UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

VALIDAÇÃO DE PLANEJAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES APORFÍNICOS NA PLANTA *Unonopsis duckei* R.E.FR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

PABLO RODRIGO NASCIMENTO ROCHA

MANAUS
2017

PABLO RODRIGO NASCIMENTO ROCHA

VALIDAÇÃO DE PLANEJAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES APORFÍNICOS NA PLANTA *Unonopsis duckei* R.E.FR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Métodos Analíticos e Estudos Ambientais.

Orientador: Prof. Drº Hector Koolen

Co-orientadora: Profª. Drª Patrícia Kaori Soares

MANAUS

2017

PABLO RODRIGO NASCIMENTO ROCHA

VALIDAÇÃO DE PLANEJAMENTO QUIMIOMÉTRICO PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ALCALOIDES APORFÍNICOS NA PLANTA *Unonopsis duckei* R.E.FR POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA ALTA PERFORMANCE ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL

BANCA EXAMINADORA

Aprovado em 21 de junho de 2017.

Prof. Drº Hector Henrique Ferreira Koolen

Universidade Federal do Amazonas
Orientador

Prof. Drº Jamal da Silva Chaar

Universidade Federal do Amazonas
Membro externo

Prof. Drº Marco Antônio dos Santos Farias

Universidade Federal do Amazonas
Membro

À minha querida mãe,

À minha amada esposa.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo dom da vida, pelo cuidado e proteção.

À Universidade Federal do Amazonas pela oportunidade concedida.

Ao Dr. Felipe Moura Araújo da Silva pela doação das amostras.

Ao Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Kollen pela paciente orientação.

À Prof. Drª. Patrícia Kaori Soares pela co-orientação e pelo suporte nas interpretações de dados multivariados.

À Prof. Drª. Giovana Anceski Bataglion pela ajuda e suporte nas interpretações dos dados da validação do método desenvolvido.

Ao Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela ajuda com a disciplina de validação de métodos químicos.

Ao Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin do Laboratório thoMSon de Espectrometria de Massas do Instituto de Química da UNICAMP pela ajuda nos procedimentos experimentais.

A todos os companheiros da PPGQ que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Se eu vi mais longe, foi por estar de pé
sobre ombros de gigantes.

Isaac Newton

RESUMO

O presente trabalho teve por objetivo validar uma metodologia quimiométrica para extração e quantificação de anonaína, glaziovina, norglaucina e glaucina a partir de amostras de 1 grama de folhas de *Unonopsis duckei* R.E.Fr (annonaceae). Tais compostos pertencem a classe dos alcaloides aporfínicos, substâncias bastante exploradas na literatura e de importantes propriedades terapêuticas. Para o processo de extração foi desenvolvido um planejamento com misturas do tipo simplex-centroide modificado constituído por quatro solventes: metanol, clorofórmio, n-hexano, e acetona. No total foram preparadas 23 soluções extratoras a fim de identificar a solução com a melhor eficiência de extração: 4 soluções unitárias de 100% em proporção, 6 soluções binárias de 50% em proporção, 4 soluções terciárias de 33,33% em proporção, 4 soluções quaternárias de 62,5% + 12,5% em proporção e 5 soluções quaternárias de 25% em proporção para representar o ponto central do planejamento. As 23 amostras foram extraídas por um período de 48 horas e secadas a gás nitrogênio (N_2). A partir dos extratos secos preparou-se 23 soluções metanólicas de concentração 1 mg/mL que foram submetidas às análises exploratória e quantitativa. A análise exploratória foi desenvolvida em um sistema UHPLC-ESI/Q-TOF enquanto que a análise quantitativa foi desenvolvida em um sistema UHPLC-ESI^+/QqQ. Para a corrida cromatográfica foram ajustados os parâmetros tempo de retenção e resolução afim de otimizar os processos de separação cromatográfica. Para a otimização do processo de detecção e identificação espectrométrica foram ajustados o potencial do orifício, energia de colisão, potencial de saída da cela de colisão e a transmissão dos analisadores. A metodologia foi submetida à validação onde foram validadas as figuras do mérito: seletividade, a linearidade, a precisão (ensaio interdia), a exatidão (percentual de recuperação) e os limites de detecção e quantificação. Os resultados indicaram que a amostra de nº 5 de composição binária metanol/clorofórmio apresentou o melhor rendimento por grama de folha permitindo obter 6,79 $\mu g\ g^{-1}$ de anonaína, 131,10 $\mu g\ g^{-1}$ de glaziovina, 40,58 $\mu g\ g^{-1}$ de norglaucina e 20,54 $\mu g\ g^{-1}$ de glaucina.

Palavras chaves: validação**,** quimiometria, UHPLC-MS/MS, *Unonopsis duckei*.

ABSTRACT

The present work had the objective of validating a chemometric methodology for extraction and quantification of anonaine, glaziovine, norglaucine and glaucine from samples of 1 gram of leaves of *Unonopsis duckei* R.E.Fr (annonaceae). These compounds belong to the class of aporphinic alkaloids, substances widely explored in the literature and of important therapeutic properties. For the extraction process a planning with modified simplex-centroid mixtures consisting of four solvents was developed: methanol, chloroform, n-hexane, and acetone. In total, 23 extractive solutions were prepared in order to identify the solution with the best extraction efficiency: 4 unit solutions of 100% in proportion, 6 binary solutions of 50% in proportion, 4 tertiary solutions of 33.33% in proportion, 4 Quaternary solutions of 62.5% + 12.5% in proportion and 5 quaternary solutions of 25% in proportion to represent the central point of the planning. Each sample was extracted for a period of 48 hours and dried with nitrogen gas (N2). From the dry extracts 23 methanol solutions of 1 mg / mL concentration were prepared, which were submitted to the exploratory and quantitative analysis. The exploratory analysis was developed in a UHPLC-ESI$^+$/Q-TOF system while the quantitative analysis was developed in a UHPLC-ESI$^+$/QqQ system. For the chromatographic run, the retention and resolution time parameters were adjusted in order to optimize the chromatographic separation processes. For the optimization of the spectrometric detection and identification process, the potential of the hole, collision energy, collision cell output potential and the transmission of the analyzers were adjusted. The methodology was submitted to validation where the merit figures were validated: selectivity, linearity, precision (interday test), accuracy (percentage of recovery) and limits of detection and quantification. The results indicated that the nº 5 sample of binary methanol/chloroform composition showed the best yield per gram of leaf allowing to obtain 6.79 μg g^{-1} of anonaine, 131.10 μg g^{-1} of glaziovine, 40.58 μg g^{-1} of norglaucine and 20.54 μg g^{-1} of glaucine.

Keywords: validation, chemometrics, UHPLC-MS/MS, *Unonopsis duckei*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esqueleto de alcaloides aporfínicos stricto sensu. 21
Figura 2. Espaço experimental em um planejamento simplex para quatro componentes. Os vértices equivalem a substâncias puras..... 25
Figura 3. Distribuição dos 15 pontos no espaço experimental SCD. 26
Figura 4. Representação genérica de um modelo linear por regressão de mínimos quadrados. Quanto menor for o intervalo entre o valor observado e o valor previsto menor será o valor dos resíduos e melhor será o ajuste do modelo. 28
Figura 5. Representação genérica da decomposição dos desvios dos valores observados e previstos em relação à média global. 28
Figura 6. Esquema genérico de um espectrômetro de massas. 32
Figura 7. Esquema simplificado de um analisador tempo de voo. 34
Figura 8. Esquema simplificado de um quadrupolo. 35
Figura 9. Definição de resolução de massa a 10% de vale e largura total do pico a meia altura. 36
Figura 10. Esquema do sistema de ionização via ESI no modo positivo. 37
Figura 11. Esquema de um sistema tipo QqQ-MS/MS. 39
Figura 12. Representação esquemática de sistema QTOF-MS/MS. Fonte: DOWNARD, 2004. Pg, 82. 40
Figura 13. Representação em gráfico de barras do planejamento simplex-centroide das 23 soluções extratoras. Cada ponto foi preparado aleatoriamente de acordo com a seguinte ordem: 2, 1, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 11, 12, 14, 5, 8, 9, 16. Legenda: a – acetona, h – n-hexano, c – clorofórmio, m – metanol. 53
Figura 14. Preparo dos 23 pontos segundo as massas obtidas de acordo com SCD para análise UHPLC-MS/MS. 55
Figura 15. Percentual de rendimento em ordem decrescente obtidos dos extratos de *U. duckei* de acordo com o SCD. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. As amostras 5 e 3 destacam-se com o maior e menor percentual de rendimento respectivamente. 60
Figura 16. Distribuição dos picos cromatográficos da anonaína e glaziovina obtidos dos extratos de *U. duckei* a partir do planejamento SCD. Para esses alcaloides a magnitude das áreas dos picos é aproximadamente a mesma. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. 60
Figura 17. Distribuição dos picos cromatográficos da norglaucina e glaucina obtidos dos extratos de *U. duckei* a partir do planejamento SCD. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. 61

Figura 18. Distribuição dos picos de área cromatográficos da anonaína em ordem decrescente. Quanto mais alto o pico maior o poder de extração da solução extratora. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. 62
Figura 19. Distribuição das áreas de picos cromatográfico da glaziovina em ordem decrescente. Quanto mais alto o ponto maior o poder de extração da solução extratora. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. 63
Figura 20. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da glaziovina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões. 64
Figura 21. Distribuição das áreas de pico cromatográficos da norglaucina em ordem decrescente. As amostras 5 e 1 apresentaram maior capacidade de extração. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona. 66
Figura 22. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da norglaucina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões. 67
Figura 23. Distribuição dos picos cromatográficos da glaucina em ordem decrescente. As amostras 5 e 7 apresentaram maior capacidade de extração. Legenda: m – metanol, c – clorofórmio, h – n-hexano, a – acetona 68
Figura 24. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da glaucina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões. 69
Figura 25. Gráfico dos escores das componentes principais obtidos dos dados cromatográficos dos 23 extratos das partes aéreas da planta *U. duckei* 70
Figura 26. Gráfico dos loadings da CP1 para os dados cromatográficos dos 23 extratos de partes aéreas da planta *U. duckei* no intervalo de tempo de retenção de 9 a 14 minutos 71
Figura 27. Gráfico dos loadings da CP2 para os dados cromatográficos dos 23 extratos de partes aéreas a planta *U. duckei* no mesmo intervalo de tempo de retenção da PC1 72
Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas dos extratos cujos solventes extratores foram os solventes puros metanol e acetona. 73
Figura 29. Dendrograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de partes aéreas da planta *U. duckei* obtido pelo método de ligação completo. 73
Figura 30. Cromatogramas, em modo SRM para uma corrida total de 15 minutos, dos alcaloides de interesse obtidos a partir de padronização externa das soluções preparados de acordo com o planejamento SCD dos extratos brutos das amostras da planta *U. duckei* utilizando a geometria UHPLC-ESI^+-QqQ/MS. A corrida foi realizada na modalidade de análise rápida de acordo com as condições especificadas na sessão 3.8. Com exceção da anonaína, são mostrado as transições de qualificação e

