



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

LUIS FABRÍCIO SANTANA SANTOS

**APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO μ MSPD E BA μ E
PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES EM MATRIZES *IN NATURA*
E PROCESSADAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) POR
CROMATOGRÁFIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE
MASSAS.**

**APPLICATION OF THE MICROEXTRACTION TECHNIQUES μ MSPD
AND BA μ E FOR DETERMINATION OF ALKALOIDS IN NATURAL AND
PROCESSED TOBACCO MATRIX (*Nicotiana tabacum* L.) BY LIQUID
CHROMATROGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.**





LUIS FABRÍCIO SANTANA SANTOS

APLICAÇÃO DAS TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO μ MSPD E BA μ E PARA DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES EM MATRIZES *IN NATURA* E PROCESSADAS DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.) POR CROMATOGRAPHIA LÍQUIDA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS.

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Sergipe, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sandro Navickiene

Coorientador: Prof. Dr. Alain Gaujac

APPLICATION OF THE MICROEXTRACTION TECHNIQUES μ MSPD AND BA μ E FOR DETERMINATION OF ALKALOIDS IN NATURAL AND PROCESSED TOBACCO MATRIX (*Nicotiana tabacum* L.) BY LIQUID CHROMATROGRAPHY-MASS SPECTROMETRY.

Doctoral thesis presented to the Graduate Program in Chemistry of the Federal University of Sergipe, as a partial requirement to obtain Ph.D. in Chemistry.



**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

Santos, Luis Fabricio Santana
S237a Aplicação das técnicas de microextração μ MSPD e BA μ E para determinação de alcaloides em matrizes *in natura* e processadas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.) por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas / Luis Fabrício Santana Santos ; orientador Sandro Navickiene - São Cristóvão, 2019.
187 f. : il.

Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Química. 2. Tabaco - Produtos. 3. Alcalóides. 4. Espectrometria de massa. I. Sandro Navickiene orient. II. Título.

CDU 54



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
Programa de Pós-Graduação em Química
PPGQ

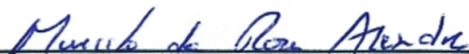


FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Tese de Doutorado de Luis Fabricio Santana Santos apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 30/09/2019.



Prof. Dr. Sandro Navickiene
Departamento de Química - UFS



Prof. Dr. Marcelo da Rosa Alexandre
Departamento de Química - UFS



Prof.ª Dr.ª Lisiane dos Santos Freitas
Departamento de Química - UFS



Prof.ª Dr.ª Quezia Bezerra Cass
Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. Charles dos Santos Estevam
Departamento de Fisiologia - UFS

***À minha amada esposa, Fernanda.
Por toda dedicação e incentivo nos momentos
mais conflitantes dessa caminhada acadêmica,***

DEDICO.

*“Não é que fé mova montanhas, nem que todas as estrelas estejam ao alcance,
para as coisas que não podem ser mudadas resta-nos somente paciência, porém,
preferir a derrota prévia à dúvida da vitória é desperdiçar a oportunidade de
merecer.”*

Sarah Westphal

AGRADECIMENTOS

A Deus e ao guerreiro São Jorge, pelo infinito amor, misericórdia e proteção ao me guiarem nessa fantástica jornada acadêmica.

A Sandro Navickiene, minha gratidão pela confiança creditada e ensinamentos transmitidos no decorrer de uma década de formação acadêmica, e admiração pela forma que conduz sua carreira profissional.

À minha amada família por toda fraternidade. Em particular minha MÃE, Rosilda Santana, por toda prioridade zelada à minha formação enquanto pessoa e meus irmãos, Felipe e Fabiano, por todo afeto, cuidado e encorajamento. AMO VOCÊS!

A Fernanda, por todo amor e paciência nos momentos de ausências decorrentes das demandas acadêmicas e aos seus pais, Augusto e Neide, por todo acolhimento e carinho.

"... aos amigos que fiz e que mantém a coragem de gostar de mim, apesar de mim!"

Aos companheiros de jornada acadêmica que tive a honra de firmar amizade e que foram cúmplices de inúmeros momentos de alegrias, conflitos e tristezas: Bruno, Joseane, Michel, Vilma, Bárbara, Jany Hellen, Nicaellen, Rafael, Sanny.

Aos companheiros de trabalho, técnicos de laboratório do Departamento de Química, por toda parceria, incentivo e colaboração nos momentos em que precisei me ausentar para realizar as atividades do doutorado e também pelo convívio diário.

Aos professores do Departamento de Química e Programa de Pós-graduação em Química por toda formação acadêmica e profissional.

Ao professor José Manuel Florêncio Nogueira e seu grupo de pesquisa da Universidade de Lisboa: Nuno Neng, Samir Ahmad e Mariana, pela receptividade e assistência durante a realização do estágio de doutorado-sanduíche em Portugal.

À família de brasileiros que tive a honra de conviver em Portugal e que tornaram meus dias lisboetas muito mais leves e enriquecedores enquanto SER HUMANO: Rosana, Júnior, Shirley, Álvaro, Diana, Danyelle, Alexandre, Flávia, Mariane, Jessâmine, Marcelo, José Ricardo e Kátia! Vocês não imaginam o tanto que aprendi com vocês!

A Adriana Teixeira, por me conduzir à superação de conflitos e angústias a partir da terapia de maneira tão profissional e afetuosa.

Ao coorientador Alain Gaujac e aos membros avaliadores do exame de qualificação e da defesa de tese, por todas as considerações para que o trabalho desenvolvido fosse conduzido de maneira eficiente e digna; os professores Luciane Pimenta, Lisiane Freitas, Haroldo Silveira, Quézia Cass, Marcelo Alexandre, e Charles Estevan.

À universidade Federal de Sergipe, o Departamento de Química, o Programa de Pós-Graduação em Química e o Centro de Laboratórios de Química Multiusuários pelo suporte administrativo e estrutural para o desenvolvimento do projeto.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

Tabaco é uma planta do gênero *Nicotiana* pertencente à família das solanáceas; sendo *Nicotiana tabacum* L. a principal a ser cultivada e comercializada. Não obstante a vasta diversidade de substâncias químicas, os alcaloides assumem importante papel na composição química do tabaco no que diz respeito aos efeitos que elevaram esta *commodity* a destaque mundial. Os alcaloides β -carbolínicos e indólicos são metabólitos secundários formados a partir da rota biossintética do aminoácido L-triptofano. Estes compostos apresentam ação inibidora da enzima monoamina oxidase (MAO) que potencializa, em fumantes, a susceptibilidade à dependência química. Todavia, pesquisas destacam também os seus importantes efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC), o que os colocam em posição de destaque para estudos em diferentes áreas da ciência. Nesse contexto, este estudo apresenta o desenvolvimento e validação de métodos analíticos de microextração para determinação dos alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahydroharmina e triptamina em amostras *in natura* e processadas de tabaco e fumaça de cigarro utilizando as técnicas de dispersão da matriz em fase sólida miniaturizada (μ MSPD), microextração adsortiva em barra (BA μ E), cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPL) e espectrometria de massas (MS). As condições instrumentais de análise foram otimizadas para assegurar resultados fidedignos de identificação e quantificação dos alcaloides. O procedimento de extração por μ MSPD foi otimizado nas seguintes condições: 0,01 g de amostra, 0,1 g de adsorvente Discovery DPA 6S e eluição com 2 mL de solução aquosa de ácido fórmico 1%. Por sua vez, o procedimento por BA μ E foi otimizado com dispositivo de extração contendo o adsorvente OASIS HLB, com etapa de extração de 3 horas pelo mecanismo de flutuação por *vórtex* a 1500 rpm em meio aquoso, e etapa de retroextração assistida por ultrassom utilizando 100 μ L de metanol. Os métodos desenvolvidos foram aplicados em amostras de tabaco e fumaça de cigarro, mostrando-se eficientes para a determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos. Os alcaloides harmano e norharmano foram detectados em todas as amostras analisadas. Pela primeira vez, o alcaloide harmina foi identificado em folhas de tabaco.

PALAVRAS-CHAVE: Alcaloides, *Nicotiana tabacum* L., μ MSPD, BA μ E, UHPLC, Espectrometria de Massas.

ABSTRACT

Tobacco is a plant of the genus *Nicotiana* from the Solanaceae family, whose *Nicotiana Tabacum* L. is the most cultivated and commercialized species. Despite the wide diversity of chemicals, the alkaloids play an important role in the chemical composition of tobacco due the effects that have made this commodity a worldwide prominence. The indole and β -carboline alkaloids are secondary metabolites formed from the biosynthetic pathway of the amino acid L-tryptophan. These compounds show inhibitory action of the enzyme monoamine oxidase (MAO) that enhances, in smokers, the susceptibility to chemical dependence. However, research also highlights its important effects on the Central Nervous System (CNS), which puts them in a prominent position for studies in different areas of science. In this context, this study presents the development and validation of microextraction analytical methods for determination of N,N-Dimethyltryptamine, harmaline, harmalol, harman, harmine, norharman, tetrahydroharmine and tryptamine alkaloids in natural and processed samples of tobacco and cigarette smoke by micro-matrix solid-phase dispersion (μ MSPD) bar adsorptive microextraction (BA μ E), ultra high performance liquid chromatography (UHPLC) and mass spectrometry (MS). The instrumental conditions of analysis were optimized to ensure reliable alkaloid identification and quantification results. The μ MSPD procedure was optimized as follows: 0.01 g sample, 0.1 g Discovery DPA 6S adsorbent and elution with 2 mL 1% aqueous formic acid solution. The BA μ E procedure was optimized using an extraction device containing the OASIS HLB adsorbent, with extraction step of floating mechanism (3h and 1500 rpm by vortex mechanism) in aqueous solution, and back extraction step by sonication using 100 μ L methanol for 5 min. The developed methods were applied to tobacco and cigarette smoke samples, proving to be efficient for the determination of indol and β -carboline alkaloids. The alkaloids harman and norharman were detected in all samples analyzed. For the first time, harmine was identified in tobacco leaf samples.

KEYWORDS: Alkaloids, *Nicotiana tabacum* L., μ MSPD, BA μ E, UHPLC, Mass spectrometry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição e composição química aproximada do tabaco.....	26
Figura 2. Exemplos de núcleos comuns de alcaloides.....	28
Figura 3. Estrutura química do aminoácido L-Triptofano.....	28
Figura 4. Rota biosintética de formação dos alcaloides alvo de estudo.....	31
Figura 5. Processo de homogeneização da amostra com suporte sólido e montagem do cartucho de extração.....	37
Figura 6. Etapa de Eluição da amostra em MSPD para posterior análise instrumental.....	38
Figura 7. Ilustração de dispositivo de extração BA μ E. A) Vista lateral, B) Vista frontal.....	40
Figura 8. Ciclo analítico da BA μ E. 1) Extração, 2) Retroextração.....	42
Figura 9. Cromatograma obtido a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H ₂ O, Coluna BEH C18, UV-DAD.....	82
Figura 10. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H ₂ O, Coluna BEH C18, UV-DAD. 1) 0,2 mL min ⁻¹ , 2) 0,3 mL min ⁻¹	83
Figura 11. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análise individuais dos alcaloides na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeCN:H ₂ O, Coluna BEH C18, UV-DAD. 1) 0,1 mL min ⁻¹ , 2) 0,2 mL min ⁻¹	84
Figura 12. Cromatograma obtido a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeCN:H ₂ O, Coluna CSH Phenyl-Hexyl, UV-DAD.....	85
Figura 13. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análise de solução padrão conjunta dos alcaloides na concentração de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H ₂ O, Coluna CSH Phenyl-Hexil, UV-DAD. 1) 0,1 mL min ⁻¹ 2) 0,2 mL min ⁻¹ e 3) 0,3 mL min ⁻¹	87

Figura 14. Perfil cromatográfico obtido a partir de gradiente de eluição otimizado com fase móvel MeOH:H ₂ O, Coluna CSH Phenyl-Hexyl, e detecção por UV-DAD.....	88
Figura 15. Ilustração do gradiente de eluição otimizado.....	89
Figura 16. Espectros de massas de moléculas protonadas dos alcaloides pelo Sistema 1.....	91
Figura 17. Espectros de massas com perfil de fragmentação dos alcaloides estudados.....	94
Figura 18. Cromatograma de íons de quantificação dos alcaloides estudados a partir das condições de análises descritas nas Tabelas 8 e 9.....	96
Figura 19. Comportamentos de intensidade da molécula protonada do alcaloide harmano obtidos a partir de ajustes de voltagem dos parâmetros: A) Cone, B) Sampling Cone e C) Source Offset.....	97
Figura 20. Cromatograma dos íons percussores dos alcaloides estudados obtido a partir de análise em modo MS ^E em baixa energia de ionização utilizando o sistema 2.....	99
Figura 21. Espectros de massas dos alcaloides estudados obtidos a partir de análises em baixa (A) e alta (B) energia de colisão para o método MS ^E utilizando o sistema 2.....	100
Figura 22. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 µg L ⁻¹ utilizando diferentes materiais dispersantes.(n=3).....	105
Figura 23. Estrutura molecular do adsorvente Discovery DPA-6S.....	106
Figura 24. Extratos dos brancos das amostras obtidos nos ensaios de avaliação de eficiência dos adsorventes Florisil (A), alumina neutra (B) e Discovery DPA 6S (C) utilizando metanol como solvente extrator.....	107
Figura 25. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 µg L ⁻¹ utilizando diferentes colunas auxiliares para <i>clean-up</i> (n=3). Análises realizadas no Sistema 1. RSD estimado apenas para ensaio com C18. ND - Não detectado.....	109
Figura 26. Extratos obtidos após ensaios (A e B) de <i>clean-up</i> com cartucho de C18.....	110
Figura 27. Estrutura molecular das clorofilas a e b.....	110
Figura 28. Extratos obtidos após ensaio de <i>clean-up</i> com os solventes n-hexano (A) e diclorometano (B).....	111

Figura 29. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes solventes para <i>clean-up</i>	112
Figura 30. Extratos obtidos após ensaios de extração com solventes acidificados com 10% de ácido fórmico. Metanol (A) e água ultrapura (B).....	113
Figura 31. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes solventes de extração acidificados com ácido fórmico, (n=3).....	114
Figura 32. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes volumes de solução de ácido fórmico a 10%, (n=3).....	115
Figura 33. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes concentrações percentuais de solução de ácido fórmico, (n=3).....	116
Figura 34. Etapas do processo de preparo da amostra por maceração. A) amostra fortificada (0,01g), B) adição do adsorvente (0,1g), C) início da maceração e D) amostra homogeneizada.....	117
Figura 35. Espectros massas de molécula protonada (A) e íons fragmentos (B e C) do alcaloide harmina gerados a partir de análises em modo MS ^E no sistema UHPLC-ESI-QTOF em solução padrão (1) e extratos de folhas de tabaco verde (2).....	129
Figura 36. Cromatograma (1) de solução padrão conjunta dos alcaloides Norhamano (A) e harmano (B) e espectros de absorção na região do UV-Vis.....	152
Figura 37. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes materiais adsorventes (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	155
Figura 38. Estrutura química do adsovente Oasis HLB com destaque aos sítios ativos.....	156
Figura 39. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes para dessorção líquida (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	158
Figura 40. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes tempos dessorção líquida com recurso à ultrassom (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	159

Figura 41. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes velocidades de rotação no sistema de agitação por vórtex (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	160
Figura 42. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes tempos extração analítica. (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	161
Figura 43. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes valores de pH da solução amostral (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	162
Figura 44. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes condições de modificadores do meio amostral. (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.....	164
Figura 45. Eficiência de extração (%) da metodologia BA μ E otimizada após inclusão dos demais alcaloides estudados.com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 2.....	165
Figura 46. Eficiências de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes variáveis de otimização realizadas no Sistema 3.....	167
Figura 47. Sistema adaptado para coleta de fumaça primária de cigarro comercial.....	170
Figura 48. Solução de fumaça de cigarro antes (A) e após filtração com filtro membrana 0,22 μm (B).....	171
Figura 49. Solução de fumaça de cigarro antes (A) e após filtração com filtro membrana 0,22 μm (B).....	172
Figura 50. Espectros massas de molécula protonada (A) e íons fragmentos (B e C) dos alcaloides harmano e norharmano gerados a partir de análises em modo MS ^E no sistema UHPLC-ESI-QTOF em extrato de fumaça de cigarro obtido por BA μ E.....	173

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fórmula estrutural e nomenclatura dos alcaloides estudados.....	32
Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos alcaloides estudados.....	34
Tabela 3. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no sistema 1.....	76
Tabela 4. Parâmetros de <i>tunning</i> otimizados no espectrômetro de massas do sistema 1.....	77
Tabela 5. Parâmetros ajustados para o método de aquisição SRM no sistema 1.....	77
Tabela 6. Parâmetros de <i>tunning</i> otimizados no espectrômetro de massas do sistema 2.....	78
Tabela 7. Gradiente de eluição otimizado para análise cromatográfica no Sistema 1 com coluna analítica CSH Phenyl-Hexyl e fase móvel MeOH:H ₂ O.....	89
Tabela 8. Condições de análise da fonte de ionização ESI para o sistema 1.....	93
Tabela 9. Parâmetros de detecção otimizados no Sistema 1 para análises em modo SRM.....	95
Tabela 10. Intervalo de variação e condições otimizadas da fonte de ionização no sistema 2.....	98
Tabela 11. Estimativa de erro de massa experimental para detecção dos alcaloides pelo sistema 2.....	102
Tabela 12. Equação da reta e coeficiente de determinação dos alcaloides no intervalo de concentração de 1-1000 µg L ⁻¹	119
Tabela 13. Intervalo de concentração, equações das retas, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os alcaloides em estudo.....	121
Tabela 14. Eficiência de recuperação e coeficientes de variação do método µMSPD para determinação dos alcaloides em folhas de tabaco.....	123
Tabela 15. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método desenvolvido.....	125
Tabela 16. Identificação dos alcaloides, com erros de massa calculados, em amostras de tabaco por espectrometria de massas de alta resolução (Sistema 2) e análises em modo MS ^E	127

Tabela 17. Quantificação dos alcaloides identificados nas amostras de tabaco ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) preparadas pela metodologia $\mu\text{MSPD/UHPLC-ESI-QTOF}$..	128
Tabela 18. Comparação de diferentes metodologias de extração para determinação de alcaloides β -carbólicos.....	131
Tabela 19. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no Sistema 2....	148
Tabela 20. Parâmetros de <i>tunning</i> otimizados no espectrômetro de massas do Sistema 2.....	149
Tabela 21. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no Sistema 3....	149
Tabela 22. Composição química, especificações estruturais, e mecanismo de retenção avaliados no estudo de desenvolvimento do método de extração por BA μ E.....	154
Tabela 23. Resultados obtidos do processo de validação da metodologia de extração otimizada empregando BA μ E.....	169
Tabela 24. Erros de massa calculados para as m/z da molécula protonado e ions fragmentos dos alcaloides harmano e norharmano identificados no extrato de fumaça de cigarro obtido por BA μ E.....	174
Tabela 25. Comparação de diferentes metodologias de extração para determinação dos alcaloides harmano e norharmano em fumaça de cigarro.....	176

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μMSPD	Micro dispersão da matriz em fase sólida (<i>Micro-Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APCI	Ionização a pressão atmosférica (<i>Atmospheric pressure chemical ionization</i>)
ASE	Extração assistida por ultrassom (<i>Ultrasonic Assisted Extraction</i>)
AuE	Microextração adsortiva (<i>Adsorptive Microextraction</i>)
B _A	Branco da amostra
BA _μ E	Microextração adsortiva em barra (<i>Bar Adsorptive Microextraction</i>)
B _R	Branco dos reagentes
CC	Cromatografia em coluna
CE	Energia de colisão (<i>Collision Energy</i>)
CE	Eletroforese capilar (<i>Capillary Electrophoresis</i>)
CI	Cigarro industrializados
CID	Dissociação induzida por colisão (<i>Collision-Induced Dissociation</i>)
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLUE	Cromatografia líquida de ultra eficiência
CP	Cromatografia de papel
DAD	Detector de arranjo de diodos (<i>Diode Array Detector</i>)
DIA	Aquisição independente de dados (<i>Data-Independent Acquisition</i>)
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (<i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DMT	<i>N,N</i> -dimetiltriptamina
DW	Peso seco (<i>Dry weight</i>)
ESI	Ionização por eletrospray (<i>Electrospray ionization</i>)

ESI ⁺	Ionização por eletrospray em modo positivo (<i>Positive Electrospray ionization</i>)
EU-SANTE	<i>Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed</i>
FD	Detector de fluorescência (<i>Fluorescence Detector</i>)
FR	Fumo de rolo
FTC	Folhas de tabaco curada
FTV	Folhas de tabaco verde madura
GC	<i>Gas Chromatography</i>
h	Hora
HLB	<i>Hydrophilic-Lipophilic Balanced</i>
HPLC	<i>High Performance Líquid Chromatography</i>
HRL	Harmalina
HRM	Harmina
HRN	Harmano
HRO	Harmalol
ICH	Conferência Internacional sobre Harmonização (<i>International Conference on Harmonisation</i>)
iMAO	Inibidor da enzima monoamina oxidase
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial
IUPAC	União Internacional de Química Pura e Aplicada (<i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i>)
LCP	Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes
LD	Dessorção líquida (<i>Líquid Dessolvation</i>)
LLE	Extração Líquido-Líquido (<i>Liquid-liquid extraction</i>)
LOD	Limite de detecção (<i>Limit of detection</i>)
Log D	Log de coeficiente de partição octanol/água (Log Kow) para moléculas ionizáveis

Log Kow	Log de Coeficiente de distribuição octanol/água
LOQ	Limite de quantificação (<i>Limit of quantification</i>)
<i>m/z</i>	Relação massa-carga
MAO	Monoamina oxidase
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MeCN	Acetonitrila
MeOH	Metanol
MIP	Polímero com capacidade de reconhecimento molecular (<i>Molecularly Imprinted Polymer</i>)
MOF	Material metal-orgânicos (<i>Metal-Organic Frameworks</i>)
SRM	Monitoramento de reações selecionadas (<i>Selective reaction monitoring</i>)
MS	Espectrometria de massas (<i>Mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial (<i>Tandem mass spectrometry</i>)
MSPD	Dispersão da matriz em fase sólida (<i>Matrix Solid Phase Dispersion</i>)
n.d	Não detectado
NHR	Norharmano
pH	Potencial hidrogeniônico
pK_a	Constante de dissociação ácida
ppm	Parte por milhão
Q	Analizador de <i>m/z</i> do tipo quadrupolo (<i>Quadrupole</i>)
QqQ/TQD	Analizador de <i>m/z</i> do tipo triplo-quadrupolo
QTOF	Analizador de <i>m/z</i> híbrido do tipo quadrupolo–tempo-de-voo (<i>Quadrupole – time-of-flight</i>)
R	Coeficiente de correlação
R^2	Coeficiente de determinação
RAM	Material de acesso restrito (<i>Restricted Access Material</i>)
RCA	Razão dos coeficientes angulares

rpm	Rotação por minuto
RSD	Desvio padrão relativo (<i>Relative standard deviation</i>)
SA	Área superficial (<i>Superficial Area</i>)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i>)
SCP	Partículas de núcleo sólido (<i>Solid-Core Particles</i>)
SIM	Monitoramento de íon selecionado (<i>Selected Ion Monitoring</i>)
SLE	Extração sólido-líquido (<i>Solid–Liquid Extraction</i>)
SNC	Sistema Nervoso Central
SPE	Extração em fase sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração em fase-sólida (<i>Solid-Phase Microextraction</i>)
SPP	Partículas porosas superficiais (<i>Superficially Porous Particles</i>)
T _{Ebulição}	Temperatura de ebulição
T _{Fusão}	Temperatura de fusão
THH	Tetrahidroharmina
TOF	Tempo de voo (<i>Time of Flight</i>)
T _{Partícula}	Tamanho de partícula
T _{poro}	Tamanho de poro
TPP	Partículas totalmente porosas (<i>Totally Porous Particle</i>)
TPT	Triptamina
T _R	Tempo de retenção
u.a.	Unidade de absorbância
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra eficiência (<i>Ultra High Performance Liquid Chromatography</i>)
US-EPA	Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (<i>United States Environmental Protection Agency</i>)

US-FDA	Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (<i>United States Food and Drug Administration</i>)
UV-Vis	Ultravioleta-Visível
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais sobre a determinação de alcaloides indólicos e β-carbolínicos em tabaco.....	24
1.1 INTRODUÇÃO.....	24
1.2 Tabaco.....	25
1.3 Alcaloides	27
1.4 Técnicas de Microextração	35
1.4.1 Dispersão da Matriz em Fase Sólida.....	36
1.4.2 Microextração Adsorativa em Barra	39
1.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência.....	43
1.6 Validação de Método Analítico.....	45
1.6.1 Linearidade.....	46
1.6.2 Seletividade.....	47
1.6.3 Exatidão e Precisão.....	48
1.6.4 Limite de Detecção e Quantificação	50
1.7 REVISÃO DA LITERATURA.....	51
1.8 OBJETIVO GERAL	54
1.9 REFERÊNCIAS	55
 CAPÍTULO 2 – Determinação de alcaloides indólicos e β-carbolínicos em matrizes de tabaco por μMSPD/UHPLC-MS/MS.....	 72
2. INTRODUÇÃO.....	72
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	73
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS	74
2.2.1 Reagentes	74
2.2.2 Equipamentos.....	74
2.2.3 Obtenção e preparo das amostras	75
2.2.4 Processo de Liofilização das amostras	75
2.2.5 Preparo de soluções padrão dos alcaloides.....	75
2.2.6 Condições cromatográficas de análise e parâmetros de detecção por espectrometria de massas	76
2.2.6.1 Sistema 1 (UHPLC-ESI-TQD).....	76

2.2.6.2 Sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF)	78
2.2.7 Procedimento de extração por μ MSPD	79
2.2.8 Limpeza de materiais	79
2.2.9 Descarte de resíduos	80
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
2.3.1 Desenvolvimento das condições cromatográficas de análise	81
2.3.2 Otimização de condições de análise por espectrometria de massas	90
2.3.2.1 Otimização das condições de análise por ESI-TQD Waters (Sistema 1)	90
2.3.2.2.. Otimização das condições de análise por ESI-QTOF Waters (Sistema 2)	96
2.3.3 Desenvolvimento do procedimento de extração por μ MSPD	103
2.3.3.1 Avaliação da eficiência de adsorventes	105
2.3.3.2 Ensaios de limpeza da amostra	107
2.3.3.3 Otimização do procedimento de extração.....	115
2.3.4 Validação do método.....	118
2.3.4.1 Linearidade e Sensibilidade.....	118
2.3.4.2 Efeito Matriz.....	120
2.3.4.3 Exatidão e Precisão	121
2.3.4.4 Limites de detecção e quantificação	124
2.3.5 Análise de amostras de tabaco	125
2.4 CONCLUSÕES.....	132
2.5 REFERÊNCIAS	134

CAPÍTULO 3 – Determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em fumaça de cigarro por BA μ E/UHPLC-MS/MS.

3.1 INTRODUÇÃO.....	144
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	145
3.3 MATERIAIS E MÉTODOS	146
3.3.1 Reagentes	146
3.3.2 Equipamentos.....	146
3.3.3 Obtenção e preparo das amostras	147
3.3.4 Preparo de soluções padrão dos alcaloides.....	147

3.3.5	Condições cromatográficas de análise e parâmetros de detecção	148
3.3.5.1	Sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF)	148
3.3.5.1	Sistema 3 (HPLC-UV/DAD)	149
3.3.6	Procedimento de extração por BA μ E	150
3.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	151
3.4.1	Desenvolvimento das condições cromatográficas de análise	151
3.4.2	Desenvolvimento do procedimento de extração por BA μ E	153
3.4.2.1	Seleção do adsorvente	153
3.4.2.2	Retroextração	157
3.4.2.3	Microextração	159
3.4.2.3.1	Velocidade de Agitação	160
3.4.2.3.2	Tempo de Equilíbrio	161
3.4.2.3.3	Efeito do pH.....	162
3.4.2.3.4	Efeito da Força Iônica e Modificador Orgânico.....	163
3.4.2.4	Avaliação da eficiência do adsorvente Discovery DPA 6S por BA μ E	166
3.4.2.5	Validação do método	168
3.4.3	Aplicação em amostras fumaça de cigarro.....	170
3.5	CONCLUSÃO	177
3.6	REFERÊNCIAS	178
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	181
	APÊNDICE	183

CAPÍTULO 1

CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A DETERMINAÇÃO
DE ALCALOIDES INDÓLICOS E β -CARBOLÍNICOS EM
TABACO.

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais sobre a determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em tabaco.

1.1 INTRODUÇÃO

Nicotiana tabacum L. é uma planta que desperta interesse em pesquisas científicas devido a sua complexa e peculiar composição química que a coloca em destaque no que diz respeito aos seus impactos de produção e consumo no mundo. Estudos relacionados à identificação e teor de compostos que justifiquem a qualidade do tabaco para produção de cigarros e derivados, os efeitos e problemas associados a saúde quanto à prática do tabagismo, e ainda aspectos culturais e terapêuticos são constantemente apresentados à comunidade científica mundial. [1-4]

Sob o aspecto cultural, o consumo de tabaco em rituais místicos-religiosos é uma prática historicamente estabelecida. Religiões de origem indígena fazem uso do tabaco na busca de condições de alteração de estado de consciência, seja pelo hábito de fumar as folhas secas, seja em associação com bebidas vegetais, como a Ayahuasca. Tais condições psíquicas são decorrentes da presença de alcaloides na composição química do tabaco e bebidas, mais especificamente os alcaloides indólicos e β -carbolínicos, que atuam no organismo humano de maneira colaborativa; em que as β -carbolinas (e.g. harmano e norharmano) potencializam os efeitos alucinógenos do alcaloide indólico *N,N*-dimetiltryptamina. Outrossim, quanto às propriedades terapêuticas, pesquisas relatam a atividade destes alcaloides β -carbolínicos no tratamento de distúrbios neurológicos e condições psiquiátricas [5-7]

Embora seja bem estabelecido a correlação entre os alcaloides β -carbolínicos e indólicos com diferentes patologias do sistema nervoso, pesquisadores têm questionado se os teores desses compostos em tabaco são significativos para a promoção dos efeitos e benefícios supracitados [8]. Nesse contexto, estudos que assegurem a identificação e quantificação desses compostos em matrizes de tabaco apresentam-se como uma demanda científica contemporânea. Todavia, dada a complexa composição química do tabaco, torna-se imprescindível a aplicação de métodos analíticos de extração e instrumentais de análises precisos e sensíveis para a determinação em níveis de traços, e a aplicação de protocolos de validação que corrobore os resultados obtidos.

1.2 Tabaco

Tabaco é uma planta do gênero *Nicotiana* pertencente à família das solanáceas. Neste gênero existem cerca de 60 espécies, sendo *Nicotiana rustica* e *Nicotiana tabacum* as principais a serem cultivadas. É uma planta bastante adaptável a diferentes condições climáticas e solo e, portanto, encontrada já no Período Pré-Colombiano do leste do Canadá ao sul da Argentina; do Atlântico ao Pacífico e da Costa Noroeste da América do Norte à Cordilheira Aleutianas, no Alasca. [9,10]

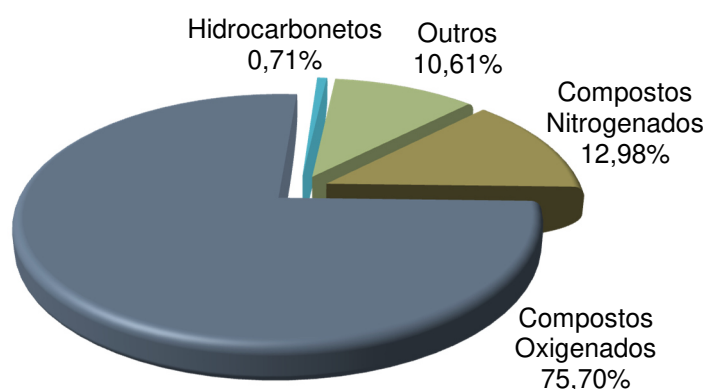
Desde a sua descoberta, relatos acerca do consumo do tabaco pelos povos ameríndios sempre foi vinculado a aspectos místicos, onde as folhas eram fumadas, cheiradas na forma de pó, mascaradas, associadas a bebidas, entre outros. Acreditava-se que o tabaco era uma planta sagrada pois permitia uma “comunicação com o sobrenatural”. Essa crença, no entanto, era evidenciada pelos estados de transe alcançados em rituais xamânicos devido aos efeitos psicoativos causados por substâncias presentes na planta. Mas outras funções também eram atribuídas ao tabaco; à época, era utilizado como um medicamento de incomparável eficácia em todos os estágios de tratamento de doenças, desde o diagnóstico à medicação. Devido aos seus efeitos analgésico, anestésico e antisséptico, era indicado para amenizar dores, curar feridas e queimaduras, combater germes, tratamento de asma, e até para higiene bucal. Fato que despertou nos europeus bastante curiosidade e interesse. [9,11,12]

Embora a sociedade ameríndia tivesse a sua disposição centenas de plantas e formulações com efeitos tanto alucinógenos como curativos, a exemplo da *Datura* e a *Ayahuasca*; o tabaco destacava-se ora no contexto religioso por causar efeitos de alteração de estados e visões (psicoativos) de curta duração e sem risco de vida, ora pelo abrangente uso medicinal; sendo, portanto, fatores cruciais para uma rápida propalação e ampla aceitação do consumo e cultivo por todo o mundo. [10]

Das crenças e rituais indígenas à intensa divulgação do seu caráter medicinal, o tabaco tornou-se a mais importante cultura agrícola não-alimentícia do planeta, com produção mundial de mais 7 milhões de toneladas em 2014; tendo como principais produtores a China, Brasil, Índia, Estados Unidos e Indonésia. O Brasil, embora seja o segundo maior produtor mundial, assume a liderança no critério exportação, e como consequência a 12ª posição no que diz respeito ao consumo de cigarro (tabagismo). [13,14]

O principal fator pelo qual o tabaco assumiu essa ampla proporção de consumo está associado à sua rica composição química. Rodgman e Perfetti (2013), estimaram que existem cerca de 5700 substâncias identificadas no Tabaco, distribuídas em diferentes classes químicas. Esse quantitativo inclui desde os compostos orgânicos e inorgânicos naturais a aditivos provenientes do plantio, processamento pós-colheita e industrialização e também aqueles compostos gerados via processos oxidativos, pirólise, entre outros presentes na fumaça e material particulado; conforme pode ser visto na Figura 1. [15]

Figura 1. Distribuição e composição química aproximada do tabaco.



FONTE: Adaptado de *The Chemical Components of Tobacco and Tobacco Smoke*. [7]

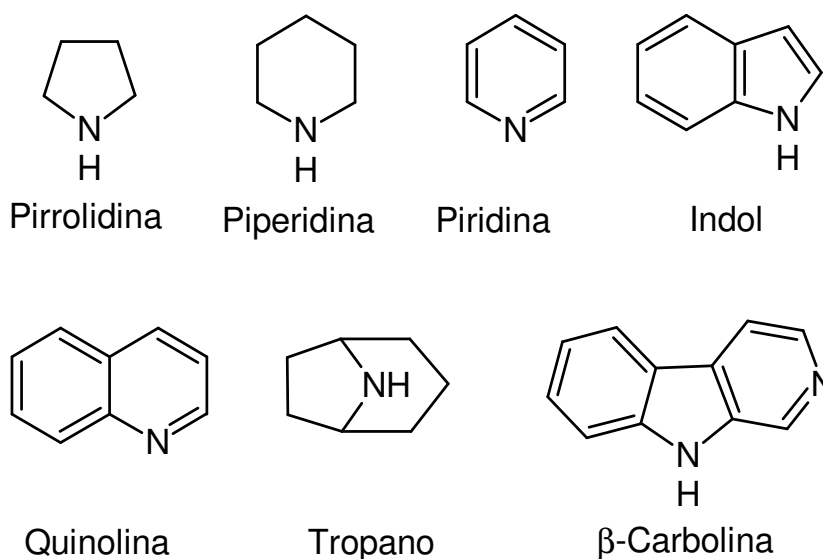
Não obstante a vasta diversidade de substâncias químicas, os compostos nitrogenados assumem importante papel na composição química do tabaco no que diz respeito aos efeitos que elevaram esta *commodity* a destaque mundial. A classe dos alcaloides assume a representação deste grupo de compostos, apesar de não serem os majoritários (cerca de 2%), tendo a nicotina como protagonista: uma substância que atua no organismo como um potente estimulante do sistema nervoso central provocando estímulos semelhantes à cocaína, anfetaminas ou metanfetamínas e desenvolvendo nos usuários elevados índices de dependência. [15 16]

1.3 Alcaloides

Em uma abordagem abrangente, alcaloides são metabólitos secundários constituídos por compostos heterocíclicos nitrogenados, de caráter básico, derivados de aminoácidos, que apresentam significativa atividade biológica e/ou toxicidade e são encontrados em uma grande variedade de fontes naturais, como plantas (majoritariamente), micro-organismos, animais e humanos. [17-20]

Diferentes abordagens têm sido utilizadas com a finalidade de classificar os alcaloides, tais como: taxonomia, estrutura química, atividade biológica, biossíntese, metabolismo, entre outros. No que diz respeito à estrutura química, toma-se como parâmetro o núcleo (esqueleto) que compõe o composto, tipicamente um anel heterocíclico nitrogenado, classificando-os em diferentes grupos: isoquinolina, indol, quinolina, pirrolidona, tropano, β -carbolinas etc. A Figura 2 apresenta alguns núcleos comuns de alcaloides. [17]

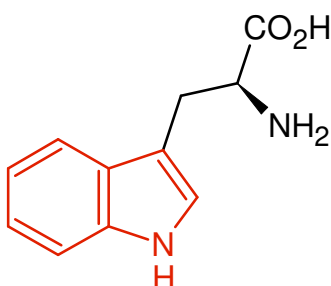
Figura 2. Exemplos de núcleos comuns de alcaloides.



FONTE: Adaptado de *The Biochemistry of Alkaloids*. [17]

Esses esqueletos estruturais, que dão origem e classificam os alcaloides, têm como precursores os aminoácidos aromáticos presentes nos organismos vivos e são obtidos a partir de diferentes rotas Biosintética. O L-triptofano (Figura 3), por exemplo, é o aminoácido precursor das classes de alcaloides indólicos, β-carbolinas, quinolina, pirrolidona e ergotamina; uma vez que possui em sua estrutura o heterociclo indol comum a essas classes. [13,14]

Figura 3. Estrutura química do aminoácido L-Triptofano.



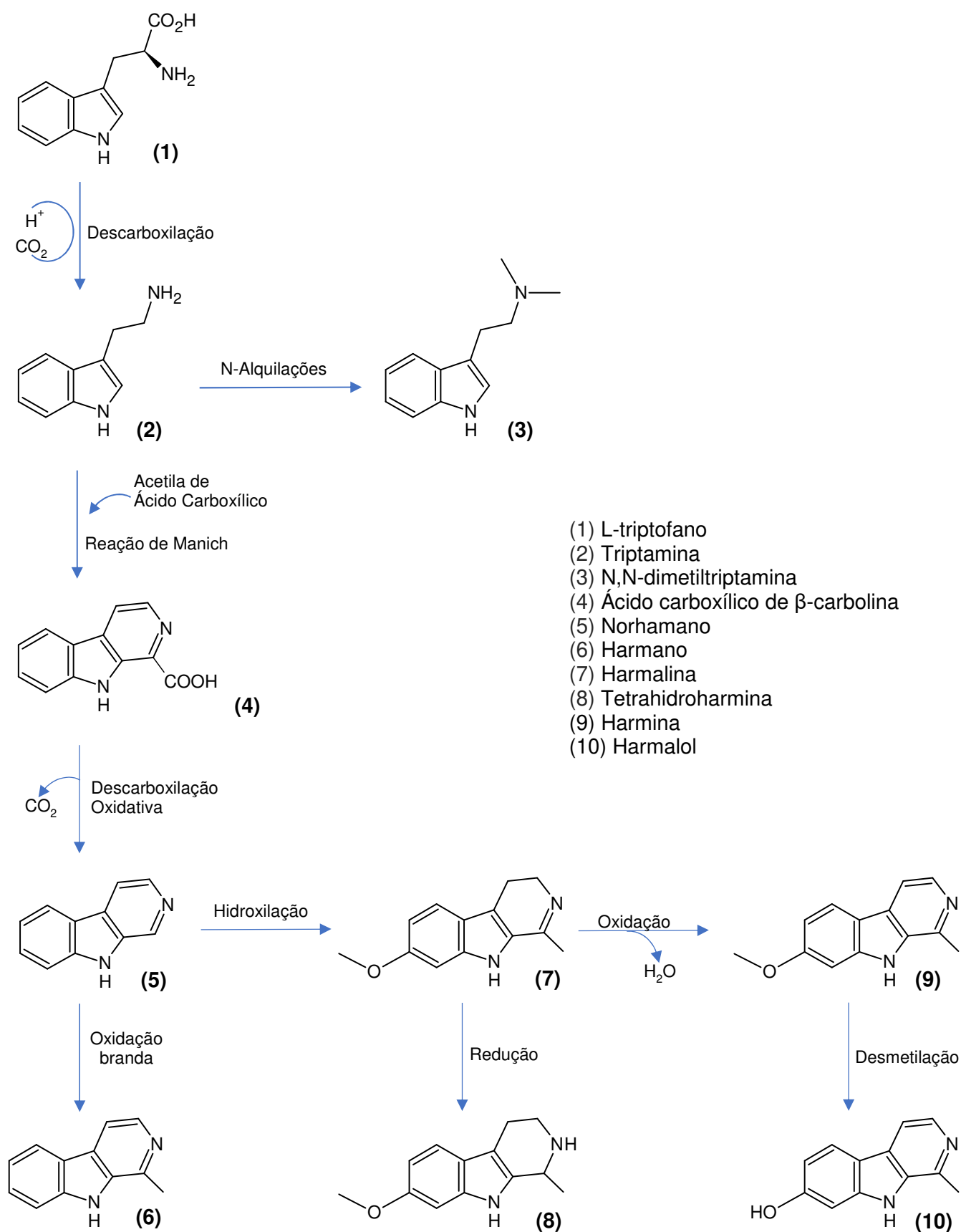
Alcaloides indólicos e β -carbolínicos, provenientes da rota metabólica do precursor L-triptofano, são extensivamente encontrados em diferentes organismos, desde plantas, fungos, insetos, animais marinhos, mamíferos, bem como tecidos humanos e fluidos corporais; e amplamente mencionados na literatura por sua extensa atividade bioquímica e múltiplas funções farmacológicas em animais e humanos. Pesquisas destacam os seus efeitos no Sistema Nervoso Central (SNC), suas potenciais atividades sedativa, ansiolítica, antitumoral, anticancerígena e antiviral, dentre outros; o que os colocam em posição de destaque para estudos em diferentes áreas da ciência. [2, 23-26]

Essa classe de alcaloides, no organismo humano, apresenta a mesma ação do grupo de fármacos denominados inibidores da enzima monoamina oxidase (iMAO), os quais são prescritos para o tratamento de distúrbios neurológicos, como doenças de Parkinson e Alzheimer, e condições psiquiátricas como depressão, pois tem a capacidade de bloquear de maneira reversível a ação daquela enzima, promovendo o aumento nos níveis cerebrais de aminas biogênicas (noradrenalina e serotonina) e neurotransmissores (dopamina), responsáveis pelas sensações de bem estar e excitação, antagônicos àqueles distúrbios e condição psiquiátrica. [27-30]

É bem estabelecido que a atividade da monoamina oxidase (MAO) é reduzida no organismo de fumantes. Uma vez que as enzimas MAO metabolizam a dopamina, a sua inibição favorece a absorção de nicotina por neurotransmissores específicos, levando à dependência química. Alerta-se que a inibição de MAO em fumantes possa ser proveniente de efeitos aditivos ou sinérgicos de várias substâncias derivadas do tabaco; a exemplo do harmano que atua como um inibidor específico da MAO A e norharmano como um inibidor não específico da MAO A e MAO B. Neste contexto, estudos com foco na identificação e atividade destas substâncias tornam-se essenciais como possível respaldo das evidências relacionadas aos efeitos indutores do tabagismo. [27,30,31]

A Figura 4 apresenta um esquema com a rota biosintética de formação dos alcaloides alvo de estudo com as principais reações envolvidas a partir do precursor *L-triptofano* (1). A descarboxilação do precursor produz a *Triptamina* (2), que por sua vez pode ser convertida a *N,N-dimetiltriptamina* (3) a partir de duas reações consecutivas de N-alkilação a partir da N-metiltransferase. Por outro lado, o C-2 do núcleo indol na triptamina se comporta como nucleófilo, devido ao átomo de nitrogênio adjacente, permitindo que ele participe de uma reação do tipo Mannich/Pictet-Spengler. Estes rearranjos propiciam que uma base de Schiff derivada da triptamina interaja com um aldeído ou cetoácido para produzir o *ácido carboxílico de β -carbolina* (4) que, a partir de uma descarboxilação oxidativa, origina *norhamano* (5). Na formação de estruturas simples de β -carbolina também são utilizados cetoácidos, em que a partir de uma oxidação branda ocorre a conversão em *harmano* (6) ou partir de uma hidroxilação a formação da *harmalina* (7). A oxidação da harmalina com a perda de molécula de água, por sua vez, gera *harmina* (9) enquanto a redução produz a *tetrahidroharmina* (8). A desmetilação da harmina dá origem ao alcaloide *harmalol* (10). [32,33]

Figura 4. Rota biossintética de formação dos alcaloides alvo de estudo.



FONTE: Adaptado de Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach e Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes. [32,33]

Informações estruturais e nomenclaturas destes compostos são apresentadas na Tabela 1, e as propriedades físico-químicas são mostradas na Tabela 2.

Tabela 1. Fórmula estrutural e nomenclatura dos alcaloides estudados.

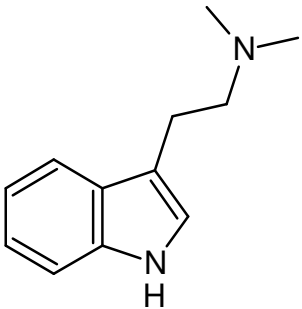
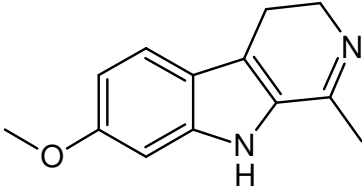
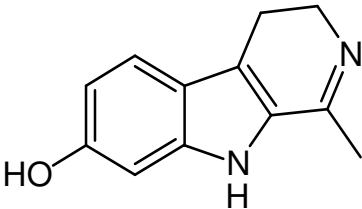
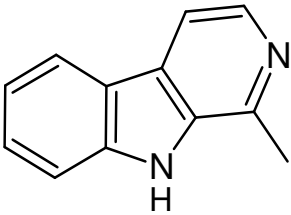
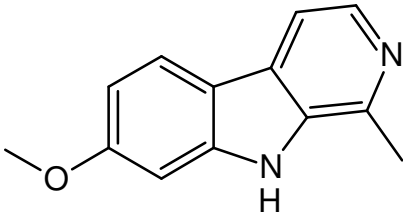
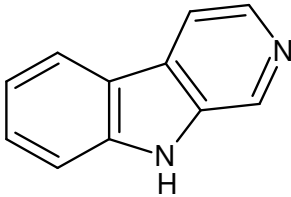
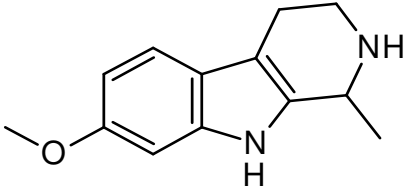
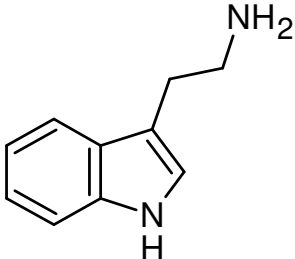
Composto	Nomenclatura Comum	Nomenclatura IUPAC
	<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)- <i>N,N</i> -dimetiletanamina
	Harmalina	7-metoxi-1-metil-4,9-dihidro-3 <i>H</i> - β -carbolina
	Harmalol	1-metil-4,9-dihidro-3 <i>H</i> - β -carbolin-7-ol
	Harmano	1-metil-9 <i>H</i> - β -carbolina
	Harmina	7-metoxi-1-metil-9 <i>H</i> - β -carbolina

Tabela 1 – Continuação.

