLTE, S., THÖMING, J. *Detection of Bioactive Exometabolites Produced by the Filamentous Marine Cyanobacterium Geitlerinema sp.* **Mar Biotechnology**, v. 14, pp. 436-445 (2012).
- CALDAS, S. S., GONÇALVES, F.F., PRIMEL, E. G., PRESTES, O. D., MARTINS, M. L., ZANELLA, R. *Principais Técnicas de Preparo de Amostra para a Determinação de Resíduos de Agrotóxicos em Água por Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodos e por Espectrometria de Massas*. **Química Nova**, v. 34, No. 9, pp. 1604-1617 (2011).
- CARERI, M., BIANCHI, F., CORRADINI, C. *Recent Advances in the Application of Mass Spectrometry in Food-Related Analysis*. **Journal of Chromatography A**, v. 970, pp. 3-64 (2002).

CASS, Q. B., BARREIRO, J. C. Os Avanços Tecnológicos na Química Analítica: Sucesso e Desafios. **Ciência e Cultura**, v. 63, No. 1, pp. 37-40 (2011).

CROTTI, A. E. M., VESSECCHI, R., LOPES, J. L. C., LOPES, N. P. *Espectrometria de Massas com Ionização por "Electrospray": Processos Químicos Envolvidos na Formação de Íons de Substâncias Orgânicas de Baixo Peso Molecular*. **Química Nova**, v. 29, No. 2, pp. 287-292 (2006).

DAVID, F., SANDRA, P. *Stir Bar Sorptive Extraction for Trace Analysis*. **Journal of Chromatography A**, v. 1152, pp. 54-69 (2007).

DHAWAN, K., DHAWAN, S., SHARMA, A. *Passiflora: A Review Update*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, pp. 1-23 (2004).

EG Silicone Twister® **GERSTEL GmbH & Co. KG** Edição 11/2011.

GALCERAN, M. T., MOYANO, E., PUIGNOU, L., PAIS, P. *Determination of heterocyclic amines by pneumatically assisted electrospray liquid chromatography-mass spectrometry*. **Journal of Chromatography A**, v. 730, pp. 185-194 (1996).

GILART, N., MIRALLES, N., MARCÉ, R. M., BORRULL, F., FONTANALS, N. *Novel Coatings for Stir Bar Sorptive Extraction to Determine Pharmaceuticals and Personal Care Products in Environmental Waters by Liquid Chromatography and Tandem Mass Spectrometry*. **Analytica Chimica Acta**, v. 774, pp. 51-60 (2013).

HAJNOS, M. W. e SHERMA, J. *High Performance Liquid Chromatography in Phytochemical Analysis*. **Chromatographic Science Series**, v. 102. CRC Press Taylor and Francis Group (2011).

HERRAIZ, T. *Analysis of the Bioactive Alkaloids Tetrahydro- β -Carboline and β -Carboline in Food*. **Journal of Chromatography A**, v. 881, pp. 483-499 (2000).

LANÇAS, F. M. *A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente "Compatíveis"?* **Scientia Chromatographica**, v. 1, No. 2, pp. 35-61 (2009).

LANÇAS, F. M. *A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: Finalmente "Compatíveis"? II A Escolha do Analisador de Massas*. **Scientia Chromatographica**, v. 5, No. 1, pp. 27-46 (2013).

LI, S., LIU, W., TENG, L., CHENG, X., WANG, Z., WANG, C. *Metabolites Identification of Harmane in vitro/in vivo in Rats by Ultra-Performance Liquid Chromatography Combined with Electrospray Ionization Quadrupole Time-of-Flight Tandem Mass Spectrometry*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, pp. 53-62 (2014).

LUMBRERAS, R. G., CONRADO, N. R., GONZÁLEZ, M. E. L., ARRIBAS, P., DÍEZ, L. M. P. *Capillary Liquid Chromatography with Diode Array and Mass Spectrometry Detection for Heterocyclic Aromatic Amine Determination in Ready-to-Eat Food Treated with Electron-Beam Irradiation*. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, pp. 6778-6784 (2010).

LUTOMSKI, J., MALEK, B., RYBACKA, L. *Pharmacochemical Investigation of the Raw Materials from Passiflora genus.2. The Pharmacochemical estimation of Juices from the Fruits of Passiflora edulis and Passiflora edulis forma flavicarpa*. **Planta Medica**, vol 27, pp. 112-121 (1975) apud ZERAİK, M. L., PEREIRA, C. A. M., ZUIN, V., G., YARIWAKE, J. H. *Maracujá: Um Alimento Funcional?* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, No. 3, pp. 459-471 (2010).

MACHADO, M. W., NETO, C. S., SALGADO, J., ZAFFARI, A. B., CAMPOS, F. R., CORILO, Y. E., EBERLIN, M. N., BIAVATTI, M. W. *Search for Alkaloids on Callus Culture of Passiflora alata*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, No. 4, pp. 901-910 (2010).