quantificação para os demais alcaloides. O t*r* do método é inferior a 7 minutos. A anonaína possui o maior t*r* com 6,5 minutos e a glaucina o menor t*r* com 5,5 minutos..... 75
Figura 31. Gráficos das curvas analíticas e dispersão de resíduos estatísticos da norglaucina obtidos nas condições instrumentais descritas na sessão 3.8. a) Curva com 6 níveis de concentração. b) Curva analítica com 5 níveis de concentração. c) dispersão de resíduos estatísticos para uma curva com cinco níveis de concentração. 78
Figura 32. Gráfico das curvas analíticas e gráficos das dispersões de resíduos estatísticos obtidos conforme as condições instrumentais descritas na sessão 3.8: a) anonaína. b) glaziovina. c) glaucina. Nos gráficos de dispersão, a distribuição aleatória dos pontos residuais indicam a aceitabilidade da curva e a qualidade da linearidade do método. 79
Figura 33. Faixas lineares das curvas analíticas dos alcaloides de interesse obtidos pela plotagem da razão entre o sinal analítico e a concentração versus o log da concentração. a) anonaína. b) glaziovina. c) norglaucina. e) glaucina. As setas vermelhas indicam as faixas de trabalho linear das curvas. 80
Figura 34. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de baixa concentração (50 ng L^{-1}) apara os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina. 85
Figura 35. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de média concentração (500 ng L^{-1}) apara os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina. Para este gráfico a glaucina não apresentaram intensidade de erro perceptível. 86
Figura 36. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de alta concentração (1000 ng L^{-1}) para os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina. Para este gráfico apenas a anonaína e norglaucina apresentaram intensidade de erro perceptível. As intensidades dos erros dos demais alcaloides foram demasiados pequenos para serem perceptíveis. 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Exemplos de atividades biológicas e farmacológicas descritas na literatura para alcaloides aporfínicos. 21
Tabela 2. Tipos de permutações para um experimento SCD com 4 componentes. 25
Tabela 3. Pontos distintos de um experimento SCD com 4 componentes. 26
Tabela 4. Tabela de análise de variância para ajuste de modelos por mínimos quadrados. 31
Tabela 5. Modos de operação do sistema de espectrometria de massas sequencial - MS/MS. 39
Tabela 6. Solventes utilizados no preparo dos extratos e nas análises cromatográficas. 52
Tabela 7. Dados gravimétricos do material botânico de *U. duckei*. 52
Tabela 8. Dados gravimétricos em ordem decrescente de percentual de rendimento dos extratos secos. 54
Tabela 9. Volumes extraídos das soluções estoques para o preparo das soluções da faixa de concentração da curva analítica. 56
Tabela 10. Otimizações instrumentais utilizados na corrida cromatográfica das análises quantitativas. 56
Tabela 11. Otimização das transições SRM (Tensão pré-polarização (V) Q1, Tensão pré-polarização Q3 (V) e energia de colisão (V)). 57
Tabela 12. Proporções entre as soluções extratoras, áreas dos picos cromatográficos (dividido por 1000) dos alcaloides de interesse e seus respectivos percentuais de rendimento em termos de extrato seco. 59
Tabela 13. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial às áreas de pico da glaziovina. 63
Tabela 14. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial às alturas de pico da substância Norglaucina. 65
Tabela 15. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aplicado às áreas de pico do alcaloide glaucina. 68
Tabela 16. Dados de linearidade obtidos pela regressão pelo método de mínimos quadrados. 77
Tabela 17. LoQ e LoD obtidos pela via geometria UHPLC-ESI(+)-QqQ/MS. 81
Tabela 18. Algumas referências de quantificação (LoQ) para os alcaloides aporfínicos. 81
Tabela 19. Coeficientes de variação das áreas médias do picos cromatográficos. 84
Tabela 20. Concentrações calculadas a partir das curvas de controle de baixa, média e alta concentração e os percentuais de recuperação dos alcaloides de interesse. 84
Tabela 21. Aplicação do método na quantificação de uma amostra de *U. duckei*. 88

LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS

a – Acetona

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agencia Nacional de Vigilância Sanitária

APCI – *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

APPI – *Atmospheric Pressure Photon Ionization*

ATP – *adenosine triphosphate*

c – Clorofórmio

CI – *Chemical Ionization*

CMR – Comparação com Método de Referência

CV – Coeficiente de Variação

DIC – *Collision-induced Dissociation*

Da – Dalton

DOE – *Design Of Experiments*

EES - Espaço Experimental Simplex

EI – *Electron Ionization*

EN – Erro Normalizado

ER – Erro Relativo

FT-ICR - *Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance*

h – n-Hexano

HCA – *Hierarchical Cluster Analysis*

HPLC - *High Performance Liquid Chromatography*

HPLC-MS/MS – *Ultra High Pressure Liquid Chromatography – Tandem Mass Spectrometry*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia

kV – Quilovolt

L/min – Litro por minuto

LOQ – *Limit of Quantification*

LLOQ – *Lower Limit of Quantification*

LOD – *Limit of Detection*

LOD_I – Limite de detecção do instrumento

LOD_M – Limite de detecção do método

LOQ_I – Limite de quantificação do instrumento

LOQ_M – Limite de quantificação do Método

m – Metanol

ME – *Mixture experiments*

MRC – Material de referência certificado

MS – *Mass Spectrometry*

MS/MS – Espectrometria de Massa acoplado a Espectrometria de Massa

MS^n – Espectrometria de Massas Sequencial (do inglês, *tandem*)

***m/z* –** Razão massa/carga

N_2 – Nitrogênio

ng/L – Nanograma por litro

OMS - Organização Mundial de Saúde

PCA – *Principal Component Analysis*

QqQ – *Triple Quadrupole*

QqQ-MS/MS – Espectrometria de massa sequencial com geometria triplo quadrupolo

Q-TOF – Quadrupole -Time-of-Fly

R – Coeficiente de correlação

R^2 – Coeficiente de determinação

SCD - *Simplex-Centroid Design*

SI – *Electro Spray Ionization*

SR – *Surface Response*

SRM – *Selected Reaction Monitoring*

TOF - *Time-Of-Flight*

UHPLC-MS – *Ultra High Pressure Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

µL/min – Microlitro por minuto

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS IX
LISTA DE TABELAS XII
LISTA DE ACRÔNIMOS E ABREVIATURAS XIII
1 INTRODUÇÃO 18
1.1. FITOTERÁPICOS 18
1.2. METABOLISMO VEGETAL SECUNDÁRIO 18
1.3. ALCALOIDES 19
1.4. ALCALOIDES APORFÍNICOS 20
1.5. QUIMIOMETRIA 22
1.6. EXPERIMENTOS COM MISTURAS 23
1.7. ANÁLISE DE VARIÂNCIA 27
1.8. ESPECTROMETRIA DE MASSAS (MS) 31
1.9. TIPOS DE FONTES DE IONIZAÇÃO 32
1.10. ANALISADOR DE MASSAS DE GEOMETRIA TEMPO DE VOO 33
1.11. ANALISADOR DE MASSAS DE GEOMETRIA QUADRUPOLO 35
1.12. RESOLUÇÃO DE MASSAS 35
1.13. IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY (ESI) 36
1.14. ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL EMPREGANDO-SE GEOMETRIA DO TIPO TRIPLO-QUADRUPOLO (QQQ-MS/MS) 38
1.15. ESPECTROMETRIA DE MASSAS SEQUENCIAL EMPREGANDO-SE GEOMETRIA DO TIPO QUADRUPOLO TEMPO DE VOO (QTOF-MS/MS) 40
1.16. VALIDAÇÃO DE MÉTODOS ANALÍTICOS 41
1.17. ESPECIFICIDADE E SELETIVIDADE 41
1.18. FAIXA DE TRABALHO E FAIXA LINEAR DE TRABALHO (INTERVALO) 43
1.19. LINEARIDADE E SENSIBILIDADE 43
1.20. LIMITE DE DETECÇÃO (LOD) 45
1.21. LIMITE DE QUANTIFICAÇÃO (LOQ) 46
1.22. EXATIDÃO 47
1.23. PRECISÃO 49
1.24. ROBUSTEZ 50
2 OBJETIVOS 51
2.1 OBJETIVO GERAL 51

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 51
3 PARTE EXPERIMENTAL 52
3.1. REAGENTES 52
3.2. OBTENÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO DA PLANTA *UNONOPSIS DUCKEI* R. E. FR 52
3.3 DADOS GRAVIMÉTRICOS DO MATERIAL BOTÂNICO DA PLANTA *UNONOPSIS DUCKEI* R. E. FR 52
3.4 PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL DAS SOLUÇÕES EXTRATORAS 53
3.5 PREPARO DOS EXTRATOS 53
3.6 PREPARO DAS SOLUÇÕES PARA AS ANÁLISES EXPLORATÓRIAS E QUANTITATIVAS 54
3.7 ANÁLISES EXPLORATÓRIAS E QUANTITATIVAS 55
3.8 PREPARO DAS SOLUÇÕES PADRÕES PARA CONSTRUÇÃO DAS CURVAS ANALÍTICAS PARA O ESTUDO DA LINEARIDADE, EXATIDÃO E PRECISÃO. 56
3.9 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS INSTRUMENTAIS DO UHPLC 56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO 58
4.1. PLANEJAMENTOS EXPERIMENTAIS SIMPLEX-CENTROIDE 58
4.2. RESULTADOS DO PLANEJAMENTO SIMPLEX-CENTROIDE DESIGN 58
4.2.1. Rendimento 61
4.2.2. Anonaína 62
4.2.3. Glaziovina 62
4.2.4. Norglaucina 65
4.2.5. Glaucina 67
4.3. ANÁLISE DAS COMPONENTES PRINCIPAIS E ANÁLISE HIERÁRQUICA DE AGRUPAMENTOS 70
4.4. VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA 74
4.4.1. Seletividade 74
4.4.2. Linearidade 76
4.4.3. Limites de detecção e quantificação 80
4.4.4. Precisão e exatidão 83
4.5. APLICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO MÉTODO 86
5 CONCLUSÃO 89
REFERÊNCIAS 90