	Norharmano	9 <i>H</i> - β -carbolina
	Tetrahydroharmina	7-metoxi-1-metil-2,3,4,9-tetrahidro-1 <i>H</i> - β -carbolina
	Triptamina	2-(1 <i>H</i> -indol-3-il)etanamina

FONTE: MarvinSketch, 6.3.0, 2014. [34]

Tabela 2. Propriedades físico-químicas dos alcaloides estudados.

Composto	Fórmula Molecular	Massa Molar (g mol ⁻¹)	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a3}	T. Ebulição (°C)	T. Fusão (°C)	Log D ^a (pH 3 / pH 6/ pH 10)
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	C ₁₂ H ₁₆ N ₂	188,2688	9,55	17,16	-	332	58	-4,19 / -1,25 / 2,17
Harmalina	C ₁₃ H ₁₄ N ₂ O	214,2631	7,96	14,95	-	120-140	238	-3,29 / -0,30 / 1,66
Harmalol	C ₁₂ H ₁₂ N ₂ O	200,2365	7,89	9,53	15,96	423	212	-3,38 / -0,39 / 0,92
Harmano	C ₁₂ H ₁₀ N ₂	182,2212	5,97	13,72	-	339	235	-0,97 / 1,72 / 2,00
Harmina	C ₁₃ H ₁₂ N ₂ O	212,2472	6,15	13,54	-	421	256	-1,30 / 1,46 / 1,85
Norharmano	C ₁₁ H ₈ N ₂	168,1946	5,28	13,22	-	349	199	-0,41 / 1,80 / 1,87
Tetrahydroharmina	C ₁₃ H ₁₆ N ₂ O	216,2789	9,11	16,30	-	399	199	-4,22 / -1,26 / 1,80
Triptamina	C ₁₀ H ₁₂ N ₂	160,2157	9,73	17,17	-	318	114 - 119	-5,04 / -2,25 / 1,30

^a - Log de coeficiente de distribuição octanol/água (Log Kow) para moléculas ionizáveis.

FONTE: Buckingham *et al.*, 2010, MarvinSketch, 6.3.0, 2014. MarvinView, 6.3.0, 2014, Fattorusso & Tagliatela-Scafati, 2007. [18, 34-36]

1.4 Técnicas de Microextração

A busca por metodologias analíticas de extração que possibilitem a identificação e quantificação de substâncias de origem natural e/ou antropogênica com elevada seletividade em amostras complexas é alvo recorrente de intenso estudo. Essa necessidade de pesquisa por sua vez é justificada ao passo em que a evolução das instrumentações analíticas, cada vez mais sensíveis, preceitua amostras processadas livres de interferências.

Nos últimos anos, as técnicas de preparo de amostra para a determinação de compostos orgânicos em amostras ambientais e alimentos vêm sendo progressivamente substituídas por técnicas miniaturizadas, denominadas técnicas de microextração, que são caracterizadas pelo uso de pequenas quantidades de amostra, uso reduzido/ausência de solventes tóxicos, boa relação custo-benefício, maior seletividade e especificidade de extração, além de possibilitar a automação. Essa tendência acompanha os preceitos da química analítica verde, que tem como principal objetivo a redução/eliminação de ativos poluidores do meio ambiente e/ou a implementação de materiais alternativos que possuem pouca ou nenhuma toxicidade à saúde humana. [37-42]

De modo geral, o surgimento das metodologias de extração miniaturizadas decorre de otimizações aplicadas às técnicas clássicas. Como exemplos relevantes, têm-se a microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - *Dispersive liquid-liquid microextraction*), que possibilitou a expressiva redução de solventes orgânicos utilizados no processo de extração líquido-líquido (LLE - *Liquid-liquid extraction*); e a microextração em fase-sólida (SPME - *Solid-phase microextraction*) que tem como base os princípios da extração sólido-líquido (SLE - *Solid-Liquid Extraction*) [43,44]. Destarte, gradativamente novos protocolos analíticos de extração miniaturizados são apresentados na literatura científica de preparo de amostras, dentre eles a micro dispersão da matriz em fase sólida (μ MSPD - *Micro-matrix solid phase dispersion*) e microextração adsortiva em barra (BA μ E - *Bar adsorptive microextraction*).

1.4.1 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

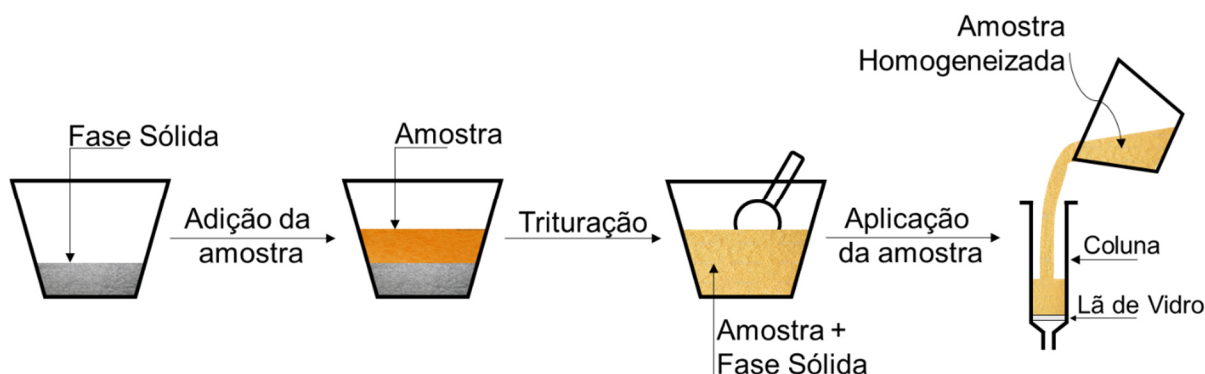
A técnica denominada Dispersão da matriz em fase sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion* (MSPD), foi apresentada à comunidade científica em 1989 por Barker e colaboradores como uma técnica alternativa de isolamento de drogas e metabólitos em tecidos biológicos, caracterizados pelos altos teores de proteínas, lipídios ou matéria orgânica e que exigiam exaustivos procedimentos experimentais. O seu desenvolvimento foi baseado nos princípios da extração em fase sólida (SPE – *Solid Phase Extraction*). [45]

O uso da SPE, embora seja amplamente aplicada no isolamento de uma grande variedade de classe de compostos, apresenta uma limitação quanto às amostras estudadas: é aplicada exclusivamente àquelas que se encontram no estado líquido. Logo, para o estudo de amostras sólidas é imprescindível a adição de processos preliminares que a tornem adequadas para tal aplicação, como por exemplo a adição de reagentes (ácidos, bases, solventes orgânicos) ou pré-extração com Soxhlet, ultrassom ou micro-ondas, a fim de promover o rompimento da estrutura da matriz. [46]

Com o desenvolvimento da MSPD, no entanto, uma nova alternativa de extração permitiu a simplificação e/ou eliminação daquelas etapas consideradas trabalhosas e dispendiosas em estudos de amostras sólidas, semissólidas e/ou altamente viscosas de origem biológica (tecidos, frutas, plantas etc.). [47]

O princípio fundamental da MSPD consiste no rompimento da matriz da amostra a partir da homogeneização com um suporte sólido que age como um abrasivo. Uma vez misturados, obtém-se uma fase mista em que matriz e os analitos encontram-se distribuídos na superfície do adsorvente por meio de diferentes mecanismos de interação. Este processo permite o preparo, purificação e extração em uma única etapa. A Figura 5 ilustra o esquema de homogeneização da amostra com o suporte sólido. Nesta etapa, a escolha do suporte sólido, a proporção amostra:suporte e o tempo de trituração são fatores importantes para uma adequada extração dos analitos da amostra. [48]

Figura 5. Processo de homogeneização da amostra com suporte sólido e montagem do cartucho de extração.



FONTE: Elaborada pelo autor.

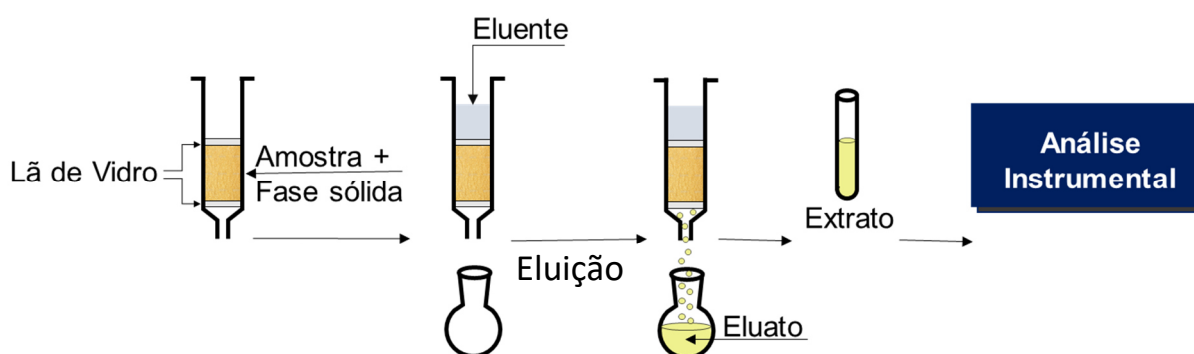
A escolha do suporte sólido é baseada em informações a respeito dos analitos e da matriz; portanto sua natureza química é importante no processo de extração, de modo que a presença de sítios ativos presentes no suporte possam interagir com os analitos ou com os compostos provenientes da amostra. Isto definirá o mecanismo a ser empregado: adsorção, partição, troca iônica, exclusão por tamanho etc. [49]

Adsorventes comercialmente disponíveis em cartuchos de SPE, como sílica, alumina, C18 e Florisil são rotineiramente utilizados em MSPD, todavia a utilização de materiais como polímeros, nanotubos de carbono, zeólitas, materiais metal-orgânicos (MOFs- *Metal-Organic Frameworks*), polímeros com capacidade de reconhecimento molecular (MIPs - *Molecularly Imprinted Polymers*), líquidos iônicos, grafeno, materiais de acesso restrito (RAMs - *Restricted Access Materials*) têm se destacado na literatura. [50-53]

A proporção amostra:suporte e o tempo de trituração para dispersão são fatores que devem ser estabelecidos no processo de extração por MSPD, posto que ambos influenciam na qualidade da dispersão da amostra. A obtenção de uma fase homogênea, seca e em finas partículas são indicativos de uma eficiente abertura da amostra. Uma vez homogeneizada, a amostra é quantitativamente transferida para um cartucho de eluição e empacotada. [48]

Em uma etapa posterior, é realizada a eluição da amostra com solvente, o qual deverá ser cuidadosamente selecionado, pois deve eluir preferencialmente o(s) analito(s), mas não permitir a eluição dos interferentes da matriz. O ideal é que a eluição seja realizada com um pequeno volume de solvente, de modo que a solução coletada já se encontre em concentração apropriada para a realização da análise instrumental; entretanto, em alguns casos, medidas adicionais são necessárias no auxílio da remoção de interferentes, como o uso de colunas auxiliares, ou conectando-se uma segunda coluna no próprio processo de MSPD [55,56]. A Figura 6 ilustra a etapa de eluição da amostra.

Figura 6. Etapa de eluição da amostra em MSPD para posterior análise instrumental.



FONTE: Elaborada pelo autor.

A MSPD tem apresentado uma grande aplicabilidade, pois minimiza a maioria das complicações encontradas em técnicas de extração como a extração líquido-líquido convencional, que exige grandes volumes de solventes, ou extração em fase sólida, em que a amostra deve estar em fase líquida [47,54]. No que diz respeito à aplicação desta técnica à extração de alcaloides, um discreto número de metodologias é notado frente aos exaustivos protocolos clássicos. Gaujac *et al.*, 2012, obtiveram êxito na extração do alcaloide *N,N*-dimetilriptamina da casca de caule de *M. tenuiflora* utilizando Florisil como agente dispersante e *n*-hexano como solvente de extração sem a necessidade de etapas de *clean-up*. Minaleshewa *et al.*, 2013, otimizaram uma

metodologia para determinação de alcaloides da classe de fenilpropilamino em folhas de Khat, obtendo resultados semelhantes aos obtidos quando utilizado procedimentos de extração assistida por ultrassom (ASE - *Ultrasonic Assisted Extraction*) seguida por SPE (ASE-SPE) e SLE seguida por LLE (SLE-LLE). [56,57]

O processo de miniaturização da técnica de MSPD é estabelecido quando metodologias com o uso reduzido de amostra, adsorvente e solvente de extração asseguram resultados de extração com eficiência e sensibilidade equivalentes às tradicionais. Llompart *et al.*, 2013, são pioneiros na utilização da dispersão da matriz em fase sólida miniaturizada (μ MSPD); na ocasião obtiveram êxito na extração de componentes químicos de cosméticos com apenas 0,1 g de amostra e 1,0 mL de solvente de extração. A partir de então, novas metodologias têm sido apresentadas, com aplicabilidade em amostras de produtos de beleza, frutas, plantas, fluidos biológicos e moluscos marinhos. [58-64]

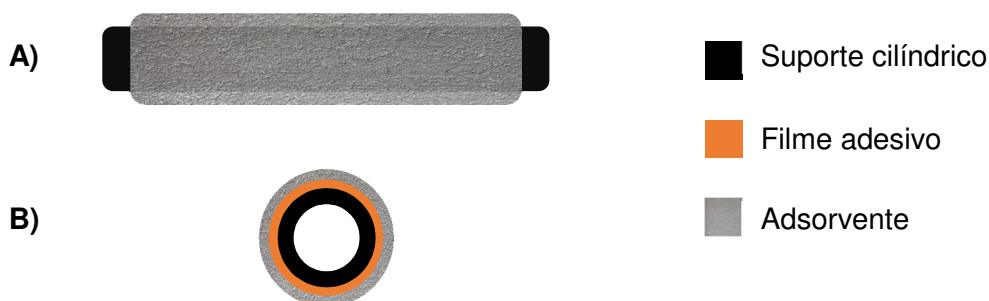
1.4.2 Microextração Adsorptiva em Barra

Microextração adsorptiva em barra (BA μ E) é uma técnica de extração analítica que foi idealizada por Nogueira *et al.*, 2010, com a premissa de compensar a principal limitação da técnica de extração sortiva em barra de agitação (SBSE - *Stir Bar Sorptive Extraction*): a ausência de dispositivos (barras magnéticas) revestidos com fases aptas à extração de compostos orgânicos de natureza polar ($\log K_{o/w} < 3$) em meio aquoso. [65]

BA μ E foi projetada sob os princípios da microextração adsorptiva (A μ E – *Adsorptive microextraction*) com mecanismo de amostragem estática por flutuação. Para tanto, utiliza-se dispositivos analíticos construídos a partir da deposição de materiais adsorventes em tubos cilíndricos de composição inerte e reduzida densidade (e.g. polipropileno e polietileno) revestido com material adesivo, comumente nas dimensões de 7,5 ou 15 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro externo, acumulando de 1 - 5 mg de adsorvente (Figura 7). No que diz respeito à

estabilidade, estes dispositivos possuem apreciável robustez, assegurando eficiência de extração e integridade das fases adsorvidas sob variadas condições de operação, tais como: pH, salinidade, temperatura, solventes orgânicos, agitação e até irradiação de ultrassom. Assim, a reutilização desses dispositivos pode ser ponderada, dependendo da complexidade da matriz, do tipo de solutos alvo, das condições experimentais impostas, assim como das fases adsorventes selecionadas. [65-67]

Figura 7. Ilustração de dispositivo de extração BA μ E. A) Vista lateral, B) Vista frontal.



FONTE: Elaborada pelo autor.

Considerando a simplicidade do processo de elaboração da barra de extração, executada *lab-made*, BA μ E apresenta como vantagem a possibilidade de selecionar a fase adsorvente mais adequada às propriedades dos analitos alvo de estudo de modo a obter o máximo de eficiência de extração. Características como reduzidos tamanho de partícula, área superficial e tamanho de poros são essenciais para obtenção de dispositivos com alta capacidade de adsorção; assim, polímeros quimicamente modificados, carvão ativado, MIPs e nanotubos de carbono têm mostrado resultados satisfatórios para um amplo espectro de compostos. [68-75]

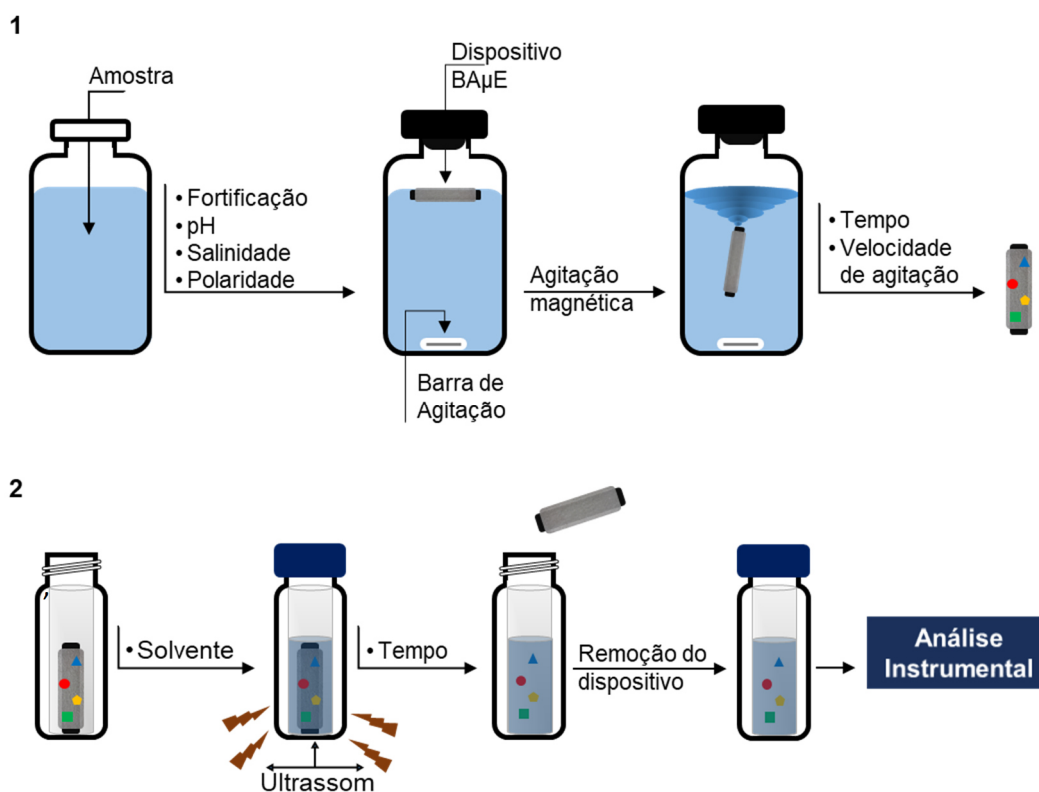
O ciclo analítico da BAμE é dividido, basicamente, em duas etapas: extração e retroextração. Ambas possuem relevância equivalente para a eficiência da técnica e, portanto, estudos de otimização durante o desenvolvimento do método são indispensáveis. [67]

A etapa de extração consiste em promover a migração dos analitos do seio da amostra para o dispositivo de extração. Sob este aspecto, prioritariamente são realizados ensaios com foco na escolha da fase adsorvente mais seletiva aos analitos alvo de estudo. Tendo em vista que o processo de migração acontece por difusão molecular em condições de equilíbrio e que, idealmente, o dispositivo de extração deve permanecer sob flutuação no centro do frasco de amostragem, parâmetros cinéticos como tempo de extração e velocidade de agitação são indispensavelmente avaliados. A agitação é promovida com recurso à adição de uma barra de agitação magnética ao frasco de amostragem, em que o movimento circular contínuo desencadeia a formação de um *vórtex* e mantém o dispositivo de extração centralizado; além de direcionar a difusão do analitos no mesmo sentido. [67, 76-78]

Parâmetros termodinâmicos como pH, força iônica e polaridade da amostra também são avaliados durante a otimização da etapa de extração, e são definidos sob condições em que o equilíbrio de adsorção dos analitos seja favorecido. Quando deseja-se extrair compostos ionizáveis, o ajuste de pH da matriz torna-se uma variável importante; haja visto que, para estes compostos, a solubilidade no meio amostral e/ou afinidade ao adsorvente são afetadas pela forma em que se encontram (ácida, neutra ou básica). Pelos mesmos critérios, a força iônica e a polaridade podem atuar como facilitadores do processo de interação entre os analitos e adsorvente; seja em decorrência do efeito *salting-out* que, de modo geral, promove a redução da solubilidade dos compostos orgânicos na matriz aquosa, seja pela eliminação do fenômeno denominado *wall-effect*, em que os analitos adsorvem à parede de vidro do frasco de amostragem. [67, 76-78]

A etapa de retroextração é realizada, posteriormente, com a finalidade de dessorver quantitativamente os analitos em um solvente adequado à análise instrumental. Para tanto, toma-se como recurso o processo de dessorção líquida (LD – *Liquid Dessolvation*), no qual o dispositivo de extração, após ser retirado do frasco contendo a amostra e seco, é inserido em um *vial* ou *insert* contendo solvente e submetido a tratamento ultrassônico e/ou agitação por vórtex. Variáveis como tipo de solvente e tempo de dessorção são rotineiramente avaliadas. Via de regra, define-se como volume de solvente ideal aquele suficiente para manter o dispositivo integralmente submerso (0,1 – 1,5 mL); no entanto também é passível de otimização. A abordagem de retroextração por LD apresenta a vantagem de poder ser combinada com variados sistemas de análise instrumental, incluindo a cromatografia gasosa (GC – *Gas Chromatography*), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*), a eletroforese capilar (CE – *Capillary Electrophoresis*) ou mesmo técnicas hífenadas (e.g. GC-MS, LC-MS etc.) [65,67,78]. A Figura 8 esquematiza o ciclo analítico da BA μ E.

Figura 8. Ciclo analítico da BA μ E. 1) Extração, 2) Retroextração.



FONTE: Elaborada pelo autor.

1.5 Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

A cromatografia líquida de ultra eficiência (CLUE, ou UHPLC - *Ultra High Performance Liquid Chromatography*) é uma evolução da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE, ou HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*) que preserva os princípios fundamentais originários: processo físico-químico baseado no equilíbrio entre duas fases (estacionária e móvel) para promover a separação de misturas de compostos. A particularidade desta evolução, no entanto, está associada ao uso de colunas com partículas de diâmetros menores que 2 μm e instrumentação que permite operar com altas pressões da fase móvel; destacando-se, assim, como uma das mais poderosas técnicas de separação para a análise de misturas complexas. [79-81]

A principal motivação para o desenvolvimento de cromatógrafos cada vez mais robustos e eficientes foi sustentada na busca por análises mais rápidas e com melhores desempenhos (*e.g.* alta sensibilidade e resolução). Neste sentido, dado o relevante destaque que colunas cromatográficas assumem para a capacidade de separação analítica, abrangentes estudos aplicados à inovação destes dispositivos são apresentados. Dentre eles, o desenvolvimento de novos materiais e a redução do tamanho das partículas para a fase estacionária, bem como a redução nas medidas das colunas. [80]

Colunas compostas por fases estacionárias com partículas inferiores a 2 μm mostraram resultados bastante satisfatórios para a redução do tempo de análise sem prejuízo de eficiência cromatográfica, promovendo perfis de separação de compostos com elevada resolução e seletividade. Tais resultados são respaldados à luz da teoria extraída da Equação de Van Deemter, que vincula o critério de eficiência das colunas cromatográficas ao tamanho de suas partículas. Assim, diferentes materiais destinados à essa necessidade têm sido desenvolvidos e ofertados comercialmente, a exemplo das partículas porosas superficiais (SPP - *Superficially Porous Particles*), partículas totalmente porosas (TPP - *Totally Porous Particle*), monolitos, partículas coloidais submicrônicas, partículas de nanodiamantes, partículas de núcleo sólido (SCP - *Solid-Core Particles*) entre outros, os quais abrangem variados mecanismos de separação. [82-86]

Com a introdução de fases estacionárias com partículas reduzidas, inúmeras adaptações instrumentais tornaram-se imprescindíveis para assegurar a eficiência de separação almejada e a possibilidade de implementação dessa nova modalidade de cromatografia; dentre elas, destacam-se: a redução do tamanho das colunas (comprimento e diâmetro interno) para compensar o acréscimo da pressão resultante no sistema, a construção de bombas mais potentes para promover a eluição da fase móvel sob condições de pressão superiores (≥ 15.000 Psi) às comumente observadas por HPLC, e o desenvolvimento de detectores capazes de adquirir e processar dados suficientemente rápido para serem compatíveis com os picos estreitos resultantes destas análises cromatográficas.[87-88]

No que diz respeito aos detectores para sistemas UHPLC, o acoplamento da espectrometria de massas é bem consolidado dado a existência de espectrômetros com capacidade de operar em baixos tempos de residência (*dwell time*), de troca de canal (*inter-channel delay*) e de varredura (*inter-scan delay*) de tal forma que forneçam uma quantidade de pontos suficientes para a construção do pico cromatográfico e assegurem identificação e quantificação altamente sensíveis. Determinadas configurações de espectrômetros de massas são favoráveis ao acoplamento com UHPLC, dentre os quais destacam-se as fontes de ionização a pressão atmosférica (ESI - *Electrospray ionization* e APCI - *Atmospheric pressure chemical ionization*) e os analisadores de m/z do tipo triploquadrupolo (QqQ ou TQD), tempo de voo (TOF – *Time of Flight*) e orbitrap, além de configurações híbridas como a quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF), de modo que a plataforma UHPLC–MS/MS tem sido empregada com sucesso na última década para vários tipos de aplicações (bioanálise, metabolismo de drogas, triagem de múltiplos resíduos, metabolômica, biofármacos e compostos polares), a exemplo do recente estudo desenvolvido por Jeong et al., 2018, que desenvolveram uma metodologia por UHPLC-ESI-QTOF para identificação e quantificação de alcaloides indólicos em *Catharanthus roseus*. [82,88,90]

1.6 Validação de Método Analítico

Após o desenvolvimento de um método analítico e antes de sua aplicação na análise de amostras reais e/ou implementação em processos de rotina, é fundamental que seja submetido à avaliação de diferentes parâmetros de qualidade, de modo a assegurar que nas condições em que será aplicado, fornecerá informações que expressem resultados confiáveis. Este processo de avaliação é denominado validação. Segundo Ribani, 2004, a validação de um método analítico é definida como um processo contínuo de avaliação, desde a etapa de planejamento, passando pelo desenvolvimento e coleta de dados, até o monitoramento constante da aplicação e transferência deste; de modo que, quando bem definido, oferece evidências objetivas de que o método é adequado para o uso desejado. [91-95]

A importância da validação no desenvolvimento de métodos analíticos é assumida cientificamente na ocasião em que se nota um crescente número de publicações científicas, revisões e normativas institucionais padronizadas, tanto de natureza universal quanto setorial, dedicadas à abordagem da certificação dos procedimentos estabelecidos para diferentes finalidades (e.g. pesticidas, drogas, fármacos etc.). As normativas institucionais, normalmente desenvolvidas por agências de controle governamentais, são importantes documentos que visam agrupar e padronizar os diferentes parâmetros inerentes ao processo de validação; a exemplo da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) e Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) na esfera nacional, e Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (US-EPA - *United States Environmental Protection Agency*), Agência de Administração de Drogas e Alimentos dos Estados Unidos (US-FDA - *United States Food and Drug Administration*), Guia de Procedimentos de Controle de Qualidade Analítica e Validação de Métodos para Análises de Resíduos e Pesticidas em Alimentos da União Europeia (EU-SANTE - *Analytical Quality Control and Method Validation Procedures for Pesticides Residues Analysis in Food and Feed*), Conferência Internacional sobre Harmonização (ICH - *International Conference on Harmonisation*), União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*) e Organização Mundial da Saúde (WHO - *World Health Organization*) no âmbito internacional. [92, 95-104]

Diferentes parâmetros podem ser aplicados durante o processo de validação, os quais visam diminuir ou controlar os fatores que levam à imprecisão ou inexatidão de um dado gerado. Embora cada normativa estabeleça os seus critérios de aceitabilidade, o que leva a discrepâncias tanto de procedimento quanto de terminologia; de modo geral, os parâmetros linearidade, seletividade, exatidão, precisão, robustez, limite de detecção e limite de quantificação, são comumente contemplados durante a certificação de um método analítico. [95]

1.6.1 Linearidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do composto estudado dentro de uma determinada faixa de concentração. Pode ser determinada a partir da relação matemática entre o sinal medido e a concentração ou massa da espécie de interesse, geralmente obtida por uma equação de reta, $y = ax + b$, denominada curva analítica, com a qual é possível calcular o coeficiente de correlação (R) ou o coeficiente de determinação (R^2), que são parâmetros que permitem uma estimativa da qualidade da curva. A ANVISA recomenda um coeficiente de correlação igual a 0,99, enquanto o INMETRO aceita valores acima de 0,90. [92,96,97]

Para elaboração de um gráfico de linearidade, é prudente considerar os seguintes critérios: O tipo de amostras de calibração (solvente ou extrato da matriz), o número de níveis de concentração, o intervalo de concentrações (a razão entre os níveis limites de concentração do analito) e a distribuição dos pontos ao longo da linha de calibração e também o protocolo de medição, ou seja, a ordem e a quantidade de medidas de cada solução. Via de regra, recomenda-se a análise de no mínimo 5 concentrações do(s) analito(s), com variação equidistante das concentrações, preparadas em solvente e/ou extrato da matriz a partir de diluições independentes, e análises em replicatas e randômicas. [95]

Além da análise do coeficiente de correlação, ou determinação, para conclusões a respeito da qualidade da linearidade do método, é possível também estimar o grau de sensibilidade analítica a partir dos parâmetros da equação da reta.

Sensibilidade é caracterizada pela capacidade de mudança de resposta sob variações significativamente pequenas de concentração do analito e é prevista por intermédio da inclinação da curva de calibração, isto é, o coeficiente angular da equação da reta. Para o caso de uma reta com aceitável coeficiente de determinação, tão maior seja o ângulo de inclinação, mais sensível será o método analítico. A sensibilidade não configura, necessariamente, um parâmetro de validação analítica; todavia, estar atento à sua análise é importante para etapas de otimização do método e análises de rotina, uma vez que pode indicar, por exemplo, estabilidade do desempenho instrumental ao longo de um ciclo de análises. [95, 105]

1.6.2 Seletividade

Monitorar de maneira inequívoca a identificação e quantificação dos analitos estudados em um método analítico é de fundamental importância para que se garanta a qualidade deste. Tal monitoramento consiste em investigar a presença de outras substâncias susceptíveis a interferirem na determinação e expressa o quão seletivo é o método proposto. Um importante parâmetro que permite avaliar a seletividade do método é o estudo de efeito matriz; o qual tem por objetivo avaliar se os componentes da amostra interferem nos sinais dos analitos a partir do aumento ou supressão da resposta instrumental de análise [91,107-109].

Segundo Krue *et al.*, 2015, o efeito matriz pode ser avaliado a partir da construção de duas curvas analíticas; uma com os analitos preparados em solvente e outra no extrato da matriz em que, após obtenção das equações da reta é calculada a razão entre os coeficientes angulares (RCA). Quando a razão obtida for superior a 1 o efeito matriz é positivo e ocorre enriquecimento do sinal analítico, enquanto valores inferiores a 1 indicam efeito matriz negativo, ou seja, supressão de sinal. Supressão/enriquecimento de sinal na faixa de 0 a 20% ($RCA \ 1 \pm 0,20$) pode ser considerado efeito matriz irrelevante para o método sob validação, enquanto resultados na faixa de 20-50% ($RCA \ 1 \pm 0,20-0,50$) são classificados de baixa significância e acima de 50% ($RCA > 1 \pm 0,50$) significativo e, por conseguinte, passível de modificação no método proposto. [108-110]

Em análises por espectrometria de massas acoplada a cromatografia líquida, o fenômeno de efeito matriz é comumente observado devido à competição entre compostos provenientes da matriz e os analitos durante o processo de conversão das moléculas em íons gasosos na interface da fonte de ionização. Assim, diferentes procedimentos experimentais com vistas à compensação ou eliminação deste efeito têm sido desenvolvidos e aplicados com eficiência; dentre eles: ajustes nas condições de separação cromatográfica, ajustes nas condições de ionização e detecção, diluição do extrato, ajustes no método de preparo da amostra, adição de etapa de *clean-up*, quantificação pelo método de adição padrão ou de padrão interno, e calibração a partir de extratos da matriz fortificados. [111-115]

1.6.3 Exatidão e Precisão

Estudos de *exatidão* são conduzidos para expressar a concordância entre o valor médio medido experimentalmente e o valor aceito como verdadeiro ou como referência, ao passo que a *precisão* é a expressão da concordância entre vários resultados obtidos para uma mesma amostra sob condições específicas. [105]

A estimativa de exatidão de um método pode ser feita a partir dos estudos de recuperação analítica com a finalidade de quantificar perdas do analitos durante o procedimento de preparo de amostra. Para tanto, faz-se uso de padrões analíticos, onde concentrações pré-estabelecidas são adicionadas à amostra antes do seu procedimento de preparo (extração, *clean-up*, concentração, diluição, etc.). Após o seu preparo e análise instrumental, a resposta do analito obtida é comparada com aquela dada pela análise da solução do padrão de referência (preparado em solvente puro ou em extrato controle) no mesmo nível de concentração; sendo então a recuperação calculada pela Equação 1:

$$\text{Rec (\%)} = \frac{\text{Valor obtido} - \text{valor adicionado}}{\text{Valor adicionado}} \times 100 \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde “valor obtido” e “valor adicionado” representam a quantificação dos sinais analíticos instrumentais oriundos do analito nas amostras fortificados e amostras de controle, respectivamente. Valores de recuperação na faixa de 70-120% são considerados aceitáveis quando se estuda amostras complexas; além disso, faz-se necessário que a eficiência de recuperação seja constante para diferentes níveis de concentração. [91]

A precisão, por sua vez, é caracterizada por erros aleatórios decorrentes de análises em replicata, estimados a partir de dados estatísticos de desvio padrão relativo (RSD – *Relative Standard Deviation*); tendo como critério de aceitabilidade valores inferiores a 20%. A quantidade de análises realizadas durante o processo de validação, nesta etapa, é variável de acordo com o protocolo adotado; todavia, é recorrente a execução de pelo menos 5 ensaios. [95]

Consensualmente, as principais normativas de validação analíticas consideram a subdivisão da precisão em dois tipos principais: repetibilidade e precisão intermediária. Enquanto repetibilidade tem a finalidade de expressar a fidelidade dos resultados obtidos de forma independente para subamostras preparadas a partir de uma amostra homogênea sob mesmas condições experimentais (dia, laboratório, operador e reagentes), a precisão intermediária refere-se às variações ocorridas dentro de um mesmo laboratório quando um ou mais fatores importantes são alterados (analista, dia, lotes de amostras, instrumentação etc.). Ainda é possível encontrar na literatura a definição de um terceiro tipo de precisão: a reprodutibilidade; que é implementada quando deseja-se avaliar a variabilidade de resultados entre laboratórios distintos. [92,95,105]

Quando a única variação empregada nos ensaios de precisão é sob a condição de dias de ensaios, repetibilidade e precisão intermediária são comumente denominadas como precisão intradia (quando medida em um mesmo dia) e precisão interdia (quando medida ao longo de vários dias, sucessivos ou não), respectivamente. [91]

1.6.4 Limite de Detecção e Quantificação

Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) são parâmetros que estão relacionados à capacidade de o método proposto identificar os analitos em baixas concentrações e correspondem respectivamente à menor quantidade que um analito pode ser detectado, mas não necessariamente quantificado como um valor exato; e à menor concentração pode ser quantificada com um nível aceitável de exatidão e precisão [95, 105, 116]

Diferentes procedimentos podem ser aplicados para a determinação de LOD e LOQ: método visual, método da relação sinal-ruído, método baseado em parâmetros da curva analítica; e a escolha entre um deles deve levar em consideração a técnica analítica utilizada e o grau de confiabilidade estatística necessária. Segundo Ribani *et al.*, 2004, a determinação dos limites de detecção e quantificação a partir do método baseado nos parâmetros da curva analítica é estatisticamente mais confiável em métodos em que a determinação é feita por técnicas cromatográficas; tal entendimento é corroborado por normativas internacionais atualizadas, a exemplo da SANTE/2018 [92, 101, 117]. Para tanto, são aplicadas as equações 2 e 3:

$$LOD = 3 \times \frac{s}{S} \quad (Eq. 2) \quad e \quad LOQ = 10 \times \frac{s}{S} \quad (Eq. 3)$$

Onde s é a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear e S o coeficiente angular das curvas analíticas. [117]

1.7 REVISÃO DA LITERATURA

Alcaloides indólicos e β -carbolínicos compreendem um grupo de compostos que despertou o interesse de várias áreas da ciência em decorrência de importantes descobertas a respeito de suas propriedades etno e psicofarmacológicas. Inicialmente identificados exclusivamente em plantas de variadas espécies, ao passo em que as pesquisas são expandidas, comprovações da existência dessas substâncias em alimentos, bebidas e humanos passaram a ser apresentadas à comunidade científica, onde revisões têm contemplado esses estudos [118,119]. Aqui, todavia, buscou-se revisar trabalhos voltados à identificação dos alcaloides alvo de estudo em amostras de tabaco; focando em técnicas de extração, análises instrumentais e validação de metodologias:

POINDEXTER *et al.*, 1962, foram pioneiros no estudo de isolamento dos alcaloides harmano e norharmano em folhas de tabaco e em fumaça de cigarros. Estudos quantitativos mostraram que as amostras de fumaça continham cerca de 15 e 20 μg destes alcaloides por grama de tabaco fumado, enquanto que nas amostras de folhas foi encontrado apenas 1% do encontrado na fumaça. O processo de isolamento dos alcaloides foi realizado a partir de um laboroso processo de extração ácido/base associado à cromatografia em papel e técnicas de ultravioleta e infravermelho para detecção e quantificação dos analitos. Nenhum processo de validação foi aplicado à metodologia proposta. [120]

SNOOK *et al.*, 1982, quantificaram por cromatografia gasosa e espectrometria de massas os alcaloides harmano e norharmano em fumaça de cigarro condensada. Para tal finalidade, um procedimento que simulava o ato de fumar foi utilizado para coletar por condensação a fração de fumaça primária (aquela aspirada pelo fumante); posteriormente aplicou o método de extração líquido-líquido à amostra condensada com partição em ácido clorídrico 2 mol L⁻¹. A eficiência do método de extração foi monitorada por ensaios de recuperação com resultados médios de 100%. A quantificação foi realizada por análises comparativas aos sinais instrumentais de padrões analíticos. Os autores não mencionaram procedimento de validação analítica. [121]

TOTSUKA *et al.*, 1999, quantificaram por espectrofotometria de ultravioleta e fluorescência os alcaloides harmano e norharmano em amostras de fumaça de cigarro (primária e secundária) condensadas em filtros de quartzo, de onde foram extraídos com solução de metanol:clorofórmio e purificados em cromatografia líquida semipreparativa. Seus níveis de concentração no caso de fumaça primária foram de 900-4240 ng/cigarro para norharmano, e 360-2240 ng/cigarro para harmano, e na fumaça secundária, 4130-8990 ng/cigarro e 2100-3000 ng/cigarro para norharmano e harmano, respectivamente. A estimativa desses resultados foi realizada a partir de ensaios de recuperação com valores percentuais de 67,5% e 63,8%. [122]

SMITH *et al.*, 2004, a partir de um procedimento preliminar de coleta de material particulado em fumaça de cigarro, desenvolveram um método de extração por SPE empregando o adsorvente de troca iônica MCX®, solvente alcalino (hidróxido de amônio concentrado em acetonitrila (95:5, v/v) para extração e *clean-up* em condições ácidas; fizeram a determinação dos alcaloides harmano e norharmano utilizando cromatografia gasosa/espectrometria de massas. A metodologia de extração foi desenvolvida a partir de estudos de recuperação e desvio padrão. Para a técnica de detecção, realizaram um procedimento de calibração externa com soluções padrão e avaliaram os limites de detecção e quantificação (LOD e LOQ). [123]

HERRAIZ, 2004, avaliou a presença de harmano e norharmano em amostras de fumaça de cigarro. Os alcaloides foram isolados a partir do borbulhamento da fumaça em solução 0,6 mol L⁻¹ de HClO₄ em metanol (20 mL) e quantificados por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de fluorescência e espectrometria de massas com ionização por eletrospray. Nestes estudos foram encontradas concentrações (ng/cigarro) de 1242,8 ± 630,7 e 500,8 ± 266,8 para norharmano e harmano, respectivamente. Não foi descrito processo de validação, de modo que o método foi desenvolvido apenas a partir de ensaios de recuperação com estimativa do desvio padrão. [124]

Diante do exposto, no que diz respeito à determinação de alcaloides derivados do L-Triptofano em matrizes de matriz, apenas um estudo relata a presença dessa classe de compostos em amostras de folhas de tabaco e, apesar do seu mérito quanto ao pioneirismo, já não se adequa às tendências modernas de estudos de monitoramento de compostos endógenos em matrizes complexas como plantas devido ao laboroso protocolo de extração desenvolvido e a falta de rigor quanto a integridade do dados apresentados, uma vez que não aborda estudos de validação analítica. Adiante, motivados por aquele estudo precursor, alguns trabalhos foram desenvolvidos para a determinação da mesma classe de compostos em amostras de fumaça de cigarro, sempre acompanhando a evolução dos métodos analíticos, todavia precários quanto às abordagens de validação, além de não serem considerados ambientalmente amigáveis.

1.8 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas de microextração para identificação e quantificação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em matrizes de tabaco e fumaça de cigarros com recurso às técnicas de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas sequencial e de alta resolução.

1.9 REFERÊNCIAS

- [1] SCHWANZ, T.G., BOKOWSKI, L.V.V., MARCELO, M.C.A., JANDREY, A.C., DIAS, J.C., MAXIMIANO, D.H., CANOVA, L.S., PONTES, O.F.S., SABIN, G.P., KAISER, S. **Analysis of chemosensory markers in cigarette smoke from different tobacco varieties by GC×GC-TOFMS and chemometrics.** Talanta, V. 202, pg. 74-89, 2019.

- [2] VELJKOVIC, E.; XIA, W.; PHILLIPS, B.; WONG, E. T.; HO, J.; OVIEDO, A.; HOENG, J.; PEITSCH, M. Chapter 10: Other Compounds From Tobacco With Potential Impact on Neurodegenerative Diseases. In **Nicotine and Other Tobacco Compounds in Neurodegenerative and Psychiatric Diseases: Epidemiological Data on Smoking and Preclinical and Clinical Data on Nicotine.** Academic Press. pg.83-97, 2018.

- [3] JOKIĆ, S., GAGIĆ, T., KNEZ, Ž., BANOŽIĆ, M., ŠKERGET, M. **Separation of active compounds from tobacco waste using subcritical water extraction.** The Journal of Supercritical Fluids, V. 15, pg. 104593, 2019.

- [4] NAPIERALA, M., MERRITT, T.A., MIECHOWICZ, I., MIELNIK, K., MAZELA, J., FLOREK, E. **The effect of maternal tobacco smoking and second-hand tobacco smoke exposure on human milk oxidant-antioxidant status.** Environmental Research, V. 170, pg. 110-121, 2019.

- [5] PIECHOWSKA, P. ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. MILDNER-SZKUDLARZ, S. **Bioactive β -Carbolines in Food: A Review.** Nutrients, V. 11 , pg. 814-824, 2019.

- [6] SOUZA, R.C.Z., ZANDONADI, F.S., FREITAS, D.P., TÓFOLI, L.F.F., SUSSULINI, A. **Validation of an analytical method for the determination of the main ayahuasca active compounds and application to real ayahuasca samples from Brazil.** Journal of Chromatography B, V. 1124, 197–203. 2019
- [7] HALBERSTADT, A.L. **Behavioral and pharmacokinetic interactions between monoamine oxidase inhibitors and the hallucinogen 5-methoxy-*N,N*-dimethyltryptamine.** Pharmacology Biochemistry and Behavior. V. 143, pg. 1-10, 2016.
- [8] TRUMAN, P., GROUNDSC, P., BRENNAND, K. A. **Monoamine oxidase inhibitory activity in tobacco particulate matter: Are harman and norharman the only physiologically relevant inhibitors?** NeuroToxicology, V. 59, pg. 22–26, 2017.
- [9] GOODMAN, J. **Tobacco in History: The Cultures of Dependence.** Routledge, London, 1993.
- [10] GOODMAN, J. **Tobacco in history and culture: an encyclopedia.** Thomson Gale, V. 2, 2005.
- [11] CHARLTON A. **Medicinal uses of tobacco in history.** Journal of the Royal Society of Medicine. V. 97, pg.292-296, 2004.
- [12] STEWART, G.G. **A history of the medicinal use of tobacco, 1492-1860.** Medical History, vol. 11(3), 228–268, 1967.
- [13] ERIKSEN, M., MACKAY, J. & SCHLUGER, N. **The Tobacco Atlas.** 5th ed., Atlanta, Georgia: The American Cancer Society, 2015.
- [14] FAO. Faostat–Food and agriculture organization of the United Nations statistics. Disponível <<http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC/visualize>> Acesso em janeiro de 2018.

- [15] RODGMAN, A., PERFETTI, T. A. **The chemical components of tobacco and tobacco smoke**. CRC Press, 2th ed, 2013.
- [16] WAGNER, H.L. **Nicotine**. Chelsea House Publishers, Philadelphia, 2003.
- [17] ROBINSON, T. **The Biochemistry of Alkaloids**. New York: Springer-Verlag, 2º edição, 1981.
- [18] BUCKINGHAM, J.; BAGGALEY, K. H.; ROBERTS. A.D.; SZABÓ, L.F. **Dictionary of Alkaloids**. CRC Press. 2º edição. 2010.
- [19] SFUNAYAMA, S.; CORDELL, G.A. **ALKALOIDS: A Treasury of Poisons and medicines**. Elsevier, 2015.
- [20] ANISZEWSKI, T. **Alkaloids: Chemistry, biology, Ecology, and Applications**. Amsterdam: Elsevier, 2º edição, 2015.
- [21] ALLEN, J.R.F.; HOLMSTEDT, B.R. **The simple β -carboline alkaloids**. *Phytochemistry*, Vol. 19,157-1582. 1980.
- [22] DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. John Wiley & Sons: New York, 2002.
- [23] HERRAIZ, T. **Relative exposure to β -carboline norharman and harman from foods and tobacco smoke**. *Journal Food Additives & Contaminants*, Vol. 21, 2004.
- [24] PFAU, W.; SKOG, K. **Exposure to β -carboline norharman and Harman**. *Journal of Chromatography B*, vol. 802, 115–126, 2004.
- [25] FARZIN, D.; MANSOURI, N. **Antidepressant-like effect of harmene and other beta-carboline in the mouse forced swim test**. *European Neuropsychopharmacology*, vol. 16(5), 324-328. 2006.
- [26] RADULESCU, M.C.; BUCUR, M.P.; BUCUR. B.; RADU, G.L. **Biosensor based on inhibition of monoamine oxidases A and B for detection of β -carboline**. *Talanta*, vol. 137, 2015.