MAGI, E., DI CARRO, M., SCAPOLLA, C., NGUYEN, K. *Stir Bar Sorptive Extraction and LC/MS-MS for Trace Analysis of UV Filters in Different Water Matrices*. **Chromatographia**, v. 75, pp 973-982 (2012).

MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. *O Estado da Arte da Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência*, **Química Nova**, v. 32, No. 1, pp. 214-222 (2009).

MARAKOV, A. *Electrostatic Axially Harmonic Orbital Trapping: A High-Performance Technique of Mass Analysis*. **Analytical Chemistry**, v. 72, pp. 1156-1162 (2000).

MCLLHENNY, E. H., RIBA, J., BARBANOJ, M. J., STRASSMAN, R., BARKER, S. A. *Methodology for and the Determination of the Major Constituents and Metabolites of the Amazonian Botanical Medicine Ayahuasca in Human Urine*. **Biomedical Chromatography**, v. 25, pp. 970-984 (2011).

NIE, Y., BENNE, E. K. *Using Three Types of Twister Phases for Stir Bar Sorptive Extraction of Whisky, Wine and Fruit Juice*. **Global analytical Solutions – Gerstel**, v. 3 (2011).

NOGUEIRA, J. M. F. *Novel Sorption-Based Methodologies for Static Microextraction Analysis: A Review on SBSE and Related Techniques*. **Analytica Chimica Acta**, v. 757, pp. 1-10 (2012).

ONISHI, Y., OISHI, K., KAWANO, Y., YAMAZAKI, Y. *The Harmala Alkaloid Harmine is a Modulator of circadian Bmal1 Transcription*. **Bioscience Reports**, v. 32, pp. 45-52 (2012).

PEREIRA, C. A. M. ; J.H. Yariwake . Quantification of harman alkaloids in passion fruit samples by dual SBSE-LC/Flu. In: 36th ISCC / 9th GC x GC Symposium, 2012, Riva del Garda, Italia. Proceedings 36th ISCC / 9th GC x GC Symposium, (2012).

PEREIRA, C. A. M., RODRIGUES, T. R., YARIWAKE, J. H. *Quantification of Harman Alkaloids in Sour Passion Fruit Pulp and Seeds by a Novel Dual SBSE-LC/Flu (Stir Bar Sorptive Extraction-Liquid Chromatography with Fluorescence Detector) Method*. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 25, No. 08, pp. 1472-1483 (2014).

Pharmacognosy. Acesso em 15 de agosto de 2013: <http://www.e Pharmacognosy.com/2012/07/simple-carboline-alkaloids.html>

PLOTKA, J., TOBISZEWSKI, M., SULEJ, A. M., KUPSKA, M., GÓRECKI, T., NAMIESNIK, J. *Green Chromatography*. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, pp. 1-20 (2013).

RIBANI, M., BOTTOLI, C. B. G., COLLINS, C. H., JARDIM, C. S. F., MELO, L. F. C. *Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos*. **Química Nova**, v. 27, No. 5, pp. 771-780 (2004).

RIPA, F. A., NAHAR, L., HAQUE, M., ISLAM, M. M. *Antibacterial, Cytotoxic, and Antioxidant Activity of Crude Extract of Marsilea Quadrifolia*. **European Journal of Scientific Research**, v. 33, No. 1, pp. 123-129 (2009).

RODRIGUES, T. R. *Estudo de Alcaloides Harmânicos em Sementes de Passiflora edulis Sims. F. flavicarpa Degener (Maracujá Azedo) por SBSE/CLAE-Flu dual*. Dissertação de Mestrado. **Instituto de Química de São Carlos – USP** (2013).

RODRIGUEZ, J. A., ARTEAGA, K. A., DÍEZ, C., BARRADO, E. *Recent Advances in the Extraction of Triazines from Water Samples*. **Intech – Herbicides: Advances in Research**. Capítulo 13, pp. 255-276 (2013).

SHARMA, V., SARKAR, I. *Leveraging Biodiversity Knowledge for Potential Phyto-Therapeutic Applications*. **Journal American Medicinal Informatics Association**. v. 20, pp. 668-679 (2013).

SILVA, C., G. A., COLLINS, C. H., *Aplicações de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência para o Estudo de Poluentes Orgânicos Emergentes*. **Química Nova**, v. 34, pp. 665-676 (2011).

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., KIEMLE, D. J. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*; tradução de Ricardo Bicca de Alencastro. – [Reimpr.]. – Rio de Janeiro: LTC, 2010. Capítulo 1, pp.13-18 e 45.

TEOFILO, R. F., FERREIRA, M. M C. *Quimiometria II: Planilhas Eletrônicas para Cálculos de Planejamentos Experimentais, um Tutorial*. **Química Nova**, v. 29, No. 2. pp. 338-350 (2006).