1 INTRODUÇÃO

1.1. Fitoterápicos

Fitoterápico segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é todo medicamento cujo(s) princípio(s) ativo(s) seja obtido a partir do emprego exclusivo de matérias-primas vegetais e seus derivados, não sendo considerado como tal caso haja a associação com outros extratos vegetais ou a inclusão de substâncias ativas isoladas (desconhecidas) em sua composição (CZELUSNIAK et al., 2012; ANVISA, 2010). Cerca de 80% da população mundial tem nas plantas medicinais a principal opção terapêutica e essa prática é incentivada pela própria Organização Mundial de Saúde (OMS). Esta organização define uma planta medicinal como todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, uma ou mais substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos (CZELUSNIAK et al., 2012; VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

No Brasil, tanto as pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais quanto o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais ainda são incipientes. Como consequência, as plantas medicinais da flora nativa são praticamente consumidas sem a devida comprovação de suas propriedades farmacológicas (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). A região norte do Brasil é a maior produtora de fitoterápicos, e também a que menos fiscaliza tais produtos (CZELUSNIAK et al., 2012). Devido a esta falta de fiscalização, produtos adulterados e de má qualidade são comercializados livremente. O consumo destes pode acarretar consequências à saúde da população e até a morte em razão da falta de conhecimento prévio de que muitas plantas apresentam outras substâncias cujos efeitos são nocivos à saúde tais como: efeito tóxico e hepatotóxico, ação tóxica renal, ação antinutricional e atividade citotóxica, dentre outras (FERREIRA & PINTO, 2010; VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

1.2. Metabolismo vegetal secundário

Todos os processos naturais que envolvem o desenvolvimento dos organismos vegetais desde seu nascimento, desenvolvimento e reprodução são coordenados pela ação de enzimas específicas através de mecanismos metabólicos distintos que, em nível celular, agem com o fim de preservar e perpetuar essas plantas através da produção de energia na forma de ATP (do

inglês, *adenosine triphosphate*), necessário à vida, resultante de conversões de compostos orgânicos através de reações oxidativas (DEWICK, 2009). O campo de pesquisa que se dedica a estudar os produtos resultantes (metabólitos) de tais mecanismos ou via metabólicas é denominado metabolômica que por definição é a análise qualitativa e quantitativa de todos os metabólitos num organismo (BRAZ FILHO, 2010). Esses metabólitos agrupam-se de acordo com o tipo de metabolismo dos quais são consequentes. Assim, metabólitos primários são aqueles oriundos do metabolismo primário responsáveis pela realização das funções essenciais ao crescimento e desenvolvimento da planta, ou seja, ácidos nucleicos, aminoácidos, proteínas, açúcares, lipídeos, celulose (DEWICK, 2009; CHAMPE al., 2008). Similarmente, os metabólitos secundários são aqueles oriundos do metabolismo secundário sendo específicos de espécie para espécie e cuja produção, além de ser em menor concentração, depende de fatores ambientais como disponibilidade hídrica, altitude, temperatura, radiação ultravioleta, poluição atmosférica, ataques de patógenos entre outros (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Normalmente apresentam baixo peso molecular, estrutura química complexa e atividades biológicas marcantes e, embora seja conhecido seu papel de defesa e polinização, ainda não se tem pleno conhecimento sobre seus benefícios às plantas (BRAZ FILHO, 2009; DEWICK, 2009; BERG & LUBERT, 2008).

A importância dos metabólitos secundários se dá não somente pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em resposta aos estímulos do meio ambiente, mas, principalmente em função da imensa atividade farmacológica que possuem, ou seja, seus efeitos bioativos sobre a saúde humana agindo na prevenção de diversas doenças crônicas não transmissíveis quando consumidos regularmente (PEREIRA & CARDOSO, 2012; BRAZ FILHO, 2010; CROZIER et al., 2006). Tais metabólitos podem ser divididos em três grandes grupos quimicamente distintos: terpenos, compostos fenólicos e alcaloides (GARCIA et al., 2010; SOUZA et al., 2009; TAIZ & ZEIGER, 2004). Dentre estas classes, os alcaloides e mais especificamente os alcaloides aporfínicos são os metabólitos de interesse.

1.3. Alcaloides

Definir um alcaloide não é uma tarefa fácil dado as controvérsias acadêmicas envolvendo este tipo de metabólito secundário. Ao que parece, não existe, até o momento, uma definição ampla ou estrita em que não se verifique exceções tendo em vista que diferentes profissionais dão diferentes definições para este termo e, desta forma, uma dada definição pode excluir desta classe de compostos uma determinada substância nitidamente aceita como

alcaloide (ANISZEWSKI, 2015; FATTORUSSO & TAGLIALATELA-SCAFATI, 2008). Assim, embora impreciso, de um ponto de vista natural pode-se definir alcaloides como produtos biologicamente ativos, ou seja, de serventia ecológica, farmacológica ou mesmo medicinal; quimicamente natural de estrutura heterocíclica contendo um átomo de nitrogênio podendo ou não apresentar característica básica (dependendo da estrutura da molécula e da presença e localização de grupos funcionais), derivado biossinteticamente de aminoácidos e encontrados em sua maioria em plantas (cerca de 20% das espécies) e, em menor escala, em microrganismos e animais (ANISZEWSKI, 2015; CROZIER et al., 2006; STÉVIGNY et al., 2005; DEWICK, 2009). Dentre os diversos metabólitos secundários conhecidos, os alcaloides representam a mais difundida classe de substâncias químicas com múltiplas propriedades farmacológicas (GUPTA et al., 2014; STÉVIGNY et al., 2005). Quanto as suas derivações, os alcaloides podem ser derivados tanto de aminoácidos quanto também de processos de transaminação podendo ser classificados de acordo com o aminoácido fornecedor de parte de seu esqueleto e nitrogênio em: verdadeiros, quando o átomo de nitrogênio está ligado a um anel heterocíclico; protoalcaloides, quando o nitrogênio está ligado a um sistema heterocíclico, e pseudoalcaloides que são aqueles que não derivam de um aminoácido (ANISZEWSKI, 2015; DEWICK, 2009). Alcaloides verdadeiros e protoalcaloides, como os alcaloides isoquinolínicos e indólicos, são derivados dos aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina e triptofano. A lisina é precursora dos alcaloides piperidínicos e quinolizidínicos. A ornitina é precursora dos alcaloides pirrolidínicos, pirrolizidínicos e tropânicos. Os pseudoalcaloides podem ser sintetizados a partir de processos de transaminação envolvendo compostos diferentes como o acetato, precursor dos pseudoalcaloides piperidínicos coniína e piridina (ANISZEWSKI, 2015).

1.4. Alcaloides aporfínicos

Alcaloides do tipo aporfínicos ou aporfinóides (stricto sensu) são derivados do esqueleto isoquinolínico e caracterizam-se por apresentarem em seu perfil estrutural o esqueleto aporfínico (Figura 1) (DA SILVA et al., 2007; SILVA, 2011). Por definição são conhecidos como compostos básicos tetracíclicos, formados a partir de ligações direta dos anéis aromáticos A e D dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos (STÉVIGNY et al., 2005). No anel heterocíclico B, o átomo de nitrogênio na posição 6 geralmente é terciário mas pode ser também quaternário e, menos frequentemente, acetilado ou formilado. Os aporfínicos apresentam atividade ótica, possuindo as configurações absolutas R-(-) e S-(+), dependendo da estereoquímica do carbono 6a (STÉVIGNY et al., 2005).

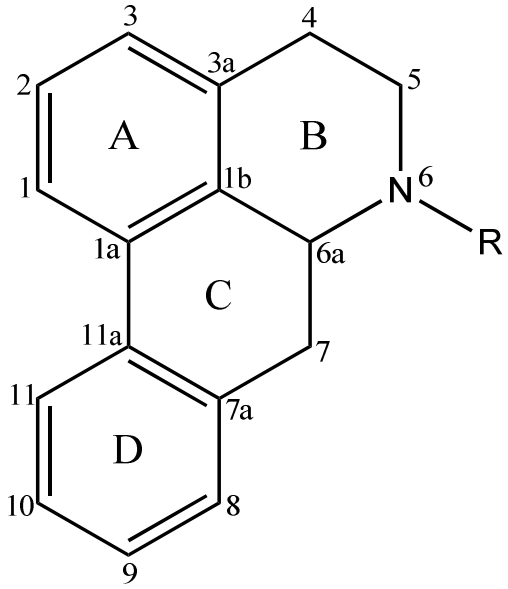


Figura 1. Esqueleto de alcaloides aporfínicos stricto sensu.

Quanto à possibilidade de sofrer substituições oxigenadas como metoxilas e hidroxilas nesse esqueleto, as posições mais comuns (invariáveis) são C1, C2 e C3 no anel A. No anel D, essas substituições sempre ocorrem em C9, C10 e C11, sendo menos frequente em C8. Os alcaloides aporfínicos são distribuídos em uma grande diversidade de famílias botânicas, dentre essas pode-se destacar: Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae e Ranunculaceae (STÉVIGNY et al., 2005). Estes alcaloides inserem-se em um amplo subgrupo de compostos benzilisoquinolínicos com mais de 500 alcaloides isolados e identificados (STÉVIGNY et al., 2005). Sobre as propriedades biológicas e farmacológicas dos alcaloides aporfínicos é possível encontrar na literatura científica uma vasta gama de publicações referentes a tais propriedades. Na Tabela 1 é possível visualizar algumas propriedades de interesse dos alcaloides aporfínicos.

Tabela 1. Exemplos de atividades biológicas e farmacológicas descritas na literatura para alcaloides aporfínicos.