- [27] HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. **Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke: beta-carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors.** Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 326(2), 378-386, 2005.
- [28] RÄTSCH, C. **The Encyclopedia of Psychoactive Plants: Ethnopharmacology and Its Applications.** Rochester, Vt: Park Street Press, 2005.
- [29] YANG, Y.J.; LEE, J.J.; JIN, C.M.; LIM, S.C.; LEE, M.K. **Effects of harman and norharman on dopamine biosynthesis and L-DOPA-induced cytotoxicity in PC12 cells.** European Journal of Pharmacology, vol. 587(1-3), 57-64, 2008.
- [30] TRUMAN, P.; GROUNDS, P.; BRENNAN, K.A. **Monoamine oxidase inhibitory activity in tobacco particulate matter: Are harman and norharman the only physiologically relevant inhibitors?** Neurotoxicology, Vol. 59, 22-26, 2017.
- [31] HOGG, R.C. **Contribution of Monoamine Oxidase Inhibition to Tobacco Dependence: A Review of the Evidence.** Nicotine & Tobacco Research, vol. 18(5), 509-523, 2016.
- [32] DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach.** John Wiley & Sons, 2^o ed., Inglaterra, 2002.
- [33] RAMAWAT, K. G., MÉRILLON, J. M. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes.** Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, 2013.
- [34] MarvinSketch, versão 6.3.0, 2014. Disponível em <<https://chemaxon.com/products/marvin>>.
- [35] MarvinView, versão 6.3.0, 2014. Disponível em <<https://chemaxon.com/products/marvin>>.

- [36] FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology**. Wiley-VCH, 2007.
- [37] LORD, H.; PAWLISZYN, J. **Microextraction of drugs**. Journal of Chromatography A, V. 902, pg.17-63, 2000.
- [38] WARNER, J.C.; CANNON, A.S.; DYE, K.M. **Green chemistry**. Environmental Impact Assessment Review, v. 24, p. 775–799, 2004.
- [39] TOBISZEWSKI, M.; MECHLIŃSKA, A.; ZYGMUNT, B.; NAMIEŚNIK, J. **Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 28, p. 943-951, 2009.
- [40] ZANELLA, R.; MARTINS, M.L.; PRIME, E.G.; CALDAS, S.S.; PRESTES, O.D.; ADAIME, M.B. **Microextração Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME): fundamentos e aplicações**. Scientia Chromatographica, v. 4, p. 35-51, 2012.
- [41] ARMENTA, S.; GARRIGUES, S.; GUARDIA, M DE LA. **The role of green extraction techniques in Green Analytical Chemistry**. Trends in Analytical Chemistry, V. 71, pg. 2–8, 2015.
- [42] PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; OWCZAREK, K.; NAMIEŚNIK, J. Chapter Ten - Miniaturized Solid Phase Extraction. In **Green Extraction Techniques: Principles, Advances and Applications**. Comprehensive Analytical Chemistry, V. 76, pg. 279-318, 2017.
- [43] OLIVEIRA, A. R. M. DE.; MAGALHÃES, I. R. S.; SANTANA; F. J. M. DE.; BONATO, P. S. **Liquid-phase microextraction (LPME): fundamentals and applications to the analysis of drugs in biological samples**. Química Nova, V.31, 2008.
- [44] CASSIANO, N. M.; BARREIRO; J. C.; CASS, Q. B. **New Trends in sample preparation in Brazil: an overview of bioanalytical applications by liquid chromatography**. Journal of the Brazilian Chemical Society. V. 25, 2014.

- [45] BARKER, S.A.; LONG, A.R.; SHORT, C.R. **Isolation of drug residues from tissues by solid phase dispersion**. Journal of Chromatography, v. 475, p. 353-361, 1989.
- [46] DOPICO-GARCÍA, M.S.; VALENTÃO, P.; JAGODZIŃSKA, A.; KLEPCZYŃSKA, J.; GUERRA, L.; ANDRADE, P.B.; SEABRA, R.M. **Solid-phase extraction versus matrix solid-phase dispersion: Application to White grapes**. Talanta, v. 74, p. 20-31, 2007.
- [47] BARKER, S.A. **Matrix solid-phase dispersion (MSPD)**. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, v. 70, p. 151-162, 2007.
- [48] BARKER, S.A. **Matrix solid-phase dispersion**. In: Simpson, N.J.K. **Solid-Phase Extraction: Principles, Techniques, and Applications**. New York, Estados Unidos: Marcel Dekker, 2000.
- [49] LANÇAS, Fernando M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE**. Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.
- [50] AUGUSTO, F.; HANTAO, L.W.; MOGOLLÓN, N.G.S.; BRAGA, S.C.G.N. **New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 43, pg.14–23. 2013.
- [51] WEN, Y.; CHEN, L.; LI, J.; LIU, D.; CHEN, L. **Recent advances in solid-phase sorbents for sample preparation prior to chromatographic analysis**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 59, pg. 26-41, 2014.
- [52] FUMES, B. H., SILVA, M.R., ANDRADE, F. N., NAZARIO, C. E. D., LANÇAS, F. M. **Recent advances and future trends in new materials for sample preparation**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 71, pg. 9-25, 2015.
- [53] CAPRIOTTI, A.L., CAVALIERE, C., FOGLIA, P., SAMPERI, R., STAMPACHIACCHIERE, S., VENTURA, S., LAGANÀ, A. **Recent advances and developments in matrix solid-phase dispersion**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 71, pg. 186-193, 2015.

- [54] KRISTENSON, E.M.; RAMOS, L.; BRINKMAN, U.A.Th. **Recent advances in matrix solid-phase dispersion**. Trends in Analytical Chemistry, v. 25, p. 96-111, 2006.
- [55] DÓREA, H. S., LOPES, W. G. **Aplicação da técnica de dispersão da matriz em fase sólida (DMFS) na análise de pesticidas em quiabo por CG-EM**. Química Nova, V. 27, 2004.
- [56] GAUJAC, A., AQUINO, A., NAVICKIENE, S., ANDRADE, J. B. **Determination of N,N-dimethyltryptamine in Mimosa tenuiflora inner barks by matrix solid-phase dispersion procedure and GC–MS**. Journal of Chromatography B, V. 881–882, pg. 107-110, 2012.
- [57] MINALESHEWA, A., NELSON, T., BHAGWAN, S.C., MESFIN, R. **Matrix solid-phase dispersion for the HPLC–DAD determination of psychoactive phenylpropylamino alkaloids from Khat (*Catha edulis Forsk*) chewing leaves**. Chromatographia, V. 76, pg. 401-408, 2013.
- [58] LLOMPART, M.; CELEIRO, M.; LAMAS, J.P.; SANCHEZ-PRADO, L.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C. **Analysis of plasticizers and synthetic musks in cosmetic and personal care products by matrix solid-phase dispersion gas chromatography-mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, V. 1293, pg. 10-19, 2013.
- [59] CELEIRO, M.; GUERRA, E.; LAMAS, J.P.; LORES, M.; GARCIA-JARES, C., LLOMPART, M. **Development of a multianalyte method based on micro-matrix-solid-phase dispersion for the analysis of fragrance allergens and preservatives in personal care products**. Journal of Chromatography A, V. 1344, pg. 1-14, 2014.
- [60] CAO, W.; CAO, J.; YE, L.-H.; XU, J.-J.; HU, S.-S.; PENG, L.-Q. **Synthesis and application of mesoporous molecular sieve for miniaturized matrix solid-phase dispersion extraction of bioactive flavonoids from toothpaste, plant, and saliva**. Electrophoresis, V. 36, pg. 2951–2960, 2015.

- [61] CAO, W.; HU, S.-S.; YE, L.-H.; CAO, J.; PANG, X.-Q.; XU, J.-J. **Trace matrix solid phase dispersion using a molecular sieve as the sorbent for the determination of flavonoids in fruit peels by ultra-performance liquid chromatography.** Food Chemistry, V.190, pg. 474-480, 2016.
- [62] XU, J.-J.; YANG, R.; YE, L.-H.; CAO, J.; CAO, W.; HU, S.-S. PENG, L.-Q. **Application of ionic liquids for elution of bioactive flavonoid glycosides from lime fruit by miniaturized matrix solid-phase dispersion.** Food Chemistry, V. 204, pg. 167-175, 2016.
- [63] CARRO, N.; VILAS, L.; GARCÍA, I.; IGNACIO, M.; MOUTEIRA, A.M. **Optimization of a method based on micro-matrix solid-phase dispersion (micro-MSPD) for the determination of PCBs in mussel samples.** Analytical Chemistry Research, V. 11, pg. 1-8, 2017.
- [64] CHU, C.; WEI, M.; WANG, S.; ZHENG, L.; HE, Z.; CAO, J.; YAN, J. **Micro-matrix solid-phase dispersion coupled with MEEKC for quantitative analysis of lignans in *Schisandrae Chinensis Fructus* using molecular sieve TS-1 as a sorbent.** Journal of Chromatography B, V.1063, pg. 174-179, 2017.
- [65] NENG, N. R.; SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. **Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media.** Journal of Chromatography A , V. 217, pg. 7303-7310, 2010.
- [66] ALMEIDA, C.; NOGUEIRA, J. M. F. **Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction - Application to trace level analysis of fungicides in real matrices.** Journal of Chromatography A, V. 1265, pg. 7-16, 2012.
- [67] NOGUEIRA, J. M. F. **Microextração adsortiva em barra (BAµE): Um conceito analítico inovador para microextração estática.** *Scientia Chromatographic*, V. 5, pg. 275-283, 2013

- [68] NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. **ADSORÇÃO: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- [69] NENG, N. R.; NOGUEIRA, J. M. F. **Development of a bar adsorptive microextraction-large-volume injection-gas chromatography-mass spectrometric method for pharmaceuticals and personal care products in environmental water matrices**. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, V. 402, pg. 1355-1364, 2012.
- [70] AHMAD, S.M.; ALMEIDA, C.; NENG, N.R.; NOGUEIRA, J.M.F. **Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices**. *Journal of Chromatography B*, V. 969, pg. 35-41, 2014.
- [71] ANDRADE, F. N.; IDE, A. H.; NENG, N. R.; LANÇAS, F. M.; NOGUEIRA, J. M. F. **Determination of trace levels of triazines in corn matrices by bar adsorptive microextraction with a molecularly imprinted polymer**. *Journal of Separation Science*, V.39, pg. 756–761, 2016.
- [72] OENNING, A. L.; MORAES, L.; DIAS, A. N.; CARASEK, E. **A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis**. *Analytica Chimica Acta*, pg.1-9, 2017.
- [73] IDE, A.H.; NOGUEIRA, J.M.F. **New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach – Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids**. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* V.153, pg. 126–134, 2018.

- [74] ABUJABER, F.; AHMAB, S. M.; NENG, N. R.; MARTÍN-DOIMEADIOS, R. C. R.; BERNARDO, F. J. G.; NOGUEIRA, J.M.F. **Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbonnanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental Waters.** *Journal of Chromatography A*. 2019
- [75] AHMAD, S.M., NOGUEIRA, J.M.F. **High Throughput Bar Adsorptive Microextraction: A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples.** *Talanta. In press.* 2019.
- [76] BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; FRANK D.; CRAMERS, C. **Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles.** *J. Microcol.*, V. 11, pg. 737-747, 1999.
- [77] QUEIROZ, M. E. C. **Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): Fundamentos teóricos e fases seletivas.** *Scientia Chromatographica*, V. 1, pg. 21-29, 2009.
- [78] NOGUEIRA, J.M.F. **Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática.** *Scientia Chromatographica*; V. 4, pg. 259-269, 2012.
- [79] BLUE, L. E., FRANKLIN, E. G., GODINHO, J.M., GRINIAS, J. P., GRINIAS, K. M., LUNN, D. B., MOORE, S. M. **Recent advances in capillary ultrahigh pressure liquid chromatography.** *Journal of Chromatography A*, V. 1523, pg. 17 – 39, 2017.
- [80] MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. **UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes.** *Scientia Chromatographica*, V. 4(3), pg. 197-207, 2012.
- [81] FANALI, S., HADDAD, P. R., POOLE, C. F., SCHOENMAKERS, P., LLOYD, D. **Liquid Chromatography: Fundamentals and Instrumentation.** Second Edition, Elsevier, USA, 2017.

- [82] MALDANER, L., JARDIM, I. C. S. F. **O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência.** Química Nova, V. 32(1), pg. 214 - 222, 2009.
- [83] WALTER, T. H., ANDREWS, R. W. **Recent innovations in UHPLC columns and instrumentation.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, V. 63, pg. 14-20. 2014.
- [84] PERISTYY, A. A., FEDYANINA, O. N., PAULL, B., NESTERENKO, P. N. **Diamond based adsorbents and their application in chromatography.** Journal of Chromatography A, V. 1357, pg. 68-86, 2014.
- [85] FEKETE, S., SCHAPPLER, J., VEUTHEY, J. L., GUILLARME, D. **Current and future trends in UHPLC.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, V. 63, pg. 2-13, 2014.
- [86] GAMA, M. R., BOTTOLI, C. B. G., HUSSAIN, C. M. **Nanomaterials in Liquid Chromatography: Recent Advances in Stationary Phases.** Nanomaterials in Chromatography, Elsevier, Cap. 9, pg. 255-297, 2018.
- [87] GUILLARME, D., SCHAPPLER, J. RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L. **Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, V. 29 (1), pg. 15-27, 2010.
- [88] GILAR, M., MCDONALD, T. S., GRITTI, F. **Impact of instrument and column parameters on high-throughput liquid chromatography performance.** Journal of Chromatography A, V. 1523, pg. 215-223, 2017.
- [89] RODRIGUEZ-ALLER, M., GURNY, R., VEUTHEY, J. L., GUILLARME, D. **Coupling ultra high-pressure liquid chromatography with mass spectrometry: Constraints and possible applications.** Journal of Chromatography A, V. 1292(2), pg. 2-18, 2013.
- [90] JEONG, W. T., LIM, H. B. **A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in Catharanthus roseus.** Journal of Chromatography B, V. 1080, pg. 27-36, 2018.

- [91] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise**. Editora RiMa. São Carlos. 2004.
- [92] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos**. Química Nova, v. 27, p. 771-780, 2004.
- [93] ARAGÃO, N.M.; VELOSO, M.C.C.; ANDRADE, J.B. **Validação de métodos cromatográficos de análise - um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas**. Química Nova, v. 32, p. 2476-2481, 2009.
- [94] RIBEIRO, F.A. DE L.; FERREIRA, M. M. C.; MORANO, S. C.; DA SILVA, L. R.; SCHNEIDER, R. P. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. Química Nova, v. 31, p. 164-171, 2008.
- [95] KRUIVE, A.; REBANE, R.; KIPPER, K.; OLDEKOP, M-L.; EVARD, H.; HERODES, K.; RAVIO, P.; LEITO, I. **Tutorial review on validation of liquid chromatography–mass spectrometry methods: Part I**. Analytica Chimica Acta, V. 870, pg. 29–44, 2015.
- [96] Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA. **RESOLUÇÃO RDC Nº 166, DE 24 DE JULHO DE 2017**.
- [97] INMETRO. DOQ-CGCRE-008: **Orientação sobre validação de métodos analíticos**. Rev. 7, 2018.
- [98] BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento-MAPA. **Manual de garantia da qualidade analítica: áreas de identidade e qualidade de alimentos e de insumos**. 2015

- [99] UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Environmental Protection Agency .**Chemical Methods Validation and Peer Review Guidelines**. 2016.
- [100] UNITED STATES. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, Draft Guidance**. 2018.
- [101] EUROPEAN UNION. **SANTE/11813/2017, Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed**. 2018.
- [102] International Conference on Harmonisation. **ICH Q14: Analytical Procedure Development and Revision of Q2(R1) Analytical Validation**. 2018.
- [103] IUPAC. **Harmonized guidelines for single-laboratory validation of method of analyses** .IUPAC technical report. Pure and Applied Chemistry. V. 74, pg. 835–855, 2002.
- [104] World Health Organization. **QAS/16.666 - GUIDELINES ON VALIDATION**. 2016.
- [105] LEITE, F. **Validação em análise química**. Editora Átomo, 4^o Edição. Campinas, SP. 2002.
- [106] CUADROS-RODRÍGUEZ, L.; BAGUR-GONZÁLEZ, M.G.; SÁNCHEZ-VIÑAS, M.; GONZÁLEZ-CASADO, A.; GÓMEZ-SÁEZ, A.M. **Principles of analytical calibration/quantification for the separation sciences**. Journal of Chromatography A, v. 1158, p. 33-46, 2007.
- [107] PASSAGLI, M. **Toxicologia Forense - Teoria e prática**, Editora Millenium, 2^a edição. Campinas. 2009.
- [108] KRUIVE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. **Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry**. Journal of Chromatography A, v. 1187, p. 58-66, 2008.

- [109] PINHO, G. P.; NEVES, A. A.; QUEIROZ, M. E. L. R.; SILVÉRIO, F. **O Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa.** Química Nova, v. 32, p. 987-995, 2009.
- [110] CUTILLAS, V., GALERA, M. M., RAJSKI, Ł., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Evaluation of supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for pesticide residues in food.** Journal of Chromatography A, V.1545, pg. 67-74, 2018.
- [111] MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. **Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS.** Analytical Chemistry, V. 75, pg. 3019-3030, 2003.
- [112] TAYLOR, P.J. **Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography–electrospray–tandem mass spectrometry.** Clinical Biochemistry, V. 38, pg. 328 – 334, 2005.
- [113] CÔTÉ, C.; BERGERON, A.; MESS, JN.; FURTADO, M.; GAROFOLO, F. **Matrix effect elimination during LC-MS/MS bioanalytical method development.** Bioanalysis, V. 1(7), pg. 1243-1257, 2009.
- [114] PANG, G-F.; FAN, C-L.; CHANG, Q-Y.; YANG, F.; CAO, Y-Z. **Chapter 4 - Matrix effect for determination of pesticide residues in Tea,** in Analysis of Pesticide in Tea, Elsevier, pg. 535-595, 2018.
- [115] KIM, Y-A.; EL-ATY, A.M.A.; RAHMAN, MD.M.; JEONG, J.H.; SHIN, H-C.; WANG, J.; SHIN, S-S.; SHIM, J-H. **Method development, matrix effect, and risk assessment of 49 multiclass pesticides in kiwifruit using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry.** Journal of Chromatography B, V.1076 , pg. 130-138, 2018.

- [116] EVARD, H.; KRUBE, A.; LEITO, I. **Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part I: Theoretical review.** *Analytica Chimica Acta*, V. 942, pg. 23-39, 2016.
- [117] EVARD, H.; KRUBE, A.; LEITO, I. **Tutorial on estimating the limit of detection using LC-MS analysis, part II: Practical aspects.** *Analytica Chimica Acta*, V. 942, pg. 40-49, 2016.
- [118] PAIS, P., MOYANO, E., PUIGNOU, L., GALCERAN, M.T. **Liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a routine method for the analysis of mutagenic amines in beef extracts.** *Journal of Chromatography A*, v. 778, pg 207-218, 1997.
- [119] HERRAIZ, T. **Analysis of the bioactive alkaloids tetrahydro- β -carboline and β -carboline in food.** *Journal of Chromatography A*, v. 881, pg. 483-499, 2000.
- [120] POINDEXTER, E. H., CARPENTER, R. D. **The isolation of harmane and norharmane from tobacco and cigarette smoke.** *Phytochemistry*, v. 1, pg. 215-221, 1962.
- [121] SNOOK, M. E., CHORTYK, O.T. **Capillary gas chromatography of carbolines: application to cigarette smoke.** *Journal of Chromatography*, v. 245, pg. 331-338, 1982.
- [122] TOTSUKA, Y., USHIYAMA, H., ISHIHARA, J., SINHA, R., GOTO, S., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. **Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods.** *Cancer Letters*, v. 143, pg. 139-143, 1999.
- [123] SMITH, C. J., QIAN, X., ZHA, Q., MOLDOVEANU, S. C. **Analysis of α - and β -carbolines in mainstream smoke of reference cigarettes by gas chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1046, pg. 211-216, 2004.

- [124] HERRAIZ, T. **Relative exposure to beta-carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke.** Food additives and contaminants, v. 21, pg. 1041-1050, 2004.

CAPÍTULO 2

DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES INDÓLICOS E β -
CARBOLÍNICOS EM MATRIZES DE TABACO POR
 μ MSPD/UHPLC-MS/MS

CAPÍTULO 2 – Determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em matrizes de tabaco por μ MSPD/UHPLC-MS/MS

2. INTRODUÇÃO

O presente capítulo apresenta um estudo de desenvolvimento de uma metodologia de extração inovadora empregando os princípios da técnica de dispersão da matriz em fase sólida para a determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em amostras de tabaco empregando as técnicas UHPLC-ESI-TQD e UHPLC-ESI-QTOF.

As modernas técnicas instrumentais de análise adotadas neste estudo terão suas configurações cuidadosamente ajustadas para assegurar precisas identificações e sensíveis quantificações dos analitos estudados a partir da utilização de padrões analíticos.

Visando a adequação aos princípios de química analítica verde, a técnica de MSPD será miniaturizada, almejando assim a redução de consumo de reagentes ativos poluidores do meio ambiente. Buscou-se a otimização de um protocolo de extração eficiente e seletivo para os alcaloides a partir de ensaios de *clean-up* e recuperação analítica, dando atenção aos parâmetros inerentes à técnica.

A autenticidade dos resultados obtidos será sustentada pelas principais figuras de méritos estabelecidas em protocolos de validação padronizados por agências reguladoras mundiais, de modo que o método proposto seja confiavelmente aplicado à análise de amostras de tabaco de diferentes tipos.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Otimizar as condições cromatográficas para análise rápida e seletiva de alcaloides indólicos e β -carbolínicos empregando cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC);
- Otimizar condições instrumentais para identificação e quantificação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em amostras de tabaco empregando técnicas de espectrometria de massas sequencial e de alta resolução;
- Desenvolver um método analítico rápido, seletivo e sensível para extração de alcaloides em matrizes de tabaco utilizando a técnica de dispersão da matriz em fase sólida miniaturizada;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar a metodologia em amostras de tabaco *in natura* e processadas com vistas a identificação dos alcaloides alvo de estudo.

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Reagentes

Acetonitrila grau LC-MS (Merck), Metanol grau LC-MS (Merck), Diclorometano grau HPLC (J.T Baker), n-Hexano grau HPLC (J.T Baker), Acetona grau HPLC (J.T Baker), Acetona grau P.A (J.T Baker), Água ultra purificada em sistema Milli-Q (Millipore Corporation), Ácido Fórmico grau LC-MS (Sigma-Aldrich), Lã de vidro silanizada (Hexis Científica), Alumina Neutra 50-200 µm (Sorbent Technologies), Florisil 100-200 µm (J.T. Baker), C18 50 µm (Sigma-Aldrich), Discovery DPA 6S (Supelco), Carvão Ativado (Synth), PSA (Phenomenex).

Padrões certificados dos alcalóides harmano, norharmano, triptamina, harmalol, harmina e harmalina, foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA), com grau de pureza superior a 95%.

O alcaloide *N,N*-dimetilriptamina (grau de pureza > 95%), foi isolado de cascas de *Mimosa tenuiflora* em estudo desenvolvido por Gaujac *et al.*, 2013. [1]

O alcaloide tetrahidroharmina (grau de pureza de 98,2%) foi sintetizado e caracterizado em estudo anterior desenvolvido por Santos, 2016. [2]

2.2.2 Equipamentos

Balança analítica (Sartorius BL 2105); Sistema para *SPE vacuum manifold* (Varian); Ultra-freezer (Liotop, UFR30), Liofilizador de bancada (Liotop, L101), Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, *GENIUS NM32LA*).

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters modelo Acquity UPLC H Class equipado com sistema quaternário de bombas, módulo de comunicação, autoinjeter, forno para coluna, detector espectrofotométrico com arranjo de diodos e espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray, analisador Triplo quadrupolo modelo Xevo TQD Waters; com software de controle instrumental e aquisição de dados *MassLynx (Sistema 1)*.

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters modelo Acquity UPLC H Class equipado com sistema binário de bombas, módulo de comunicação, autoinjeter, forno para coluna e espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray, analisador Quadrupolo/Tempo de Voo modelo Xevo G2 Q-ToF Waters; com software de controle instrumental e aquisição de dados *MassLynx* (**Sistema 2**).

2.2.3 Obtenção e preparo das amostras

Amostras de folhas verdes de tabaco foram coletadas em uma fazenda de agricultura familiar localizada no povoado Treze, no município de Lagarto/SE. No laboratório foi realizada a lavagem das folhas com água ultrapura para remoção de particulados sólidos e/ou insetos, seguido de um processo de secagem por liofilização. Após secagem, as folhas foram trituradas com o auxílio de um processador de alimentos portátil, peneiradas e armazenadas em frascos de vidro, previamente limpo e etiquetado, o qual foi armazenado sob temperatura ambiente ao abrigo da luz.

2.2.4 Processo de Liofilização das amostras

As folhas de tabaco previamente lavadas foram dispostas em bandejas inox e congeladas em ultra freezer com temperatura de -80°C , por 4 horas. Em seguida, as bandejas contendo a amostra congelada foram rapidamente transferidas para o liofilizador com temperatura programada entre 50 e 55°C negativos e pressão inferior a 4,7 mm de mercúrio, o qual ficou em funcionamento por 24 horas para sublimação da água presente na amostra.

2.2.5 Preparo de soluções padrão dos alcaloides

A partir dos padrões sólidos, foram preparadas soluções estoque individuais dos alcaloides em concentração de $1000\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol grau HPLC, das quais foram preparadas soluções intermediárias de 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Soluções individuais e

conjuntas em diferentes concentrações foram preparadas para realização dos ajustes de condições cromatográficas, desenvolvimento e otimização do processo de extração por MSPD e validação analítica. As soluções de trabalho foram utilizadas por um período de 30 dias.

2.2.6 Condições cromatográficas de análise e parâmetros de detecção por espectrometria de massas

2.2.6.1 Sistema 1 (UHPLC-ESI-TQD)

Eluição em modo gradiente com fase móvel composta pela mistura binária metanol: água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, com tempo total de 11 min (Tabela 3); vazão da fase móvel 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção de 1 µL, forno da coluna com temperatura controlada em 40°C, temperatura do amostrador 15°C e Coluna analítica CSH Phenyl-Hexyl Waters (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm).

Tabela 3. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no sistema 1.

Tempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
0,01	95	5
7,00	67	33
7,50	0	100
8,50	0	100
9,00	95	5
11,00	95	5

Deteção dos alcaloides por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo positivo (ESI⁺) com parâmetros da fonte otimizados (*tunning*) (Tabela 4) aplicando a metodologia de Monitoramento de Reações Seleccionadas (SRM), em que foram analisados dois íons produtos (quantificação e confirmação)

para cada analito a partir das melhores voltagens de cone e energias de colisão em janelas de aquisição programadas de acordo com a ordem de eluição (Tabela 5).

Tabela 4. Parâmetros de *tunning* otimizados no espectrômetro de massas do sistema 1.

Parâmetro	Condição Ajustada
Voltagem do capilar:	3,0 kV
Temperatura da fonte:	100 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Vazão de gás de dessolvatação	900 L h ⁻¹
Vazão de gás no cone	50 L h ⁻¹

Tabela 5. Parâmetros ajustados para o método de aquisição SRM no sistema 1.

Alcaloide	T _R (min)	Íon Precursor (<i>m/z</i>)	Voltagem do Cone (V)	Íons Produtos (Energia de Colisão - eV)	
				Quantificação	Confirmação
Triptamina	0,77	161,00	16	144,00 (10)	117,31 (23)
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	1,08	189,10	23	57,95 (12)	144,10 (17)
Harmalol	1,95	200,99	45	160,00 (23)	67,97 (26)
Norharmano	2,16	168,91	65	114,97 (30)	141,97 (26)
Tetrahydroharmina	2,66	217,02	20	188,01 (14)	200,10 (12)
Harmano	3,23	182,96	60	114,97 (32)	88,99 (47)
Harmalina	4,49	215,01	45	200,00 (22)	173,97 (23)
Harmina	4,86	212,99	45	170,10 (30)	198,04 (23)

2.2.6.2 Sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF)

Eluição em modo gradiente com fase móvel composta pela mistura binária metanol:água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, com tempo total de 11 min (idem ao Sistema 1, vide Tabela 3); vazão da fase móvel $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, volume de injeção de $1 \text{ }\mu\text{L}$, forno da coluna com temperatura controlada em 40°C , temperatura do amostrador 15°C e coluna analítica CSH Phenyl-Hexyl Waters ($50 \text{ mm} \times 2,1 \text{ mm} \times 1,7 \text{ }\mu\text{m}$).

Deteção dos alcaloides por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo positivo (ESI^+) com parâmetros da fonte otimizados (*tunning*) (Tabela 6) e aquisição de dados aplicando a metodologia de Aquisição Independente de Dados (DIA - *Data-independent acquisition*) ou MS^E , com funções de baixa (6 eV) e alta energia (rampa 6-80 eV) no intervalo de m/z 50 - 600. Como padrão de correção de massa (*Lock-mass*) foi utilizado uma solução de leucina-encefalina (m/z 556,2771, em modo positivo) na concentração de $500 \text{ pg }\mu\text{L}^{-1}$ sob vazão $5 \text{ }\mu\text{L min}^{-1}$.

Tabela 6. Parâmetros de *tunning* otimizados no espectrômetro de massas do sistema 2.

Parâmetro	Condição Ajustada
Voltagem do capilar	3,0 kV
Temperatura da fonte	100°C
Temperatura de dessolvatação	450°C
Vazão de gás de dessolvatação	900 L h^{-1}
Vazão de gás no cone	50 L h^{-1}

2.2.7 Procedimento de extração por μ MSPD

O procedimento de extração foi otimizado com as seguintes etapas:

- Pesar em vidro de relógio 0,01 g de amostra e transferir para almofariz,
- Para amostras fortificadas, adicionar 50 μ L de solução padrão conjunta dos alcaloides e aguardar 30 min para interação dos analitos com a matriz.
- Pesar em vidro de relógio 0,1 g de adsorvente Discovery DPA 6S,
- Homogeneizar a amostra com o adsorvente por 5 min com auxílio de um almofariz e pistilo de porcelana,
- Transferir o conteúdo do almofariz para um cartucho de extração, tipo SPE com capacidade de 1 mL, contendo disco poroso de polietileno inerte como base.
- Eluir com 2 mL de solução aquosa de ácido fórmico 1% usando o sistema para *SPE vacuum manifold* a vácuo, com vazão de aproximadamente 1 mL min⁻¹, recolhendo o eluato em um balão volumétrico de 2 mL.
- Filtrar o extrato com membrana de 0,22 μ m,
- Realizar análise instrumental (1 μ L).

2.2.8 Limpeza de materiais

A lavagem da vidraria segue um procedimento padrão do Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes (LCP):

- Enxágua com água destilada;
- Sonicar com água ultrapura;
- Enxágua com ultrapura.
- Lavar com n-hexano,
- Lavar com acetona,
- Secar em estufa a 100°C ou temperatura ambiente, de acordo com a especificidade da vidraria.

2.2.9 Descarte de resíduos

Os resíduos gerados durante o desenvolvimento do trabalho foram descartados de acordo com as suas classificações: Resíduos líquidos oriundos de solventes orgânicos foram descartados em bombonas de plástico devidamente identificadas e distintas entre solventes clorados e não clorados. Os resíduos sólidos resultantes do procedimento de extração foram armazenados em frasco de vidro também identificados.

2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

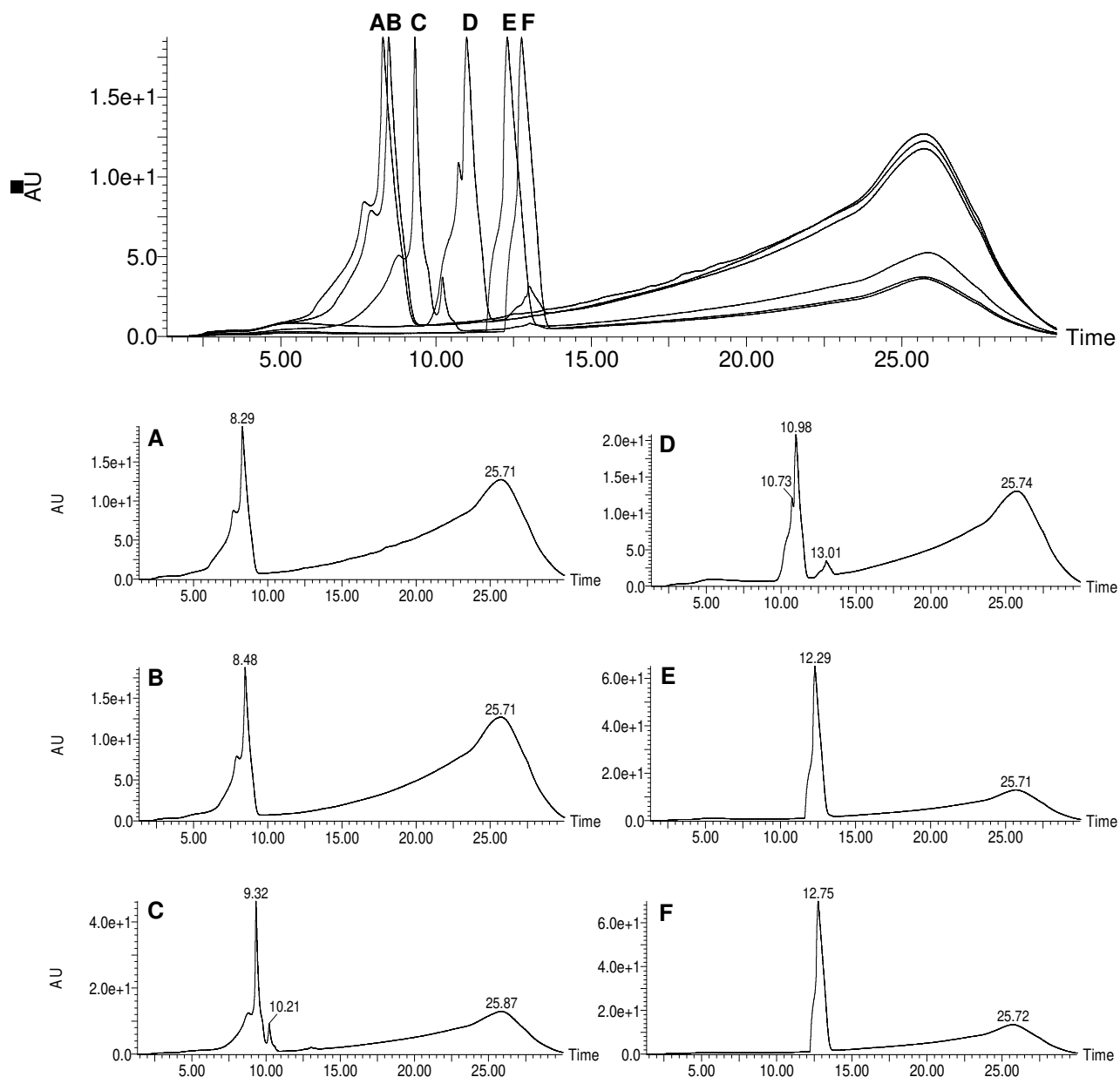
2.3.1 Desenvolvimento das condições cromatográficas de análise

Para o desenvolvimento das condições cromatográficas foram utilizados padrões analíticos dos alcaloides selecionados. O uso de padrões analíticos certificados permite que se tenha um conhecimento do comportamento do princípio ativo na técnica cromatográfica escolhida para análise [3]. Desta forma, inicialmente, soluções padrões individuais dos alcaloides *N,N*-dimetiltryptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahidroamina e tryptamina foram analisadas no Sistema 1 em modo exploratório utilizando o detector UV-Vis/DAD.

O método de análise exploratória em cromatografia líquida é uma ferramenta comumente utilizada no desenvolvimento de um método de separação pois é capaz de fornecer ao analista informações relacionadas ao comportamento dos analitos como grau de afinidade com as fases estacionária e móvel, tempo de retenção, e possíveis co-eluições; informações estas utilizadas na elaboração do método de eluição, seja isocrático ou gradiente [4]. Ademais, as condições cromatográficas foram desenvolvidas também a partir da avaliação dos seguintes parâmetros: fase estacionária, fase móvel, vazão da fase móvel e volume de injeção; até que fosse obtida uma condição que fornecesse uma eficiente separação analítica com picos bem resolvidos em um curto tempo de análise.

Os testes foram iniciados a partir de uma análise exploratória com a fase móvel metanol:água (acidificadas com ácido fórmico a 0,1%) variando de 5-100% do solvente orgânico em um tempo total de 30 min, vazão 0,1 mL min⁻¹, coluna analítica modelo BEH C18 Waters, e volume de injeção de 5 µL de soluções individuais dos alcaloides na concentração de 50 µg mL⁻¹. Conforme pode ser notado na Figura 9, todos os analitos apresentaram resposta cromatográfica, todavia foram observados picos alargados e não simétricos com resolução inadequada

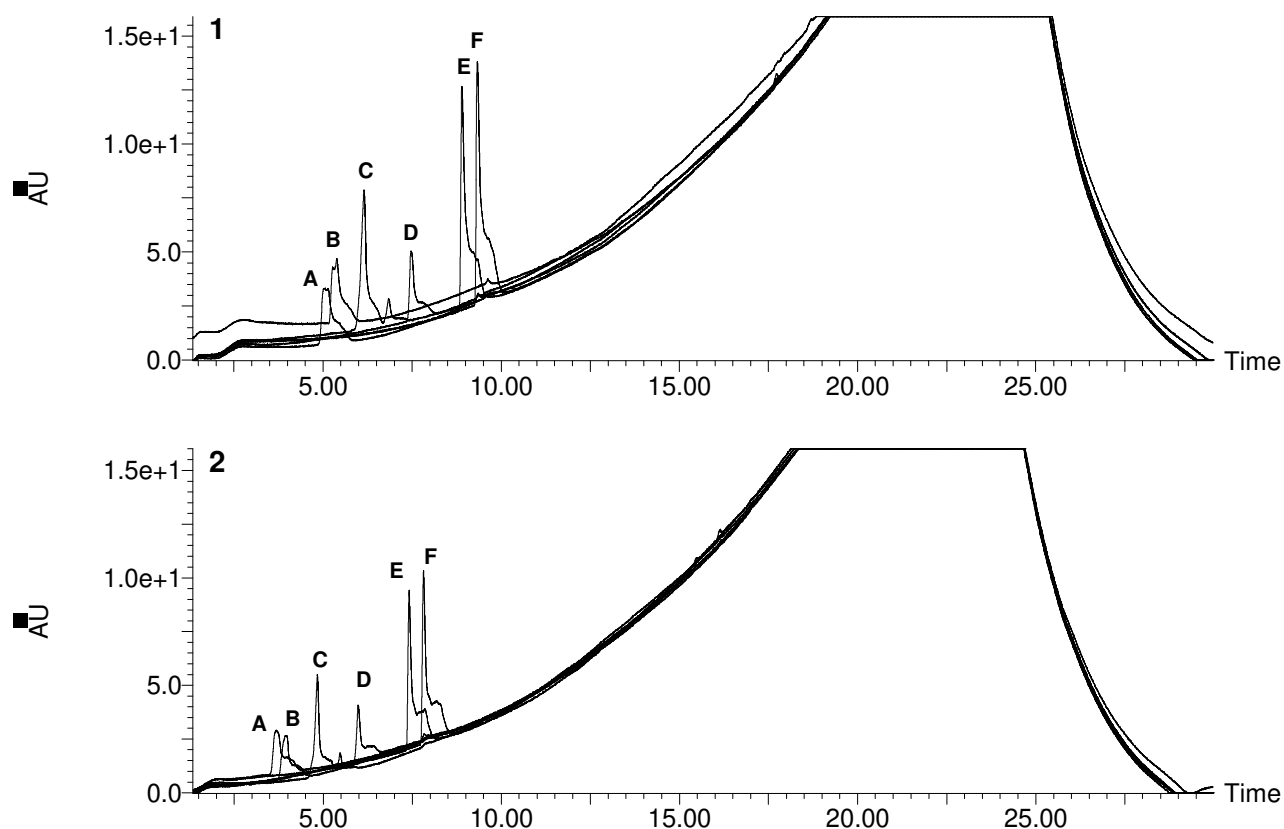
Figura 9. Cromatograma obtido a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H₂O, Coluna BEH C18, UV-DAD.



A) Triptamina, B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Tetrahydroharmina, E) Harmalina, F) Harmina.

A obtenção de picos alargados e/ou não simétricos pode ser advindo de condições de vazão e gradientes de eluição aplicados ao método de análise, e, à vista disso, podem ser corrigidos a partir de modificações aplicadas a estes parâmetros. A Figura 10 apresenta os cromatogramas obtidos quando da variação da vazão da fase móvel para $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, mantendo as demais condições inalteradas. Nota-se que em ambos os casos o perfil dos sinais foi mantido (apresentando ainda má simetria) implicando na necessidade de novas otimizações. Contudo, o tempo de retenção dos analitos foi reduzido com a vazão de $0,3 \text{ mL min}^{-1}$, de modo que esta condição foi adotada como satisfatória para a obtenção de uma análise com menor tempo.

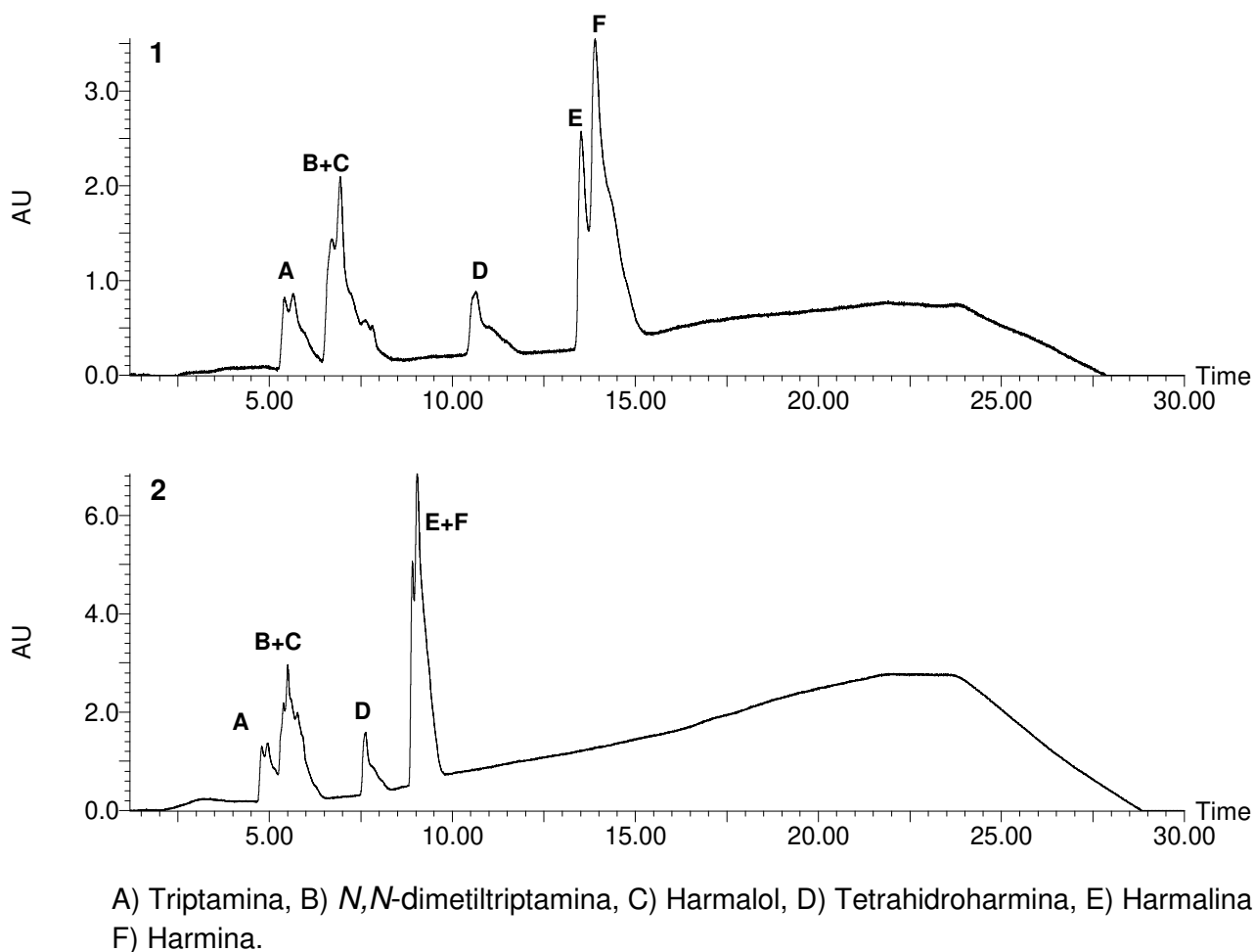
Figura 10. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H₂O, Coluna BEH C18, UV-DAD. 1) $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, 2) $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.



A) Triptamina, B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Tetrahidroharmina, E) Harmalina, F) Harmina.

Ainda em busca de sinais cromatográficos com melhores resoluções e perfil de separação, foram aplicados novos gradientes de eluição, todavia sem êxito dentro dos critérios pré-estabelecidos; o que levou à modificação da composição da fase móvel a partir da substituição do metanol por acetonitrila (MeCN) como solvente orgânico. Retomou-se ao gradiente de análise exploratória (5 -100% MeCN em 30 min) e os perfis cromatográficos foram avaliados após análise sob condições de vazão de 0,1 e 0,2 mL min⁻¹. A Figura 11 apresenta os resultados destas análises.

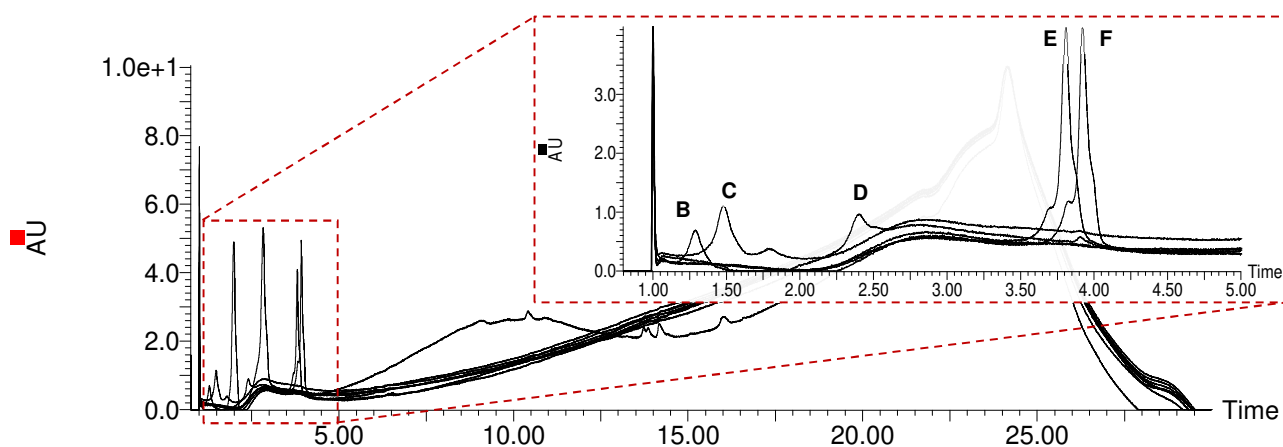
Figura 11. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análise individuais dos alcaloides na concentração de 50 µg mL⁻¹ em modo exploratório com fase móvel MeCN:H₂O, Coluna BEH C18, UV-DAD. 1) 0,1 mL min⁻¹, 2) 0,2 mL min⁻¹.