THERMO SCIENTIFIC. Protein Methods Library. **Overview of Mass Spectrometry**. Rockford, IL USA, 2014. Disponível em: <<http://www.piercenet.com/method/overview-mass-spectrometry>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

VIÑAS, P., CAMPILLO, N., PÉREZ, M. H., CÓRDOBA, M. H. *A Comparison of Solid-Phase Microextraction and Stir Bar Sorptive Extraction Coupled to Liquid Chromatography for the Rapid Analysis of Resveratrol Isomers in Wines, Musts and Fruit Juices*. **Analytica Chimica Acta**, v. 611, pp. 119-125 (2008).

WATERS CORPORATION. HPLC Columns. **Continuing the Legacy of HPLC Column Performance**. Mildford, MA USA, 2014. Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720003995en.pdf>> Acesso em: 02 dez. 2014.

WATERS CORPORATION. XP Columns. **Extended Performance – Xbridge XSelect Columns**. Mildford, MA USA, 2012. Disponível em: <<http://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720004195en.pdf>> Acesso em: 28 nov. 2014.

WU, H., GUO, J., CHEN, S., LIU, X., ZHOU, Y., ZHANG, X., XU, X. *Recent Developments in Qualitative and Quantitative Analysis of Phytochemical Constituents and their Metabolites Using Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 72, pp. 267-291 (2013).

XU, J., CHEN, B., HE, M., HU, B. *Analysis of Preservatives with Different Polarities in Beverage Samples by Dual-Phase Dual Stir Bar Sorptive Extraction Combined with High-Performance Liquid Chromatography*. **Journal of Chromatography A**, vol 1278, pp. 8-15 (2013).

YADAV, R. N. S., AGARWALA, M. *Phytochemical Analysis of Some Medicinal Plants*. **Journal of Phytology**, v. 12, No. 3, pp. 10-14 (2011).

YANG, M., SUN, J., LU, Z., CHEN, G., GUAN, S., LIU, X., JHANG, B., YE, M., GUO, D. *Phytochemical Analysis of Traditional Chinese Medicine Using Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry*. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, pp. 2045-2062 (2009).

YODIM, K. A., SAUNDERS, K. C. *A Review of LC-MS Techniques and High-Throughput Approaches Used to Investigate Drug Metabolism by Cytochrome P450s*. **Journal of Chromatography B**, v. 878, pp. 1326-1336 (2010).

ZERAIK, M. L., PEREIRA, C. A. M., ZUIN, V., G., YARIWAKE, J. H. *Maracujá: Um Alimento Funcional?* **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, No. 3, pp. 459-471 (2010).

ZERAIK, M. L. *Estudo analítico dos flavonóides dos frutos do maracujá (Passiflora edulis Sims f. Flavicarpa Degener)*. Tese de doutorado. **Instituto de Química de São Carlos – USP** (2010).

ZHANG, Y., LIN, C., FANG, G., MEI, J., WANG, X., WANG, S. *Tandem Solid Phase Extraction Coupled to LC-ESI-MS/MS for the Accurate Simultaneous Determination of Five Heterocyclic Aromatic Amines in Processed Meat Products*. **European Food Research Technology**, v. 234, pp. 197-205 (2012).

ZHAO, T., ZHENG, S., ZHANG, B., LI, Y., BLIGH, S. W. A., WANG, C., WANG, Z. *Metabolic Pathways of the Psychotropic-Carboline Alkaloids, Harmaline and Harmine, by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry and NMR Spectroscopy*. **Food Chemistry**, v. 134, pp. 1096-1105 (2012).

ZUCOLOTTI, S. M., FAGUNDES, C., REGINATTO, F. H., RAMOS, F. A., CASTELLANOS, L., DUQUE, C., SCHEKEL, E. P. *Analysis of C-glycosyl Flavonoids from South America Passiflora Species by CLAE-DAD and CLAE-MS*. **Phytochemical Analysis**, v. 23, pp. 232-239 (2012).

ZUIN, V. G., MONTERO, L., BAUER, C., POPP, P. *Stir Bar Sorptive Extraction and High-Performance Liquid Chromatography-Fluorescence Detection for the Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Mate Teas.* **Journal of Chromatography A**, v. 1091, pp. 2-10 (2005).

ZUIN, V. G., SCHELLIN, M., MONTERO, L., YARIWAKE, J. H., AUGUSTO, F., POPP, P. *Comparison of Stir Bar Sorptive Extraction and Membrane-Assisted Solvent Extraction as Enrichment Techniques for the Determination of Pesticide and Benzo[a]pyrene Residues in Brazilian Sugarcane Juice.* **Journal of Chromatography A**, v. 1114, pp. 180-187 (2006).