Espécie	Família	Atividade farmacológica e/ou biológica	Referência
Zizyphus vulgaris	*Rhamnaceae*	Sedativa	HAN & PARK et al., 1987
Lindera chunii	*Lauraceae*	Inibidora contra HIV-1 integrase	HATTORI et al., 2002
Lindera angustifólia	*Lauraceae*	Antinociceptiva e sequestradora de radicais livres	ZHAO et al., 2006
Coptidis rhizoma	*Ranunculaceae*	Inibidora contra Aldose redutase	CHOI et al., 2008
Nelumbo nucifera	*Nelumbonaceae*	Antimalárica e Antifúngica	KHAN et al., 2008

Polyalthia cerasoide	*Annonaceae*	Antimicobacteriana	TIWARI et al., 2009
Duguetia furfuraceae	*Annonaceae*	Antitumoral, tripanocida, antileishmania	SILVA et al., 2009
Coptidis rhizoma	*Ranunculaceae*	Anti-Alzheimer e antioxidante	CHOI et al., 2009
Stephania zippeliana	*Menispermaceae*	Antitripanossômica e Antiplasmódica	AVERY et al., 2010
Liriodendron tulipifera	*Magnoliaceae*	Antiplasmódica	RASKIN et al., 2011

1.5. Quimiometria

Por meio da quimiometria ou análise multivariada de dados aplicada a química é possível investigar, interpretar, classificar e prever conjuntos de dados de interesse químico (SOUZA & POPPI, 2012). Em essência a quimiometria é uma ferramenta matemático-estatística e computacional cujo fim é planejar ou selecionar experimentos de forma otimizada fornecendo o máximo de informações químicas a partir da análise dos dados obtidos (GAD et al., 2013; FERREIRA et al., 1999; BRUNS & FAIGLE, 1985). As principais áreas de aplicação da quimiometria são: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada (PEREIRA et al., 2014). A calibração multivariada consiste em estimar a concentração de uma ou mais espécies, a partir dos valores de determinadas propriedades físico-químicas do sistema de interesse estabelecendo, desta forma, uma relação entre propriedades medidas e concentrações (BARROS NETO et al., 2006). O reconhecimento de padrões tem por objetivo detectar tendências similares nos dados resultantes de agrupamentos de amostras (objetos) a partir de uma vasta gama de informações como, por exemplo: medidas químicas ou espectrais, concentrações dos elementos mais importantes, alturas de picos em perfis cromatográficos, ou intensidades e absorbâncias em diferentes comprimentos de onda (PEREIRA et al., 2014).

Dentro dessa aplicação a Análise de Componentes Principais (PCA, do inglês *principal component analysis*) e a Análise de Agrupamentos Hierárquica (HCA, do inglês *hierarchical cluster analysis*) são os métodos mais importantes utilizados para a detecção de padrões de associação no conjunto de dados, a partir dos quais se pode estabelecer relações entre objetos e variáveis, descobrir objetos anômalos (outliers) ou agrupar objetos, reduzindo desta forma, a dimensionalidade do conjunto de dados (BARROS NETO et al., 2006; PEREIRA et al., 2014). O planejamento e otimização de experimentos visa o ajuste da equação de regressão para superfície de resposta (SR, do inglês *surface response*) que é obtido através dos resultados estimados a partir de modelos matemáticos que representam o comportamento do sistema de misturas, percorrido em todo o espaço experimental simplex (BARROS NETO et al., 2010).

1.6. Experimentos com misturas

Para realizar a otimização da capacidade extratora de um grupo de solventes, com diferentes polaridades e solubilidades, proporcionalmente combinados entre si, com o fim de selecionar deste grupo a solução que apresente a melhor capacidade extratora para um determinado fim, faz-se necessário realizar o procedimento experimental conhecido como planejamento simplex-centroide (SCD, do inglês *simplex-centroid design*) (BARROS NETO et al., 2010; SOARES & SCARMINIO et al., 2008; ALMEIDA & SCARMINIO, 2007). Esta ferramenta quimiométrica tem amplo emprego na química analítica (LIMA et al., 2016) e faz parte de uma linha de estudo maior denominado planejamento de experimentos (DOE, do inglês *design of experiments*). O DOE tem como vertentes os experimentos fatoriais e os experimentos com misturas, sendo esta última, a vertente onde se insere o SCD, que é a ciência base para os fins de interesse deste estudo. DOE específico para misturas envolve a combinação proporcional de dois ou mais solventes em um único sistema de tal modo que a propriedade resposta a ser aferida dependa apenas das proporções envolvidas na mistura e não de suas quantidades absolutas (ALMEIDA & SCARMINIO, 2007; CORNELL, 2002; SCARMINIO et al., 1998; SCHEFFÉ, 1963). Como supracitado, o foco principal do DOE para o experimento pretendido visa a análise e modelagem da SR através de uma quantidade limitada de observações (CORNELL, 1973) com o fim fornecer uma resposta analítica mais otimizada e embasada em um modelo estatístico-matemático ajustado. Por meio dessa modelagem é possível: (a) a dedução da resposta para qualquer composição da mistura dentro da região abrangida pelo experimento; (b) inferir a influência de cada componente na resposta seja na forma pura ou em mistura e (c) estimar o ponto do espaço experimental que provoca o ajuste ótimo gerando assim os melhores resultados para a resposta (CORNELL, 2002a).

Como foi dito, no DOE para misturas a resposta analítica depende apenas das proporções dos componentes e não de suas quantidades absolutas no sistema. Para esse tipo de experimento a combinação dos componentes deve ser de tal forma que a soma de suas proporções sejam sempre iguais a 1, ou seja, se quatro componentes distintos (X_1, X_2, X_3 e X_4) são proporcionalmente misturados a soma percentual de suas proporções será: $\%_{(X1)} + \%_{(X2)} + \%_{(X3)} + \%_{(X4)} = 100\%$ o que em termos absolutos equivale a 1 e, como consequência, a forma do espaço experimental da mistura pretendida torna-se uma região "simplex" limitada pela condição da equação 1 (BARROS NETO et al., 2010):

$$xi \geq 0 \; ; \; 1 \leq i \geq q \; \textbf{eq} \; (1)$$

Esta região simplex é definida como uma configuração espacial "de n dimensões determinadas por n+1 pontos num espaço de dimensão igual ou maior que n", ou seja, é determinada por um número de pontos que sempre correspondem a uma unidade a mais em relação ao número de dimensões do espaço (BARROS NETO et al., 2010; CROSIER, 1984). A somatória das proporções para qualquer valor de q em DOE para misturas pode ser matematicamente expressa pela equação 2 (MARCHI et al., 2010; SCARMINIO et al., 1998):

$$\sum_{i=1}^{q} Xi = 100\% = 1 \ \mathbf{eq} \ (2)$$

Onde "q" representam o número de componentes (variáveis) na mistura e "Xi" representa a proporção do i-ésimo componente na mistura. Assim para um experimento que seja necessário trabalhar as possíveis combinações para quatro solventes com diferentes polaridades temos que "q" é igual a 4 e a soma em termos de proporções de cada componente na mistura assume valores percentuais que vão de 0% a 100%. A consequência da equação 2 consiste no fato das variáveis "Xi" serem linearmente dependentes o que, na prática, significa que a alteração na proporção de um deles afetará a proporção de pelo menos um dos demais (BARROS NETO et al., 2010).

Em DOE para misturas cada "q" pontos no espaço experimental simplex (EES) caracteriza um tipo de mistura. Nesse espaço os vértices são os pontos em que "q" equivale a 1 (100%) e representam o solvente puro. A forma do EES é determinada pelo número total de componentes e para um sistema com quatro componentes (q = 4) sua configuração é um tetraedro regular onde os vértices estão igualmente distantes uns dos outros (BARROS NETO et al., 2010; REIS & ANDRADE, 1996) conforme se vê na Figura 2.

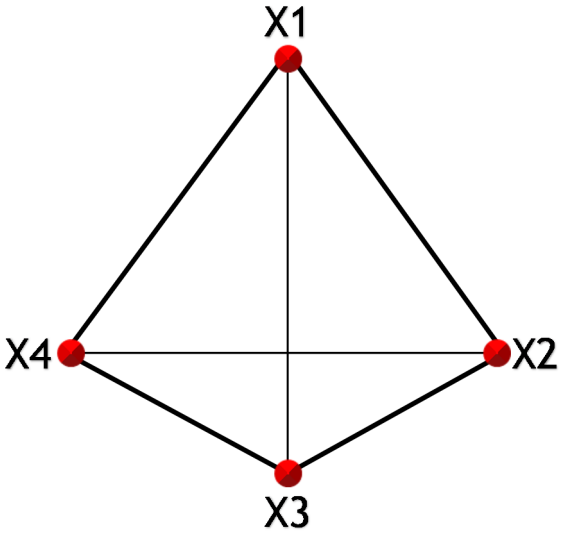


Figura 2. Espaço experimental em um planejamento simplex para quatro componentes. Os vértices equivalem a substâncias puras.

No SCD o número de q-pontos é definido pela equação 3 (REIS & ANDRADE, 1996):

$$(q^2) - 1 \textbf{ eq } (3)$$

Estes pontos correspondem a permutações do tipo "q" para solventes puros, permutações do tipo "q/2" de iguais proporções para misturas binárias, permutações do tipo "q/3" de igual proporção para misturas ternárias e assim por diante até as permutações do tipo "1/q" para o ponto central (SCHEFFÉ, 1963). Assim, para este tipo de experimento onde q = 4, temos 15 pontos distintos (2^4 -1 = 15) sendo 4 pontos respectivos aos solventes puros; 6 pontos respectivos as misturas binárias; 4 pontos respectivos as misturas ternárias e 1 ponto respectivo ao ponto central (centroide) que é característico da mistura quaternária deste planejamento onde $X_1=X_2=X_3=X_4$ =1/4. O resumo dos tipos de permutações, dos pontos distintos para DOE de misturas do tipo SCD para 4 componentes bem como a distribuição desses pontos no EES pode ser visualizada nas Tabelas 2 e 3 e na Figura 3 respectivamente.

Tabela 2. Tipos de permutações para um experimento SCD com 4 componentes.

Mistura	Proporção	Tipo de permutação
Pura	Q	(1, 0, 0, ..., 0)
Binária	q/2	(1/2, 1/2, 0, ..., 0)
Ternária	q/3	(1/3, 1/3, 1/3, ..., 0)
Ponto central	1/q	(1/4, 1/4, ..., 1/4)

Tabela 3. Pontos distintos de um experimento SCD com 4 componentes.