Conforme pode ser observado, a eluição com acetonitrila implicou em co-eluição dos alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina e harmalol (t_R 6,9 min), dado a presença de apenas 5 sinais no cromatograma 1. Este inconveniente foi agravado quando do aumento da vazão para $0,2 \text{ mL min}^{-1}$, no qual o número de sinais foi reduzido a 4 devido a eluição concorrente entre os alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina e harmalol (t_R 5,5 min) e harmina e harmalina no t_R 8,9 min. Tais resultados sugerem, portanto, que o solvente acetonitrila não favoreceu uma interação dos analitos com a fase estacionária C18 quando comparado com o metanol, acarretando baixa seletividade.

Diante da ineficiência de separação com a coluna BEH C18, foram avaliados alguns dos gradientes e parâmetros de eluição supracitados em uma nova fase estacionária: a ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl. Esta coluna é composta por grupos fenil e hexil ligados quimicamente a partículas de sílica e oferece um mecanismo de separação de modo misto em que a cadeia C6 é responsável por interações hidrofóbicas e o anel fenil é responsável por interações do tipo π - π , ampliando assim o espectro de polaridade de compostos [5]. A Figura 12 apresenta o cromatograma obtido a partir da análise de uma solução padrão conjunta dos alcaloides em análise exploratória com a fase móvel acetonitrila:água.

Figura 12. Cromatograma obtido a partir de análises individuais dos alcaloides na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeCN:H₂O, Coluna CSH Phenyl-Hexyl, UV-DAD.



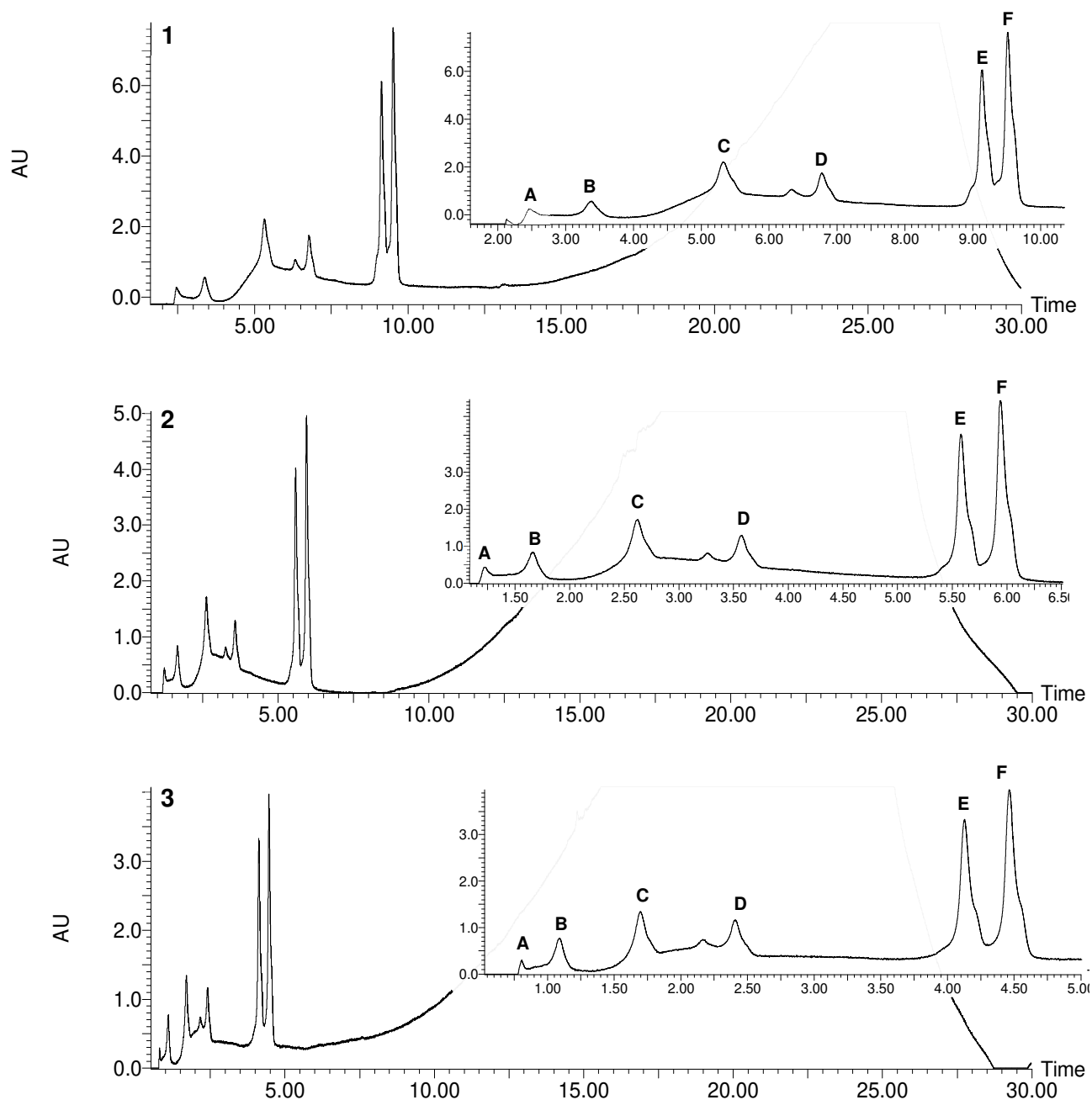
B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Tetrahydroharmina, E) Harmalina, F) Harmina.

Embora com co-eluições parciais (harmina e harmalina) e picos alargados para a maioria dos compostos, claramente foi possível notar indicativos de uma melhor eficiência na separação dos analitos com a coluna CSH Phenyl-Hexyl frente os resultados obtidos com a coluna BEH C18. Há de se destacar, porém, que o alcaloide triptamina não apresentou sinal cromatográfico, levando à suspeita de que estivesse sendo eluído juntamente com o pico da fase móvel, ou seja, não estava sendo retido à fase estacionária da coluna; situação inconveniente para o desenvolvimento das condições cromatográficas pretendidas. Variação nas proporções de solventes foi aplicada em distintos gradientes, todavia não foram verificadas melhorias em relação ao perfil cromatográfico apresentado na Figura 10.

Substituindo o solvente acetonitrila por metanol, perfis cromatográficos em consonância com o objetivo proposto começaram a ser notados na análise em modo exploratório (Figura 13). Foi avaliado a influência da vazão de eluição (0,1, 0,2, e 0,3 mL min⁻¹), obtendo um cromatograma com melhores condições de separação, picos bem definidos, estreitos e com boas intensidades a partir da vazão de 0,3 mL min⁻¹ com um tempo de análise de 6 min.

A eficiência obtida na separação, com boa seletividade para os compostos estudados, se deve ao mecanismo de interação proposto pela fase estacionária fenil-hexil; indicada para retenção de compostos com anéis aromáticos. A presença do grupo fenil ligada à superfície de sílica favorece a retenção dos alcaloides a partir de ligações do tipo π - π entre este grupo e as ligações duplas presentes no grupo indol/ β -carbolina que compõe os alcaloides. O melhor perfil cromatográfico obtido com o metanol é devido à ausência de elétrons π em sua estrutura; diferente do que acontece com acetonitrila que neste caso atenua as interações analitos/fase estacionária, prejudicando a seletividade da coluna cromatográfica. [6,7]

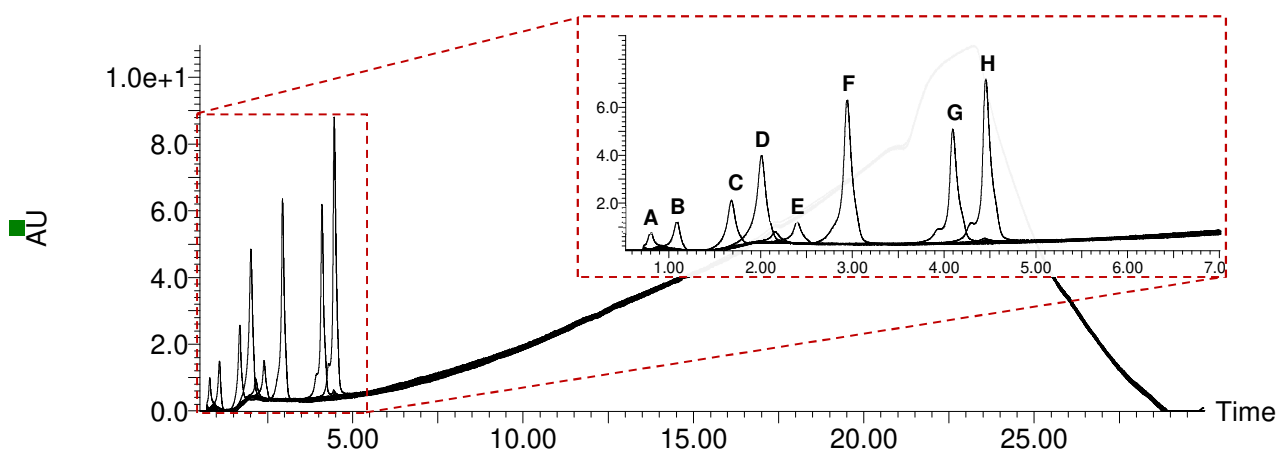
Figura 13. Cromatogramas obtidos dos ensaios de variação da vazão da fase móvel a partir de análise de solução padrão conjunta dos alcaloides na concentração de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ em modo exploratório com fase móvel MeOH:H₂O, Coluna CSH Phenyl-Hexil, UV-DAD. 1) $0,1 \text{ mL min}^{-1}$, 2) $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ e 3) $0,3 \text{ mL min}^{-1}$.



A) Triptamina B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Tetrahydroharmina, E) Harmalina, F) Harmina.

Após inclusão dos compostos harmano e norharmano à solução de alcaloides, novas análises nestas condições foram realizadas obtendo-se ainda um perfil cromatográfico satisfatório haja vista que os tempos de retenção destes dois compostos não interferiram no perfil de separação (Figura 14). Ademais, visando à redução do tempo total de corrida cromatográfica, e por consequência consumo de reagentes, ajustes no método de análise exploratória resultaram em gradiente de eluição satisfatório (12 min), no qual os critérios de eluição dos analitos alvos (parte A), limpeza da coluna cromatográfica (parte B) e reequilíbrio de condições iniciais de análise (parte C) foram contemplados [4]; conforme apresentado na Tabela 7 e ilustrado na Figura 15.

Figura 14. Perfil cromatográfico obtido a partir de gradiente de eluição otimizado com fase móvel MeOH:H₂O, Coluna CSH Phenyl-Hexyl, UV-DAD.

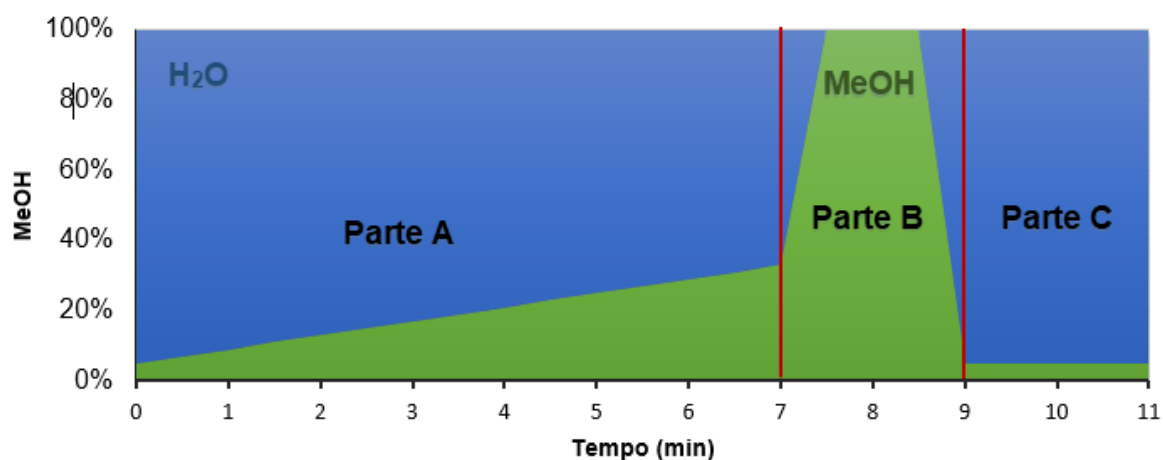


A) Triptamina B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Norharmano, E) Tetrahydroharmina, F) Harmano, G) Harmalina e H) Harmina.

Tabela 7. Gradiente de eluição otimizado para análise cromatográfica no Sistema 1 com coluna analítica CSH Phenyl-Hexyl e fase móvel MeOH:H₂O.

Tempo (min)	%H ₂ O	%MeOH
0,01	95	5
7,00	67	33
7,50	0	100
8,50	0	100
9,00	95	5
11,00	95	5

Figura 15. Ilustração do gradiente de eluição otimizado.



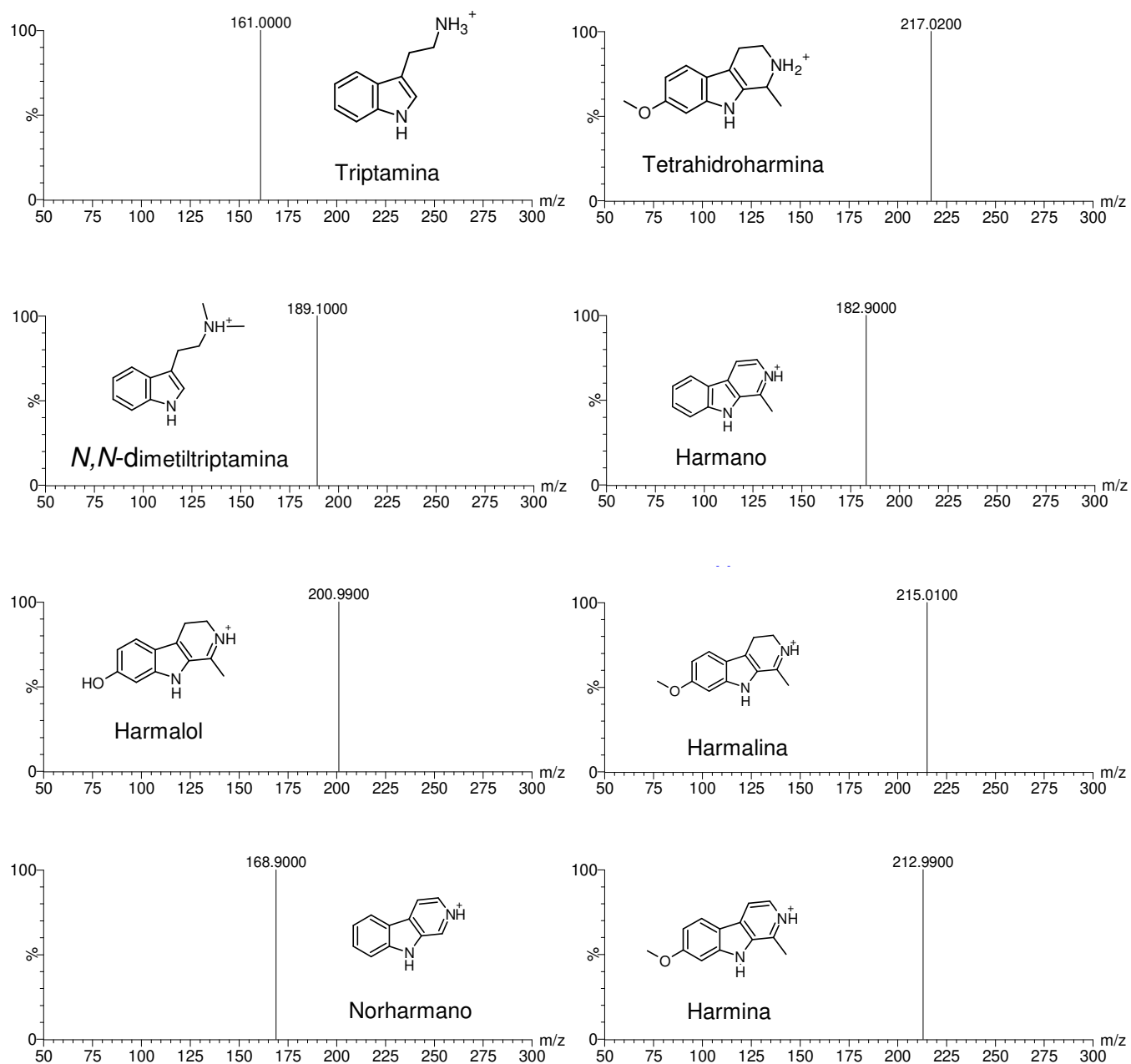
Assim, foi definido as condições cromatográficas para análise dos alcaloides alvo de estudo neste trabalho: Coluna analítica ACQUITY UPLC CSH Phenyl-Hexyl (130Å, 1,7 µm, 2,1 mm x 100 mm); fase móvel binária composta por metanol e água acidificados com 0,1% de ácido fórmico em modo gradiente de eluição, vazão de 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção 1 µL, forno da coluna aquecido a 40°C.

2.3.2 Otimização de condições de análise por espectrometria de massas

2.3.2.1 Otimização das condições de análise por ESI-TQD Waters (Sistema 1)

A otimização dos parâmetros experimentais do espectrômetro de massas Xevo TQD Waters foi desenvolvida a partir da infusão, ou seja, injeção direta sem análise cromatográfica, das soluções individuais dos alcaloides preparados na concentração de $1 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol: água (50:50, v/v) acidificado com 0,1% de ácido fórmico. Foram avaliados, de maneira sistemática e individual, o modo de ionização da fonte (positivo e/ou negativo), voltagem do capilar, voltagem do cone e energias de colisão de modo a alcançar o máximo de desempenho de ionização dos analitos e consequentemente, detecção e quantificação; tomando como critério de otimização a intensidade dos sinais. Para tal finalidade, fez-se uso da ferramenta *Intellistart™* Waters disponível no software do equipamento para desenvolvimento de método.

Foi avaliada inicialmente o melhor modo de ionização dos íons precursores a partir de análises em modo positivo e negativo da fonte ESI. Esta fonte foi selecionada levando-se em consideração a característica dos analitos estudados (polares e ionizáveis), sua vasta aplicabilidade e compatibilidade com as condições cromatográficas de separação estabelecidas (baixa vazão de fase móvel e mecanismo de separação em fase reversa). Para todos os compostos, o modo ESI⁺ foi o que favoreceu as melhores condições de ionização, fornecendo moléculas protonadas do tipo $[\text{M}+\text{H}]^+$ (Figura 16). Tal comportamento é característico para compostos básicos dada a relativa facilidade em que são protonados e foi favorecido pelo uso de ácido fórmico como agente ionizante, o qual, por sua vez, atua como facilitador no processo de ionização de moléculas pela habilidade de doação de próton. [8,9]

Figura 16. Espectros de massas de moléculas protonadas dos alcaloides pelo Sistema 1.

A voltagem aplicada ao capilar é responsável por promover a protonação (no caso do modo positivo) dos analitos alvo e, portanto, deve ser ajustada com a finalidade de garantir que o máximo de volume de amostra transferida para a fonte de ionização seja ionizada durante a etapa de nebulização. Os valores de voltagem ajustados foram aqueles que promoveram a ionização das moléculas de cada alcaloide com o máximo de densidade de carga; sendo, portanto, tomado como critério a intensidade dos sinais dos íons moleculares. De modo geral, o melhor valor de voltagem aplicado ao capilar foi 3,0 kV e portando definido para o método.

Com a seleção do modo de ionização e voltagem do capilar, foram verificadas as melhores condições de temperatura da fonte, temperatura e vazão do gás de dessolvatação (N_2) e vazão do gás no cone (N_2). Os três primeiros parâmetros estão associados à condição em que a amostra é introduzida na fonte de ionização e devem ser ajustados para garantir que todo o volume transferido pelo capilar seja nebulizado, o último por sua vez é utilizado para minimizar a formação de aglomerados de íons indesejáveis (*clusters*) e/ou facilitar o processo de eliminação do solvente remanescente. Para o ajuste destes parâmetros tomou-se como critério a vazão de eluição da fase móvel otimizada nas condições cromatográficas; valores pré-definidos são estabelecidas pelo fabricante do equipamento onde para o intervalo de vazão de 0,101 a 0,500 mL min⁻¹, recomenda-se que a temperatura da fonte, a temperatura de dessolvatação e a vazão do gás de dessolvatação operem em 150°C, 500°C e 1000 L h⁻¹, respectivamente. No entanto, para a vazão de 0,3 mL min⁻¹ melhores respostas em termos de intensidade de sinal foram obtidos com os valores de 100°C, 450°C e 900 L h⁻¹. Uma vazão de N_2 no cone de 50 L h⁻¹ mostrou-se adequado para as condições de análise. A Tabela 8 agrupa os parâmetros otimizados da fonte de ionização.

Tabela 8. Condições de análise da fonte de ionização ESI para o sistema 1.

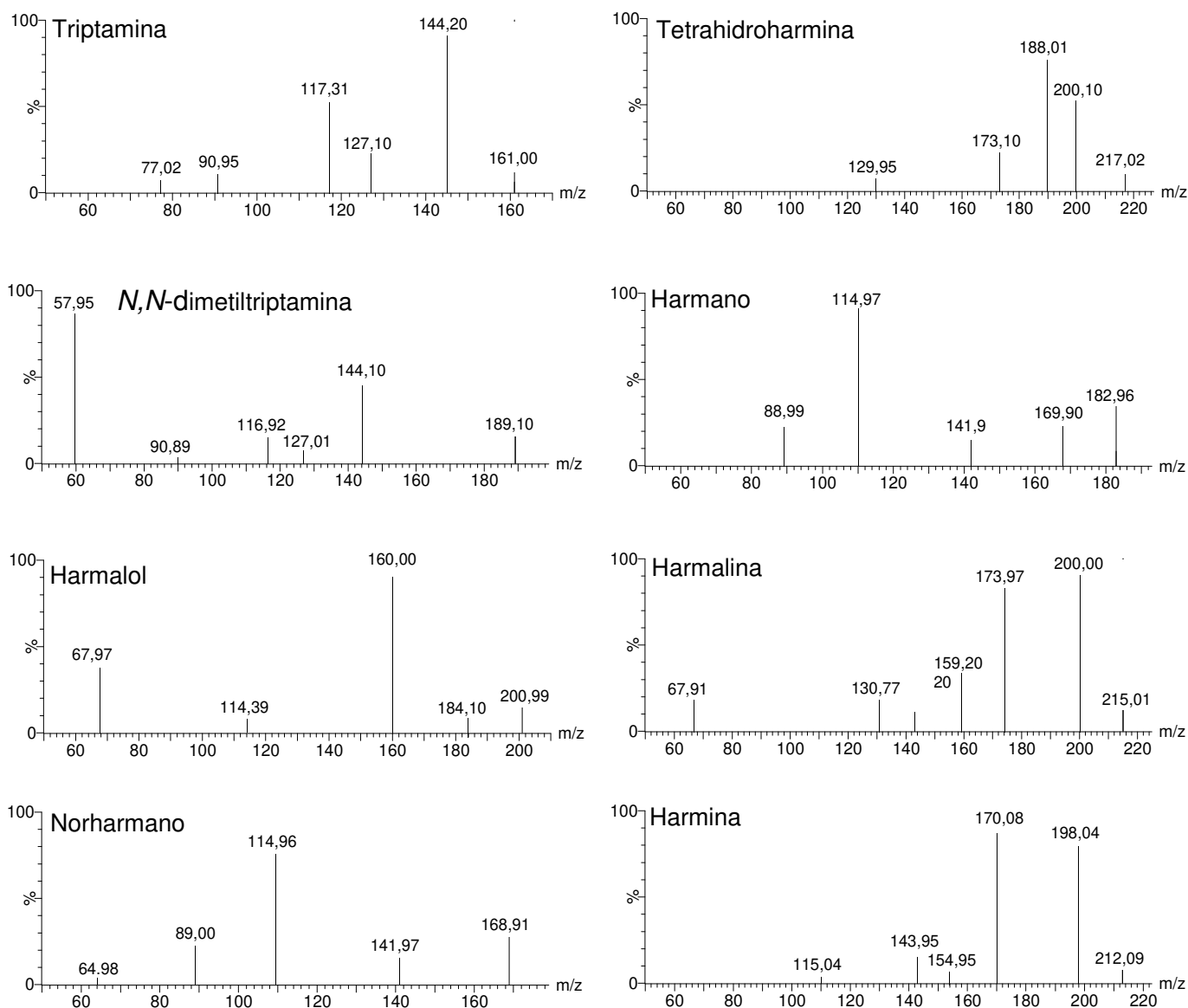
Parâmetro	Condição ajustada
Modo de Ionização	Positivo (ESI+)
Voltagem do Capilar	3,0 kV
Temperatura da Fonte	150° C
Temperatura de Dessolvatação	450° C
Vazão de Gás de Dessolvatação	900 L h ⁻¹
Vazão de Gás no Cone	50 L h ⁻¹

Em continuidade, foi ajustado o melhor valor de voltagem do cone para cada alcaloide. Este parâmetro é responsável por direcionar os íons protonados presentes na amostra nebulizada aos analisadores de massas pelo efeito de atração eletrostática, sendo assim, a otimização indispensável para garantir a efetiva transferência dos íons e consequentemente uma precisa quantificação. As voltagens de cone otimizadas para cada analito são relatadas na Tabela 9 e foram definidas pelo critério de máximo de intensidade da molécula protonada, ao passo em que se evitou possíveis fragmentações e/ou rearranjos provocados pelo processo de dissociação induzida por colisão (CID – *Collision-Induced Dissociation*) entre as moléculas protonadas dos analitos e gás de contravazão ainda na fonte de ionização. [10]

O método de análise (aquisição de dados) escolhido para identificação e quantificação dos compostos alvo foi o Monitoramento de Reação Seleccionada (*SRM, Selective Reaction Monitoring*). Este método é importante em estudos de monitoramento de moléculas alvos por espectrometria de massas pois promove uma alta sensibilidade na quantificação e elimina análises qualitativas equivocadas. Para a obtenção do método SRM, portanto, fez-se necessário investigar a formação de fragmentos de cada alcaloide estudado a partir de ajustes no parâmetro energia de colisão (CE – *Collision energy*). Assim, foi analisado a formação de íons produtos a partir da variação de energia (2-50 eV) aplicada ao íon precursor selecionado quando da sua passagem pela célula de colisão sob atmosfera de gás argônio.

A Figura 17 apresenta os espectros de massas dos ensaios de fragmentação dos íons percussores, nos quais são observados em média a formação de 5 fragmentos para cada alcaloide, com perfis análogos aos resultados encontrados na literatura e bancos de dados online (*i.e.* MassBank). Dentre os fragmentos gerados, foram selecionados os dois mais intensos de cada alcaloide para serem monitorados no método SRM e utilizados como íon de quantificação e íon de confirmação (em ordem de intensidade, respectivamente). [11]

Figura 17. Espectros de massas com perfil de fragmentação dos alcaloides estudados.



Dada a semelhança estrutural das moléculas estudadas, fragmentos mais estáveis com mesma relação m/z foram observados, como é o caso do harmano e norharmano com o íon de m/z 114,97, e *N,N*-dimetiltriptamina e triptamina com íon de m/z 144,10; tal observação, no entanto, não gerou inconveniente para a quantificação, uma vez que os íons de confirmação selecionados para cada composto são distintos, assegurando a seletividade do método. Além disso, há de recordar o fato de que as condições cromatográficas otimizadas possibilitaram uma eficiente separação, de modo que os compostos foram eluídos em tempos de retenção diferentes.

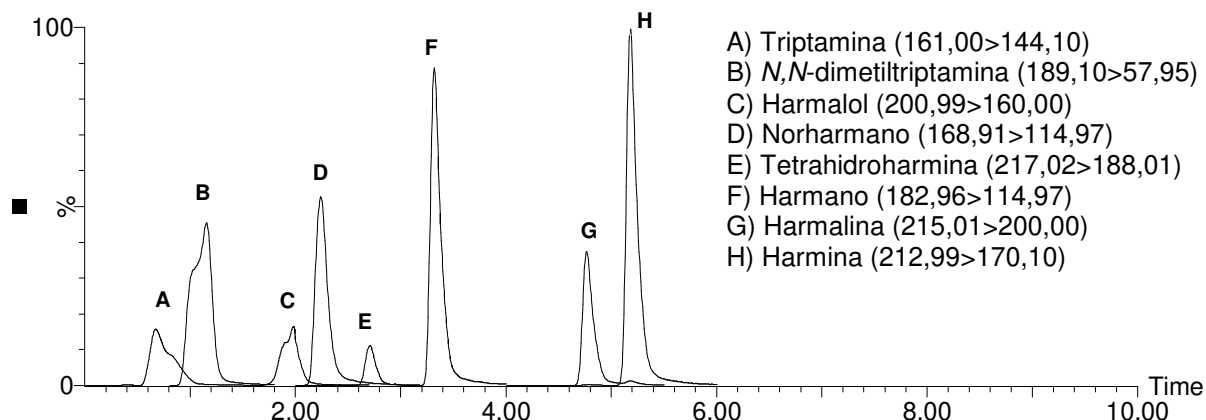
A Tabela 9 apresenta os melhores valores de voltagem de cone, energia de colisão (CE, *Collision energy*) e *Dwell time* para os analitos estudados. A Figura 18 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise de uma solução padrão conjunta pelo método SRM configurado com os sinais provenientes do monitoramento dos íons de quantificação. Os valores de *Dwell time* foram ajustados de modo a assegurar uma contagem de aproximadamente 25 pontos de aquisição por pico para cada analito. [12]

Tabela 9. Parâmetros de detecção otimizados no Sistema 1 para análises em modo SRM.

Alcaloide	Íon precursor (m/z)	Voltagem do Cone (V)	Íon produto (CE)		<i>Dwell Time</i> (s)
			Quantificação	Confirmação	
<i>N,N</i> -dimetiltriptamina	189,10	23	57,95 (12)	144,10 (17)	0,080
Harmalina	215,01	45	200,00 (22)	173,97 (23)	0,080
Harmalol	200,99	45	160,00 (23)	67,97 (26)	0,052
Harmano	182,96	60	114,97 (32)	88,99 (47)	0,108
Harmina	212,99	45	170,10 (30)	198,04 (23)	0,080
Norharmano	168,91	65	114,97 (30)	141,97 (26)	0,052
Tetrahidroharmina	217,02	20	188,01 (14)	200,10 (12)	0,052
Triptamina	161,00	16	144,00 (10)	117,31 (23)	0,080

CE – Energia de colisão (*Collision energy*)

Figura 18. Cromatograma de íons de quantificação dos alcaloides estudados a partir das condições de análises descritas nas tabelas 8 e 9.

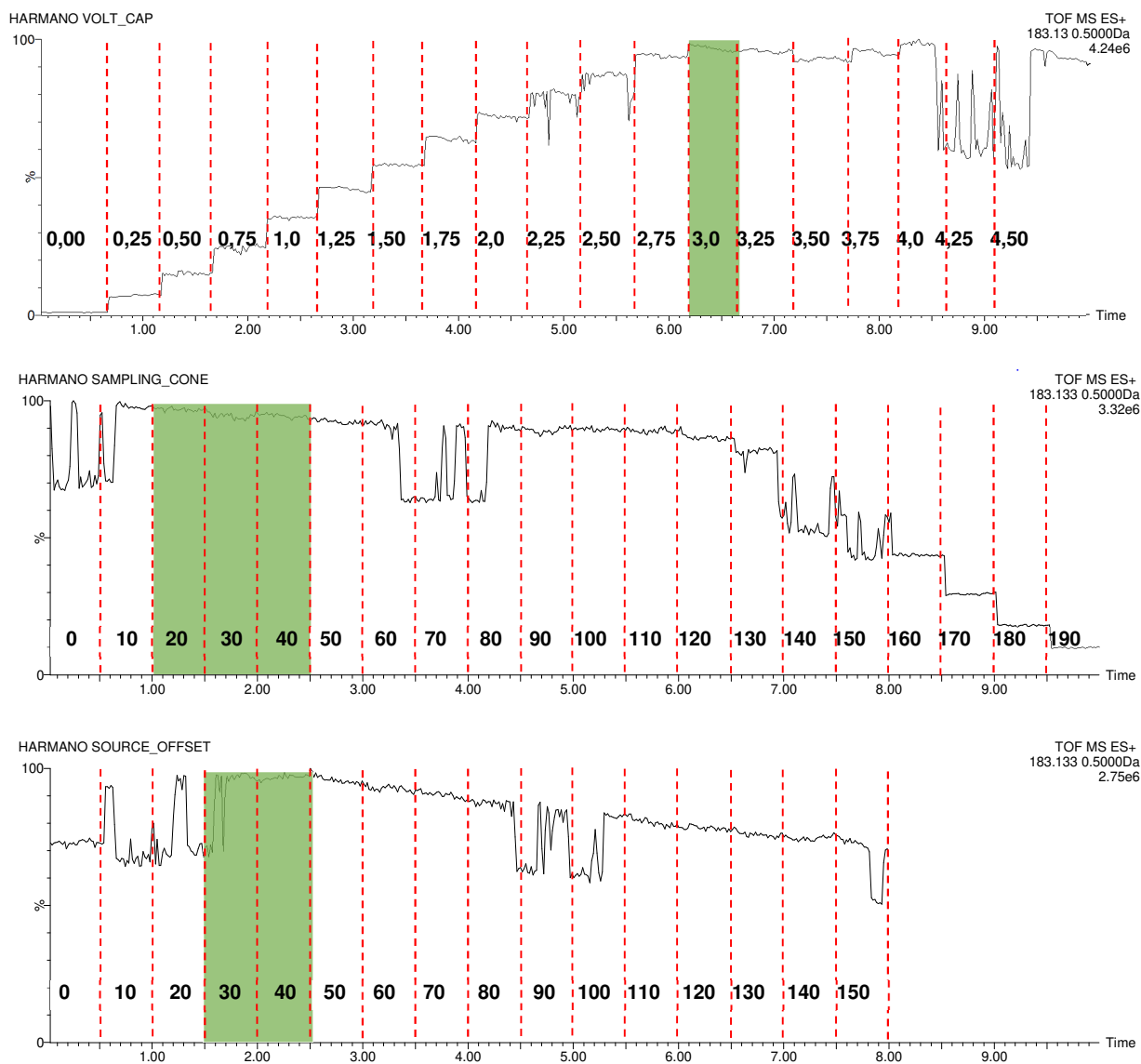


2.3.2.2 Otimização das condições de análise por ESI-QTOF Waters (Sistema 2)

O *Sistema 2* foi utilizado com a finalidade de confirmar a presença dos alcaloides selecionados em extratos de amostras de tabaco devido ao seu poder de resolução de massa frente aos resultados obtidos pelo *sistema 1*; possibilitando assim a confirmação, quando existente, destes compostos de maneira inequívoca. Para análise dos alcaloides por este sistema, as condições de separação cromatográfica foram as mesmas utilizadas no *Sistema 1*, distinguindo somente no sistema de análise por espectrometria de massas.

Otimizações das condições de ionização das moléculas foram desenvolvidas a partir de infusões individuais dos alcaloides. Foram estudados os melhores valores de voltagem do capilar, voltagem do *sampling cone* e voltagem de *source offset*. Para cada parâmetro foram definidos limites máximos e mínimos de condição instrumental e seccionado em intervalos ao longo do tempo. Assim como para os sistemas anteriores, tomou-se como critério de resposta a intensidade do sinal com o detector condicionado à análise da molécula protonada de cada analito. A Figura 19 apresenta os gráficos de otimização dos parâmetros supracitados para o alcaloide harmano; os gráficos dos demais analitos foram organizadas no Apêndice 1.

Figura 19. Comportamentos de intensidade da molécula protonada do alcaloide harmano obtidos a partir de ajustes de voltagem dos parâmetros: A) *Cone*, B) *Sampling Cone* e C) *Source Offset*.



A partir da análise dos gráficos gerados, foram compilados os melhores valores de voltagem de cada parâmetro de modo a desenvolver a condição de *tunning* para o método de análise multirresíduo. As condições de temperatura de dessolvatação, temperatura da fonte, vazão de gás de dessolvatação e do *sampling cone* foram definidos a partir de condições instrumentais pré-estabelecidas em relação às condições de eluição do sistema UHPLC acoplado ao espectrômetro de massas. A leucina-encefalina (m/z 556,2771) foi utilizada como solução de referência (*Lock mass*) de modo a garantir a precisão das m/z medidas durante as análises a partir da infusão de 5 μL na concentração de 500 $\text{pg } \mu\text{L}^{-1}$. A Tabela 10 apresenta os parâmetros da fonte de ionização otimizados.

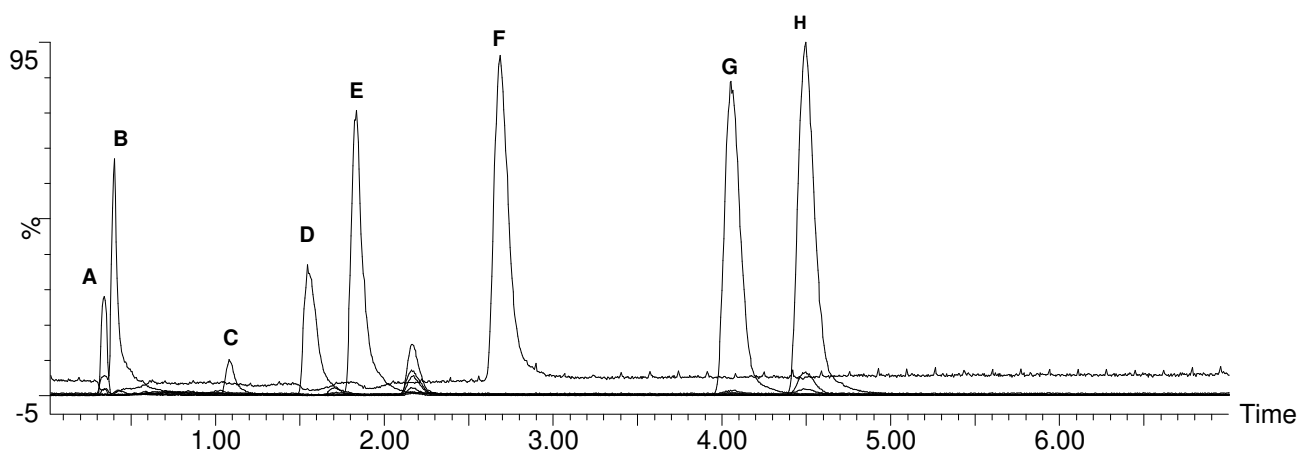
Tabela 10. Intervalo de variação e condições otimizadas da fonte de ionização no sistema 2.

Parâmetro	Intervalo de Ajuste	Valor ajustado
Voltagem do Capilar (kV)	0 – 5	3
Voltagem do <i>Sampling Cone</i> (V)	0 - 200	40
Voltagem de <i>Source Offset</i> (V)	0 - 150	20

Para a detecção analítica foi utilizado o método de Aquisição Independente de Dados (DIA - Data-Independent Acquisition) ou MS^E ; um método simples e genérico (*untargeted*) para aquisição de dados de forma abrangente e completa em que todos os íons gerados na fonte de ionização são transmitidos até a cela de colisão, que oscila sequencialmente entre funções de baixa e alta energia, enviando alternadamente precursores e fragmentos ao analisador TOF. Os experimentos com baixa energia de colisão produzem espectros de massa contendo íons precursores intactos, enquanto os experimentos com elevada energia de colisão produzem espectros de massas com íons fragmentos e assim ambos os dados obtidos são utilizados no processamento dos dados, de modo que são correlacionados às suas massas exatas. [13,14]

O método MS^E foi configurado para atuar no intervalo de m/z 50-600, de modo a abranger tanto as massas dos analitos como da leucina-encefalina, com energias de colisão variando de 10-50 V, considerando que a energia mais alta utilizada para formação de íons fragmentos quando da otimização no sistema 1 foi de 47 V (Tabela 9). A Figura 20 apresenta um cromatograma obtido a partir da análise de uma solução conjunta dos alcaloides e a Figura 21 os espectros gerados a partir combinação espectral das análises em baixa e alta energia de colisão com as massas exatas dos íons produtos e íons fragmentos, as quais serão utilizadas como critério de referência, juntamente com os tempos de retenção e erros de massa (≤ 5 ppm), para investigação de presença destes alcaloides no extrato de folhas de tabaco obtidos a partir do método de extração por MSPD desenvolvido.

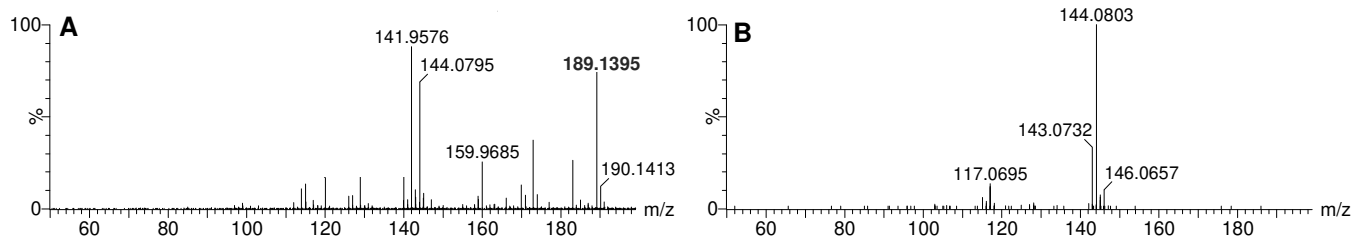
Figura 20. Cromatograma dos íons percussores dos alcaloides estudados obtido a partir de análise em modo MS^E em baixa energia de ionização utilizando o sistema 2.



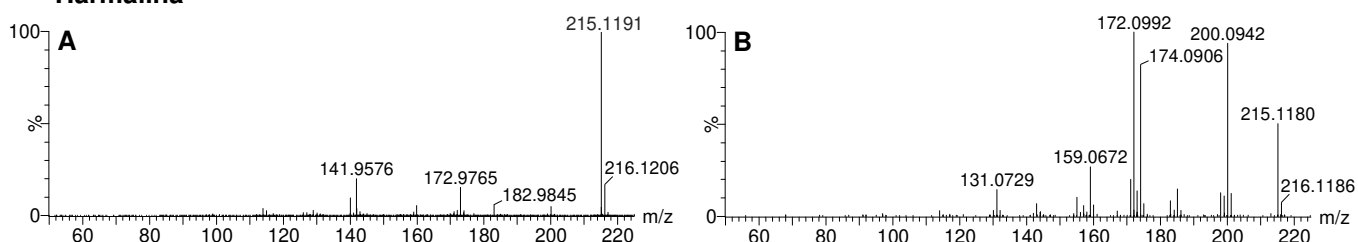
A) Triptamina B) *N,N*-dimetiltriptamina, C) Harmalol, D) Norharmano, E) Tetrahydroharmina
F) Harmano, G) Harmalina, H) Harmina.

Figura 21. Espectros de massas dos alcaloides estudados obtidos a partir de análises em baixa (A) e alta (B) energia de colisão para o método MS^E utilizando o sistema 2.

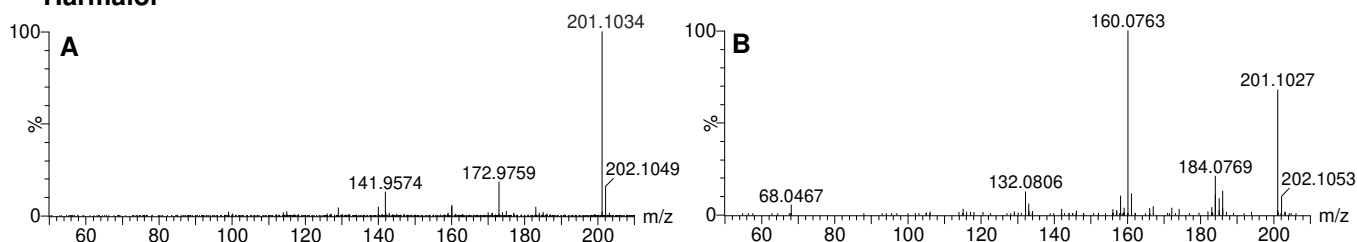
***N,N*-dimetiltriptamina**



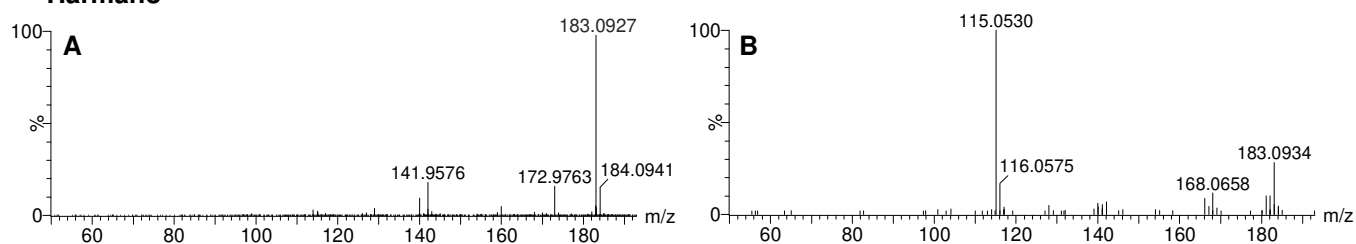
Harmalina



Harmalol



Harmano



Harmina

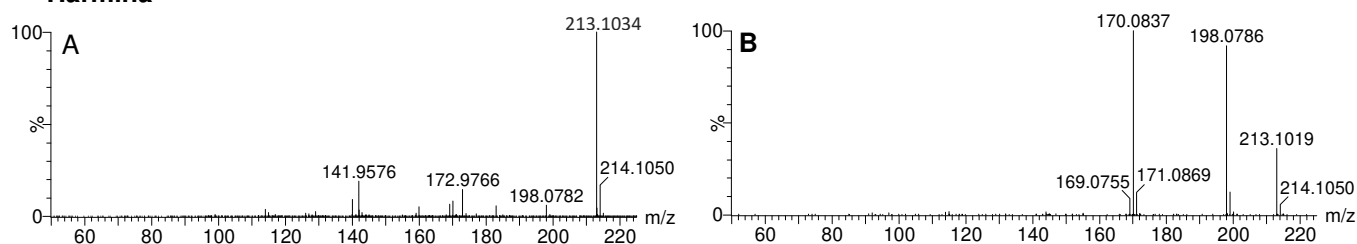
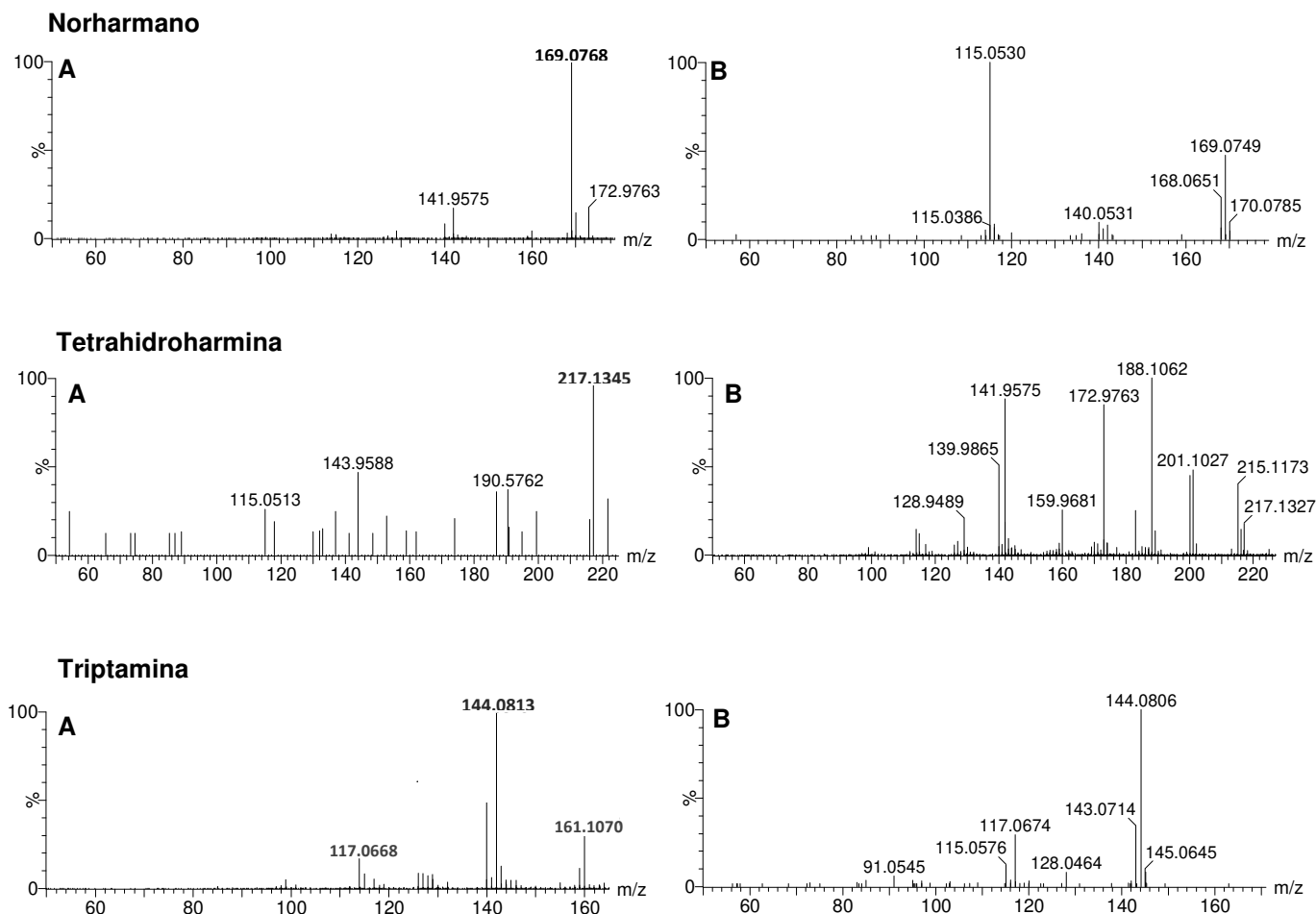


Figura 21. Continuação.