N° de Experimentos	Componente 1	Componente 2	Componente 3	Componente 4
Exp – 1	1	0	0	0
Exp – 2	0	1	0	0
Exp – 3	0	0	1	0
Exp – 4	0	0	0	1
Exp – 5	1/2	1/2	0	0
Exp – 6	1/2	0	½	0
Exp – 7	1/2	0	0	1/2
Exp – 8	0	1/2	1/2	0
Exp – 9	0	1/2	0	1/2
Exp – 10	0	0	1/2	1/2
Exp – 11	1/3	1/3	1/3	0
Exp – 12	1/3	1/3	0	1/3
Exp – 13	1/3	0	1/3	1/3
Exp – 14	0	1/3	1/3	1/3
Exp – 15	1/4	1/4	1/4	1/4

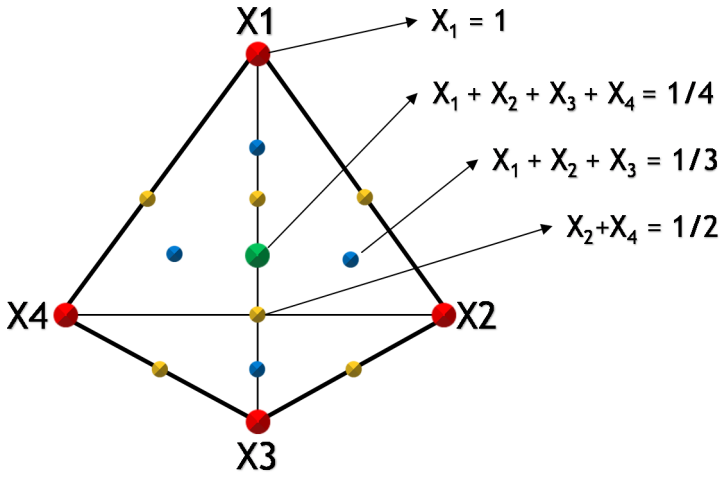


Figura 3. Distribuição dos 15 pontos no espaço experimental SCD.

Na Figura 3 os pontos vermelhos representam os solventes puros onde cada solvente está em proporção de 100%, os pontos amarelos representam as misturas binárias onde os solventes estão em proporção de 50%, os pontos azuis representam as misturas ternárias onde os solventes estão em proporção de 33,333% e por fim o ponto verde representa o ponto central onde os solventes estão em proporção de 25%. Este planejamento foi modificado pelo acréscimo de mais 4 pontos axiais nos quais um dos solventes está em maior proporção (62,5%) e os outros 3 em proporções iguais (12,5%). Uma vez que o experimento é realizado e as respostas são obtidas resta ainda ajustar o melhor modelo matemático que endossa a resposta analítica observada. Para esse ajuste geralmente utilizam-se os modelos: linear, quadrático e o

cúbico (BARROS NETO et al., 2010; COETZER & FOCKE, 2010; MARCHI et al., 2010). Para experimentos SCD ainda é possível ajustar o modelo cúbico especial que para um sistema composto por 4 componentes (q = 4) é genericamente definido pela equação 4 (BARROS NETO et al., 2010):

$$y = \sum_{i=1}^{q} \beta_i x_i + \sum_{i<j}^{q} \sum_{j}^{q} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i<j}^{q} \sum_{j<k}^{q} \sum_{k}^{q} \beta_{ijk} x_i x_j x_k + \ldots + \beta_{1234} x_1 x_2 \ldots x_4 + \varepsilon \quad \textbf{eq (4)}$$

Onde, ε é o erro experimental, βi é o coeficiente linear do componente *i* e representa a resposta esperada para os componentes puros. Similarmente βij é o coeficiente de interação entre os componentes *i* e *j* das misturas binárias, βijk é o coeficiente de interação entre os componentes *ijk* das misturas ternárias e β1234 o coeficiente de interação para o ponto central. Os coeficientes β e seus respectivos erros padrão β' são calculados de acordo com as equações 5 e 6 respectivamente (BARROS NETO et al., 2010):

$$\beta = (X^T X)^{-1} X^T y \quad \textbf{eq (5)}$$

$$\beta' = (X^T X)^{-1} S^2 \quad \textbf{eq (6)}$$

Nestas equações S^2 é a variância em y, T é a transposta da matriz X que contém os pontos do planejamento, y são as respostas obtidas a partir do planejamento, -1 é o indicativo da inversão da matriz.

1.7. Análise de variância

Toda medida está associada a um erro aleatório e assim, por mais rigoroso que seja o desenvolvimento de um experimento químico, seu ajuste estatístico sempre apresentará resíduos, ou seja, a diferença entre um valor experimental observado e seu valor teórico previsto. Essa diferença é simbolicamente representada por e_i conforme a Figura 4 e determinada de acordo com a equação 7. Os resíduos podem ser positivos ou negativos. Serão positivos quando os valores de e_i forem superiores aos valores previstos pelo modelo de regressão e negativos quando forem inferiores aos valores previsto (BARROS NETO et al., 2010).

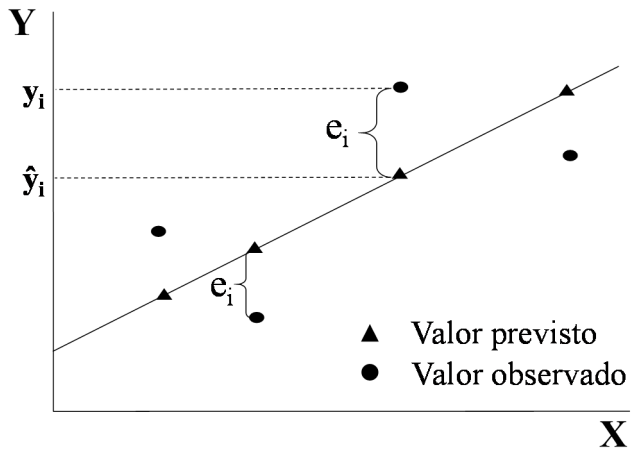


Figura 4. Representação genérica de um modelo linear por regressão de mínimos quadrados. Quanto menor for o intervalo entre o valor observado e o valor previsto menor será o valor dos resíduos e melhor será o ajuste do modelo.

$$e_i = y_i - \hat{y}_i \quad \textbf{eq}\ (7)$$

Onde y_i é o valor experimental observado e $\hat{y}_i$ é o valor previsto pelo modelo de regressão por mínimos quadrados. Quanto mais próximo de zero for os valores residuais melhor será o ajuste do modelo. A qualidade do ajuste de um modelo é geralmente avaliada através da análise de variância (ANOVA, do inglês *analysis of variance*). A ANOVA leva em consideração a decomposição dos desvios das respostas individuais observadas em relação à média de todas as respostas (y_i - $\bar{y}$) conforme a Figura 5 (BARROS NETO et al., 2010):

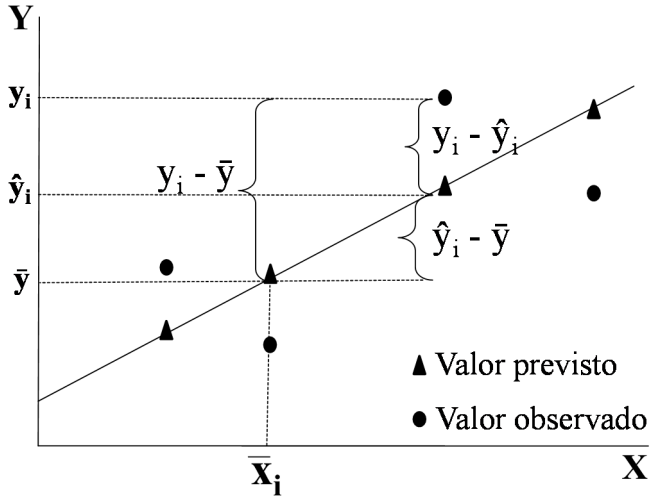


Figura 5. Representação genérica da decomposição dos desvios dos valores observados e previstos em relação à média global.

Conforme pode-se observar na figura acima, a relação (y_i - $\bar{y}$) é decomposta em duas parcelas: uma relacionada a regressão, ou seja, aos desvios dos valores previstos pelo modelo

em relação à média global ($\hat{y}_i$ - $\bar{y}$) e a outra relacionada aos resíduos (y_i - $\hat{y}_i$). Esta decomposição é melhor observada na equação 8 (BARROS NETO et al., 2010):

$$(y_i - \bar{y}) = (\hat{y}_i - \bar{y}) + (y_i - \hat{y}_i) \textbf{ eq } (8)$$

Para um modelo ser considerado bem ajustado, os valores da relação (y_i - $\bar{y}$) e os valores residuais (y_i - $\hat{y}_i$) devem apresentar valores muito próximos quando comparados entre si. Em termos quantitativos a comparação destes desvios considera as somas quadráticas de cada parcela da equação 8 que, com o devido arranjo matemático, assume a forma da equação 9 (BARROS NETO et al., 2010):

$$\sum(y_i - \bar{y})^2 = \sum(\hat{y}_i - \bar{y})^2 + \sum(y_i - \hat{y}_i)^2 \textbf{ eq } (9)$$

Em termos práticos esta equação pode ser reescrita da seguinte forma: $SQ_T = SQ_R + SQ_r$. Onde SQ_T é a soma quadrática total, SQ_R é a soma quadrática devida a regressão e SQ_r é a soma quadrática devido aos resíduos. Isto quer dizer que a variação total de y_i em torno da média global por uma parte é explicada pela equação de regressão e por outra pelos resíduos. Em um bom ajuste, essa variação total de y_i deve ser em maior parte descrita pela fração devido a regressão e pode ser quantificada por meio do coeficiente de determinação (R^2) que é a razão SQ_R/SQ_T e quanto mais próximo de 1 (100%) for seu valor melhor será o ajuste do modelo (BARROS NETO et al., 2010).

Outro fator a ser considerado é que a soma quadrática residual também se decompõe em duas partes onde uma é referente a erros aleatórios e a outra devido à falta de ajuste do modelo. Se o experimento for realizado em j repetições para a variável x_i haverá y_{ij} respostas para cada valor x_i e assim, haverá n_i resíduos para cada nível i[1]. Desta forma cada resíduo individual pode ser decomposto conforme a equação 10 (BARROS NETO et al., 2010):

$$(y_{ij} - \hat{y}_i) = \left(\hat{y}_{ij} - \bar{y}_i\right) - (\hat{y}_i - \bar{y}_i) \textbf{ eq } (10)$$

Onde $\bar{y}_i$ é a média das respostas no nível i. Elevando-se cada termo desta equação ao quadrado e somarmos todas as observações, com o devido arranjo matemático, obtemos a

[1] Para melhor entendimento considere um experimento com X níveis de concentrações e em triplicata: em cada nível x_i de concentração haverá 3 respostas e 3 resíduos em torno das médias das respostas em cada nível.

equação 11 onde o somatório à esquerda da igualdade é a soma quadrática residual SQ_r, o primeiro somatório à direita é a soma quadrática devido ao erro puro SQ_{ep} e o segundo é a soma quadrática devido à falta de ajuste SQ_{faj} (BARROS NETO et al., 2010).

$$\sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2 = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_{ij} - \bar{y}_i)^2 + \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2 \textbf{ eq } (11)$$

Pode-se reescrever esta equação da seguinte forma: $SQ_r = SQ_{ep} + SQ_{faj}$. A SQ_{ep} não depende dos estimadores $\hat{y}_i$ pois nada tem a ver com o modelo reflete apenas a dispersão, em cada nível i, das respostas y_{ij} repetidas em torno de suas próprias médias $\bar{y}_i$. A SQ_{faj} está associada ao modelo refletindo a falta de ajuste do modelo às respostas experimentais observadas e será tanto maior quanto mais as estimativas de cada nível $\hat{y}_i$ se desviarem da resposta média $\bar{y}_i$ correspondente (BARROS NETO et al., 2010).

Todas as somas quadráticas estão associadas a um determinado número de graus de liberdade, isto é, o número de valores independentes das n observações de y_i necessários para determiná-las. Dividindo-se estas somas por seus respectivos graus de liberdade obtém-se as médias quadráticas. Estas médias relacionam-se com o Teste F, que neste caso, é utilizado para aferir a significância estatística e a falta de ajuste do modelo. Estas aferições são realizadas comparando-se os valores de F calculado (F_{cal}) contra os valores de F tabelado (F_{tab}) no mesmo grau de liberdade. Para a avaliação da significância estatística do modelo F_{cal} é a razão MQ_R/MQ_r enquanto que para a avaliação da falta de ajuste F_{cal} é a razão MQ_{faj}/MQ_{ep}. Para o modelo será considerado estatisticamente significativo a relação $MQ_R/MQ_r > F_{tab}$ deve ser comprovada. Ao mesmo tempo, o modelo somente será considerado sem falta de ajuste caso a relação $MQ_{faj}/MQ_{ep} < F_{tab}$ seja também comprovada. A Tabela 4 resume os dados da ANOVA (BARROS NETO et al., 2010).

Tabela 4. Tabela de análise de variância para ajuste de modelos por mínimos quadrados.

Fonte de variação	Soma quadrática	Nº de graus de liberdade	Média quadrática
Regressão	$SQ_R = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	p - 1	$MQ_R = \frac{SQ_R}{p-1}$
Resíduos	$SQ_r = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$	n – p	$MQ_r = \frac{SQ_r}{n-p}$
Falta de ajuste	$SQ_{faj} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$	m – p	$MQ_{faj} = \frac{SQ_{faj}}{m-p}$
Erro puro	$SQ_{ep} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$	n – m	$MQ_{ep} = \frac{SQ_{ep}}{n-m}$
Total	$SQ_T = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$	n – 1	

Nesta tabela, p é número de parâmetros do modelo a ser ajustado (coeficientes da equação), m são níveis distintos da variável independente (concentração, temperatura, etc), n é o somatório do número total ensaios realizados (total de respostas obtidas em função da variável independente), $\hat{y}_i$ é o valor previsto de i (valor previsto em cada ponto da curva analítica que define a equação do modelo), $\bar{y}$ é a média global, y_{ij} é a *j-ésima* resposta obtida para o *i-ésimo* ensaio (respostas individuais obtidas em duplicata, triplicata, etc) (BARROS NETO et al., 2010).

1.8. Espectrometria de Massas (MS)

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica analítica que tem por finalidade estabelecer a razão massa carga (m/z) de compostos em fase gasosa através de diversos processos de ionização, permitindo, com isso, a determinação de sua composição elementar e a elucidação de sua estrutura molecular (WATSON & SPARKMAN, 2007; AEBERSOLD & MANN, 2003; MORAES & LAGO, 2003). A MS é na atualidade uma das principais ferramentas analítica para a comunidade científica, sendo amplamente explorada nos mais diversos campos de pesquisa como por exemplo: Geologia (STAFFORD JUNIOR et al., 1999), Medicina (WAJNER et al., 2001), Arqueologia (BRYANT, 2003), Bioquímica (McLAFFERTY et al.,1999), Paleontologia (ASARA et al., 2008), Astrofísica (DAUPHAS et al., 2010), Meio Ambiente (SUESS & PRATHER, 1999), Nanotecnologia (ARDUCA et al., 2016), Combustíveis e Energia (WU et al., 2011). Embora seja uma técnica bastante diversificada e exista vários modelos comercialmente disponíveis para os mais diferentes

propósitos, sua base estrutural é comum: fonte de íons, o analisador de massa, o detector e o sistema de manipulação e saída de dados (LANÇAS, 2009; CARRILHO et al., 2008; MORAES & LAGO, 2003; AEBERSOLD & MANN, 2003). Na Figura 6, pode-se observar uma representação genérica da estrutura base de um espectrômetro de massas.

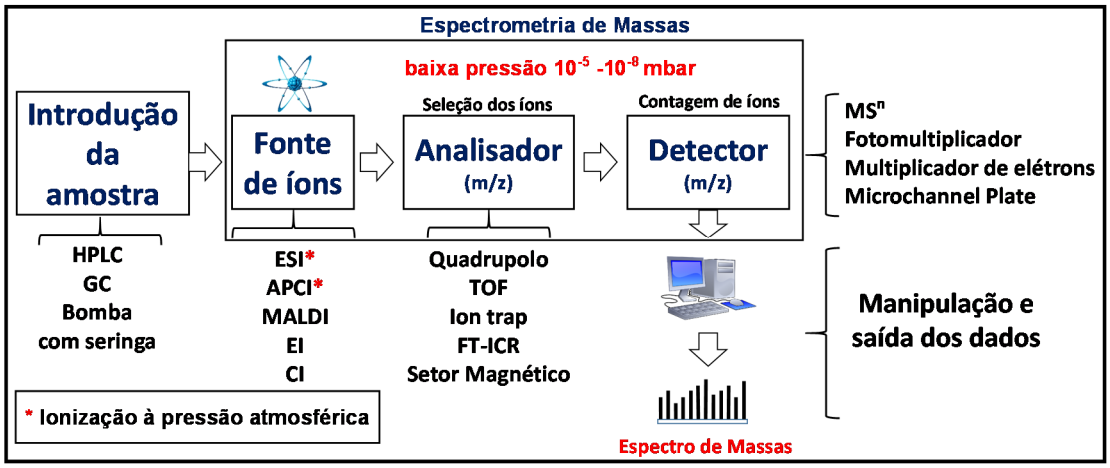


Figura 6. Esquema genérico de um espectrômetro de massas**.**

De modo geral, todo o processo pelo qual ocorre a análise em MS, desde sua introdução até a resposta final na forma de um espectro de MS, se dá inicialmente pela injeção da amostra (cromatografia, fluxo contínuo) que, uma vez introduzida, será individualmente conduzida até a câmara de ionização aonde uma fonte de ionização, por meio de um agente ionizante, converterá a amostra em íons (positivos ou negativos) através de adição e remoção de carga (modo positivo e negativo). Depois de ionizados, os íons gerados são acelerados, através de um campo eletromagnético, e direcionados ao analisador de massa aonde serão separados em função da razão massa carga (*m/z*). Dos íons que saem do analisador, somente aqueles que estiverem dentro do intervalo de *m/z* estipulado chegarão ao detector e, uma vez dentro, são contados unitariamente; cada íon contado gera um sinal próprio que é convertido em pulsos elétricos. Esses pulsos são analisados por um software apropriado instalado em um computador acoplado ao espectrômetro que os transformam em dados quali-quantitativos que posteriormente serão visualizados na tela do computador na forma de um espectro de massas (SILVERSTEIN et al., 2005).

1.9. Tipos de fontes de ionização

A forma física em que as amostras são inseridas no espectrômetro varia, sendo possível desde a injeção direta até a injeção interfaceada com cromatografia líquida de alta eficiência

(HPLC, do inglês *high performance liquid chromatography*) (LANÇAS, 2009). A funcionalidade da MS é definida em função do tipo de fonte de ionização e de seu analisador (HAM, 2008). Basicamente as fontes de ionização podem ser agrupadas em dois grupos: os que funcionam a pressão atmosférica, também conhecidos como fontes brandas de ionização, e os que necessitam de baixa pressão. A ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*), electrospray (ESI do inglês *electro spray ionization*) e ionização por fótons à pressão atmosférica (APPI, do inglês *atmospheric pressure photon ionization*) são exemplos de fontes brandas de ionização enquanto a ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*) e ionização por elétrons (EI, do inglês *electron ionization*) são exemplos de fontes de ionização que funcionam à pressão reduzida. Os analisadores de massas fazem a discriminação ou seleção dos íons que serão detectados. Essa capacidade seletiva está sujeita ao poder de resolução do equipamento que varia em função de seu princípio físico e de sua eletrônica básica. Os analisadores mais comumente empregados em MS são os do tipo quadrupolo, tempo de voo (TOF, do inglês *time of flight*), captura de íons, setor magnético e ressonância ciclotrônica de íons com Transformada de Fourier (FT-ICR, do inglês *Fourier transform ion cyclotron resonance*).

1.10. Analisador de massas de geometria tempo de voo

Em analisadores do tipo tempo de voo (TOF, do inglês *Time-of-Flight*) os íons gerados na fonte de ionização possuem a mesma energia cinética e, como suas velocidades são inversamente proporcionais à raiz quadrada de sua massa os íons com menor (*m/z*) serão primeiramente detectados (MAGNO et al., 2006). A Figura 7 mostra um esquema simples de um analisador de massas tipo TOF.

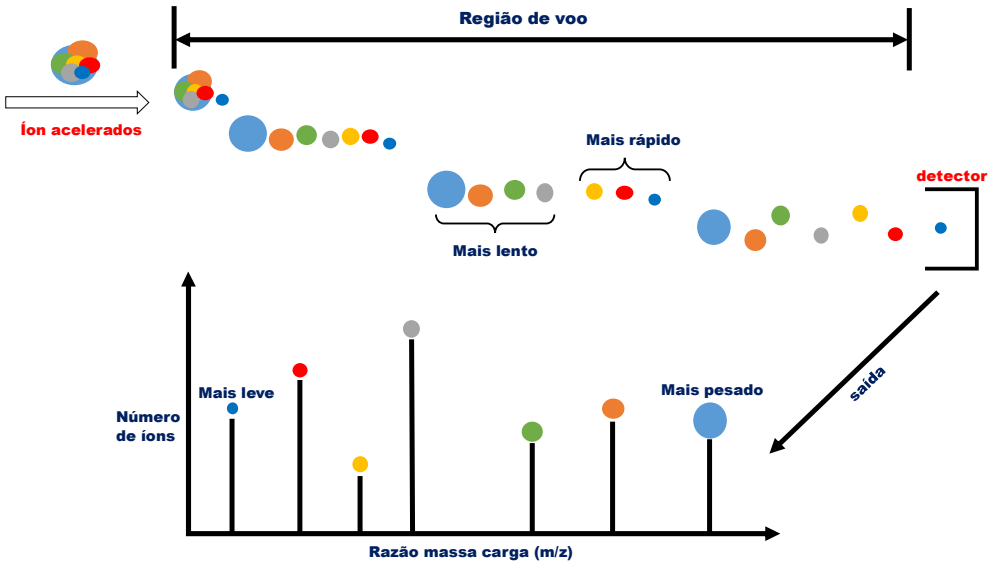


Figura 7. Esquema simplificado de um analisador tempo de voo.