Conforme pode ser notado, os íons fragmentos observados no espectro de alta energia com maiores intensidades são os mesmos obtidos nas análises por ESI-TQD (Sistema 1); esta evidência é razoável quando certifica-se que para os dois sistemas em comparação é utilizado o mesmo mecanismo de ionização, assim como a similaridade das suas condições de *tunning*. Há de ressaltar, todavia, que aqui os íons foram obtidos com as massas acuradas em alta resolução; particularidade que será utilizada para confirmação dos íons monitorados inerentes ao analitos. A Tabela 11 confronta os valores de massas medidos dos íons precursores dos alcaloides frente aos seus valores de massa exata com a finalidade de estimar a qualidade de resolução do analisador deste sistema; para tal finalidade, fez-se uso do índice de erro de massa, tomando-se como critério de aceitabilidade erros de ± 5 ppm.

Tabela 11. Estimativa de erro de massa experimental para detecção dos alcaloides pelo sistema 2.

Alcaloide	Massa Exata*	Massa Medida*	Erro de Massa (ppm)
N,N-dimetiltriptamina	189,1392	189,1395	1,6
Harmalina	215,1184	215,1191	3,3
Harmalol	201,1028	201,1034	3,0
Harmano	183,0922	183,0927	2,7
Harmina	213,1028	213,1034	2,8
Norharmano	169,0766	169,0768	1,2
Tetrahidroharmina	217,1341	217,1345	1,8
Triptamina	161,1079	161,1081	1,2

* Equivalente ao íon $[M+H]^+$.

Conforme é verificado, os resultados obtidos em termos de erro de massa asseguram a confiabilidade do sistema de espectrometria de massas de alta resolução utilizado como ferramenta para confirmação da presença dos alcaloides em amostras de tabaco. Tal eficiência se deve à cuidadosa rotina de calibração instrumental, com recurso à solução padrão de leucina-encefalina como padrão de correção de massas.

A precisa capacidade de identificação obtida pelos modernos equipamentos de espectrometria de massas de alta resolução, tal qual o sistema ESI-QTOF utilizado neste estudo, inclusive quando operados em associação à cromatografia líquida tem estimulado os investimentos em pesquisas dedicadas ao desenvolvimento de métodos qualitativos para análises de compostos em diferentes sistemas biológicos por estas instrumentações, como a identificação de metabólitos secundários de plantas, triagem metabólica de doenças e ainda controle de consumo de drogas de abusos e/ou fármacos em fluidos corporais com elevada confiabilidade científica. [15-18]

Embora as configurações de espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo sejam consensualmente indicadas para análises com viés quantitativo, os recentes avanços nos designs instrumentais dos espectrômetros do tipo TOF-MS, sobretudo no que diz respeito ao aumento significativo da faixa dinâmica linear, têm viabilizado o desenvolvimento de metodologias com sensibilidades equivalentes ou próximas às obtidas por análises em modo SIM e SRM, com exatidão e precisão assegurada; de modo que estudos simultâneos de identificação e quantificação são progressivamente apresentados na literatura com aplicações desde amostras ambientais à processos bioanalíticos complexos. Neste sentido, o sistema UHPLC-ESI-QTOF apresenta-se como um importante recurso à concretização dos objetivos propostos neste estudo. [19,20]

2.3.3 Desenvolvimento do procedimento de extração por μ MSPD

O procedimento de extração dos alcaloides nas folhas de tabaco por dispersão da matriz em fase sólida foi desenvolvido a partir da avaliação dos materiais alumina neutra, Florisil®, e Discovery® DPA-6S (DPA) como agentes dispersantes. Estes adsorventes são aplicados no desenvolvimento de metodologias de extração em fase sólida pois apresentam características físico-químicas diferenciadas entre si e por isso permitem uma abrangente aplicação em diferentes tipos de matrizes e para diferentes classes de compostos inclusive alcaloides. [21-23]

Para o processo de eluição dos analitos, após dispersão da amostra no adsorvente, diferentes solventes de eluição foram avaliados. Tomou-se como partida o solvente metanol tendo em vista que foi o solvente que apresentou melhor desempenho no processo de separação cromatográfica e por apresentar alta solubilização pelos analitos alvos no estudo. Ademais, as condições experimentais de extração por dispersão da matriz em fase sólida foram: proporção matriz/adsorvente 1:10 (m/m) com 0,01 g de tabaco, tempo de maceração de 5 min e nível de fortificação 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Durante o desenvolvimento de metodologias de extração, toma-se como critério de eficiência os resultados dos ensaios de recuperação para os compostos alvos da matriz. Para expressar estes resultados, é efetuado um processo de fortificação da amostra com solução padrão dos analitos em concentração pré-estabelecida e, após o processo de extração proposto, os compostos são quantificados no extrato final. Valores de recuperação na faixa de 70-120% com desvio padrão relativo máximo de $\pm 20\%$ são considerados aceitáveis durante o processo de otimização. [24]

Um segundo critério para definir a eficiência de um método de extração diz respeito à sua seletividade, ou seja, a sua capacidade de fornecer um extrato limpo frente à técnica utilizada para análise, de modo que o isolamento, identificação e/ou quantificação dos analitos alvos não sejam comprometidos. No que diz respeito à análise cromatográfica acoplada à espectrometria de massas, fatores como co-eluição de sinais, supressão/aumento de íons, deposição de co-extrativos nos componentes da fonte de ionização, entre outros, devem ser evitados a fim de se trabalhar com o máximo de sensibilidade do equipamento. De modo geral, é pertinente assegurar um equilíbrio de eficiência entre os dois critérios mencionados. [25,26]

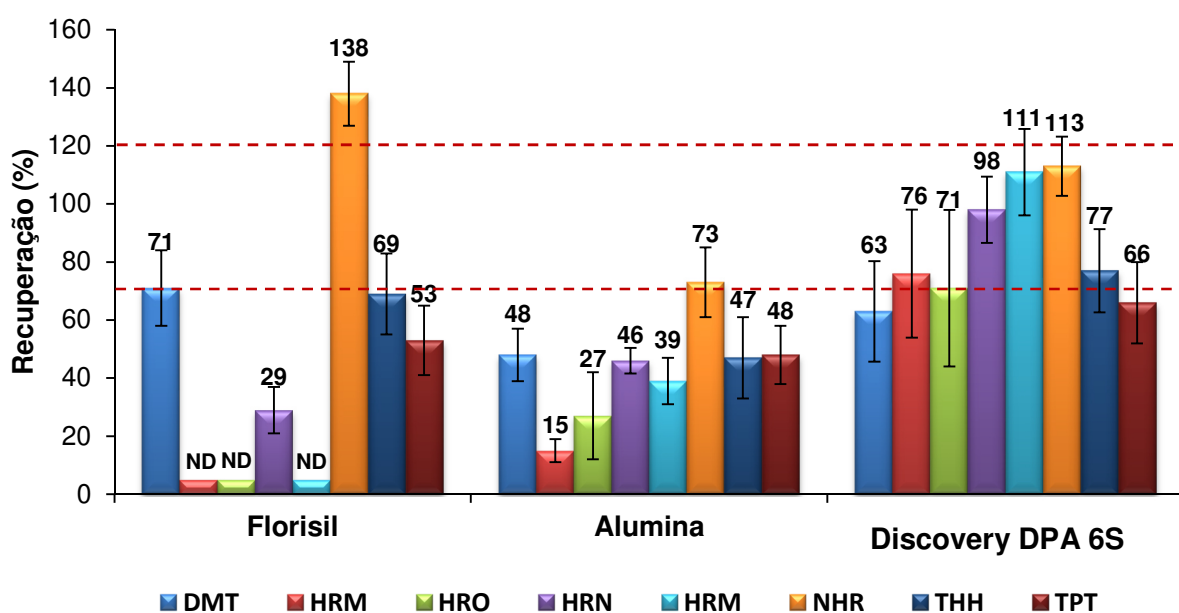
Haja visto que a amostra estudada se trata das folhas verdes de tabaco, as quais foram submetidas apenas ao processo de liofilização e trituração, e, portanto, preserva toda a sua composição química, inclusive pigmentos, foi adotado como critério preliminar de limpeza a coloração do extrato obtido, buscando-se um extrato satisfatoriamente límpido e/ou incolor. Desta maneira, para cada ensaio, foram realizados os testes com o branco dos reagentes (B_R) e branco da amostra (B_A) em que, enquanto o primeiro foi desenvolvido aplicando todas as etapas do procedimento de extração com a ausência da matriz de tabaco, o segundo diz respeito à matriz que não sofreu o processo de fortificação; conforme definido na *Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticide residues and analysis in food and feed* [27]. Assim, foi possível realizar concomitantemente tantos os estudos de recuperação como o potencial de limpeza da amostra no método de extração.

Todos os extratos obtidos a partir dos B_R foram submetidos à análise cromatográfica. Todavia, apenas aqueles extratos que apresentaram um aspecto límpido e/ou que foi verificado resultados satisfatórios em termos de recuperação analítica foram analisados, de modo a evitar acúmulo de resíduos na fonte de ionização oriundo de co-extratos provenientes da amostra.

2.3.3.1 Avaliação da eficiência de adsorventes

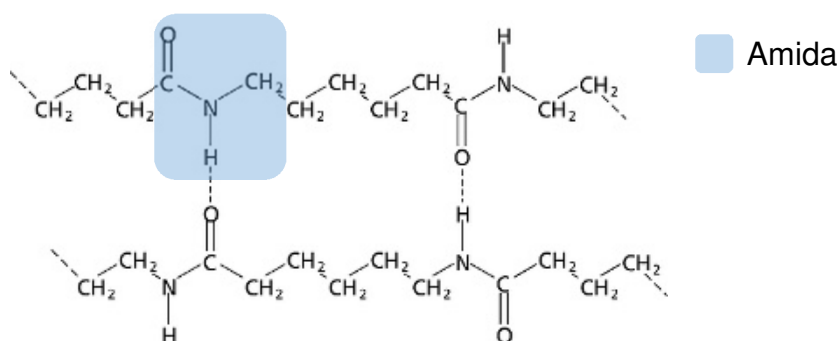
Os adsorventes alumina neutra, Florisil e Discovery DPA-6S foram avaliados como agentes dispersante da amostra na proporção matriz/adsorvente 1:10 (*m/m*) e, após 5 min de homogeneização e posterior montagem do cartucho de extração, foi realizada a eluição com 2 mL de metanol, o extrato obtido foi reduzido a 1 mL sob vazão de N₂. Os resultados de recuperação são apresentados na Figura 22 e foram mensurados a partir dos ensaios do branco dos reagentes no sistema de análise 1.

Figura 22. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 µg L⁻¹ utilizando diferentes materiais dispersantes (n=3). As análises foram realizadas no sistema 1.



Os melhores resultados foram obtidos com o adsorvente Discovery DPA-6S, cujos valores de recuperação para a maioria dos alcaloides margeiam o que a literatura admite como satisfatório quando do desenvolvimento de metodologias de extração. Este material é composto por uma resina de poliamida de natureza hidrofílica (Figura 23) e é comercialmente ofertado com a finalidade de adsorver compostos polares de soluções aquosas e metanólicas pelo mecanismo de fase reserva, interações π - π e ligações de hidrogênio ao grupo amida [28,29]. Tendo em conta a alta densidade de pares de elétrons π e a susceptibilidade de átomos de hidrogênio a ligações nos alcaloides estudados, compreende-se os bons resultados obtidos por este adsorvente.

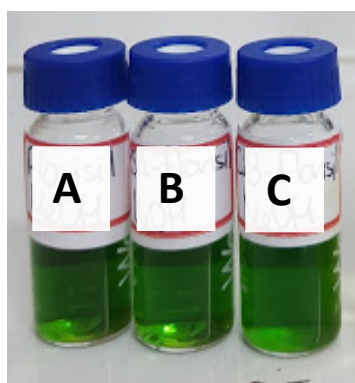
Figura 23. Estrutura molecular do adsorvente Discovery DPA-6S.



A literatura, até o momento, não reporta a aplicação do adsorvente Discovery DPA-6S para a extração de alcaloides; todavia, eficientes resultados são encontrados quando da sua aplicação em compostos de classes distintas, mas semelhante quanto a presença de elétrons favoráveis a interações do tipo π - π . Asada *et al.*, 2015, obtiveram êxito na purificação de extratos de casca de uva para a obtenção de antocianinas com o uso de água e metanol como solventes extratores; Bonan *et al.*, 2013, fizeram uso deste polímero em cartuchos de SPE para realização de procedimento de *clean-up* em amostras de alimentos objetivando a determinação de corantes (1:1, v/v).[30,31]

Os extratos obtidos dos brancos da amostra para os três adsorventes apresentaram coloração verde intensa, conforme pode ser observado na Figura 24, e por este motivo não foram submetidas à análise cromatográfica. Pigmentos presentes em plantas apresentam alta solubilidade em metanol, dentre outros solventes, como acetonitrila e acetona; logo, nenhum dos adsorventes avaliados foram eficientes para reter essa classe de substâncias, fazendo-se necessário portanto, a avaliação de um procedimento de limpeza à metodologia proposta de modo a evitar inconvenientes encontrados por exemplo por Trevisan *et al.*, 2017, quando da análise de pesticidas em folhas verdes de café por LC-MS, em que os altos teores de substância hidrofílicas, como compostos polifenólicos, cafeína e clorofila provocaram elevados valores de efeito matriz. [32,33]

Figura 24. Extratos dos brancos das amostras obtidos nos ensaios de avaliação de eficiência dos adsorventes Florisil (A), alumina neutra (B) e Discovery DPA 6S (C) utilizando metanol como solvente extrator.



2.3.3.2 Ensaios de limpeza da amostra

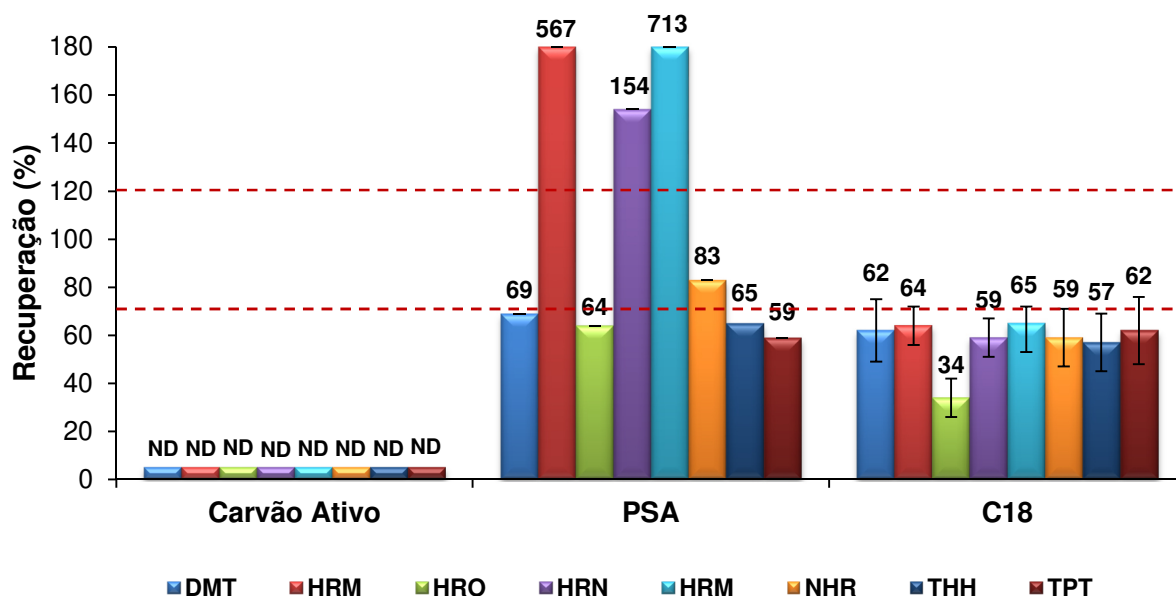
Materiais com características distintas dos utilizados como agente dispersante podem ser utilizados como agentes de limpeza de amostras em técnicas de extração em fase sólida. Para esta finalidade, o adsorvente é previamente adicionado à coluna de extração para auxiliar a retenção de compostos indesejados durante a etapa de eluição [34]. Neste trabalho, os materiais C18, PSA e carvão ativado foram avaliados como colunas auxiliares para a promoção de limpeza do extrato obtido a partir do uso do adsorvente Discovery DPA 6S e solvente de eluição metanol.

Carvão ativado é amplamente utilizado para remoção de compostos não-polares como pigmentos, carotenoides e esteróis; logo, a sua eficiência foi avaliada pela adição de 10 mg ao cartucho precedente à adição da amostra homogeneizada. No que diz respeito à limpeza do extrato, o resultado foi eficiente pois reduziu significativamente a intensidade da coloração. Contudo, os resultados de recuperação dos analitos foram prejudicados, com valores na faixa de 0,1 – 1,9%. Isto é justificado pela configuração espacial planar e a presença de elétrons deslocalizados do grupo indol dos alcaloides estudados, o que favorece uma forte adsorção à superfície deste material de modo que a força de eluição do metanol não foi suficiente para extrai-los [35,36].

Alternativamente, o carvão ativado foi substituído por PSA (100 mg); um adsorvente a base de amina alquilada (etilenodiamina-N-propil) com propriedade de troca iônica fraca apresentado comercialmente como eficaz na remoção de impurezas polares como açúcares, ácidos e pigmentos em amostras não polares por meio de ligações de hidrogênio formadas pelo grupamento NH terminal presente em sua estrutura [37,38]. No entanto, durante a eluição, notou-se que os pigmentos presentes na amostra foram gradativamente arrastados pelo metanol, findando em um extrato com coloração verde semelhante àquele obtido na Figura 24. Os valores de recuperação obtidos pelo branco dos reagentes foram elevados para os alcaloides harmina e harmalina (713% e 567%, respectivamente).

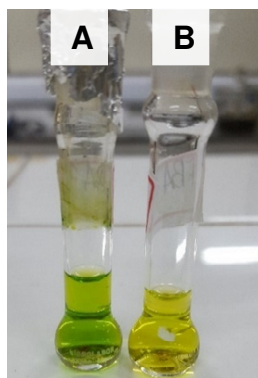
Por fim, foi investigado a capacidade do adsorvente C18 (200 mg) em remover os pigmentos das folhas verdes de tabaco. O C18 é um adsorvente de natureza apolar e é utilizado para separações em fase-reversa. Seu mecanismo de retenção é baseado em interações hidrofóbicas e portanto amplamente utilizado para adsorção de compostos não-polares ou neutros em amostras complexas [34,39]. Notou-se, nesta condição, que no início da eluição com metanol foi obtido um extrato amarelo e que uma fina camada verde ficou retida no topo da co-coluna de C18; todavia, durante a percolação majoritária do solvente, parte dos pigmentos de coloração verde também foram eluidos, sugerindo uma eficiência parcial deste adsorvente como coluna auxiliar. A Figura 25 apresenta os resultados de recuperação obtidos em cada processo de *clean-up*.

Figura 25. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes colunas auxiliares para *clean-up*. *RSD* estimado apenas para ensaio com C18 ($n=3$). ND - Não detectado.



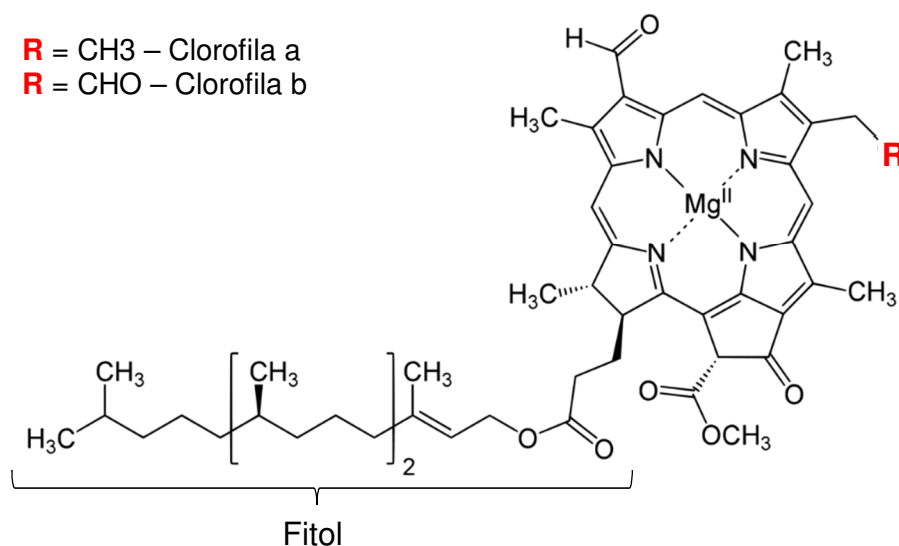
É observado que os melhores resultados de recuperação foram obtidos quando do uso de C18 como coluna auxiliar em decorrência da maior proximidade com o intervalo aceito como ótimo; por isto, novos experimentos foram direcionados à otimização com este adsorvente a partir modificações no processo de limpeza, sejam elas: A) utilização de um cartucho de SPE contendo 0,2 g de C18, sob o qual foi percolado o extrato (2 mL) obtido após procedimento de μMSPD e B) prévia redução do extrato à metade do volume com vazão N_2 , seguindo com percolação no cartucho de SPE. A Figura 26 apresenta os resultados obtidos por estas duas modificações. Em ambos os casos, o volume final foi aferido a 1 mL.

Figura 26. Extratos obtidos após ensaios (A e B) de *clean-up* com cartucho de C18.



Como é notado na Figura 26, na primeira modificação ainda se obteve um extrato com coloração esverdeada, embora com intensidade mais branda; já com a prévia redução do volume do eluato, foi obtido um extrato com coloração amarela, indicando que o volume de metanol que compõe a solução é um fator relevante no processo de limpeza, atuando de maneira inversamente proporcional. A variação da coloração dos extratos indica à existência de mais de um tipo de clorofila nas folhas verdes de tabaco, a clorofila a (verde) e a clorofila b (amarela) (Figura 27) [40]. Tais resultados, no entanto, não atenderam às expectativas de obtenção de um extrato límpido, de modo que o trabalho foi conduzido a novos experimentos.

Figura 27. Estrutura molecular das clorofilas a e b.



Além da avaliação de adsorventes como agentes de limpeza da amostra, também foi apreciado a utilização de solventes orgânicos. Para matrizes de alta complexidade, como folhas de plantas, uma mistura de dois ou três solventes pode ser usada para obter uma limpeza suficiente de vários tipos de co-extrativos, dentre eles a clorofila [26]. Aqui, foi avaliado a capacidade dos solventes n-hexano (2 mL) e diclorometano (1 mL) em remover de maneira seletiva os pigmentos, mais especificamente clorofila, presentes na amostra sem o comprometimento na recuperação dos analitos. Diferentes procedimentos foram descritos na literatura com esta finalidade: Bijttebier *et al.*, 2014, relataram a presença de altos teores de clorofila em extratos de algas obtidos a partir do uso de acetona. Resultados semelhantes foram anteriormente obtidos por Larsen e Christensen, 2005. [41,42]

Os solventes mencionados foram percolados pelo cartucho contendo a amostra de tabaco homogeneizada com o adsorvente Discovery DPA 6S antecipadamente à extração com metanol. A escolha desses dois solventes está associada às suas baixa e média polaridades. A Figura 28 apresenta imagens dos extratos obtidos destes testes, onde no recipiente inferior encontra-se a fração de *clean-up* e no recipiente superior a fração extraída com metanol, e a Figura 29 as recuperações dos alcaloides alvo extraídos da amostra.

Figura 28. Extratos obtidos após ensaio de *clean-up* com os solventes n-hexano (A) e diclorometano (B).

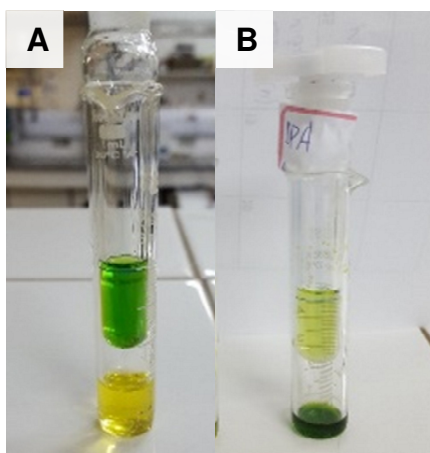
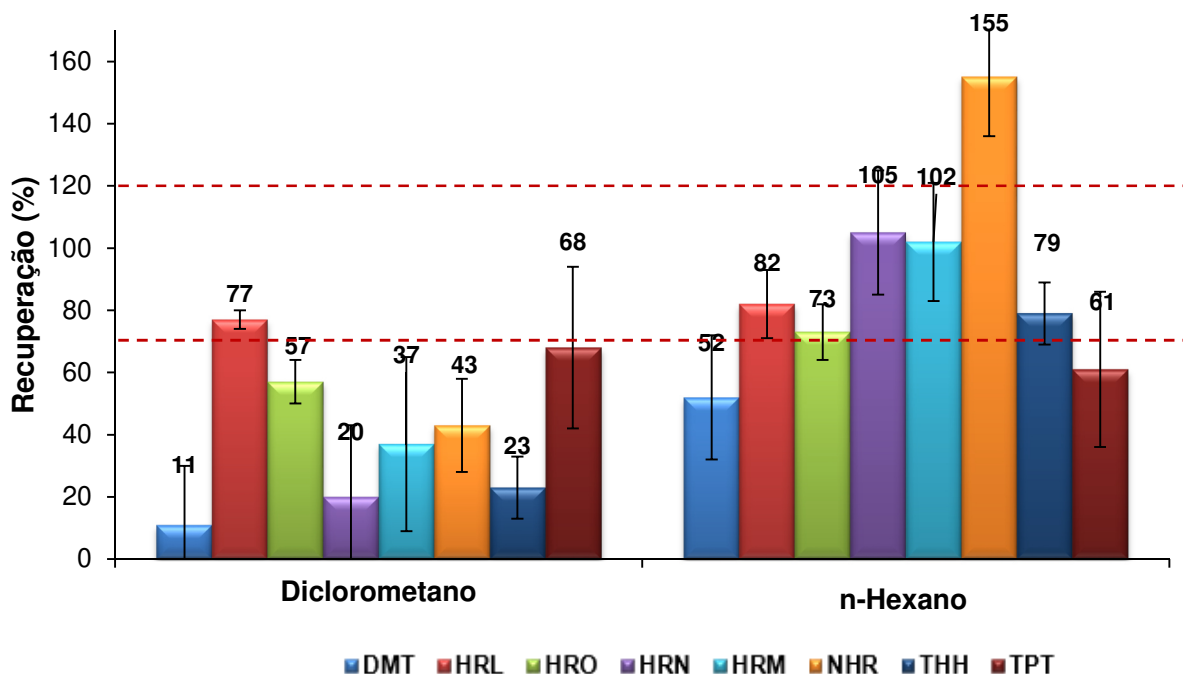


Figura 29. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes solventes para *clean-up* ($n=3$). As análises foram realizadas no sistema 1.

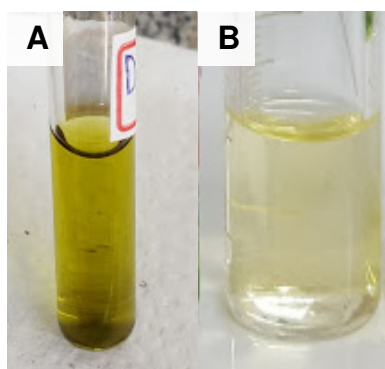


Nota-se que os solventes avaliados apresentam perfis de limpeza diferentes. O n-hexano foi eficiente apenas na remoção da fração de pigmentos amarelos da amostra, por outro lado o diclorometano removeu a fração esverdeada. Os resultados de recuperação analítica, de modo geral, são satisfatórios quando do *clean-up* com n-hexano, sugerindo que o processo pode ser otimizado; para o ensaio com diclorometano, nota-se que as recuperações foram afetadas negativamente para a maioria dos alcaloides. Diante desta observação, à fração de diclorometano foi realizada uma análise cromatográfica, em que foi detectado a presença dos analitos, justificando, portanto, as baixas concentrações no extrato metanólico.

Desde os clássicos aos mais modernos métodos de extração de alcaloides em plantas, leva-se em consideração as propriedades ácido/base dessa classe de compostos como importante parâmetro de isolamento [43]; assim, buscou-se avaliar a influência do processo de ionização dos compostos alvo frente às demais propriedades físico-químicas com vistas ao atendimento dos critérios estabelecidos neste estudo.

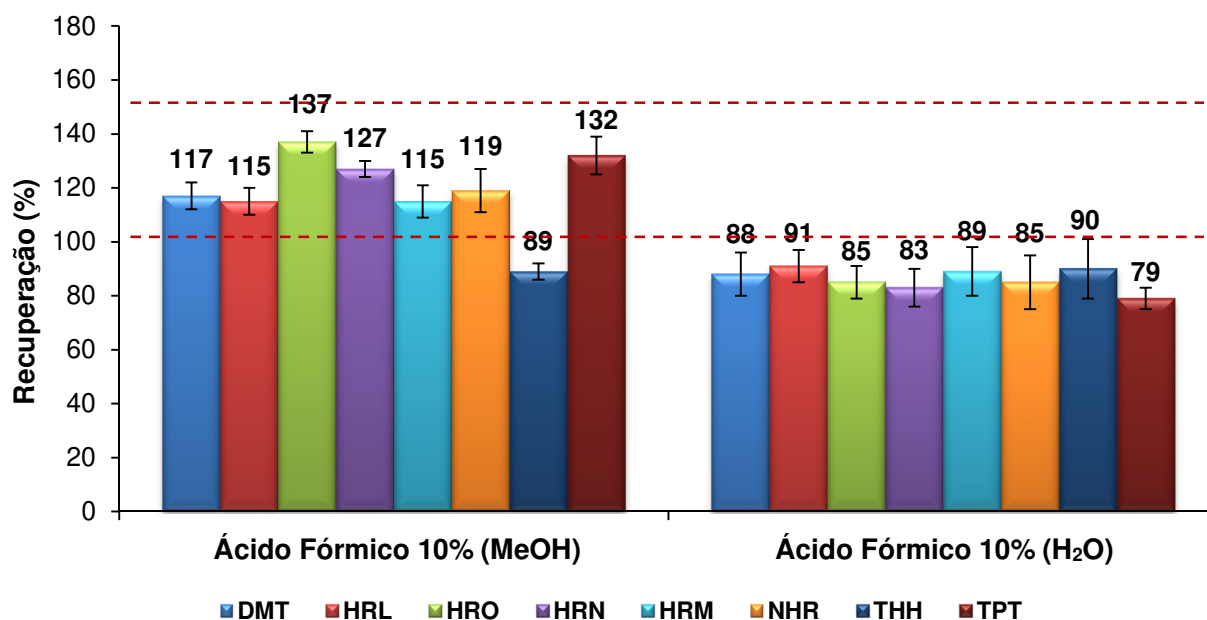
Haja visto que a clorofila apresenta em sua estrutura grupos funcionais de natureza apolar (fitol. - $C_{20}H_{39}O$) que a tornam insolúvel em água e que, por outro lado, os alcaloides estudados apresentam alta afinidade a solventes polares quando protonados, dado os seus baixos valores de LogD em pH ácido (Tabela 2), foi avaliado a eficiência de extração a partir da eluição com os solventes metanol e água, acidificados com ácido fórmico na proporção de 10%. Em ambos os casos as soluções extratoras apresentaram valor de pH=2, condição que assegura a completa protonação dos alcaloides e por consequência a hidrossolubilidade [44,45]. Para o ensaio com metanol foi realizado uma eluição com 2 mL deste solvente e o extrato resultante foi percolado por uma coluna de SPE contendo C18; já para o ensaio com água, fez-se uso de 5 mL com retirada de uma alíquota para análise cromatográfica. A Figura 30 apresenta imagens dos extratos obtidos em cada ensaio realizado.

Figura 30. Extratos obtidos após ensaios de extração com solventes acidificados com 10% de ácido fórmico. Metanol (A) e água ultrapura (B).



Quando foi utilizado metanol acidificado, foi obtido um extrato com coloração amarronzada. Tal resultado é devido à conversão da clorofila em feofitina pelo processo de hidrólise ácida, em que ocorre a substituição do átomo de Mg central por H [40]; logo conclui-se que o processo não favorece a retenção dos pigmentos ao adsorvente Discovery DPA 6S. Por outro lado, com uso da solução aquosa de ácido fórmico a 10%, o extrato apresentou um aspecto límpido com coloração suavemente amarelada, sugerindo que uma quantidade mínima de pigmentos da amostra foram eluidos com este solvente extrator. Os gráficos de recuperação são apresentados na Figura 31.

Figura 31. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes solventes de extração acidificados com ácido fórmico ($n=3$). As análises foram realizadas no sistema 1.

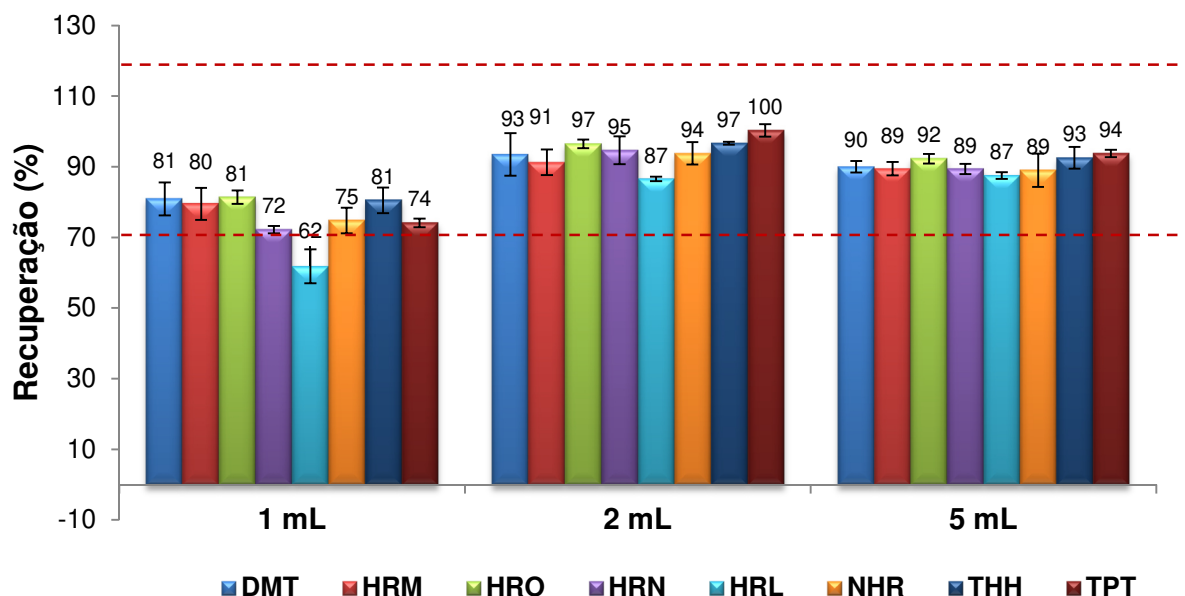


Muito embora em ambos os processos os resultados em termos de recuperação tenham se mostrado dentro dos critérios de eficiência aqui estabelecidos, de modo geral, aqueles oriundos da extração com água chamam a atenção para continuidade deste trabalho por inúmeros aspectos positivos: Para nenhum dos analitos ocorre desvios fora do intervalo de recuperação adotado (70-120%); evita-se a necessidade de realização de processo de *clean-up* da amostra, minimizando etapas adicionais de manipulação e custos com reagentes; atribui-se ao procedimento de extração um caráter ambientalmente amigável haja visto a eliminação de solventes orgânicos tóxicos; o ácido é compatível com as técnicas instrumentais de análise, uma vez que é utilizado para o processo de ionização por espectrometria de massas.

2.3.3.3 Otimização do procedimento de extração

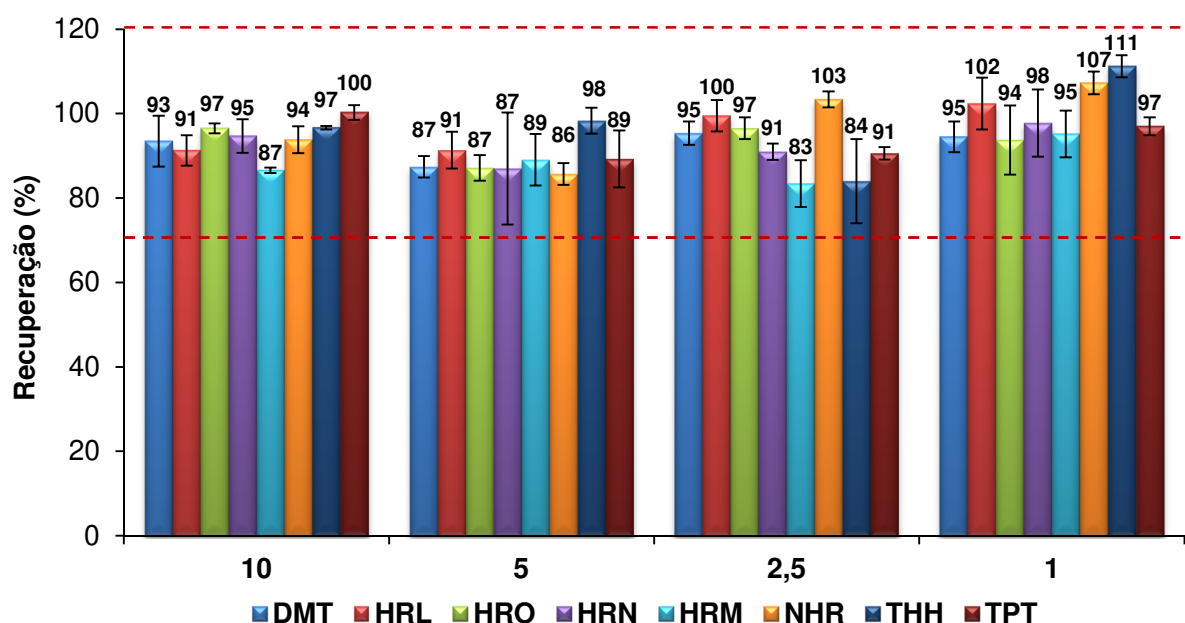
Como critério de otimização para a etapa de eluição do protocolo de extração por μ MPSD foi avaliado a variação do volume de solvente extrator com recurso à percolação dos volumes de 1 e 2 mL de solução de ácido fórmico a 10% em complemento aos ensaios previamente realizados com o volume de 5 mL. Os resultados de recuperação obtidos (Figura 32) indicaram que não há diferença significativa entre os ensaios conduzidos pelas eluições com 2 e 5 mL. Por outro lado, quando da eluição com 1 mL, nota-se que este volume não assegura a completa percolação dos analitos do cartucho de extração. Assim, foi adotado a eluição com 2 mL de solução extratora.

Figura 32. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes volumes de solução de ácido fórmico 10% (n=3).



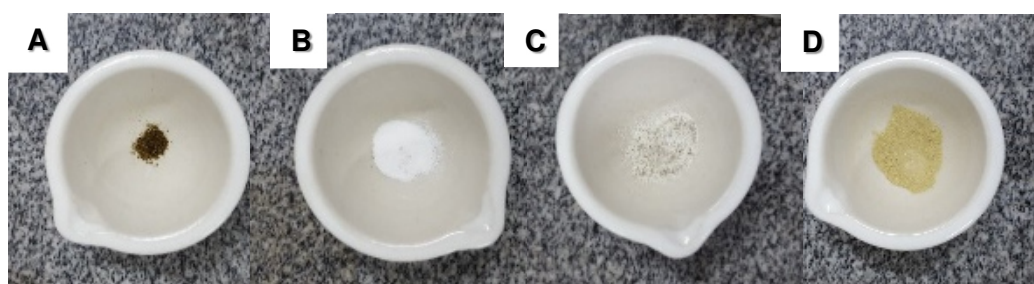
Adiante, foi avaliado a influência do teor de ácido fórmico na solução extratora quanto à capacidade de recuperação; para tanto, além da solução aquosa com teor de 10% deste ácido, procedeu-se a novas extrações com soluções em concentrações de 1, 2 e 5%. Da Figura 33, é possível acordar que o teor do ácido não resultou em variações significativas para a eficiência do método de extração. Tal semelhança é justificada pelo fato de que, para todas a soluções avaliadas o potencial hidrogeniônico, com valores experimentais inferiores a 3, foi suficiente para assegurar as espécies iônicas dos alcaloides. Logo, optou-se pela definição da solução aquosa de ácido fórmico a 1% como solução extratora por fornecer condições satisfatórias tanto em termos de *clean-up* da amostra como em termos recuperação dos alcaloides.

Figura 33. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes concentrações percentuais de solução de ácido fórmico ($n=3$).



No que diz respeito aos critérios inerentes à etapa de preparo da amostra pelo processo de maceração, salvo os ensaios de avaliação de eficiência dos adsorventes, as variáveis tempo de maceração e proporção matriz/adsorvente não foram otimizadas sob a análise dos resultados de recuperação e desvio padrão relativo, mas definidas considerando o aspecto visual da amostra: homogeneamente dispersa sob o adsorvente e na forma de pó. Para o tempo de maceração, foi cronometrado o tempo ideal para que não houvesse distinção entre a amostra e o adsorvente, condição que foi alcançada com 5 min. Quanto à proporção matriz/adsorvente, levou-se em consideração a densidade da amostra e do polímero Discovery DPA 6S; a amostra, após liofilização e trituração, apresentou uma densidade muito baixa, de modo que o volume obtido pela pesagem de 0,0100 g foi equivalente ao volume de 0,100 g do adsorvente. Assim, adotou-se a proporção matriz/adsorvente de 1:10 e optou-se por não avaliar uma proporção maior, o que implicaria em um acréscimo do consumo de adsorvente, nem uma proporção menor, por observar que o processo de homogeneização seria comprometido. A Figura 34 expõe as etapas de dispersão da matriz no adsorvente.

Figura 34. Etapas do processo de preparo da amostra por maceração. A) amostra fortificada (0,01g), B) adição do adsorvente (0,1g), C) início da maceração e D) amostra homogeneizada.



Por fim, as melhores condições para extração dos alcaloides presentes em amostra de folhas de tabaco foram: 0,0100 g de folha de tabaco liofilizada, 0,100 g de adsorvente Discovery DPA 6S como agente dispersante, fortificação, quando necessário, com 50 μ L de solução padrão conjunta dos alcaloides, repouso por 30 min, maceração continua por 5 min, transferência completa da amostra homogeneizada para cartucho tipo SPE (modelo de 1,5 mL), eluição com 2 mL de solução aquosa de ácido fórmico a 1% em sistema de vácuo, retirada de alíquota para análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas.

2.3.4 Validação do método

As análises dos extratos obtidos durante o ensaio de validação foram realizadas no sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF). Os parâmetros contemplados para a validação do método analítico desenvolvido para a determinação dos alcaloides *N,N,N*-dimetiltriptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahydroharmina e triptamina foram: linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação e foram estabelecidos a partir do protocolos de validação da SANTE e FDA, uma vez que abordam atualizações destes parâmetros quanto a quantificação utilizando espectrometria de massas de alta resolução.

2.3.4.1 Linearidade e Sensibilidade

Uma vez otimizada as condições cromatográficas de análise, foram realizados testes para determinação da linearidade visando a definição do intervalo de concentração no qual seria possível quantificar de forma segura os analitos. Para a obtenção das curvas analíticas foi preparada uma solução conjunta dos alcaloides na concentração de 1000 μ g L⁻¹ em solução aquosa de ácido fórmico a 1%, da qual foram preparadas soluções de trabalho nas concentrações de 1; 2,5; 5; 10; 25; 50; 100; 250 e 500 μ g L⁻¹. Após análise em triplicata, as curvas foram construídas a partir da relação entre a concentração e a área de resposta do íon $[M+H]^+$, sendo então plotado os gráficos de linearidade, para obtenção das equações da reta e coeficientes de determinação (Tabela 12).

Tabela 12. Equação da reta e coeficiente de determinação dos alcaloides no intervalo de concentração de 1-1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Alcaloides	Intervalo de concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Equação da Reta	Coeficiente de Determinação (R^2)
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	5 - 500	$y = 17491x + 100596$	0,9982
Harmalina	2,5 - 250	$y = 185069x + 222502$	0,9993
Harmalol	2,5 - 500	$y = 62323x + 593495$	0,9963
Harmano	2,5 - 500	$y = 147031x + 1507464$	0,9945
Harmina	1 - 500	$y = 194337x + 804612$	0,9961
Norharmano	2,5 - 250	$y = 135063x + 214135$	0,9994
Tetrahydroharmina	5 - 1000	$y = 6445,2x + 143690$	0,9969
Tryptamina	5 - 500	$y = 29535x + 930039$	0,9931

Como é notado, elevados valores de coeficiente de determinação ($>0,99$) indicam uma alta correlação linear entre a concentração dos alcaloides e as respostas cromatográficas para o intervalo em que foi proposto para o método; estando de acordo com a recomendação dada por órgãos de regulamentação de métodos analíticos tais como o SANTE e FDA. A partir das equações das retas foi possível inferir também a respeito da sensibilidade analítica do método de análise tomando como parâmetro os coeficientes angulares, que indica o quão sensível o método é capaz de distinguir com fidelidade concentrações muito próximas, onde quanto maior a inclinação da reta maior a sensibilidade. Desta maneira, nota-se que o alcaloide que apresenta uma maior sensibilidade de resposta com a variação de concentração foi a harmalina, enquanto a tetrahydroharmina apresentou-se como o composto com menor sensibilidade. [27,46-47]

2.3.4.2 Efeito Matriz

A avaliação do efeito matriz foi feita a partir da metodologia de determinação da razão dos coeficientes angulares (RCA). Logo, foram construídas duas curvas analíticas: uma a partir da diluição da solução padrão em solução aquosa de ácido fórmico a 1% e outra pela diluição em extrato de tabaco obtido após o processo de extração por μ MSPD. Todos os pontos da curva no extrato da matriz foram realizados a partir da diluição de 10 μ L de solução padrão em 990 μ L do extrato, de acordo com estudos de KRUIVE et al., 2008, a fim de evitar a diluição excessiva dos possíveis compostos interferentes da amostra e por consequência a obtenção de um falso resultado do estudo [48]. A Tabela 13 apresenta as equações das retas dos alcaloides determinadas a partir das curvas preparadas nas concentrações de 1 a 1000 μ g L⁻¹. Para cada analito foram utilizados os mesmos intervalos de concentração de modo a assegurar o caráter de comparação entre as linearidades.

Das razões dos coeficientes angulares (RCA), com exceção do harmano, nota-se que os alcaloides sofreram efeito matriz negativo, de modo que a intensidade dos sinais analíticos no extrato da amostra fortificada foi reduzida em relação aos sinais obtidos quando da solução padrão em solvente; sendo o harmalol o alcaloide que mais foi afetado por tal efeito, com uma supressão do sinal em 43%. Baseado no que prevê Cutillas et al., 2018; tais resultados são aceitáveis para a continuidade do processo de validação haja visto a adequação aos critérios que consideram uma interferência de baixa significância. Porém, com a finalidade de manter esse efeito matriz controlado, os ensaios de quantificação serão realizados a partir da calibração no extrato da matriz. [49]

Tabela 13. Intervalo de concentração, equações das retas, coeficientes de determinação e razão dos coeficientes angulares para os alcaloides em estudo.

Alcaloides	Intervalo de Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Curva Analítica		RCA
		Solvente	Extrato	
<i>N,N</i> -dimetiltriptamina	5 - 500	$y = 17491x + 100596$	$y = 10375,4x + 206445$	0,59
Harmalina	2,5 - 250	$y = 185069x + 222502$	$y = 114936x + 299980$	0,62
Harmalol	2,5 - 500	$y = 62323x + 593495$	$y = 35762x + 404990$	0,57
Harmano	2,5 - 500	$y = 147031x + 1507464$	$y = 146976x + 1526920$	1,00
Harmina	1 - 500	$y = 194337x + 804612$	$y = 121141x + 604918$	0,62
Norharmano	2,5 - 250	$y = 135063x + 214135$	$y = 89161x + 395421$	0,66
Tetrahidroharmina	5 - 1000	$y = 6445,2x + 143690$	$y = 4089x + 116099$	0,63
Triptamina	5 - 500	$y = 29535x + 930039$	$y = 18750x + 566502$	0,63

2.3.4.3 Exatidão e Precisão

Visando assegurar a eficiência do método proposto em diferentes níveis de concentração analítica, foram avaliados os parâmetros exatidão e precisão. A exatidão foi determinada pelos valores de recuperação obtidos a partir de ensaios de fortificação de amostras de folhas de tabaco em três níveis de concentração para cada alcaloide e em quintuplicata para cada nível. A precisão por sua vez foi determinada a partir dos ensaios de repetibilidade, em que foi utilizado o mesmo método, para a mesma amostra, no mesmo laboratório, pelo mesmo operador, usando o mesmo equipamento com análises nas modalidades intradia e interdia, conforme define Lanças, 2004; sendo os resultados expressos em termos do desvio padrão relativo das análises. [50]

Visto que durante os estudos de desenvolvimento e otimização do método de extração por μ MSPD os testes foram realizados com o nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$; agora, com a finalidade de assegurar a mesma eficiência de extração para níveis de concentração mais baixos, o método foi aplicado para as concentrações 1, 5, 10; 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, as quais foram definidos tomando-se como parâmetro os intervalos de concentração estabelecidos no estudo de efeito matriz (Tabela 13). A Tabela 14 exhibe os valores encontrados para os testes de exatidão e precisão em folhas de tabaco.

Os valores de recuperação e coeficientes de variação indicam que o método proposto apresenta ótimas exatidão e precisão para os níveis de concentração avaliados, tendo em vista que os resultados encontram-se dentro da faixa de 70-120% e inferiores a 20% respectivamente, conforme sugere Ribani *et al.*, 2004 [51]. Para as concentrações estabelecidas e apresentadas na Tabela 14, o método revelou-se exato e preciso para a quantificação de alcaloides em folhas de tabaco (*Nicotiana tabacum L.*).

Tabela 14. Eficiência de recuperação e coeficientes de variação do método μ MSPD para determinação dos alcaloides em folhas de tabaco.

Alcaloide	Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Intradia (n=5)		Interdia (n=15)	
		Rec. Média (%)	DPR (%)	Rec. Média (%)	DPR (%)
<i>N,N</i> -dimetiltriptamina		-	-	-	-
		107,3	10,0	103,5	9,7
		78,6	4,5	87,4	12,6
		103,3	11,4	95,2	13,4
		101,8	6,5	98,8	6,7
Harmalina		-	-	-	-
		85,6	10,9	83,7	9,7
		81,8	7,4	76,5	9,8
		90,3	3,4	89,0	4,8
		91,7	2,4	89,9	3,4
Harmalol	1	-	-	-	-
	5	91,1	11,7	95,8	12,6
	10	82,9	10,9	89,4	12,1
	100	91,5	7,7	89,4	6,1
	1000	91,4	1,8	86,0	8,9
Harmano		-	-	-	-
		88,3	4,1	87,6	7,6
		78,1	3,5	80,3	6,7
		88,4	2,6	85,9	4,4
		93,3	4,1	88,4	9,9
Harmina		108,7	9,1	104,6	7,1
		100,6	15,0	98,6	7,3
		78,9	5,8	79,0	8,1
		73,6	4,9	72,6	4,8
		83,2	3,6	80,4	6,3

Tabela 14. Continuação.

Alcaloide	Fortificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Intradia (n=5)		Interdia (n=15)	
		Rec. Média (%)	DPR (%)	Rec. Média (%)	DPR (%)
Norharmano		-	-	-	-
		96,5	9,3	98,9	11,3
		81,9	8,3	85,1	9,2
		90,4	4,8	85,7	7,1
		93,2	2,6	91,0	4,4
Tetrahydroharmina	1	-	-	-	-
	5	-	-	-	-
	10	72,1	15,8	81,4	15,2
	100	94,0	7,9	84,3	14,7
	1000	94,7	4,5	94,3	7,0
		-	-	-	-
Tryptamina		92,4	13,5	95,1	10,3
		87,4	11,5	93,4	11,6
		88,3	7,5	94,8	9,9
		95,3	4,9	94,7	4,2
		-	-	-	-

2.3.4.4 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção e quantificação foram definidos a partir dos resultados obtidos pelos ensaios de linearidade e efeito matriz. Considerando o efeito provocado pela matriz no processo de ionização dos analitos, tomou-se como parâmetro a faixa linear de trabalho proveniente das curvas analíticas construídas pelos extratos de tabaco fortificados. Também, considerando a natureza sólida da amostra, os resultados são apresentados (Tabela 15) a partir da relação massa/massa (analito/amostra), ou seja, $\mu\text{g g}^{-1}$.

Tabela 15. Limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) do método desenvolvido.

Alcaloides	Limite de detecção ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Limite de Quantificação ($\mu\text{g g}^{-1}$)
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	0,2	1,0
Harmalina	0,01	0,05
Harmalol	0,1	0,5
Harmano	0,1	0,5
Harmina	0,01	0,02
Norharmano	0,05	0,5
Tetrahydroharmina	0,2	1,0
Tryptamina	0,2	1,0

2.3.5 Análise de amostras de tabaco

O método foi aplicado em diferentes amostras de tabaco com o objetivo de identificar e quantificar a presença dos alcaloides estudados. A variedade das amostras foi definida de modo a simular as etapas de processamento das folhas de tabaco até a obtenção do produto final para consumo. O processo industrial de produção de tabaco e/ou cigarro consiste basicamente nos estágios de colheita, secagem (cura), padronização e processamento das folhas curadas e adição de componentes agregadores de sabor e aroma. Em processos artesanais, diferentes procedimentos dão origem a inúmeros produtos, tais como fumo de rolo (também chamado de fumo de corda), em que as folhas são enroladas e submetidas a secagem sob exposição ao sol; e rapé, um fino pó formado a partir da maceração de folhas torradas. [52-54]

Foi avaliado a presença e teor dos alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahydroharmina e triptamina em amostras de folhas de tabaco verde madura (FTV), folhas de tabaco curada (FTC), fumo de rolo (FR) e cigarros industrializados (CI), os quais foram obtidos após colheita, secagem sob condições ambiente, secagem ao sol e compra em estabelecimento comercial, respectivamente. As três primeiras amostras foram cedidas por produtores independentes de agricultura familiar do município de Lagarto/SE. Assim, pretende-se verificar variações na composição do tabaco quanto a presença destes alcaloides durante a cadeia de produção do tabaco.

As amostras foram submetidas ao processo de secagem por liofilização descrito no item 4.2.4 de modo a assegurar uma padronização quanto à umidade antes do processo de extração, haja visto que as amostras FTV e FTC foram previamente lavadas, conforme descrito no item 4.2.3 para remoção de resíduos sólidos decorrente da colheita. Para tanto, os resultados de concentração serão expressos pela relação massa de alcaloide (μg) por massa de amostra seca (g), $\mu\text{g g}^{-1}$ DW (DW – *Dry weight*).

A identificação dos alcaloides foi feita por análises de extratos dos brancos por UHPLC-QTOF/MS tomando como critérios o tempo de retenção e a relação m/z dos íons $[\text{M}+\text{H}]^+$ com erros de massa inferiores a 5 ppm, conforme estabelece a FDA e a SANTE quanto à abordagem de análises por espectrometria de massas de alta resolução. A quantificação por sua vez foi realizada pelo método de adição padrão em que as amostras foram fortificadas com soluções padrão dos analitos em cinco níveis de concentração incluindo o branco; com a primeira concentração de fortificação equivalente aos limites de quantificação definidos na validação. Os ensaios foram realizados em triplicata para cada nível. [27,46]

A Tabela 16 apresenta os resultados de identificação dos analitos nas amostras analisadas com suas confirmações sendo asseguradas pelos baixos erros de massas calculados. Como pode ser notado, apenas os alcaloides harmano, norharmano e harmina foram detectados nos extratos dos brancos das amostras.

Tabela 16. Identificação dos alcaloides, com erros de massa calculados, em amostras de tabaco por espectrometria de massas de alta resolução (Sistema 2) e análises em modo MS^E.

Alcaloide	[M+H] ⁺	T _R (min)	Amostra			
			FTV	FTC	FR	CI
<i>N,N</i> -dimetiltryptamina	189,1392	1,05	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Harmalina	215,1184	4,01	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Harmalol	201,1028	1,54	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Harmano	183,0922	2,67	4,1	-2,6	(3,5)	-0,5
Harmina	213,1028	4,47	-1,7	-0,9	-0,5	n.d.
Norharmano	169,0766	1,79	-4,6	-3,9	-2,5	4,1
Tetrahydroharmina	217,1341	2,18	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Tryptamina	161,1079	0,77	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

n.d. - Não detectado.

FTV – Folha de tabaco verde, FTC - Folha de tabaco curado, FR – Fumo de rolo.
CI – Cigarro industrializado.

Os compostos previamente identificados nas amostras foram submetidos a tratamento estatístico de quantificação a partir dos extratos fortificados. Para tanto, foram construídas as curvas analíticas e suas equações lineares para a determinação, por extrapolação da reta, das concentrações nos extratos sem fortificação. A Tabela 17 apresenta as concentrações previstas a partir do método de adição padrão.

Tabela 17. Quantificação dos alcaloides identificados nas amostras de tabaco ($\mu\text{g g}^{-1}$ DW) preparadas pela metodologia $\mu\text{MSPD/UHPLC-ESI-QTOF}$.

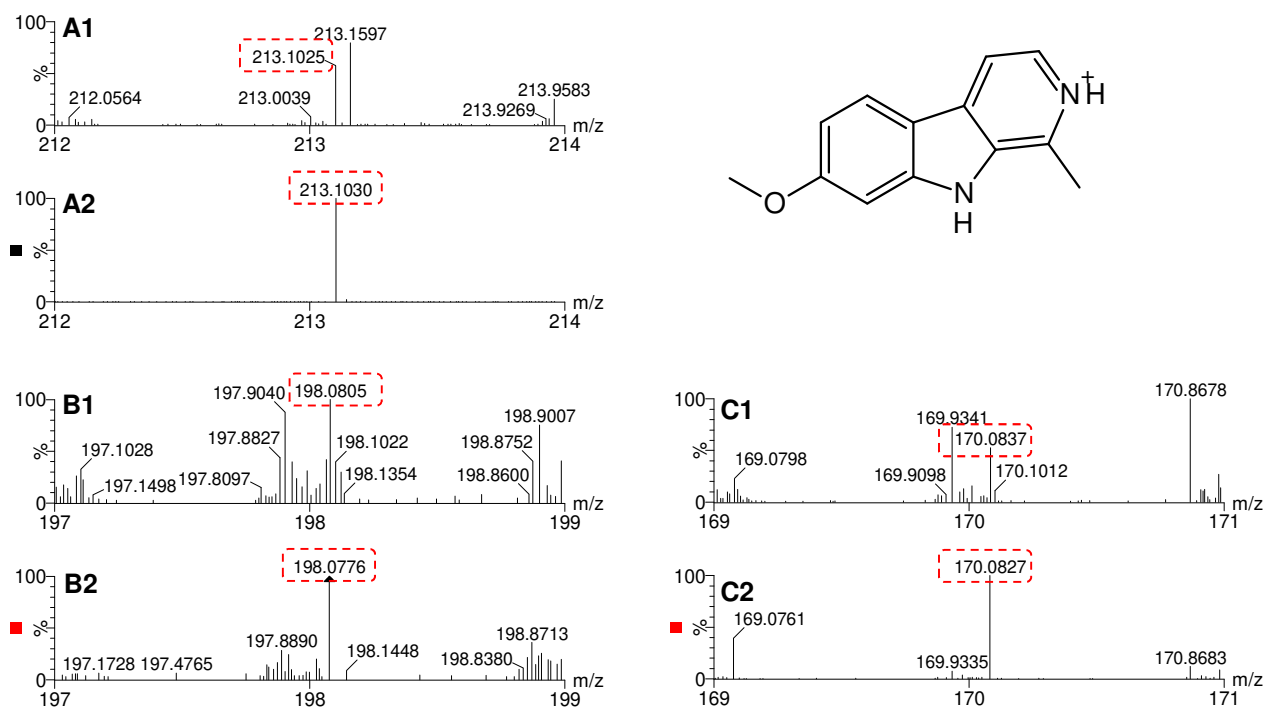
Alcaloide	Amostra			
	FTV	FTC	FR	CI
Harmano	<LOQ	$1,201 \pm 0,007$	$1,302 \pm 0,053$	$0,735 \pm 0,050$
Harmina	$0,060 \pm 0,005$	$0,227 \pm 0,014$	$0,097 \pm 0,004$	n.d
Norharmano	$0,546 \pm 0,015$	$0,888 \pm 0,042$	$1,299 \pm 0,024$	$0,577 \pm 0,024$

* n.d. – Não detectado

Como é possível constatar, a eficiência e simplicidade do procedimento analítico de extração desenvolvido aliado à potente tecnologia de análise possibilitou a confirmação e quantificação fidedigna destes alcaloides em diferentes tipos de amostras de tabaco; seja nas folhas recém colhidas ou nos produtos decorrentes do seu processo de manejo para consumo. Quanto ao teor destes compostos nota-se na Tabela 17 que ocorre elevação da concentração à medida que o processamento das folhas evolui. Esse comportamento possui relação com as condições de aquecimento (cura) às quais as folhas de tabaco são submetidas até a obtenção de produtos aptos para consumo (fumo de rolo e cigarro). Condições elevadas de temperatura favorecem o processo de formação dos alcaloides harmano e norharmano via processos de combustão do aminoácido L-triptofano e proteínas [55, 56], justificando os resultados observados na amostra FR, que em decorrência do maior tempo de secagem sob altas temperaturas, apresentaram os maiores teores dos alcaloides harmano e norharmano. Os menores teores observados para as amostras CI pode ser justificada pelo fato de que a quantidade de tabaco presente na sua composição não equivale a 100% devido a presença dos aditivos oriundos do processo de industrialização do tabaco.

Quanto à presença do alcaloide harmina nas amostras analisadas, não há relatos científicos que indiquem a determinação desta substância em amostras de folhas de tabaco. Neste sentido, prevenindo a publicação de resultados falso positivos, além dos critérios de confirmação já mencionados (tempo de retenção e erro de massa da molécula protonada), foi investigado a precisão da resolução de massas para os seus íons fragmentos característicos, m/z 198,0798 e m/z 170,0835 (descritos no item 4.3.2.1). Para os íons fragmentos, o limite de erro de massa atribuído foi de 10 ppm, conforme sugerido pela FDA [57]. A Figura 35 apresenta os espectros de massas gerados a partir das análises dos extratos dos brancos e de uma solução padrão do alcaloide utilizada como referência.

Figura 35. Espectros massas de molécula protonada (A) e íons fragmentos (B e C) do alcaloide harmina gerados a partir de análises em modo MS^E no sistema UHPLC-ESI-QTOF em extratos de folhas de tabaco verde (1) e solução padrão (2).



Considerando a compatibilidade dos resultados observados no que diz respeito aos critérios estabelecidos como índices de confirmação, é possível assumir que o alcaloide harmina compõe a fração de alcaloides derivados do L-triptofano em folhas de tabaco *in-natura* e curadas. As concentrações deste alcaloide encontradas nas amostras sugerem uma variação semelhante às observadas para os alcaloides harmano e norharmano de que o processo de secagem das folhas favorece a sua biossíntese.

Apenas um único trabalho científico reporta a identificação e os níveis de concentração dos alcaloides harmano e norharmano em amostras de folhas de tabaco. Os resultados obtidos pela metodologia μ MSPD-UHPLC-QTOF foram comparados com essa literatura (Tabela 18) indicando dados bastante semelhantes. Destaca-se, todavia, que o procedimento proposto é embasado em critérios de eficiência estabelecidos pelos principais protocolos de desenvolvimento e validação de metodologias, assegurando assim a autenticidade dos dados apresentados. Quanto ao processo de extração, a proposta apresentada revela ser simples, rápida, e livre de solventes orgânicos, adequando-se à atual filosofia de procedimentos analíticos ambientalmente amigáveis pelo uso reduzido de amostra e reagentes tóxicos. Tal condição, no entanto é favorecida pela utilização das técnicas de cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas de alta resolução, que possibilitaram análises seletivas e sensíveis dos analitos.

Tabela 18. Comparação de diferentes metodologias de extração para determinação de alcaloides β -carbolínicos.

Amostra	Quantidade de amostra (g)	Analitos	Técnica de extração	Técnica de análise	Validação	Concentração ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Ref.
Folha de tabaco	0,01	Harmano Harmina Norharmano	μ MSPD	UHPLC-MS/MS	Lineridade Exatidão Precisão Seletividade LOD e LOQ	0,04 - 0,735 (HRN) 0,06 - 0,227 (HRM) 0,546 - 1,299 (NHR)	Este estudo
Folha de tabaco	-	Harmano Norharmano	LLE, CC	CP, UV e IV	-	0,02 (HRM) 0,20 (NHR)	[58]
Café	2,0 - 7,5	Harmano Norharmano	SLE, SPE	LC-FD	-	0,025 - 32,16 (HRN) 0,097 - 124,9 (NHR)	[59]
Chá verde e Chá preto	5,0	Harmano Norharmano	SLE Ultrassom	LC-MS/MS	Lineridade Exatidão Precisão LOD e LOQ	0,15 - 31,49 (HRN) 0,73 - 59,68 (NHR)	[60]
Vegetais e Frutas	1,0 – 4,0	Harmano Norharmano	LLE SPE	LC-FD	Lineridade Exatidão Precisão LOD e LOQ	0,05 - 2,26	[61]
Carnes grelhadas	4,8 - 20,3	Harmano	Digestão básica LLE	LC - FD	-	1, 06 - 28,05	[62]
Carne e Frango	4,0	Harmano Norharmano	Digestão ácida SPE	LC-DAD	-	0 - 0,00342(HRN) 0,00108 - 0,01147 (NHR)	[63]

2.4 CONCLUSÕES

As condições instrumentais para a identificação e detecção dos alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahydroamina e triptamina em tabaco foram otimizadas de modo que análises rápidas e com altas seletividade, reprodutibilidade e sensibilidade fossem obtidas.

A eficiência do processo de separação foi decorrente da utilização do sistema de cromatografia líquida de ultra eficiência (UHPLC), possibilitando análises significativamente ágeis (< 5 min), com sinais bem definidos e com alta resolução para os sistemas 1 e 2, quando do uso da coluna com fase estacionária Phenyl-Hexyl e fase móvel composta pela mistura MeOH:H₂O.

A utilização da técnica de espectrometria de massas associada à cromatografia líquida possibilitou análises bastante sensíveis, de modo que viabiliza a identificação e quantificação dos alcaloides em matrizes de tabaco em baixos níveis de concentração. Para tal, todos os parâmetros instrumentais ajustáveis de cada sistema utilizado foram otimizados. No sistema 1, o método de monitoramento de reações selecionadas (SRM) possibilitou que os alcaloides fossem analisados a partir dos perfis de fragmentação dos íons fragmentos com os sinais mais intensos. No sistema 2, o analisador de massas QTOF foi ajustado para a identificação dos íons percussores e fragmentos selecionados com a alta resolução.

A técnica de extração por μ MSPD desenvolvida mostrou-se altamente eficiente quanto à capacidade de extração dos alcaloides em folhas de tabaco, com índices de exatidão, precisão e seletividade em conformidade com os critérios estabelecidos pela literatura. Ressalta-se aqui, que o método é prático, econômico e ambientalmente amigável, haja visto o reduzido número de etapas necessárias à obtenção do extrato final, o baixo consumo de reagentes e amostras e a não utilização de compostos tóxicos ao meio ambiente, respectivamente.

A metodologia foi validada a partir de análises pelo Sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF), onde foram contempladas as figuras de mérito: linearidade, seletividade, exatidão, precisão, limite de detecção e limite de quantificação. Os resultados desse processo de certificação de qualidade foram satisfatórios para promover a determinação dos alcaloides *N,N*-dimetiltryptamina, harmalina, harmalol, harmano, harmina, norharmano, tetrahydroamina e tryptamina em matrizes de tabaco.

Diferentes tipos de amostras de tabaco foram avaliadas pelo método proposto. Os resultados reafirmaram a presença dos alcaloides harmano e norharmano, revelando ainda que o processo de cura (secagem) das folhas de tabaco para a produção de cigarros favorece a biossíntese desses compostos na planta. De maneira inédita foi identificado a presença do alcaloide harmina nas folhas de tabaco *in-natura* e processadas.

2.5 REFERÊNCIAS

- [1] GAUJAC, A.; MARTINEZ, S. T.; GOMES, A. A.; DE ANDRADE, S. J.; PINTO, A. D. C.; DAVID, J. M.; NAVICKIENE, S.; DE ANDRADE, J. B. **Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from Mimosa tenuiflora inner barks.** Microchemical Journal. v. 109, pg. 78-83 2013.
- [2] SANTOS, M. C. **Desenvolvimento de método para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2016.
- [3] HARRIS, DANIEL C. **Análise química quantitativa.** 7. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2008.
- [4] SNYDER, L.R.; DOLAN, J.W. **HIGH-PERFORMANCE GRADIENT ELUTION: The Practical Application of the Linear-Solvent-Strength Model.** WILEY, 2007.
- [5] BAEK, S.Y., LEE, S., KIM, B. **Separation of hexabromocyclododecane diastereomers: Application of C18 and phenyl-hexyl ultra-performance liquid chromatography columns.** Journal Chromatography A, v. 1488, pg. 140-145, 2017.
- [6] STUDZIŃSKA, S., BOCIAN, S., SIECIŃSKA, L., BUSZEWSKI, B. **Application of phenyl-based stationary phases for the study of retention and separation of oligonucleotides.** Journal Chromatography B, v. 1060, pg. 36-43, 2017.
- [7] STEVENSON, P.G., MAYFIELD, K.J., SOLIVEN, A., DENNIS, G.R., GRITTI, F., GUIOCHON, G., SHALLIKER, R.A. **Pi-selective stationary phases: (I) Influence of the spacer chain length of phenyl type phases on the aromatic**

- and methylene selectivity of aromatic compounds in reversed phase high performance liquid chromatography.** Journal Chromatography A, V. 1217(33), pg. 5358-5364, 2010.
- [8] LANCAS, F. **A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente "compatíveis"? II. A escolha do analisador de massas.** Scientia Chromatographica, V. 5, pg. 27 – 46, 2013.
- [9] KOSTIAINEN, R., KAUPPILA, T. J. **Effect of eluent on the ionization process in liquid chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1216 (4), pg. 685 – 699, 2009.
- [10] WEINMANN, W., STOERTZEL, M., VOGT, S., SVOBODA, M., SCHREIBER, A. **Tuning compounds for electrospray ionization/in-source collision-induced dissociation and mass spectra library searching.** Journal of Mass Spectrometry, V. 36, pg. 1013–1023, 2001.
- [11] European MassBank (NORMAN MassBank). Disponível em <https://massbank.eu/MassBank/Index>.
- [12] GUILLARME, D., SCHAPPLER, J. RUDAZ, S., VEUTHEY, J. L. **Coupling ultra-high-pressure liquid chromatography with mass.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, V. 29 (1), pg. 15-27, 2010.
- [13] CASS, Q. B., CASSIANO M. N. **Cromatografia Líquida: Novas Tendências e Aplicações.** Elsevier – Campus, Brasil, 2015.
- [14] LESUR, A., GALLIEN, S., DOMON, B. **Hyphenation of fast liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry for quantitative proteomics analyses.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, V. 84, pg. 144-150, 2016.

- [15] JEONG, W. T., LIM, H. B. **A UPLC-ESI-Q-TOF method for rapid and reliable identification and quantification of major indole alkaloids in *Catharanthus roseus***. Journal of Chromatography B, V. 1080, pg. 27-36, 2018.
- [16] AMARAL, A.C.F.; RAMOS, A. DE S.; FERREIRA, J. L. P.; SANTOS, A. R.; CRUZ, J. D.; DE LUNA, A. V. M.; NERY, V. V. C.; LIMA, I. C.; CHAVES, M. H. C; SILVA, J. R. A. **LC-HRMS for the identification of β -carboline and canthinone alkaloids isolated from natural sources**. IntechOpen, cap. 6, pg. 187-207, 2017.
- [17] ZHAO, T.; ZHENG, S-S.; ZHANG, B-F.; LI, Y-Y, BLIGH, S.W.; WANG, C-H.; WANG, Z-T. **Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy**. Food Chemistry, V. 134, pg. 1096-1105, 2012.
- [18] WANG, K.; CHAI, L.; FENG, X.; LIU, Z.; LIU, H.; DING, L.; QIU, F. **Metabolites identification of berberine in rats using ultra-high performance liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry**. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, V. 139, pg. 73–86, 2017.
- [19] WILLIAMSON, L.N.; BARTLETT, M.G. **Quantitative liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry**. Biomedical Chromatography, V. 21, pg. 567-576. 2007.
- [20] ROMERO-GONZÁLEZ, R.; FRENICH, A. G. **Applications in High Resolution Mass Spectrometry: Food Safety and Pesticide Residue Analysis**. Elsevier, 2017.
- [21] AUGUSTO, F.; HANTAO, L.W.; MOGOLLÓN, N.G.S.; BRAGA, S.C.G.N. **New materials and trends in sorbents for solid-phase extraction**. TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 43, pg.14–23. 2013.
- [22] BERTOL, G., FRANCO, L., OLIVEIRA, B. H. **HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis**

- Optimisation by Factorial Design.** *Phytochemical Analysis*, V. 23, ed. 2, pg. 143-151, 2012.
- [23] KLEIN-JÚNIOR, L. C., HEYDEN, Y. V., HENRIQUES, A. T. **Enlarging the bottleneck in the analysis of alkaloids: A review on sample preparation in herbal matrices.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, V. 80, Pg. 66-82, 2016.
- [24] LANÇAS, FERNANDO M. **Cromatografia líquida moderna: HPLC/CLAE.** Campinas, SP: Editora Átomo, 2009.
- [25] CHEN, X., BIAN, Z., HOU, H., YANG, F., LIU, S., TANG, G., HU Q. **Development and validation of a method for the determination of 159 pesticide residues in tobacco by gas chromatography-tandem mass spectrometry.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, V. 61(24), pg. 5746-57, 2013.
- [26] BERNARDI, G., KEMMERICH, M., RIBEIRO, L.C., ADAIME, M.B., ZANELLA, R., PRESTES, O.D. **An effective method for pesticide residues determination in tobacco by GC-MS/MS and UHPLC-MS/MS employing acetonitrile extraction with low-temperature precipitation and d-SPE clean-up.** *Talanta*. V. 161, Pg.40-47, 2016.
- [27] SANTE/11813/2017, **Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** 2018.
- [28] ASADA, T., KOI, Y., ARAKAWA, R., ZHU, F., SADAOKA, M., TAMURA, H. **Isolation techniques for anthocyanidin 3,5-diglucosides and their related chemicals using supramolecules technique, and two solid-phase extraction cartridges.** *Journal of Chromatography A*, V.1351, pg. 21- 28, 2014.
- [29] FONTANALS, N., MARCÉ, R.M., BORRULL, F. **New hydrophilic materials for solid-phase extraction.** *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, v. 24, ed. 5, pg. 394-406. 2005.

- [30] ASADA, T., KOI, Y., TAMURA, H. **New technique to isolate anthocyanins from Delaware grapes by forming an aluminium complex using a Discovery DPA-6S.** Food Chemistry. V. 166, pg. 10 – 16. 2015.
- [31] BONAN, S., FEDRIZZI, G., MENOTTA, S., ELISABETTA, C. **Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector.** Dyes and Pigments. V. 99, ed. 1, pg. 36 – 40, 2013.
- [32] SINGH, 2014.SINGH, H. B., BHARATI, K. A. **Handbook of natural dyes and pigments.** 1. ed. New Delhi: Woodhead Publishing India, 2014.
- [33] TREVISAN, M. T. S., OWEN, R. W. CALATAYUD-VERNICH, P., BREUER, A., PICÓ, Y. **Pesticide analysis in coffee leaves using a quick, easy, cheap, effective, rugged and safe approach and liquid chromatography tandem mass spectrometry: Optimization of the clean-up step.** Journal of Chromatography A, v. 1512, pg. 98-106, 2017.
- [34] CAPRIOTTI, A. L., CAVALIERE, C., LAGANÀ, A., PIOVESANA, S., SAMPERI, R. **Recent trends in matrix solid-phase dispersion.** TrAC Trends in Analytical Chemistry, v. 43, pg. 53 – 66, 2013.
- [35] XIAN, Y., GUO, X., HOU, X., WANG, L., WU, Y. CHEN, L., DONG, H. WANG, B. **A modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe cleanup method followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the rapid analysis of perchlorate, bromate and hypophosphite in flour.** Journal of Chromatography A, v. 1526, pg. 31 – 38. 2017.
- [36] HENNION, M. C. **Graphitized carbons for solid-phase extraction.** Journal of Chromatography A, V. 885, pg. 73–95, 2000.
- [37] ZHAO, P., WANG, L., JIANG, Y., ZHANG, F., PAN, C. **Dispersive cleanup of acetonitrile extracts of tea samples by mixed multiwalled carbon nanotubes, primary secondary amine, and graphitized carbon black**

- sorbents.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.60, pg. 4026 – 4033, 2012.
- [38] DONG, H., XIAO, K. **Modified QuEChERS combined with ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry to determine seven biogenic amines in Chinese traditional condiment soy sauce.** Food Chemistry, v. 229, pg. 502 – 508, 2017.
- [39] MOHAMMADI, S., DOMENO, C., NERIN, I., AZNAR, M., SAMPER, P., KHAYATIAN, G., NERIN, C. **Toxic compounds from tobacco in placenta samples analyzed by UPLC-QTOF-MS.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 145, pg. 331 – 338. 2017.
- [40] KANG, Y., PARK, J., JUNG, S. K., CHANG, Y. H. **Synthesis, characterization, and functional properties of chlorophylls, pheophytins, and Zn-pheophytins.** Food Chemistry, v. 245, pg. 943 – 950, 2018.
- [41] BIJTTEBIER, S., D'HONDT, E., NOTEN, B., HERMANS, N., APERS, S., VOORSPOELS, S. **Tackling the challenge of selective analytical clean-up of complex natural extracts: The curious case of chlorophyll removal.** Food Chemistry, v. 163, pg. 147 – 153, 2014.
- [42] LARSEN, E., CHRISTENSEN, L.P. **Simple saponification method for the quantitative determination of carotenoids in green vegetables.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 53(17), pg. 6598-6602. 2005.
- [43] WANGA, Z., KANGA, D., JIAA, X., ZHANGA, H., GUOB, J., LIUB, C., MENGAQ., LIU, W. **Analysis of alkaloids from *Peganum harmala* L. sequential extracts by liquid chromatography coupled to ion mobility spectrometry.** Journal of Chromatography B, V. 1096, pg. 73–79, 2018.
- [44] FATTORUSSO, E., TAGLIALATELA-SCAFATI, O. **Modern Alkaloids: Structure, Isolation, Synthesis, and Biology.** Wiley-VCH, 2007.
- [45] LINSKENS, H.F., JACKSON, J.F. **Modern methods of plant analyses: Alkaloides.** V 15. Springer-Verlag, 2012.

- [46] United States. Department of Health and Human Services. Food and Drug Administration. **Bioanalytical Method Validation: Guidance for Industry, Draft Guidance.** 2018. Disponível em <https://www.fda.gov/media/70858/download>.
- [47] LEITE, F. **Validação em análise química.** Editora Átomo, 4^ª Edição. Campinas, SP. 2002.
- [48] KRUIVE, A.; KÜNNAPAS, A.; HERODES, K.; LEITO, I. **Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography–mass spectrometry.** Journal of Chromatography A, v. 1187, p. 58-66, 2008.
- [49] CUTILLAS, V., GALERA, M. M., RAJSKI, Ł., FERNÁNDEZ-ALBA, A. R. **Evaluation of supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry for pesticide residues in food.** Journal of Chromatography A, V.1545, pg. 67-74, 2018.
- [50] LANÇAS, F. M. **Validação de métodos cromatográficos de análise.** Editora RiMa. São Carlos. 2004.
- [51] RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L.F.C. **Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos.** Química Nova, v. 27, p. 771-780, 2004.
- [52] SOUZA CRUZ. **Processamento do tabaco.** Disponível em <http://www.souzacruz.com.br/group/sites/SOU_AG6LVH.nsf/vwPagesWebLive/DOAG9GAD?opendocument>
- [53] OLIVEIRA, F.; COSTA, M. C. F. **Cultivo de Fumo (*Nicotiana tabacum* L.).** Dossiê Técnico, Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas, Universidade de São Paulo – USP, São Paulo, 2012.
- [54] SANTOS, G. M.; SOARES, G. H. **Rapé e xamanismo entre grupos indígenas no médio Purus, Amazônia.** Rev. Antropol. (Online), V. 7, pg. 10-27, 2015.

- [55] PIECHOWSKA, P. ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R. MILDNER-SZKUDLARZ, S. **Bioactive β -Carbolines in Food: A Review.** *Nutrients*, V. 11, pg. 814-824, 2019.
- [56] HERRAIZ, T. **Relative exposure to β -carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke.** *Journal Food Additives & Contaminants*, Vol. 21, 2004.
- [57] FDA. **Acceptance Criteria for Confirmation of Identity of Chemical Residues using Exact Mass Data within the Office of Foods and Veterinary Medicine.** 2015. Disponível em: <https://www.fda.gov/downloads/ScienceResearch/FieldScience/UCM491328.pdf>
- [58] POINDEXTER, E. H., CARPENTER, R. D. **The isolation of harmane and norharmane from tobacco and cigarette smoke.** *Phytochemistry*, v. 1, pg. 215-221, 1962.
- [59] HERRAIZ, T. **Identification and occurrence of the bioactive β -carbolines norharman and harman in coffee brews.** *Food Additives & Contaminants*. V.19, pg. 748-754, 2002.
- [60] JIAO, Y., YAN, Y., HE, Z., GAO, D., QIN, F., LU, M., XIE, M., CHEN, J., ZENG, M. **Inhibitory effects of catechins on β -carbolines in tea leaves and chemical model systems.** *Food & Function*. V. 9, pg. 3126-3133. 2018.
- [61] WOJTOWICZ, E., ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R., PRZYGONSKI, K., MILDNER-SZKUDLARZ, S. **Bioactive β -carbolines norharman and harman in traditional and novel raw materials for chicory coffee.** *Food Chemistry*, V. 175, pg. 280–283, 2015.
- [62] LOUIS, E. D., ZHENG, W., JIANG, W., BOGEN, K.T., KEATING, G.A. **Quantification of the neurotoxic β -carboline harmane in barbecued/grilled**

- meat samples and correlation with level of doneness.** Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues, V. 70, pg. 1014-1019, 2007.
- [63] KEŞKEKOĞLU, H., ÜREN, A. **Inhibitory effects of pomegranate seed extract on the formation of heterocyclic aromatic amines in beef and chicken meatballs after cooking by four different methods.** Meat Science, V. 96, pg. 1446–1451, 2014.

CAPÍTULO 3

DETERMINAÇÃO DE ALCALOIDES INDÓLICOS E
 β -CARBOLÍNICOS EM FUMAÇA DE CIGARRO POR
BA μ E/UHPLC-MS/MS.

CAPÍTULO 3 – Determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em fumaça de cigarro por BA μ E/UHPLC-MS/MS.

3.1 INTRODUÇÃO

A exposição à fumaça de cigarro é culturalmente o principal mecanismo adotado pelos adeptos do tabagismo para absorção das substâncias provenientes do tabaco. É sabido que o processo de aquecimento/combustão do tabaco favorece a formação de inúmeras substâncias; dentre elas, os alcaloides derivados do aminoácido L-triptofano, alvo de estudo neste trabalho.

Considerando a relevância dos estudos da composição química da fumaça de cigarro como indicativo de fatores associados ao tabagismo, o presente capítulo propõe o desenvolvimento de uma nova metodologia de extração para a determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em amostras de fumaça de cigarro comercial.

Em continuidade à proposta de utilização de metodologias miniaturizadas visando a redução/eliminação de resíduos tóxicos, foi adotado a técnica de microextração adsorvente em barra (BA μ E). Para tanto, um sistema de coleta da fumaça de cigarro foi previamente desenvolvido para promover a conversão da amostra no estado gasoso em solução líquida a partir da solubilização por borbulhamento em água.

A metodologia BA μ E será desenvolvida a partir da otimização dos parâmetros inerentes à técnica, a citar: seleção do material adsorvente para construção de dispositivos de extração, controle de pH e adição de modificadores da solução amostral, tempo e velocidade de extração e condições de dessorção líquida.

Os analitos foram identificados e quantificados com recurso às técnicas de cromatografia líquida e espectrometria de massas, e os resultados obtidos foram certificados a partir de protocolo de validação analítica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e selecionar material adsorvente para a construção dos dispositivos de extração para BA μ E visando a seletividade aos alcaloides indólicos e β -carbolínicos;
- Desenvolver e otimizar as condições experimentais por BA μ E;
- Validar o método desenvolvido;
- Aplicar o método de extração em amostras de fumaça de cigarro com vistas a identificação e quantificação dos alcaloides alvo de estudo;

3.3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.3.1 Reagentes

Metanol grau HPLC (Carlo Erba), Metanol grau LC-MS (Merck), Acetonitrila grau HPLC (Carlo Erba), Água ultra purificada em sistema Milli-Q (Millipore Corporation), Cloreto de sódio (BDH chemicals), Hidróxido de sódio (BDH chemicals), Ácido clorídrico (Riedel-de-Haën), Ácido Fórmico grau LC-MS (Sigma-Aldrich), Strata™ X (Phenomenex), Strata™ DVB (Phenomenex), Strata™ CN (Phenomenex), OASIS HLB (Waters), OASIS MCX (Waters), OASIS MAX (Waters), PS-DVB (Merck), Envi C18 (Supelco).

Padrões certificados dos alcalóides harmano, norharmano, triptamina, harmalol, harmina e harmalina, foram adquiridos na Sigma-Aldrich (EUA), com grau de pureza superior a 95%.

O alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina (grau de pureza > 95%) foi isolado de cascas de *Mimosa tenuiflora* pela metodologia descrito em Gaujac *et al.*, 2013; e gentilmente cedido pelo autor para realização do estudos neste trabalho. [1]

O alcaloide *N,N*-dimetiltriptamina (grau de pureza > 95%), foi isolado de cascas de *Mimosa tenuiflora* em estudo desenvolvido por Gaujac *et al.*, 2013. [1]

O alcaloide tetrahidroharmina (grau de pureza de 98,2%) foi sintetizado e caracterizado em estudo anterior desenvolvido por Santos, 2016. [2]

3.3.2 Equipamentos

Balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), Placa de agitação múltipla com quinze posições (Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 15, Alemanha), Banho de ultrassônico equipado com termostato (Branson® 3510 E-DTH, EUA), Vórtex (Velp, Itália), pHmetro (Metrohm 744, Suíça), Gerador de Nitrogênio (Peak Scientific, *GENIUS NM32LA*).

Cromatógrafo líquido de ultra eficiência Waters modelo Acquity UPLC H Class equipado com sistema binário de bombas, módulo de comunicação, autoinjeter, forno para coluna e espectrômetro de massas com fonte de ionização por eletrospray, analisador híbrido Quadrupolo/Tempo de Voo modelo Xevo G2 Q-ToF Waters; com software de controle instrumental e aquisição de dados *MassLynx* (**Sistema 2**).

Cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent série 1100 (Agilent Technologies), equipado com desgaseificador a vácuo (G1322A), amostrador automático (G1313A), compartimento de coluna com termostato (G1316A), bomba quaternária (G1311A) e detector UV-DAD (G1315B); com software de controle instrumental e aquisição de dados *LC3D ChemStation* (**Sistema 3**).

3.3.3 Obtenção e preparo das amostras

Amostras de cigarro de diferentes marcas comerciais foram adquiridas em lojas de conveniência. A fumaça de cigarro foi coletada partir de um sistema à vácuo adaptado que simula o ato de fumar. Para tanto, a fumaça primária derivada da combustão do cigarro foi borbulhada em solução ácida para solubilização do material particulado. A solução obtida foi filtrada em membranas de 0,22 µm e o pH ajustado para 6 com solução de hidróxido de sódio antes de ser submetida ao processo de extração por BAµE.

3.3.4 Preparo de soluções padrão dos alcaloides

A partir dos padrões sólidos, foram preparadas soluções estoque individuais dos alcaloides em concentração de 1000 µg mL⁻¹ em metanol grau HPLC, das quais foram preparadas soluções intermediárias de 50-100 µg mL⁻¹. Soluções individuais e conjuntas em diferentes concentrações foram preparadas para realização dos ajustes de condições cromatográficas, desenvolvimento e otimização do processo de extração por BAµE e validação. As soluções de trabalho foram utilizados por um período de 30 dias.

3.3.5 Condições cromatográficas de análise e parâmetros de detecção

3.3.5.1 Sistema 2 (UHPLC-ESI-QTOF)

Eluição em modo gradiente com fase móvel composta pela mistura binária metanol:água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, com tempo total de 11 min (Tabela 19); vazão da fase móvel 0,3 mL min⁻¹, volume de injeção de 1 µL, forno da coluna com temperatura controlada em 40°C, temperatura do amostrador 15°C e coluna analítica CSH Phenyl-Hexyl Waters (50 mm x 2,1 mm x 1,7 µm).

Tabela 19. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no Sistema 2.

Tempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
0,01	95	5
7,00	67	33
7,50	0	100
8,50	0	100
9,00	95	5
11,00	95	5

Deteção dos alcaloides por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+) com parâmetros da fonte otimizados (*tunning*) (Tabela 20) e aquisição de dados aplicando a metodologia de Aquisição Independente de Dados, ou MS^E, com funções de baixa (6 eV) e alta energia (rampa 6-50 eV) no intervalo de *m/z* 50-600. Como padrão de correção de massa (*Lock-mass*) foi utilizado uma solução de leucina-encefalina (*m/z* 556,2771, em modo positivo) na concentração de 500 pg µL⁻¹ sob vazão 5 µL min⁻¹.

Tabela 20. Parâmetros de *tunning* otimizados no espectrômetro de massas do Sistema 2.

Parâmetro	Condição Ajustada
Voltagem do capilar:	3,0 kV
Temperatura da fonte:	100 °C
Temperatura de dessolvatação	450 °C
Vazão de gás de dessolvatação	900 L h ⁻¹
Vazão de gás no cone	50 L h ⁻¹

3.3.5.1 Sistema 3 (HPLC-UV/DAD)

Eluição em modo gradiente com fase móvel composta pela mistura binária metanol:água, ambas acidificadas com 0,1% de ácido fórmico, em coluna analítica Kinetex C18 Phenomenex (150 mm x 4,6 mm x 2,7 µm) com tempo total de 15 min (Tabela 21); vazão da fase móvel 0,7 mL min⁻¹, volume de injeção de 20 µL, forno da coluna com temperatura controlada em 40°C. A detecção dos alcaloides foi realizada no comprimento de onda de 250 nm.

Tabela 21. Programação de eluição em modo gradiente otimizado no Sistema 3.

Tempo (min)	% H ₂ O	% MeOH
0,01	95	20
9,00	67	60
9,50	0	100
10,50	0	100
12,00	95	20
15,00	95	20

3.3.6 Procedimento de extração por BAμE

Os dispositivos de extração utilizados foram produzidos no Laboratório de Cromatografia & Eletroforese Capilar, coordenado pelo professor José Manuel Florêncio Nogueira na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, de acordo com protocolo desenvolvido por Neng *et al.*, 2010: Um tubo cilíndrico de polipropileno (7,5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro externo) foi revestido por um filme adesivo ao qual o material adsorvente, na forma de sólido finamente dividido, foi uniformemente suportado. Antes de ser utilizado, os dispositivos foram lavados com água ultrapura sob agitação para remoção de excesso de adsorvente e possíveis impurezas. [3]

O procedimento de extração foi otimizado a partir das seguintes etapas:

- Em um frasco de vidro com capacidade de 30 mL, foi adicionado 24,9 mL de água ultrapura (pH 6) e 0,1 mL de solução padrão conjunta dos analitos;
- O dispositivo de extração previamente lavado e seco e uma barra magnética de agitação (15×4,5 mm) foram adicionados ao frasco de amostragem;
- Uma vez vedado, o frasco foi disposto em uma placa de agitação com velocidade programada em 1500 rpm, permanecendo por 3 horas a temperatura ambiente para a promover a extração;
- Decorrido o processo de extração, a barra foi removida do frasco amostral e submetida à secagem sob contato com papel absorvente;
- Posteriormente, a barra foi transferida para um *insert* de vidro, acondicionado em um vial, e foi adicionado 100 μL de metanol;
- Uma vez vedado, o vial foi levado ao banho ultrassônico por 5 min para promoção da retro-extração do adsorbato por dessorção líquida.
- Por fim, após rápida agitação em vórtex, a barra foi removida do *insert* e o extrato foi submetido à análise cromatográfica.