Em um TOF os íons formados se deslocam livres de quaisquer influências de campos eletromagnéticos em um tubo de voo até atingirem o detector. A velocidade com que cada íon atravessa o tubo é função da energia cinética dada pela equação 12 (MAGNO et al., 2006):

$$v = \left(\frac{2zV}{m}\right)^{1/2} \quad \textbf{eq (12)}$$

Se o tubo de voo tem comprimento l e v = l/t, temos que t = l/v, logo o tempo de voo que cada partícula leva para atravessar completamente o tubo é dado pela equação 13 (MAGNO et al., 2006):

$$t = l\left(\frac{m}{2zV}\right)^{1/2} \quad \textbf{eq (13)}$$

A resolução e a forma do espectro de massa de um TOF são influenciadas pela velocidade com que os íons percorrem o tubo uma vez que a aceleração não é homogênea causando com isso alargamento dos picos e diminuição da resolução (MAGNO et al., 2006). O reflectron é um dispositivo composto por vários anéis eletrodos que aplicam um potencial decrescente que corrige as acelerações dos íons com excesso de energia cinética fazendo com que percorram um caminho maior (desaceleram), enquanto que àqueles com menor energia cinética percorrem um caminho mais curto (aceleram). Esse processo causa um espessamento

do tempo de chegada dos íons o que contribui para aumento da resolução de massas (MAGNO et al., 2006).

1.11. Analisador de massas de geometria quadrupolo

Em analisadores do tipo quadrupolo (Q do inglês, *quadrupole*) quatro hastes estão paralelamente interligadas de tal modo que as hastes colaterais de cargas opostas estão eletricamente conectadas. A estas hastes aplica-se uma tensão, constituída simultaneamente elementos de radiofrequência (RF) e de corrente contínua (CC), de 180º fora de fase. Com isto, sob ação de uma voltagem específica que age como uma espécie de filtro (*m/z*), somente íons de determinada razão (*m/z*) conseguem atravessar o quadrupolo mantendo sua trajetória estável até o detector (ARDREY, 2003). A Figura 8 mostra um esquema simplificado de um típico quadrupolo.

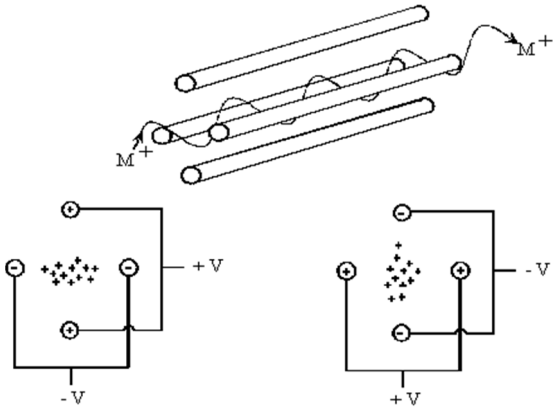


Figura 8. Esquema simplificado de um quadrupolo.
Fonte - http://science.widener.edu/svb/massspec/intro_to_ms/quad.html

Os analisadores do tipo quadrupolo normalmente trabalham com baixa resolução, ou seja, indicam a massa nominal de um íon, não sendo, por isso, capazes de fornecer a composição elementar (informação estrutural) desse íon (ARDREY, 2003).

1.12. Resolução de massas

A resolução de massas (MR, do inglês *mass resolution*) é um importante aspecto da análise em MS, sendo definida como a diferença mínima entre dois sinais, valores de (*m/z*), de intensidade relativamente próximos de espécies iônicas possibilitando uma inequívoca distinção entre esses sinais durante a análise de massas. A MR é uma função da (*m/z*) e matematicamente é expressa segundo a equação 14 (KALTASHOV & EYLES, 2005; DOWNARD, 2004; ARDREY, 2003):

$$R = \frac{M}{\Delta M} = \frac{M}{\frac{M_1}{M_1 - M_2}} \quad \textbf{eq (14)}$$

Onde *R* é a resolução, *M* é a razão (*m/z*) a ser medida, M_1 é a razão (*m/z*) do primeiro íon e M_2 é a razão (*m/z*) do segundo íon onde $M_1 > M_2$. De modo geral ΔM é a largura do pico a 50% de sua altura. A Figura 9 mostra uma representação esquemática da definição de MR.

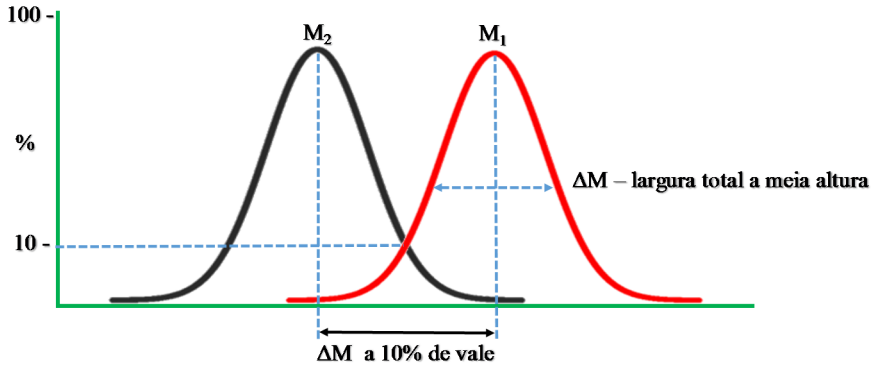


Figura 9. Definição de resolução de massa a 10% de vale e largura total do pico à meia altura.

Em termos de resolução, um instrumento de determinada geometria é dito de baixa resolução quando não é capaz de determinar além de massas nominais, ou seja, a penas a porção inteira do valor de massa. Por exemplo, para um instrumento de baixa resolução a análise dos íons CO^+ (27,9949 Da), $C_2H_4^+$ (28.0312 Da) e N_2^+ (28.0062 Da) seria nominalmente de 28 Da o que prejudicaria a correta identificação. Em contrapartida, quanto maior a resolução de um instrumento, melhor será sua capacidade de distinção e separação de íons com picos de razão (*m/z*) muito próximos (KALTASHOV & EYLES, 2005; DOWNARD, 2004; ARDREY, 2003).

1.13. Ionização por Electrospray (ESI)

As fontes brandas de ionização como a eletronebulização (ESI, do inglês *electro spray ionization*) foram desenvolvidas para serem uma interface de acoplamento entre a HPLC e a MS (CHIARADIA et al., 2008; MARÇO et al., 2008) visando sanar as incompatibilidades técnicas que impossibilitavam a geração de íons sem degradação e a partir de espécies pouco voláteis ou sensíveis a temperatura presentes em fase líquida (CHIARADIA et al., 2008; MORAES & LAGO, 2003). O processo de ionização do sistema HPLC-MS tem como característica a formação de íons "intactos" oriundos de reações de protonação e desprotonação do tipo ácido-base (CROTTI et al., 2006). No modo positivo, reações de protonação geram íons $[M+H]^+$, enquanto que no modo negativo reações de desprotonação geram íons $[M+H]^-$. Devido

a essa capacidade de gerar íons preservando a estrutura e carga da espécie, a HPLC-MS é ideal para análises de composto não voláteis, de média a alta polaridade e de alto peso molecular. Porém se o equipamento tiver baixo alcance de massas essa técnica só permite a análise de compostos de até 20.000 Da (CHIARADIA et al., 2008; CERNY et al., 2003; MORAES & LAGO, 2003). A Figura 10 resume o sistema ESI.

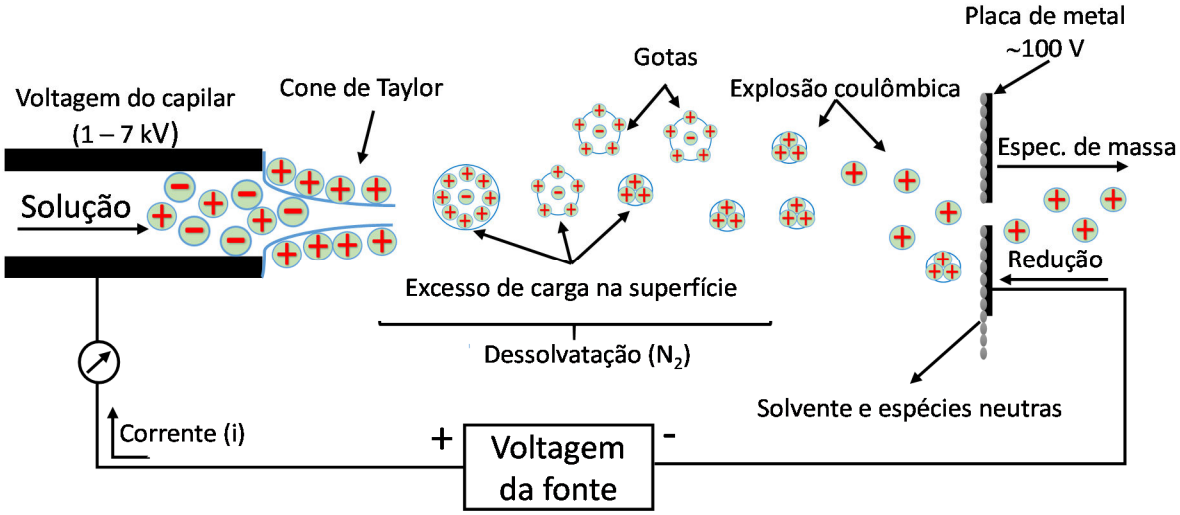


Figura 10. Esquema do sistema de ionização via ESI no modo positivo.