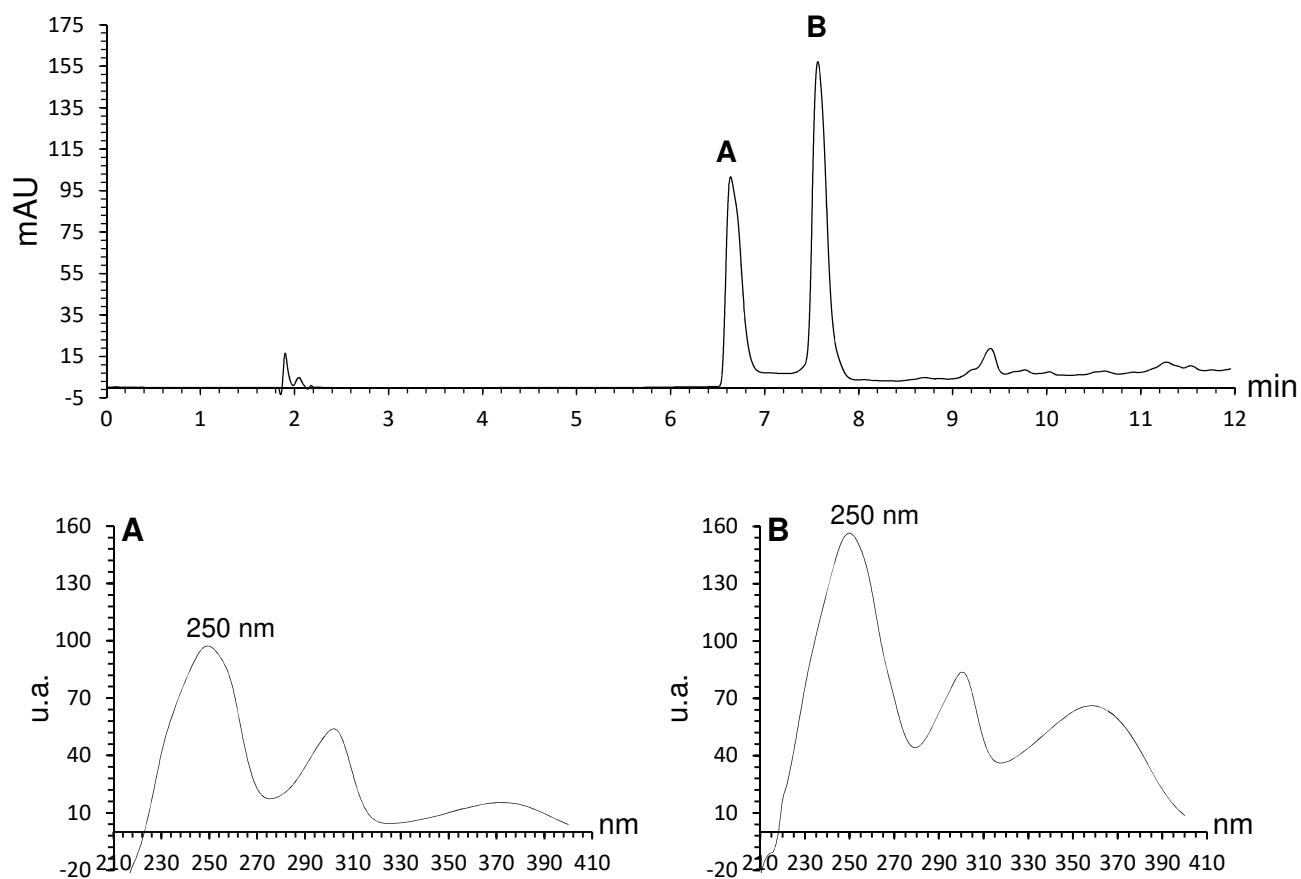
3.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os estudos desenvolvidos neste capítulo foram realizados no Centro de Química e Bioquímica, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa – Portugal sob supervisão do Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira durante a realização do estágio de doutorado sanduiche. Tendo em vista as limitações jurisdicionais aeroportuárias de transporte de substâncias químicas, apenas os alcaloides harmano e norharmano foram transportados para o país de destino do estágio; sendo, portanto, utilizados como compostos modelos para o desenvolvimento da metodologia proposta.

3.4.1 Desenvolvimento das condições cromatográficas de análise

O monitoramento de eficiência do método de extração por BAμE foi realizado a partir de análises dos extratos utilizado um sistema de cromatografia líquida com detecção espectrofotométrica por arranjo diodos (Sistema 3). Para tanto, condições instrumentais adequadas à separação e detecção dos alcaloides harmano e norharmano foram previamente otimizadas por testes com variados gradientes e modificações nos parâmetros do equipamento (vazão da fase móvel, fase estacionária, fase móvel e temperatura da coluna). O melhor perfil de separação, Figura 36, foi alcançado a partir da eluição em modo gradiente com a fase móvel composta pela mistura metanol:água acidificada com 0,1% de ácido fórmico, vazão de 0,7 mL min⁻¹, fase estacionária C18, temperatura no forno da coluna em 40°C. A detecção dos alcaloides foi realizada no comprimento de onda de 250 nm, considerando o máximo de absorção obtido experimentalmente após análises de soluções padrão dos alcaloides durante o processo de otimização das condições cromatográficas. Conforme é observado, o perfil cromatográfico assegura a separação com boa resolução entre os picos dos alcaloides.

Figura 36. Cromatograma (1) de solução padrão conjunta dos alcaloides norhamano (A) e harmano (B) e espectros de absorção na região do UV-Vis.



3.4.2 Desenvolvimento do procedimento de extração por BAμE

3.4.2.1 Seleção do adsorvente

O desenvolvimento da metodologia de microextração adsorptiva em barra (BAμE) para a identificação e quantificação dos alcaloides harmano e norharmano foi iniciado a partir da avaliação preliminar de diferentes materiais adsorventes em consonância com os protocolos estabelecidos na literatura [3,4]. Para tanto, foi verificado a capacidade de extração dos materiais: Discovery DPA 6S, Envi C18, Oasis HLB, Oasis MAX, Oasis MCX, PS-DVB, Strata CN, Strata DVB e Strata X. Para estes testes, as condições experimentais foram: 25 mL de amostra (água ultrapura, pH 5,5) fortificada com 100 μL de solução padrão dos alcaloides na concentração de 1 μg mL⁻¹, velocidade de agitação de 1000 rpm por 3 horas e dessorção líquida assistida por ultrassom (100 μL de metanol, 30 min).

Os adsorventes avaliados apresentam diferentes propriedades físico-químicas e, conseqüentemente, diferentes mecanismos de interação que são relevantes para a técnica proposta, seja no âmbito de confecção dos dispositivos de extração (*i.e.* revestimento do filme adesivo e superfície de contato), seja na eficiência de extração. A Tabela 22 apresenta um sumário com especificações estruturais, composição química e mecanismos de retenção dos adsorventes utilizados. Adsorventes com partículas substancialmente pequenas asseguram recobrimentos mais efetivo do dispositivo de extração e interstícios irrelevantes. O tamanho dos poros e a área superficial estão estreitamente associados à capacidade de adsorção dos analitos: quanto maior for superfície de contato e o tamanho dos poros tanto mais favorável será a adsorção; e por fim, o mecanismo de retenção dita a seletividade do adsorvente para grupos específicos de analitos. [5]

Tabela 22. Composição química, especificações estruturais, e mecanismo de retenção avaliados no estudo de desenvolvimento do método de extração por BAμE.

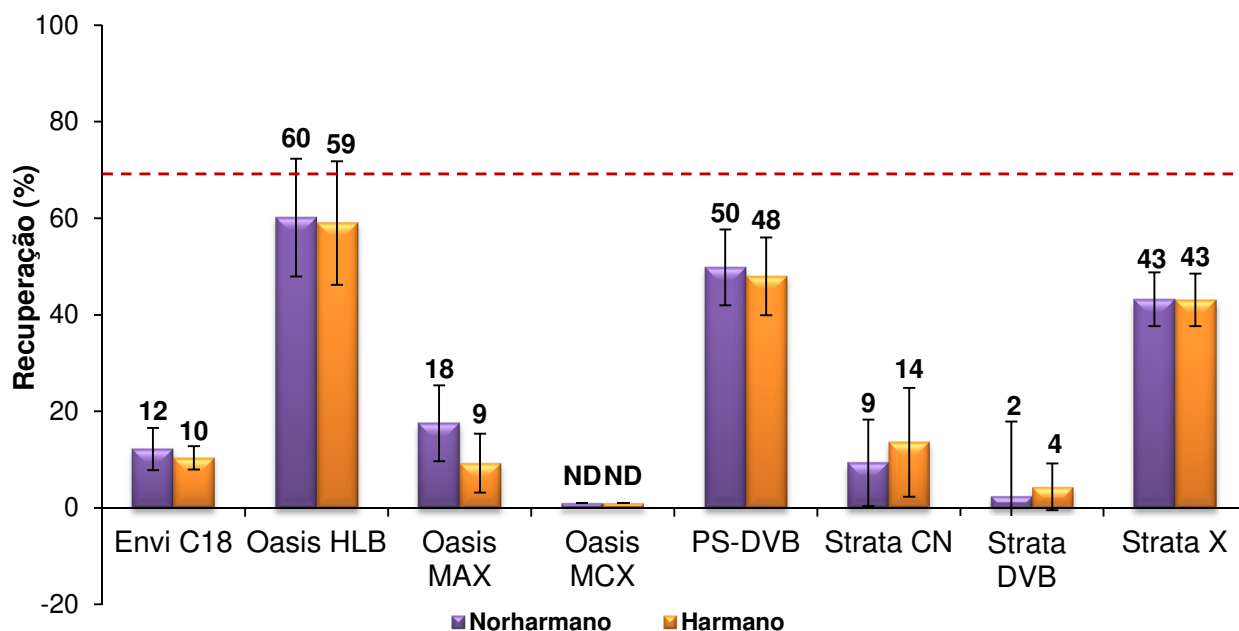
Adsorvente	Composição	T _{Partícula} (μm)	T _{poro} (Å)	SA (m ² g ⁻¹)	Mecanismo de retenção	Marca
Discovery DPA 6S	Poliamida	50-160	-	-	Fase Reversa	Supelco
Envi C18	Octadecilsilano	45	60	475	Fase Reversa	Supelco
Oasis HLB	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)	30	80	800	Balanço Hidrofílico- Lipofílico Fase Reversa	Waters
Oasis MAX	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)-C ₄ H ₉ (CH ₂) ₃ N ⁺	30	80	830	Troca Aniônica Fase Reversa	Waters
Oasis MCX	Poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona)-SO ₃ ⁻	60	80	830	Troca Catiônica Fase Reversa	Waters
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno	40-120	-	1200	Fase Reversa	Supelco
Strata CN	Cianopropil	55	70	500	Fase Normal	Phenomenex
Strata DVB	Poliestireno-divinilbenzeno	100	260	500	Fase Reversa	Phenomenex
Strata X	N-vinilpirrolidona	33	85	800	Fase Reversa	Phenomenex

T_{Partícula} = Tamanho de partícula, T_{poro} = Tamanho de poro, SA = Área superficial.

FONTE: Supelco, Waters, Phenomenex. [6-8]

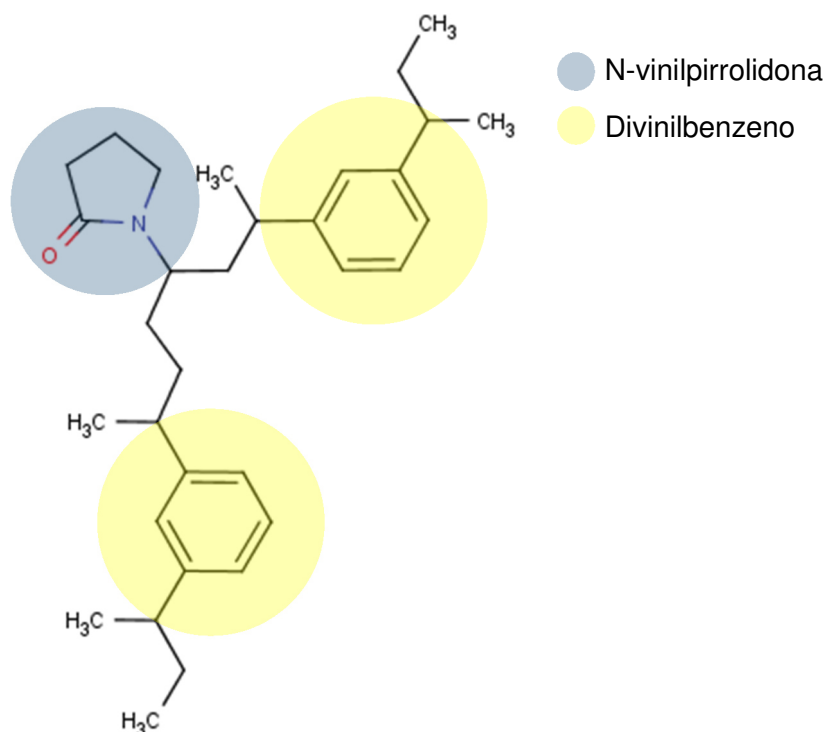
A Figura 37 apresenta a eficiência em termos de recuperação dos adsorventes avaliados para os compostos harmano e norharmano. Como é possível constatar, os melhores resultados foram obtidos com os materiais Oasis HLB, PS-DVB e Strata X em ordem decrescente. Atentando às semelhanças estruturais; verifica-se que Oasis HLB e Strata X possuem os menores tamanhos de partícula, denotando que um maior teor de partículas retidas à superfície do dispositivo influencia positivamente na qualidade dos resultados. Por outro lado, embora com dimensões disformes, o PS-DVB é o adsorvente que apresenta maior área superficial, que é um parâmetro essencial para o processo de adsorção. Tendo em vista os resultados obtidos pelo Oasis HLB, este foi selecionado para dar continuidade do processo de otimização da metodologia.

Figura 37. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes materiais adsorventes ($n=3$). As análises foram realizadas no Sistema 3.



OASIS® HLB (do inglês *Hydrophilic-Lipophilic Balanced*) é um adsorvente composto pelo co-polímero poli(divinilbenzeno-co-N-vinilpirrolidona). De natureza anfifílica, dada a existência da presença de grupos apolares (Divinilbenzeno) e polares (N-vinilpirrolidona), possui uma variada capacidade de interação com diferentes classes de compostos. Estudos realizados por Dias e Poole, 2002, demonstraram que em meio aquoso, este adsorvente possui elevada capacidade de adsorção a compostos polares e de baixa massa molecular (e.g. alcaloides β -carbólicos) em decorrência da sua alta afinidade por pares de elétrons e reduzido tamanho de poros, respectivamente. Além disso, possui estabilidade química em toda a faixa de pH (0 - 14) e também elevada área superficial, condições importantes para a aplicabilidade em metodologias de extração por BA μ E. A Figura 38 apresenta a estrutura do molecular do polímero Oasis HLB com destaque aos sítios ativos. [9]

Figura 38. Estrutura química do adsovente Oasis HLB com destaque aos sítios ativos.



Considerando o fato de que os alcaloides estudados apresentam alta densidade de pares de elétrons, proveniente do grupo indol que os estruturam, compreende-se que os bons resultados de extração quando dos testes preliminares são decorrentes da afinidade química entre os analitos e os grupos N-vinilpirrolidona, em que as interações do tipo π - π e ligações de hidrogênio asseguram a remoção desses compostos do meio amostral.

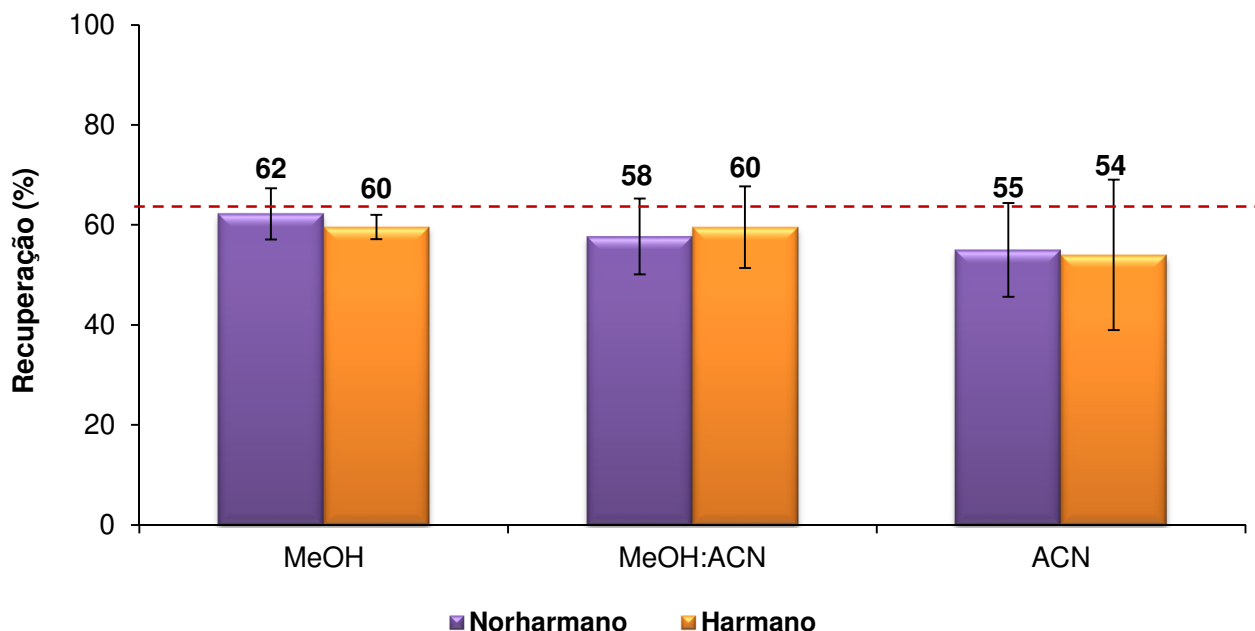
As barras de extração construídas com o adsorvente Oasis HLB apresentaram massa média de $0,0023\text{g} \pm 0,0001\text{g}$ deste material fixado ao suporte.

3.4.2.2 Retroextração

Tão importante quanto a extração dos analitos da amostra a partir da interação com o material adsorvente, o processo de retroextração é uma etapa que deve ser avaliado durante a otimização da metodologia BA μ E. Faz-se necessário assegurar a transferência majoritária do adsorvato na barra de extração, sobretudo os analitos, para um solvente extrator, de modo que seja obtido um extrato adequado para a técnica instrumental escolhida para análise; neste contexto, tendo em vista que a quantificação dos analitos é realizada por cromatografia líquida, optou-se pelo processo de dessorção líquida (DL).

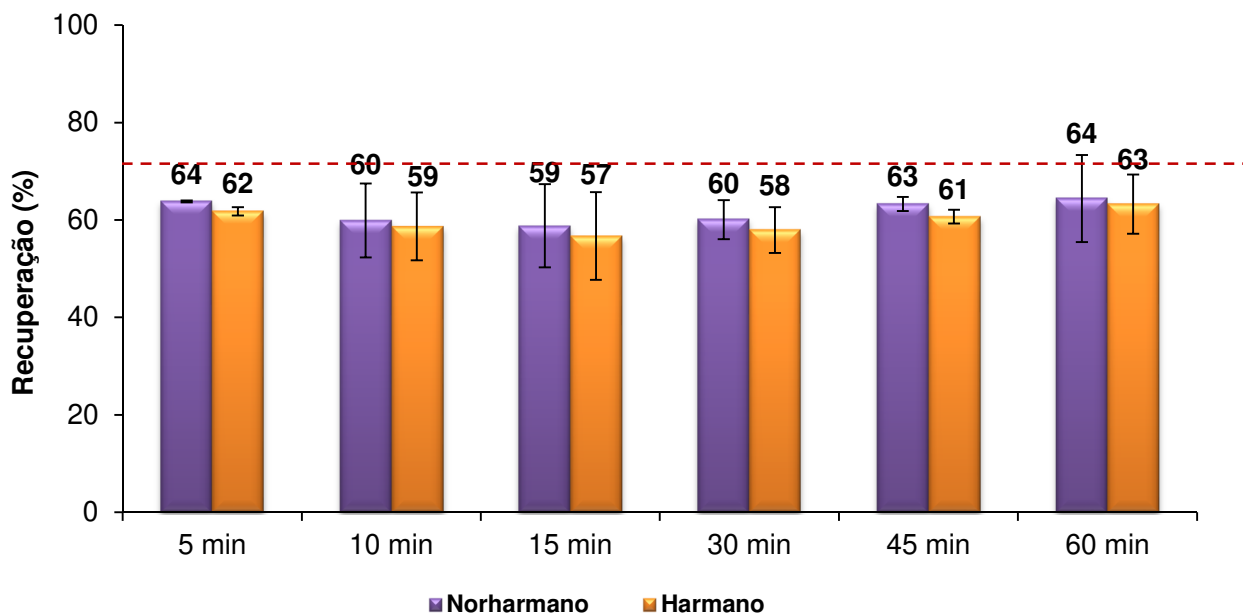
Considerando a natureza polar dos alcaloides harmano e norharmano, foi avaliado a eficiência de metanol (MeOH), acetonitrila (MeCN) e a mistura MeOH:MeCN (1:1, v/v) como solvente extrator do processo de DL sob banho ultrassônico por 30 min. O volume utilizado foi de 100 μL ; definido a partir do critério de completa imersão da barra de extração acondicionada no *insert* [3]. A Figura 39 apresenta os resultados de recuperação obtidos a partir do teste mencionado, em que se observa que o metanol apresentou o melhor desempenho de dessorção dos analitos. Considerando os menores desvios padrão experimentais e o fato de ser o solvente que compõe a fase móvel do sistema cromatográfico utilizado para análise, o metanol foi escolhido como o solvente extrator.

Figura 39. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, utilizando diferentes solventes para dessorção líquida ($n=3$). As análises foram realizadas no Sistema 3.



Conforme mencionado, recorrer a mecanismos que facilitem o processo de dessorção é uma prática usual de modo a torná-lo ágil e/ou reproduzível. Uma vez submerso em solvente, o dispositivo BA μ E foi submetido a tratamento ultrassônico em temperatura ambiente e tempo controlado. Foi avaliado o tempo, no intervalo de 5 a 60 min, necessário para promover a completa dessorção dos analitos. De modo similar ao comportamento observado nos ensaios de seleção do solvente, variações pouco significativas foram observadas nos resultados de recuperação, conforme pode ser observado na Figura 40. Neste sentido o tempo de 5 de minutos foi considerado adequado para o método.

Figura 40. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes tempos de extração líquida com recurso à ultrassom ($n=3$). As análises foram realizadas no Sistema 3.



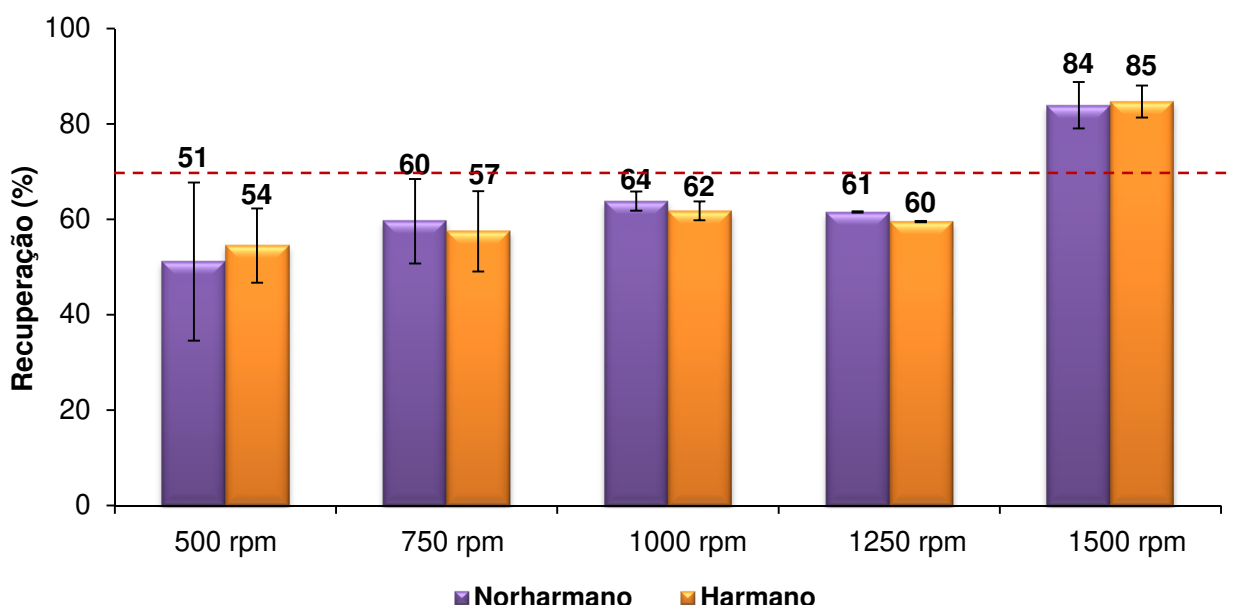
3.4.2.3 Microextração

Uma vez desenvolvida sob os princípios do processo de amostragem estática por flutuação, parâmetros cinéticos como tempo e velocidade de agitação são significativamente importantes para a qualidade de método de extração BA μ E. Ainda, critérios relacionados ao meio amostral devem ser cuidadosamente ajustados de modo a facilitar o processo de migração dos analitos para o dispositivo de extração, tornando-o seletivo; dentre eles, parâmetros como pH, força iônica e modificador orgânico são rotineiramente avaliados. A adequada combinação destes parâmetros definirá a eficiência do método.

3.4.2.3.1 Velocidade de Agitação

A velocidade de agitação está associada ao processo de difusão dos analitos do meio amostral para a barra de extração. Para avaliar a influência da velocidade de extração, foram realizados ensaios nas velocidades de 500, 750, 1000, 1250 e 1500 rpm. Conforme é visto na Figura 41, a transferência de massa dos alcaloides do meio aquoso para o adsorvente OASIS HLB foi mais efetiva sob agitação a 1500 rpm, fornecendo eficiência de recuperação média de 85% para ambos os alcaloides estudados. Tal tendência corrobora a literatura de que o equilíbrio é favorecido de maneira proporcional à velocidade de agitação em decorrência do aumento na velocidade de difusão dos analitos [4,5]. Ressalta-se, no entanto, que efeitos adversos podem ser obtidos quando do uso de velocidades mais elevadas, a exemplo da instabilidade do *vórtex* formado pelo movimento circular da barra magnética, afetando a condição de flutuação do dispositivo BA μ E e levando-o a eventuais contatos mecânicos com as paredes do frasco de amostragem e/ou na própria barra, de modo que possa provocar deformação da superfície da fase adsorvente; fato pelo qual não se avaliaram velocidades superiores a 1500 rpm.

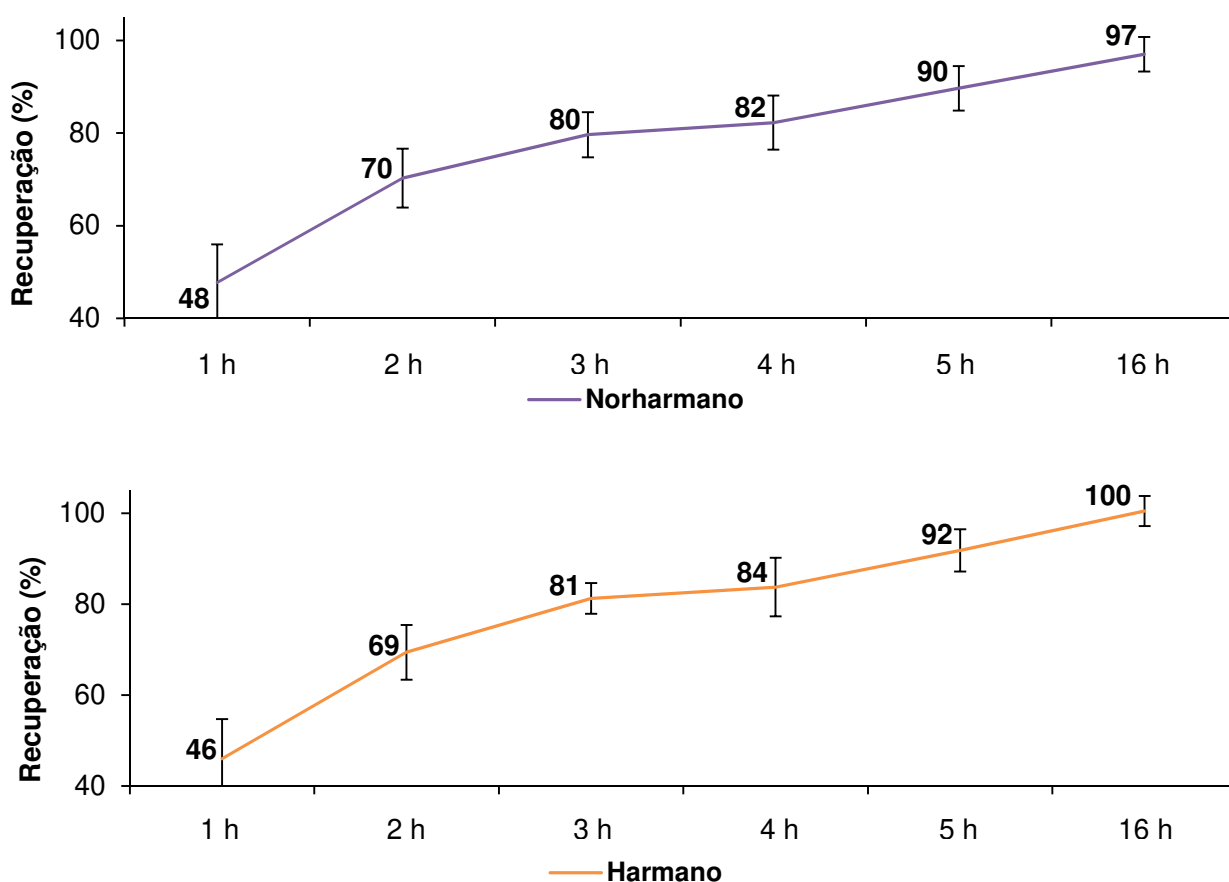
Figura 41. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ utilizando diferentes velocidades de rotação no sistema de agitação por *vórtex* (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.



3.4.2.3.2 Tempo de Equilíbrio

Definido a melhor velocidade de agitação, deu-se continuidade ao processo de otimização com o estudo de equilíbrio de extração em relação ao tempo. Conforme é possível notar na Figura 42, de acordo com os experimentos realizados com um período de 16 horas o processo de extração atinge um máximo de eficiência, com recuperações médias de 100%. Todavia, há de ressaltar que o intervalo entre os dois últimos pontos experimentais se deu demasiado longo em decorrência do ajuste de condições que tornasse a metodologia adequada à rotina laboratorial, ou seja, considerar um processo que opere *overnight* sem a necessidade de manipulação extra e/ou a presença do analista.

Figura 42. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes tempos extração analítica. (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.

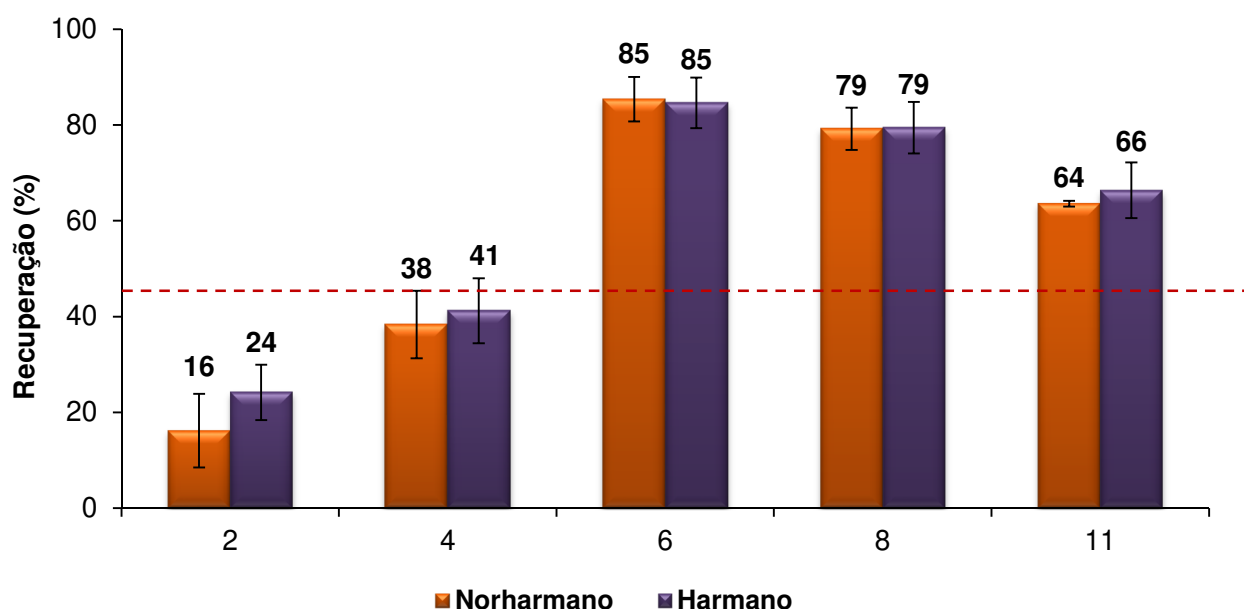


Apesar da ótima condição de equilíbrio obtida no tempo de 16 horas, optou-se por definir como condição satisfatória para a metodologia proposta o tempo de 3 h, haja vista que, em tal condição, os resultados obtidos adequam-se aos critérios de aceitabilidade de eficiência de extração em termos de recuperação (70-120%). Assim, atribui-se à metodologia um caráter mais ágil; adequando-se às premissas modernas de desenvolvimento de novas metodologias de preparo de amostra.

3.4.2.3.3 Efeito do pH

Em geral, o pH da matriz é uma variável muito importante durante a operação por BA μ E, sobretudo quando os analitos alvo de extração apresentam propriedades de dissociação, *i.e.* propriedades ácidas ou básicas. O efeito do pH na eficiência de extração foi estudado pelo ajuste de acidez do meio amostral (água ultrapura) com soluções diluídas de hidróxido de sódio e ácido clorídrico. Para tanto, as variáveis de extração anteriormente definidas foram reproduzidas sob condições de pH 2, 4, 6, 8 e 11. Como é possível verificar na Figura 43, a condição de extração em pH 6 promoveu as melhores capacidades de adsorção dos alcaloides pelo adsorvente OASIS HLB; mostrando-se eficiente também em pH 8. Esse resultado é justificado a partir da análise do comportamento dos analitos e adsorvente sob tais condições de pH.

Figura 43. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes valores de pH da solução amostral. (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.



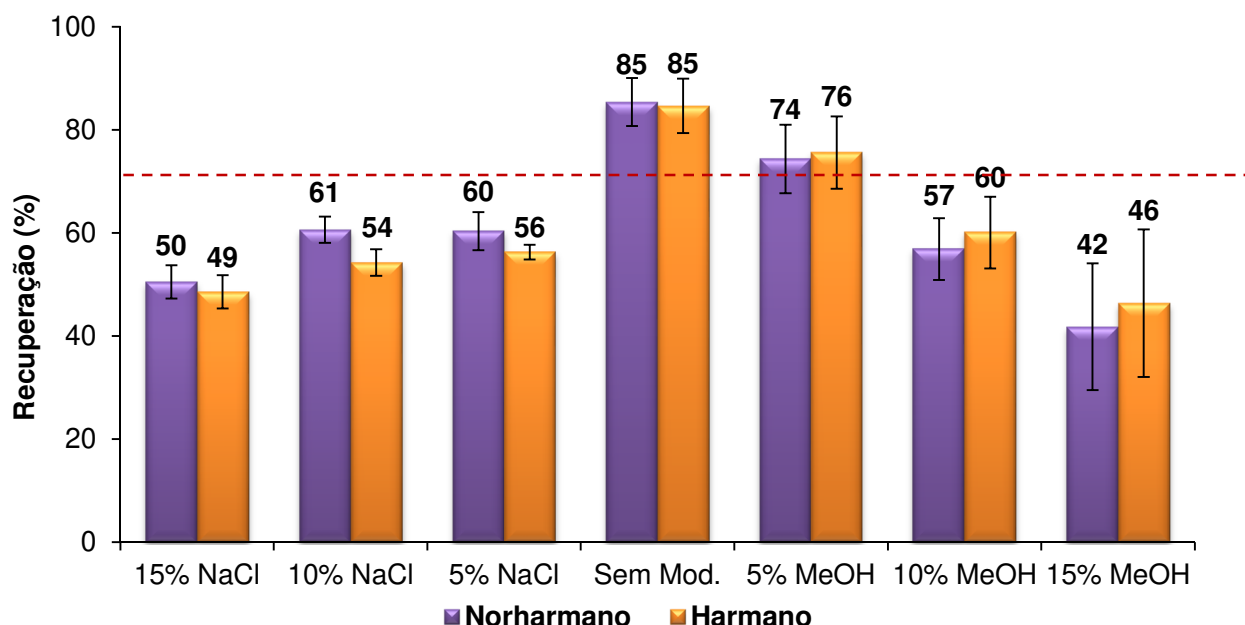
Embora com a presença do grupo amina nas estruturas químicas, o pK_{a1} dos alcaloides norharmano e Harmano (5,28 e 5,97, respectivamente) indicam um caráter levemente ácido a essas moléculas; essa condição é justificada pela hibridização sp^2 do nitrogênio, tornando o par de elétrons mais atraído pelo núcleo deste heteroátomo e, portanto, menos disponível para ser compartilhado. Em condições em que o valor do potencial hidrogeniônico supera a constante de acidez dos alcaloides, o equilíbrio das espécies desses compostos é direcionado às suas formas neutras, condição que desfavorece a solubilidade em solventes polares. Haja visto que o processo de extração por BA μ E ocorre em meio aquoso, a redução da solubilidade dos analitos no meio amostral torna-se um fator favorável para processo de migração para a barra de extração contendo o adsorvente. [10]

3.4.2.3.4 Efeito da Força Iônica e Modificador Orgânico

Modificar a matriz a partir de adição de eletrólitos e/ou álcoois é uma prática rotineira durante o estágio de otimização da extração por BA μ E. Assim como o efeito do pH, a força iônica e polaridade do meio podem atuar como facilitadores do processo de interação entre os analitos e adsorvente, afetando positivamente o equilíbrio de extração. A influência de modificadores na matriz foi avaliada a partir da adição de NaCl e MeOH para alterar a força iônica e polaridade, respectivamente; ambos nas concentrações de 5, 10 e 15%.

Conforme é apresentado na Figura 44, em ambos os casos nota-se um comportamento inversamente proporcional ao aumento das concentrações dos modificadores. No que diz respeito à força iônica, tal comportamento pode estar associado ao fato de que o aumento do teor salino provoca um incremento na viscosidade da amostra, dificultando o processo de difusão dos analitos. Quando da adição de MeOH, a redução da capacidade de extração se dá em decorrência do aumento da solubilidade dos alcaloides na matriz. Desta maneira, adição de modificadores foi rejeitada no processo de otimização experimental. [11,12]

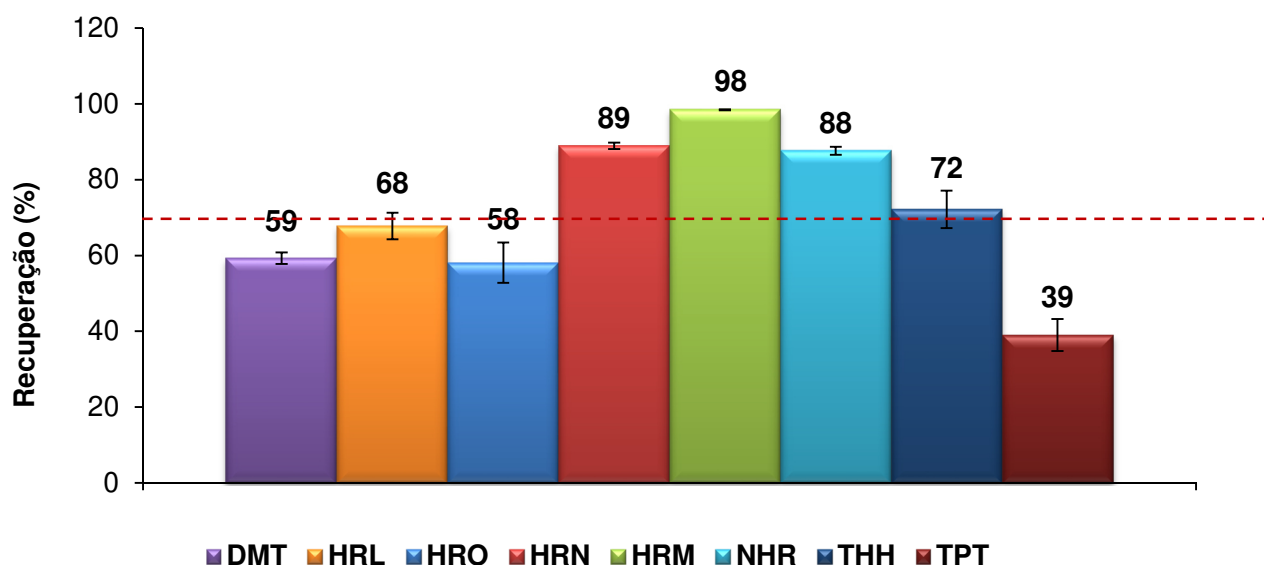
Figura 44. Eficiência de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes condições de modificadores do meio amostral. (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.



Em resumo, o método de microextração adsortiva em barra otimizado com os compostos modelo harmano e norharmano foi definido pelo uso de um dispositivo extrator elaborado pela deposição do adsorvente OASIS HLB ($0,0023\text{g} \pm 0,0001\text{g}$) com dimensões de 7,5 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro externo. A condição ideal para extração dos compostos consistiu no uso de 25 mL de solução aquosa com pH ajustado em 6, em que o dispositivo foi adicionado e submetido a flutuação por *vórtex* com recurso a uma barra de agitação magnética em rotação de 1500 rpm por 3 horas, dispensando a adição de modificadores de salinidade e polaridade para elevar a capacidade extratora. A etapa de retroextração foi promovido por dessorção líquida assistida por ultrassom utilizando 100 μL de metanol por 5 minutos de sonicação.

Foi avaliado a eficiência do método otimizado para os alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina (DMT), harmalina (HRL), harmalol (HRO), harmina (HRN), tetrahydroharmina (THH) e triptamina (TPT) em conjunto com os alcaloides modelo harmano (HRM) e norharmano (NHR). Como pode ser notado na Figura 45, as condições do método favoreceram recuperações dentro dos critérios de eficiência adotados neste estudo para os alcaloides harmalina, harmina e tetrahydroharmina. Por outro lado, para os alcaloides *N,N*-dimetiltriptamina, harmalol e triptamina a capacidade de recuperação analítica não foi satisfatória. A explicação para o comportamento dos resultados observados pode ser fundamentada sob a análise dos valores de pK_{a1} , e por consequência dos coeficientes de partição (Log D) destes compostos: A solução amostral, meio aquoso com pH 6, não favorece o deslocamento de equilíbrio dos alcaloides com maiores valores de pK_{a1} em suas espécies neutras, menos solúveis em água. Note, por exemplo, que a triptamina, por apresentar o maior valor pK_{a1} (9,73) foi o analito com menor migração para o dispositivo contendo o material adsorvente OASIS HLB, devido ao seu menor Log D (- 2,25).

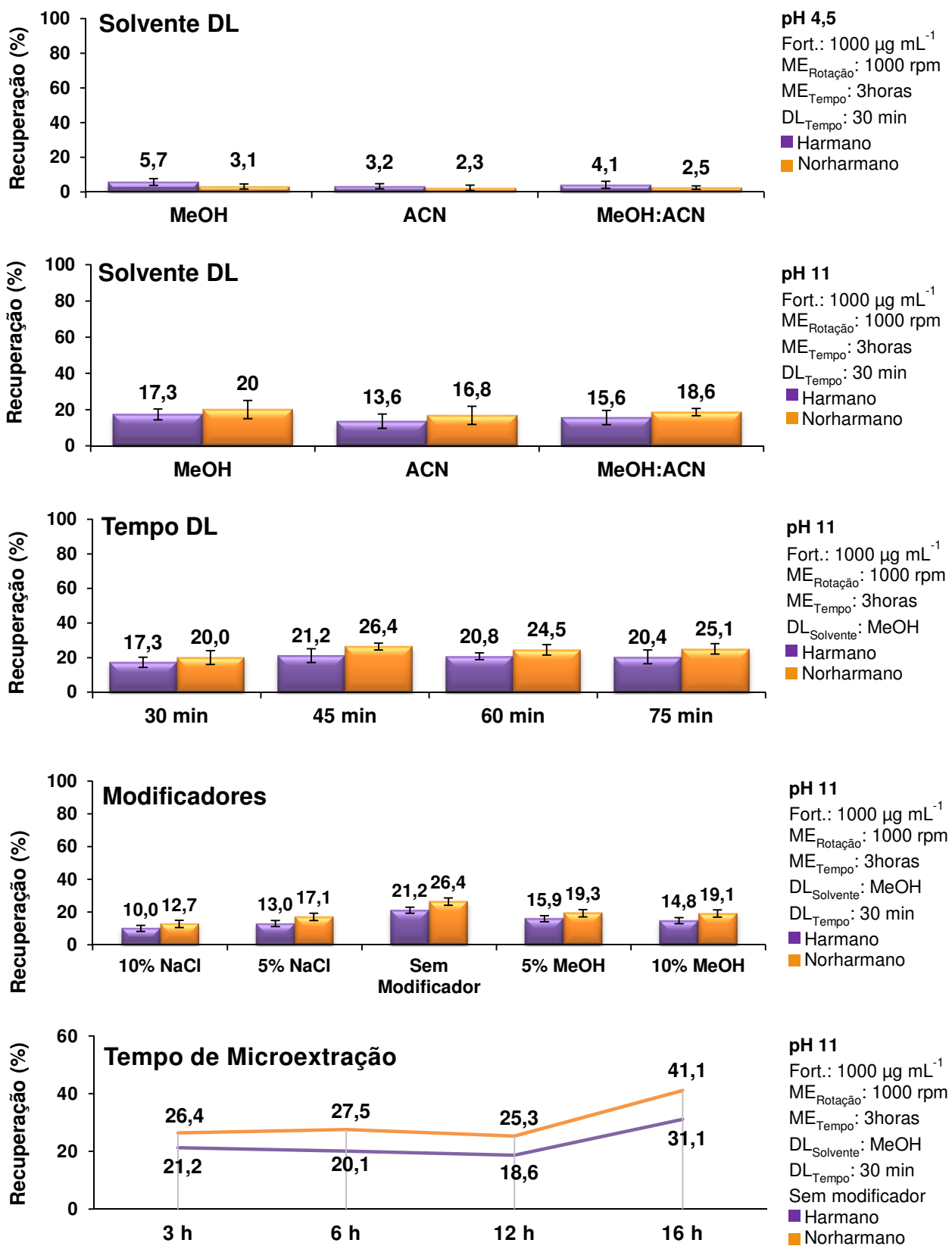
Figura 45. Eficiência de extração (%) da metodologia BA μ E otimizada após inclusão dos demais alcaloides estudados com nível de fortificação de 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 2.



3.4.2.4 Avaliação da eficiência do adsorvente Discovery DPA 6S por BAμE

Na tentativa de viabilizar a utilização dos dispositivos de extração revestidos com o adsorvente Discovery DPA 6S para extração dos alcaloides, foi realizado um estudo de otimização a partir das variáveis inerentes à técnica BAμE recentemente discutidas. A Figura 46 apresenta os resultados de recuperação obtidos quando avaliado o tempo e tipo de solvente na etapa de retroextração, o pH, a força iônica e a polaridade do meio amostral, e o tempo de microextração. Os experimentos não resultaram em condições favoráveis à utilização do adsorvente Discovery DPA 6S com a técnica de microextração adsortiva em barra; os baixos valores de recuperação podem ser justificados sob a perspectiva das suas propriedades estruturais: com tamanhos de partículas maiores e irregulares, e morfologia laminar, notou-se que o processo de revestimento do suporte adesivo no dispositivo de extração não aconteceu de maneira eficiente, resultando em baixa deposição deste adsorvente à barra e recorrente desagregação durante as etapas de microextração e dessorção líquida.

Figura 46. Eficiências de extração (%) dos alcaloides estudados com nível de fortificação de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ a partir da avaliação de diferentes variáveis de otimização da técnica BA μ E para o adsorvente Discovery DPA 6S (n=3). As análises foram realizadas no Sistema 3.



3.4.2.5 Validação do método

A validação do método de extração desenvolvido e otimizado neste capítulo foi conduzida a partir do protocolo experimental adotado no estudo de validação do Capítulo 2 - *Determinação de alcaloides indólicos e b-carbolínicos em matrizes de tabaco por μ MSPD/UHPLC-MS/MS*. Assim sendo, com apreciação das figuras de mérito: linearidade, exatidão, precisão, efeito matriz, limite de detecção e limite de quantificação. Com exceção do estudo de efeito matriz, os parâmetros foram avaliados com ensaios em água ultrapura, em conformidade aos estudos desenvolvidos por Neng *et al.*, 2010, Ide *et al.*, 2018 e Ahmad *et al.*, 2019 [3, 13,14]. Assim como no processo de otimização, a validação do método foi realizada pelos alcaloides modelos harmano e norharmano. A Tabela 22 condensa os resultados do processo de validação.

Os coeficientes de determinação (R^2) obtidos a partir das curvas analíticas indicaram ótima linearidade do método para os alcaloides harmano e norharmano no intervalo de concentração de 2,5 - 250 $\mu\text{g L}^{-1}$. A seletividade dos dispositivos de extração contendo o adsorvente OASIS HLB é confirmada pelos excelentes valores de RCA. A exatidão e a precisão do método foram avaliadas a partir de ensaios de extração por BA μ E(HLB)- μ LD/HPLC-UV/DAD nas modalidades intradia (cinco replicatas) e interdía (três dias consecutivos) para os níveis de concentração 5, 25 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$. Visto que os resultados enquadram-se nos valores aceitos pela literatura (70-120% $\pm$ 20%), estabelece-se um caráter exato e preciso ao método proposto. Os limites de detecção e quantificação foram previstos a partir de cálculos baseados em parâmetros das curvas analíticas. Os resultados obtidos asseguram que os alcaloides harmano e norharmano podem ser seguramente quantificados em amostras de fumaça de cigarro empregando a metodologia BA μ E.

Tabela 23. Resultados obtidos do processo de validação da metodologia de extração otimizada empregando BAμE.

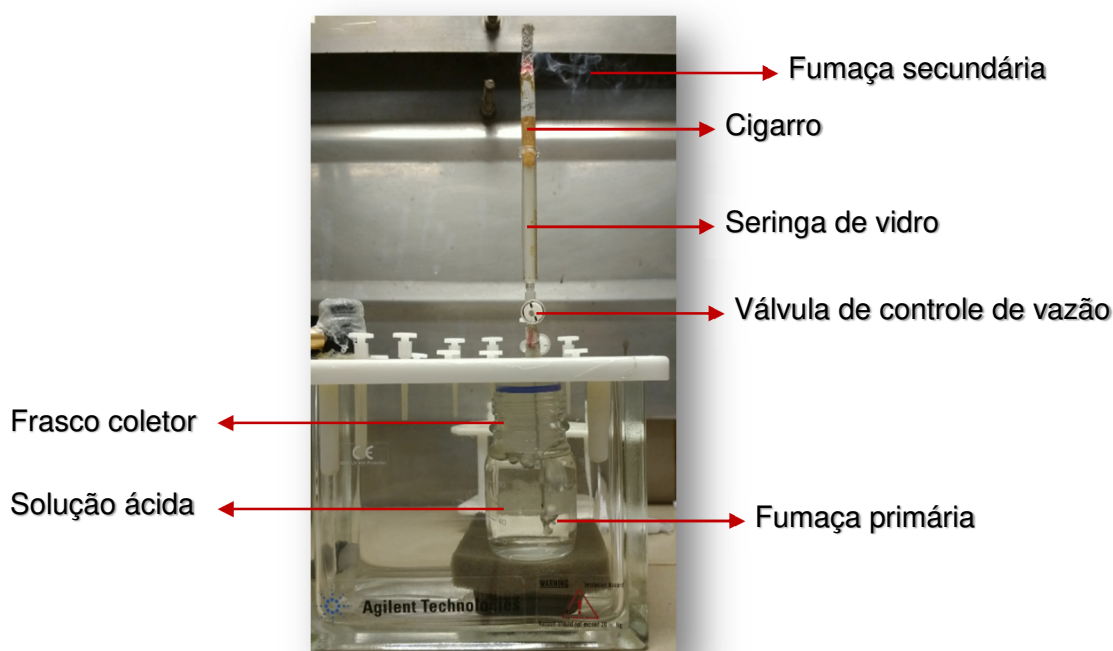
	Harmano			Norharmano		
Linearidade						
Intervalo de concentração (µg L ⁻¹)	2,5 - 250			2,5 - 250		
Equação da reta	y = 147031x + 1507464			y = 135063x + 214135		
R ²	0,9945			0,9994		
Efeito Matriz						
RCA	0,93			0,95		
Exatidão e Precisão						
	Intradia (n=5)					
Níveis de Fortificação (µg L ⁻¹)	5	25	100	5	25	100
Rec. Média (%)	77,8	75,1	82,6	77,3	74,4	81,2
DPR	3,6	3,9	3,7	3,8	4,0	3,7
	Interdia (n=15)					
Níveis de Fortificação (µg L ⁻¹)	5	25	100	5	25	100
Rec. Média (%)	79,1	75,1	80,6	78,1	76,1	80,7
DPR (%)	4,8	5,6	3,8	5,8	5,4	3,4
Lim. de Detecção (µg L ⁻¹)	0,1			0,05		
Lim. de Quantificação (µg L ⁻¹)	0,5			0,5		

3.4.3 Aplicação em amostras fumaça de cigarro

A metodologia de extração otimizada foi aplicada para a identificação e quantificação dos alcaloides em amostras de fumaça de cigarro comercial. O processo de combustão decorrente da prática do tabagismo promove a formação de dois tipos de fumaça: Fumaça primária, que é aspirada pelo fumante, e a fumaça secundária oriunda da ponta do cigarro; e estudos indicam que esses dois tipos de fumaça apresentam diferenças significativas quanto a composição química. [15, 16]

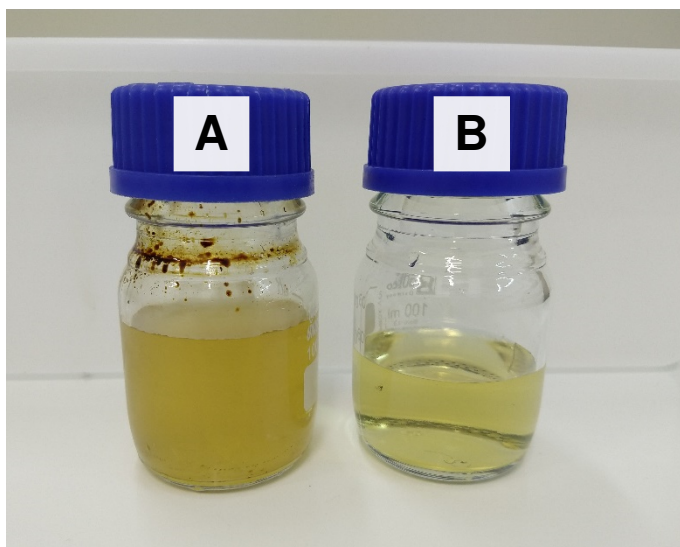
Baseado em estudos relacionados à composição química de fumaça de cigarros (e.g. Ishizaki *et al.*, 2019), foi adaptado em laboratório um sistema que simula o ato de fumar com a finalidade de capturar a fumaça primária de cigarro comercial [17]. Para tanto, foi utilizado um sistema a vácuo do tipo *SPE vacuum manifold*, ao qual foi acoplando uma seringa de vidro à válvula de controle de vazão de eluição contendo uma agulha de aço inox. Dentro do sistema de vácuo, foi acomodado um frasco coletor contendo solução aquosa de ácido fórmico com quantidade estabelecida para assegurar a imersão da agulha de aço inox. À seringa de vidro, foi encaixado o filtro do cigarro. Uma vez acionada a bomba de vácuo e aberta a válvula de vazão, o cigarro foi aceso e a fumaça aspirada foi borbulhada na solução do frasco coletor até completa combustão do cigarro. A Figura 47 apresenta uma imagem do sistema de coleta da fumaça descrito.

Figura 47. Sistema adaptado para coleta de fumaça primária de cigarro comercial.



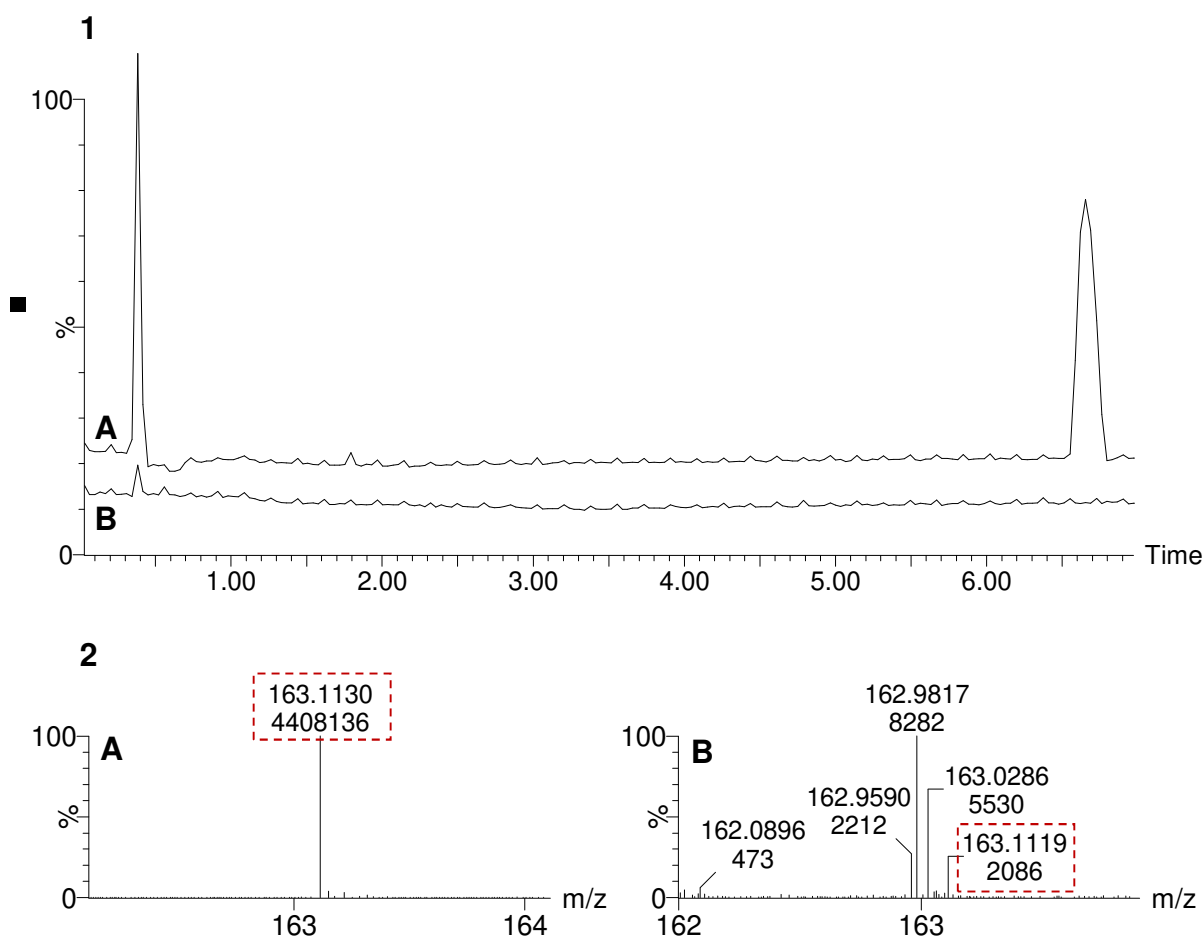
A vazão de aspiração da fumaça foi a priori ajustado para promover a combustão completa de um cigarro em um tempo médio de 5 minutos contínuos. Considerando que o volume de solução amostral para a metodologia de extração por BA μ E otimizada foi de 25 mL, foi definido a relação de 1 cigarro para cada extração realizada. Finalizada a combustão, a solução ácida utilizada para borbulhamento da fumaça apresentou coloração amarelada e turva e com odor característico de cigarro; foi observado também o acúmulo de uma resina escura nas paredes do frasco coletor (A). Ao ser filtrada com membrana de 0,22 μ m, a solução assumiu um aspecto límpido mas com permanência da coloração e odor (B) conforme fotografia apresentada na Figura 48. Antes da aplicação da metodologia de extração o pH da solução foi ajustado para 6 com adição de solução de hidróxido de sódio.

Figura 48. Solução de fumaça de cigarro antes (A) e após filtragem com filtro membrana 0,22 μ m (B).



Resultados das análises dos extratos por UHPLC-ESI-QTOF indicam que a metodologia de extração por BA μ E desenvolvida é eficiente para o processo de *clean-up* da amostra. A Figura 49 compara os cromatogramas e espectros de massas obtidos das análises da solução de fumaça antes e após extração por BA μ E, onde nota-se que compostos majoritários provenientes da fumaça de cigarro não são transferidos para o dispositivo de extração; a exemplo da nicotina ($T_R = 0,38$ min, m/z 163,1235) que por apresentar estrutura química semelhante à dos alcaloides alvo de estudo, poderia atuar como um forte concorrente dos sítios ativos do adsorvente OASIS HLB, reduzindo assim a eficiência de recuperação do dispositivo de extração.

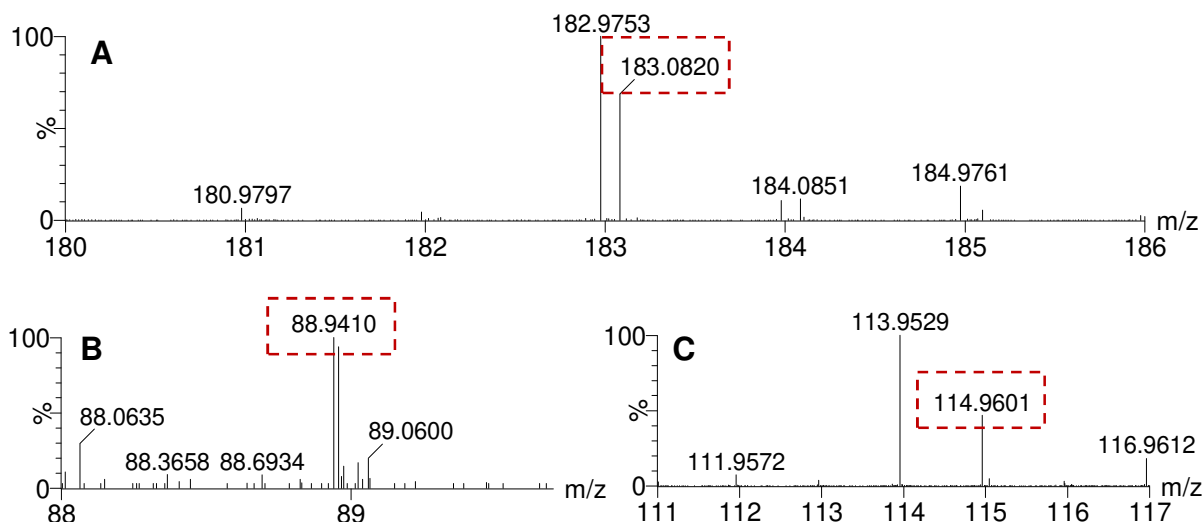
Figura 49. Solução de fumaça de cigarro antes (A) e após (B) processo de extração empregando BA μ E (B).



No que diz respeito à presença dos compostos alvo de estudo, foram identificados os alcaloides harmano e norharmano no extrato de fumaça de cigarro obtido após extração por BAμE preliminarmente analisado. A confirmação desses compostos é assegurada pelos baixos erros de massas calculados tanto para as moléculas protonadas como para os íons fragmentos mais intensos. A Figura 50 apresenta os espectros de massas extraídos para íons mencionados e a Tabela 24 os valores de erro de massas calculados.

Figura 50. Espectros massas de molécula protonada (A) e íons fragmentos (B e C) dos alcaloides harmano e norharmano gerados a partir de análises em modo MS^E no sistema UHPLC-ESI-QTOF em extrato de fumaça de cigarro obtido por BAμE.

Harmano



Norharmano

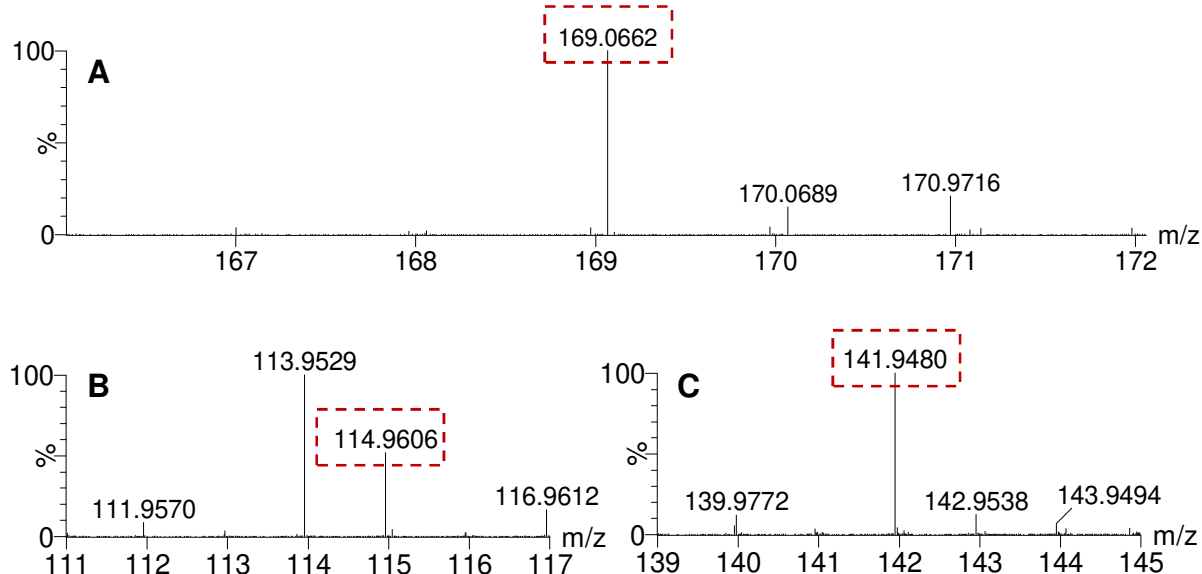


Tabela 24. Erros de massa calculados para as m/z da molécula protonado e ions fragmentos dos alcaloides harmano e norharmano identificados no extrato de fumaça de cigarro obtido por BAμE.

	Harmano			Norharmano		
	Padrão	Amostra*	Erro (ppm)	Padrão	Amostra*	Erro (ppm)
Molécula protonada	183,0816	183,0820	$2,0 \pm 0,9$	169,0658	169,0662	$2,4 \pm 0,6$
Íon fragmento 1	114,9597	114,9601	$3,5 \pm 1,2$	114,9601	114,9606	$4,3 \pm 1,1$
Íon fragmento 2	88,9418	88,9410	$-9,0 \pm 4,6$	141,9468	141,9480	$8,5 \pm 1,5$

* Valor médio

A quantificação dos alcaloides identificados no extrato obtido pela metodologia de extração por BAμE da solução de fumaça de cigarro foi realizada pelo método de adição padrão. Logo, harmano e norharmano apresentaram concentrações de $19,28 \pm 0,39 \mu\text{g g}^{-1}$ e $18,29 \pm 0,47 \mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente. Tais resultados, quando comparado àqueles obtidos para as amostras *in natura* e processadas (Tabela 17), indicam que o processo de combustão do tabaco favorece a formação dos referidos alcaloides, tal qual o processo de secagem sob altas temperaturas; elevando em cerca de 30 vezes os seus níveis de concentração (comparado à amostra de cigarro industrializado). Ressalta-se, porém, que os as concentrações foram estimadas, por ora, apenas na fração de fumaça primária; logo, é razoável inferir que o taxa de formação dos alcaloides harmano e norharmano são ainda superiores quando considerado a fração de fumaça secundária. Poindexter *et al.*, 1962, em seu estudo pioneiro e exclusivo, obtiveram teores de 25 e 68 vezes superiores para harmano e norharmano, respectivamente, quando compararam as amostras de folhas de tabaco e fumaça de cigarro. [18]

A eficiência da metodologia BAμE desenvolvida foi comparada com outros estudos de determinação de alcaloides em fumaça de cigarro; dando destaque às técnicas de extração e análises utilizadas, parâmetros de validação adotados e níveis de concentração obtidos. Conforme pode ser observado na tabela 25, os valores de concentração dos alcaloides harmano e norharmano são bastantes discrepantes; tendo este estudo determinado os maiores teores destes compostos. Diferentes fatores podem ser atribuídos à variabilidade dos resultados alcançados, dentre eles a quantidade de etapas envolvidas até a obtenção do extrato final, a eficiência do processo de coleta da fumaça de cigarro para posterior aplicação das metodologias de extração relatadas, a massa real de tabaco presente nos cigarros avaliados, entre outros. Porém, convém destacar que o método proposto neste estudo assume particularidades que o destaca dos demais: A metodologia de extração é fundamentada sobre os princípios de microextração, que atribuem à técnica consumo reduzido de reagentes sem perda da eficiência analítica, facilidade de obtenção da solução de fumaça de cigarro, simplicidade de operação, e alto rigor na apresentação dos dados assegurado pelo processo de validação adotado. Ainda, a alta seletividade e sensibilidade alcançada pelos baixos valores de limites de quantificação e detecção possibilitam a aplicação do método proposto outros tipos de amostras que também são alvo de identificação dos compostos analisados (*e.g.* monitoramento em fluidos biológicos em consumidores de tabaco e/ou ayahuasca)

Tabela 25. Comparação de diferentes metodologias de extração para determinação dos alcaloides harmano e norharmano em fumaça de cigarro.

Analitos	Técnica de extração	Técnica de análise	Validação	Concentração (ug cig ⁻¹)	Ref.
Harmano Norharmano	BA μ E	LC-MS/MS	Linearidade Seletividade Exatidão Precisão LOD e LOQ	11,96 (HRM) 12,61 (NHR)	Este estudo
	LLE + CC	CP, UV e IV	-	3,3 (HRM) 12,3 (NHR)	[18]
	LLE	GC-MS	-	3,6 (HRM) 11,2 (NHR)	[19]
	LLE	LC semipreparativa	-	0,36 - 2,24 (HRM) 0,9 - 4,2 (NHR)	[20]
	SPE	GC-MS	Linearidade LOD e LOQ	0,25 - 1,21 (HRM) 0,75 - 3,62 (NHR)	[21]
	SPE	LC-FD	-	0,5 (HRM) 1,24 (NHR)	[22]

HRM: Harmano, NHR: Norharmano

3.5 CONCLUSÃO

A metodologia de extração proposta neste capítulo em associação com a metodologia de análise por cromatografia líquida e espectrometria de massas, otimizada no capítulo 2, mostrou ótimo desempenho para a determinação seletiva dos alcaloides, harmalina, harmano, harmina, norharmano e tetrahidroamina; sendo passível de ajustes pontuais para adequação aos alcaloides *N,N*-dimetiltryptamina, harmalol e tryptamina, que apresentaram valores de recuperação inferiores a 70%.

O protocolo BA μ E-LD, com a utilização dos dispositivos de extração revestidos com o adsorvente OASIS HLB é simples, econômico e ambientalmente amigável, uma vez que envolve poucas etapas de manipulação e faz uso de quantidades significativamente baixas de reagentes (0,0023 g $\pm$ 0,0001 g de OASIS HLB e 100 μ L de metanol) por extração; mostrando-se como uma excelente alternativa às técnicas de extração líquido-líquido e extração em fase sólida, utilizadas para extração de compostos em amostras aquosas.

O sistema de amostragem da fumaça de cigarro adaptado e utilizado neste estudo mostrou-se satisfatório para promover a solubilização dos componentes presentes na fumaça primária na solução aquosa de amostragem, necessária para a metodologia de extração proposta.

Ensaio preliminares indicaram a eficiência do método proposto para extração dos alcaloides estudados com elevada seletividade, eliminando a transferência de compostos interferentes para o dispositivo de extração contendo o adsorvente OASIS HLB. Os alcaloides harmano e norharmano foram identificados no extrato de fumaça secundária de cigarro comercial. Os teores obtidos destes compostos foram bastante superiores aos identificados nas amostras de folhas de tabaco, corroborando os resultados apresentados na literatura. A validação dos ensaios realizados assegurou a integridade dos resultados apresentados.

3.6 REFERÊNCIAS

- [1] GAUJAC, A.; MARTINEZ, S. T.; GOMES, A. A.; DE ANDRADE, S. J.; PINTO, A. D. C.; DAVID, J. M.; NAVICKIENE, S.; DE ANDRADE, J. B. **Application of analytical methods for the structural characterization and purity assessment of N,N-dimethyltryptamine, a potent psychedelic agent isolated from Mimosa tenuiflora inner barks.** *Microchemical Journal*. v. 109, pg. 78-83 2013.
- [2] SANTOS, M. C. **Desenvolvimento de método para determinação de alcaloides indólicos em amostras de ayahuasca.** Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, Brasil, 2016.
- [3] NENG, N. R.; SILVA, A. R. M.; NOGUEIRA, J. M. F. **Adsorptive micro-extraction techniques - Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media.** *Journal of Chromatography A* , V. 217, pg. 7303-7310, 2010.
- [4] NOGUEIRA, J. M. F. **Microextração adsortiva em barra (BA μ E): Um conceito analítico inovador para microextração estática.** *Scientia Chromatographic*, V. 5, pg. 275-283, 2013
- [5] NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; VIDAL C. B.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. **ADSORÇÃO: aspectos teóricos e aplicações ambientais.** Imprensa Universitária da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2014.
- [6] <http://www.supelco.com.tw/C-2%20%20150-163.pdf>
- [7] https://www.waters.com/waters/en_US/Waters-Oasis-Sample-Extraction-SPE-Products/nav.htm?cid=513209&locale=167
- [8] <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/e68aa478-eafc-4cab-86ad-1f8e68423538.pdf>

- [9] DIAS, N.C.; POOLE, C.F. **Mechanistic study of the sorption properties of OASIS®HLB and its use in solid-phase extraction.** *Chromatographia*, V. 56, pg. 269–275, 2002.
- [10] RAM, V, J., SETHI, A., NATH, M., PRATAP, R. **Chapter 5 - Five-Membered Heterocycles**, in **The Chemistry of Heterocycles**. Elsevier, 2019.
- [11] MANZO, V.; HONDA, L.; NAVARRO, O.; ASCAR, L.; RICHTER, P. **Microextraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from waste water samples by rotating-disk sorptive extraction.** *Talanta*, V. 128, pg. 486–492, 2014.
- [12] TELGHEDER, U.; BADER, N.; ALSHELMANI, N. **Stir bar sorptive extraction as a sample preparation technique for chromatographic analysis: An overview.** *Asian Journal of Nanoscience and Materials*, V. 1, pg. 56-62, 2018.
- [13] IDE, A.H.; NOGUEIRA, J.M.F. **New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach – Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* V.153, pg. 126–134, 2018.
- [14] AHMAD, S.M., NOGUEIRA, J.M.F. **High Throughput Bar Adsorptive Microextraction: A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples.** *Talanta*, 2019.
- [15] RODGMAN, A., PERFETTI, T. A. **The chemical components of tobacco and tobacco smoke.** CRC Press, 2th ed, 2013.
- [16] HU, Q., HOU, H. **Tobacco Smoke Exposure Biomarkers.** CRC Press, 2015.
- [17] ISHIZAKI, A., KATAOKA, H. **A sensitive method for the determination of tobacco-specific nitrosamines in mainstream and sidestream smokes of combustion cigarettes and heated tobacco products by online in-tube solid-phase microextraction coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry.** *Anal Chim Acta*. V.1075, pg. 98-105, 2019.

- [18] POINDEXTER, E. H., CARPENTER, R. D. **The isolation of harmane and norharmane from tobacco and cigarette smoke.** *Phytochemistry*, v. 1, pg. 215-221, 1962.
- [19] SNOOK, M. E., CHORTYK, O.T. **Capillary gas chromatography of carbolines: application to cigarette smoke.** *Journal of Chromatography*, v. 245, pg. 331-338, 1982.
- [20] TOTSUKA, Y., USHIYAMA, H., ISHIHARA, J., SINHA, R., GOTO, S., SUGIMURA, T., WAKABAYASHI, K. **Quantification of the co-mutagenic β -carbolines, norharman and harman, in cigarette smoke condensates and cooked foods.** *Cancer Letters*, v. 143, pg. 139-143, 1999.
- [21] SMITH, C. J., QIAN, X., ZHA, Q., MOLDOVEANU, S. C. **Analysis of α - and β -carbolines in mainstream smoke of reference cigarettes by gas chromatography–mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, v. 1046, pg. 211-216, 2004.
- [22] HERRAIZ, T. **Relative exposure to beta-carbolines norharman and harman from foods and tobacco smoke.** *Food additives and contaminants*, v. 21, pg. 1041-1050, 2004

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento e validação das metodologias de microextração analítica, μ MSPD e BA μ E, atribuem a este trabalho uma importante inovação científica no que diz respeito à determinação de alcaloides indólicos e β -carbolínicos em matrizes de tabaco, com abrangência para amostras de toda a cadeia de produção e consumo desta notável *commodity*, que é considerada a principal fonte exógena de exposição dos compostos presentes nessas classes de alcaloides, como as β -carbolinas harmano e norharmano.

Os níveis de concentração dos alcaloides encontrados nas amostras analisadas mostraram-se análogos aos determinados em estudos anteriores, seja para amostras sólidas, em que foi aplicada a técnica μ MSPD, seja para a amostra de fumaça de cigarro por BA μ E; indicando que as metodologias desenvolvidas podem ser utilizadas de maneira complementar em estudos de monitoramento dessas classes de compostos em matrizes de diferentes origens e estados físicos, como folhas *in-natura* e processadas, alimentos e bebidas, chás e infusões, tecidos humanos e fluídos biológicos. Destaca-se aqui, que as metodologias demandam baixo consumo de amostras e reagentes químicos, adequando-se, por exemplo, a estudos que dispõe de pequenas quantidades de amostras.

Quanto à relação do consumo de tabaco associado aos rituais de contemplação do chá da ayahuasca, partindo da premissa de que as β -carbolinas harmano e norharmano possuem, no organismo humano, a mesma capacidade de inibição da monoamina oxidase dos alcaloides harmina e harmalina (predominantes no chá de ayahuasca), que são responsáveis por favorecer os efeitos alucinógenos do alcaloide indólico *N,N*-dimetiltryptamina, os teores observados dos alcaloides encontrados nas amostras estudadas neste trabalho serão comparados com aqueles característicos da bebida.

Visto que apenas uma única marca de cigarro comercial foi analisada durante a aplicação da metodologia desenvolvida para amostras de fumaça de cigarro, novos ensaios serão realizados abrangendo um número maior de amostras. Ainda, pretende-se adequar o sistema de coleta desenvolvido para análise da fumaça primária dos cigarros, buscando assim a previsão do teor total dos compostos identificados.

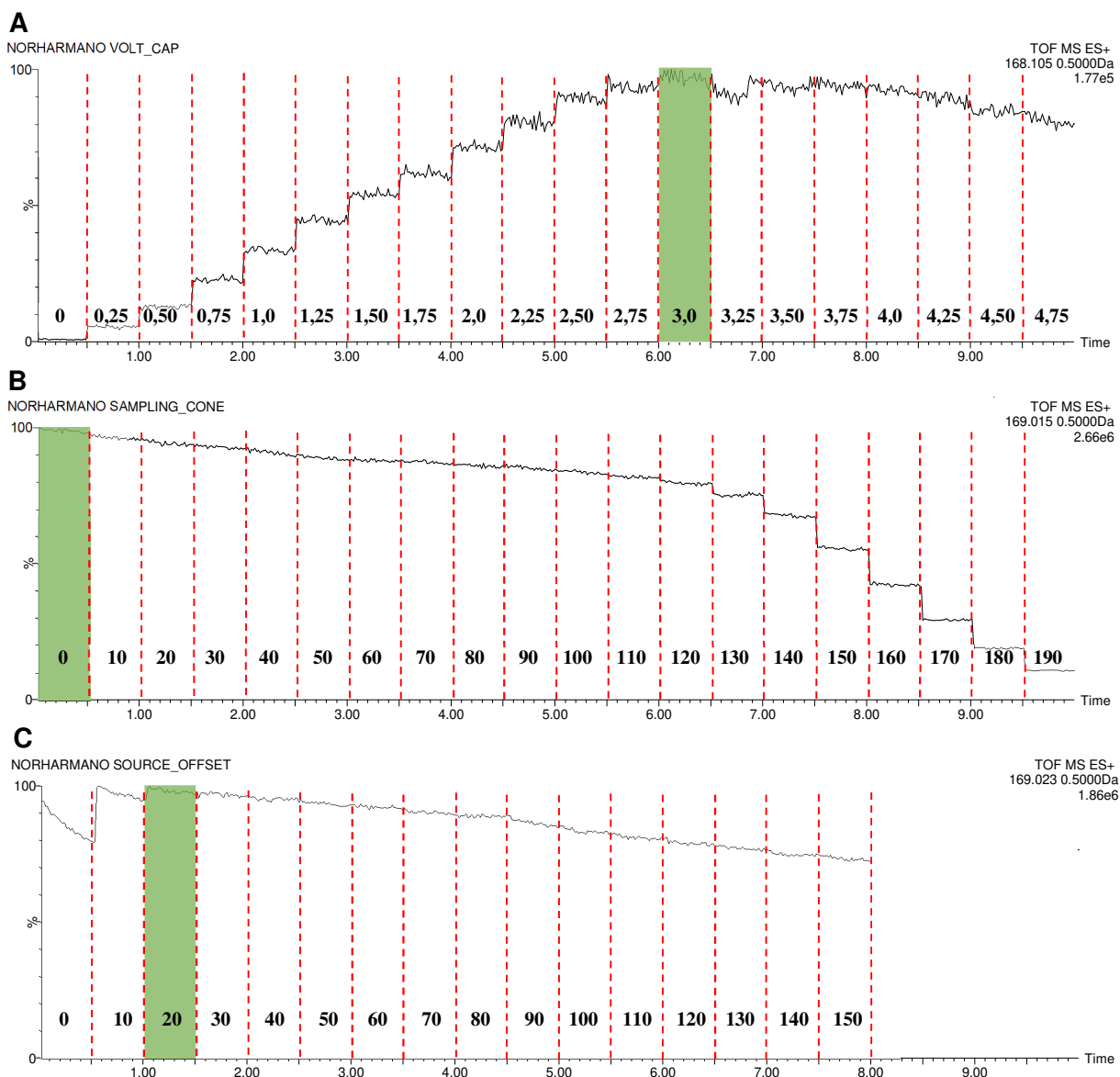
Em suma, o objetivo geral da tese foi alcançado uma vez ter-se conseguido desenvolver e validar métodos analíticos simples, eficientes e rápidos empregado técnicas de microextração de baixo custo e ambientalmente amigáveis associados a cromatografia líquida de ultra eficiência e espectrometria de massas sequencial e de alta resolução para a determinação de alcaloides em matrizes de tabaco e fumaça de cigarros.

Parte desta pesquisa foi financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE, edital Nº 47 /2017, processo nº 88881.189336/2018-01.

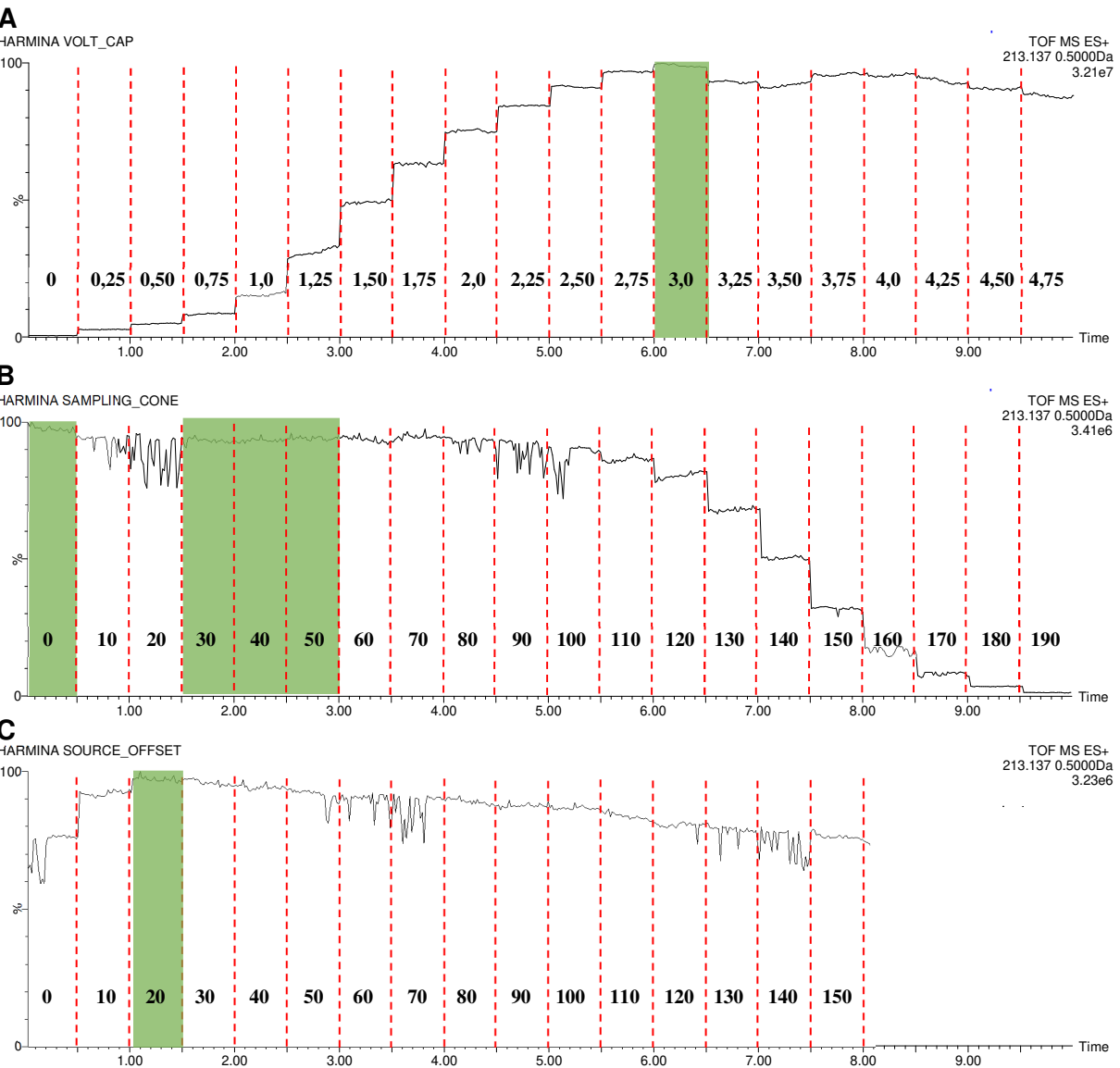
APÊNDICE

Apêndice 1. Relações de intensidade da molécula protonada $[M+H]^+$ dos alcaloides estudados, obtidas a partir de ajustes de voltagem dos parâmetros: A) *Cone*, B) *Sampling cone* e C) *Source offset*.

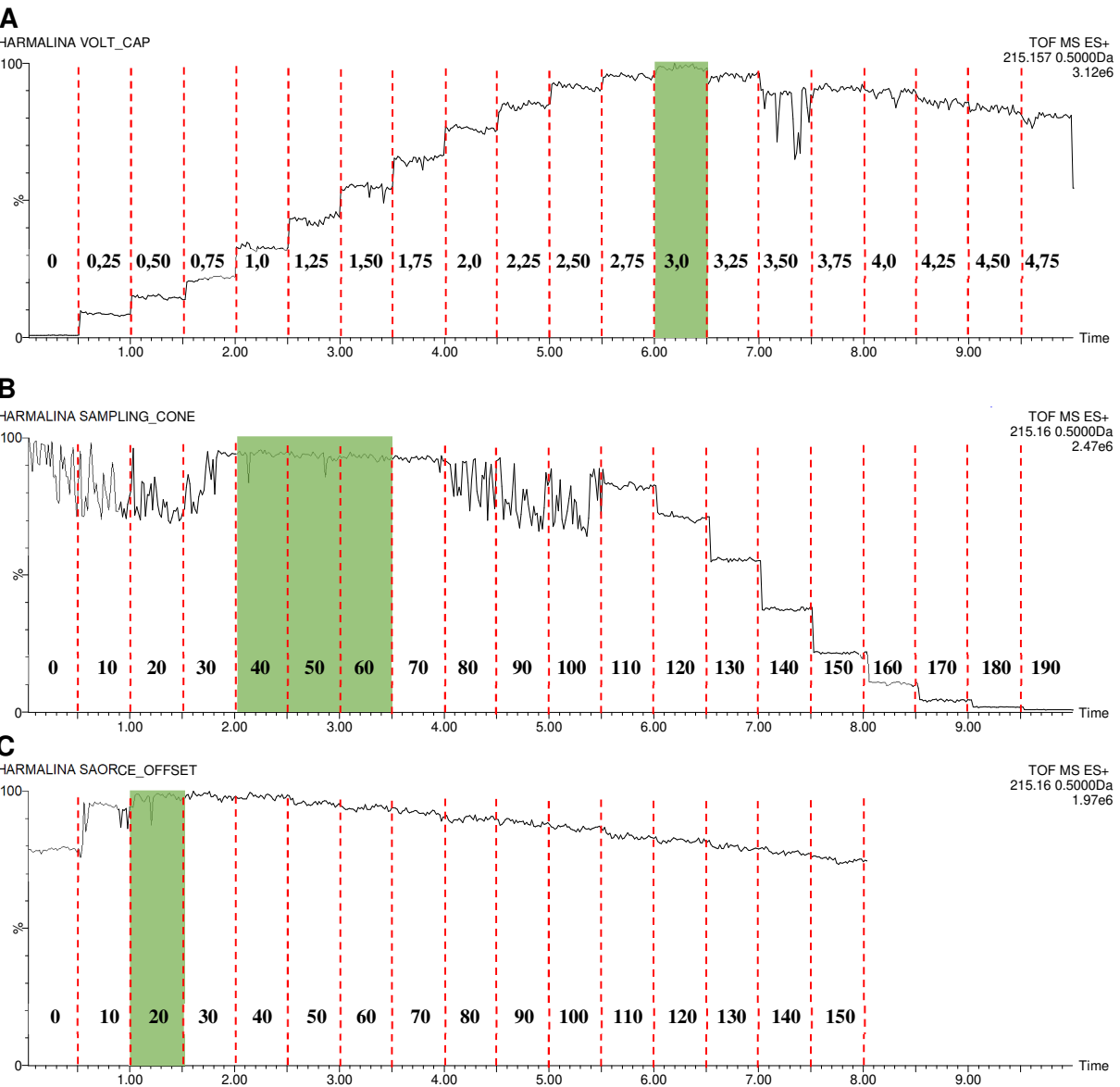
Norharmano



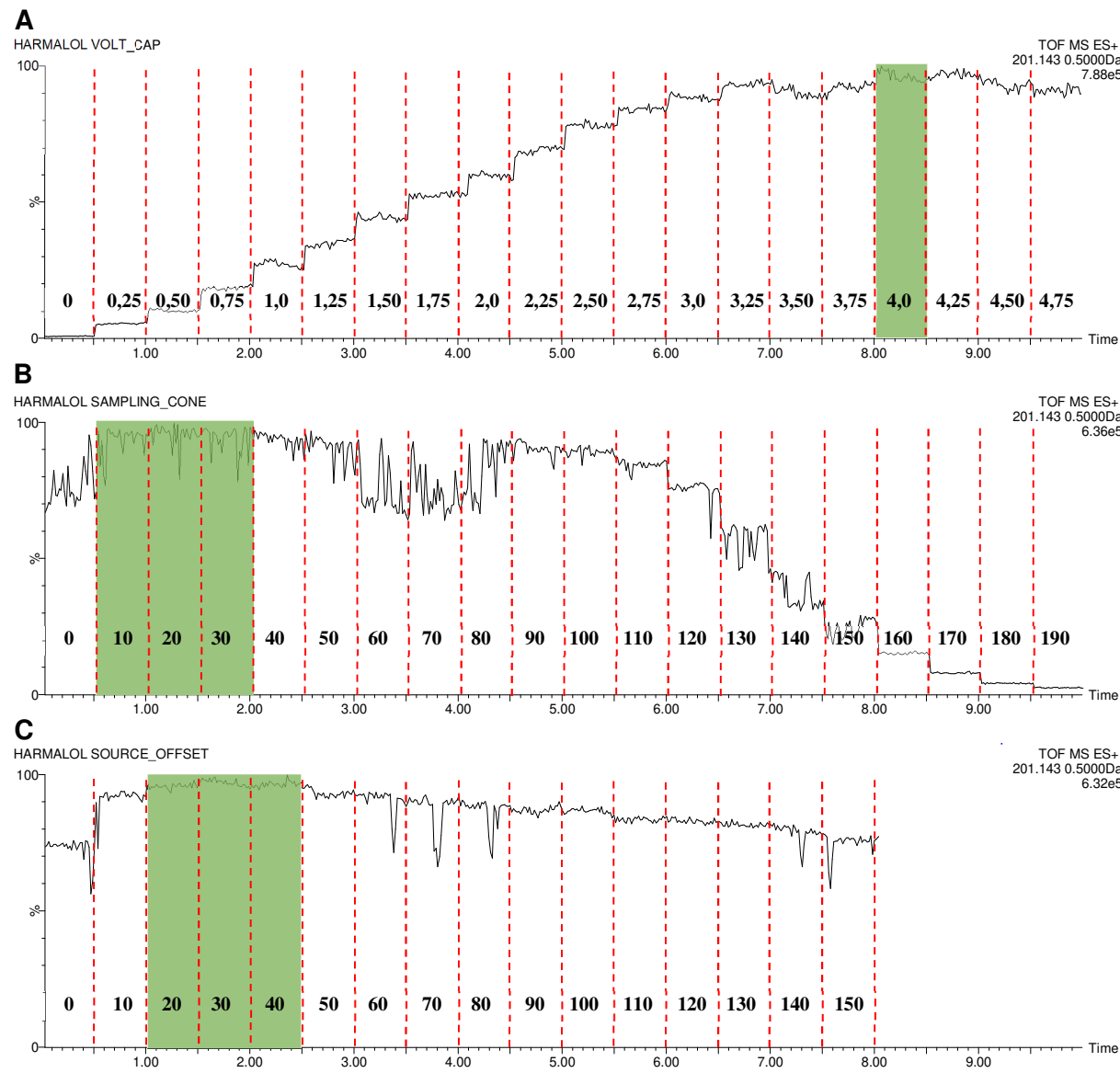
Harmina



Harmalina



Harmalol



N,N-dimetiltriptamina