No sistema de ESI o analito está em solução, que é a fase móvel do sistema de HPLC. Este conjunto chega, à pressão atmosférica e preferencialmente a uma vazão inferior a 10 µL/min, ao capilar que fica mantido em alta voltagem (1 a 7 kV). Nesse capilar ocorre o processo eletroforético de separação dos íons em função do potencial positivo ou negativo aplicado. Ainda em função desse potencial, a solução emerge do capilar na forma de um aerossol (spray) que libera gotas carregadas com maior densidade de cargas positivas ou negativas dependendo do potencial aplicado: se o potencial for positivo os contra-íons negativos serão neutralizados e vice-versa. Conforme essa densidade de cargas aumenta as gotas se deformam na extremidade do capilar em razão campo elétrico ao redor. Essa deformação toma a forma de um cone, conhecido como cone de Taylor, e permanece na extremidade do capilar até o momento em que a densidade de carga na superfície das gotas e a repulsão entre os íons vençam a tensão superficial da solução, ocorrendo então a liberação de gotas menores ainda e mais carregadas (CHIARADIA et al., 2008; MORAES & LAGO, 2003). Essas gotas resultantes são dessolvatadas, ou seja, evaporadas à medida em que entram em contato com um fluxo contínuo de gás N_2, geralmente superior a 500 L/min, a temperaturas superiores a 350 °C. Com essa perda gradativa de solventes as gotas diminuem seu volume e as cargas similares ficam

cada vez mais próximas até o ponto em que ocorre a explosão coulômbica, ou seja, as forças de repulsão eletrostática superam a tensão superficial do solvente nas gotas e os íons de interesse são ejetados em direção ao MS (CHIARADIA et al., 2008; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2004; ARDREY, 2003; MORAES & LAGO, 2003). Atualmente a ESI é a técnica de ionização mais empregada em sistemas de HPLC-MS se destacando em diversos campos de pesquisas, porém, se sobressaindo em estudos referentes à química orgânica, bioquímica, indústria de alimentos e farmacêutica (LANÇAS, 2009; CROTTI et al., 2006; MORAES & LAGO, 2003).

1.14. Espectrometria de massas sequencial empregando-se geometria do tipo triplo-quadrupolo (QqQ-MS/MS)

A espectrometria de massas acoplada a espectrometria de massa (MS/MS), comumente conhecido como sequencial (MS^n, do inglês, *tandem*), tem como característica possuir dois estágios de separação de íons de mesma razão *m/z* ao invés de utilizar apenas um único analisador de massas. Esses estágios se relacionam de maneira específica a fim de fornecer a informação analítica desejada (ARDREY, 2003). No que diz respeito à elucidação estrutural faz-se necessário realizar a fragmentação das moléculas de interesse, empregando-se geralmente, para esse fim aparelhos do tipo triplo quadrupolo (QqQ, do inglês *triple quadrupole*) e quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF, do inglês *quadrupole-time-of-fly*) (WILSON & WALKER, 2010; HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2004; ARDREY, 2003). Um sistema do tipo QqQ, como o nome diz, é constituído por uma sequência de três quadrupolos, onde o segundo funciona como uma cela de colisão onde os íons são fragmentados por dissociação induzida por colisão (DIC, do inglês *collision-induced dissociation*) gerando desta forma íons produtos cujos tipos dependem da intensidade de energia aplicada. Quando a DIC é manipulada em baixa energia a fragmentação induz a perda de fragmentos neutros que dependem da natureza do íon precursor, como por exemplo, metanol e água gerando, desta forma, informações sobre os grupos funcionais presentes na molécula. Se a energia aplicada for mais elevada, as fragmentações ocorrem em sítios específicos gerando informações estruturais bem mais significativas para fins de elucidação estrutural. A Figura 11 ilustra o esquema do sistema QqQ.

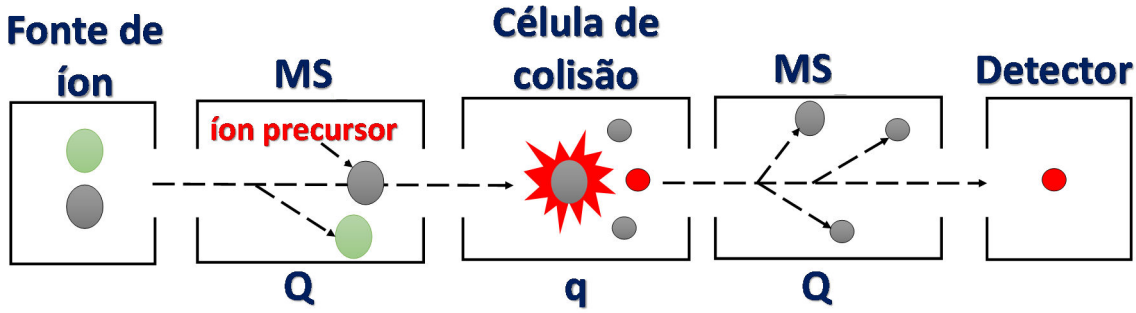


Figura 11. Esquema de um sistema tipo QqQ-MS/MS.

Resumidamente, pode-se dizer que os íons de interesse, ou íons precursores, selecionados no primeiro estágio de MS são direcionados para uma cela de colisão aonde são dissociados através de seu impacto com um fluxo gás inerte (geralmente N_2 ou Ar), os íons resultantes são separados em função de suas respectivas razões m/z no segundo estágio e, por fim, é gerado um espectro de fragmentação a partir do qual será possível caracterizar os grupos funcionais dos íons de interesse, bem como auxiliar na elucidação estrutural de diversas moléculas pequenas e biomoléculas (HOFFMANN & STROOBANT, 2007; GROSS, 2004; ARDREY, 2003). Uma característica peculiar do MS/MS são seus modos de operação que lhe possibilitam realizar diferentes tipos possíveis de experimentos. Na Tabela 5 é dado um breve resumo sobre os quatro principais modos de operação no sistema MS/MS (EKMAN et al., 2009; NIESSEN, 2006).

Tabela 5. Modos de operação do sistema de espectrometria de massas sequencial - MS/MS.

MODO	APLICAÇÃO	MS^1	MS^2	EXPERIMENTO
Íon produto	Obter informação estrutural a partir dos íons emitidos pela fonte de íons.	Seleção	Varredura	MS^1 seleciona o íon precursor e MS^2 obtém um espectro de massa total dos íons fragmentados.
Íon precursor	Encontrar compostos que produzem fragmentos em comum.	Varredura	Varredura	MS^1 escarneia todos os íons precursores e MS^2 seleciona um íon fragmentado.
Perda neutra	Encontrar compostos que perdem fragmentos neutros comuns.	Varredura	Varredura	MS^1 e MS^2 estão operando em um intervalo de faixa de *m/z*.

Seleção de monitoramento de reação (SRM)	Monitorar uma reação CID específica.	Seleção	Seleção	MS^1 seleciona um íon precursor e MS^2 seleciona um íon fragmentado.

No que diz respeito à cromatografia, a HPLC-MS/MS possibilita um aumento na detectibilidade e reduz a interferência espectral de compostos presentes na matriz. (CHIARADIA et al., 2008; ARDREY, 2003).

1.15. Espectrometria de massas sequencial empregando-se geometria do tipo quadrupolo tempo de voo (QTOF-MS/MS)

Um sistema hibrido de espectrometria de massas sequencial do tipo QTOF-MS/MS difere de um sistema QqQ-MS/MS apenas no fato de que o segundo analisador de massas é substituído por uma geometria tipo TOF (ARDREY, 2003). A figura 12 mostra um esquema desse sistema híbrido.

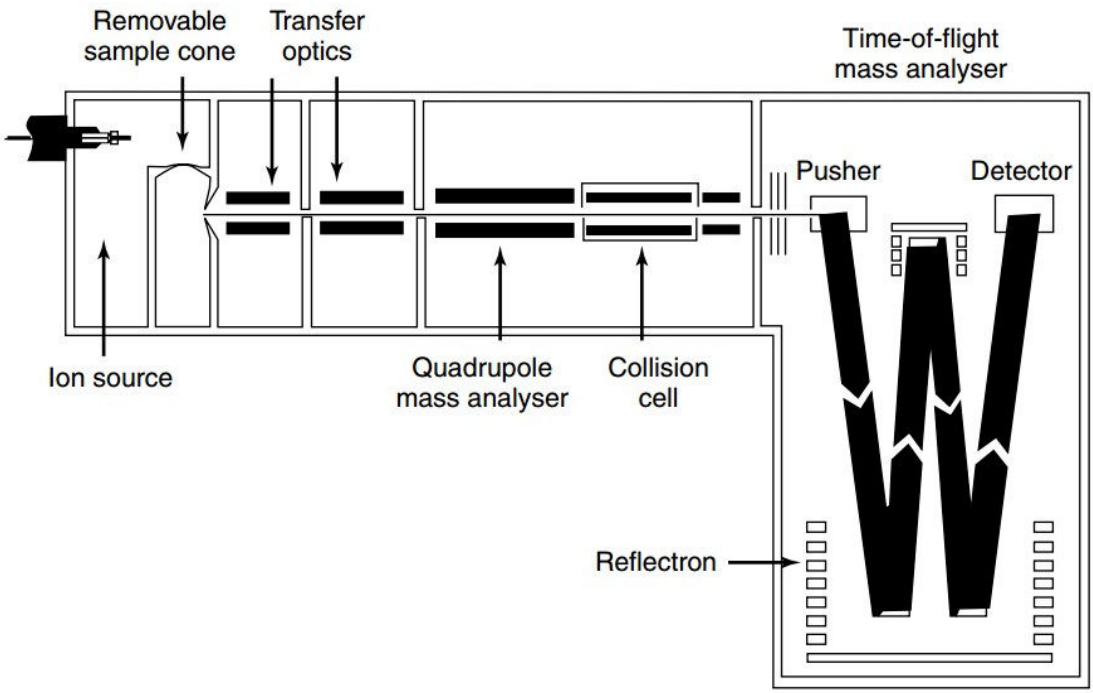


Figura 12. Representação esquemática de sistema QTOF-MS/MS. **Fonte:** DOWNARD, 2004. Pg, 82.

Esta substituição confere ao sistema a característica de apresentar maior especificidade, maior resolução e maior velocidade de varrimento. Em contrapartida, a desvantagem desta técnica consiste de não trabalhar nos modos de varredura de perda neutra e íon precursor (MAGNO et al., 2006; ARDREY, 2003).

1.16. Validação de métodos analíticos

Validação é a confirmação mediante exame e fornecimento de evidências objetivas de que os requisitos específicos para um propósito desejado são atendidos (SANTOS et al., 2014; PÉREZ-LOZANO et al., 2004). O processo de validação visa: (I) controlar ou amenizar os fatores que possam causar imprecisão nas medidas garantindo que os resultados da análise apresentem um nível aceitável de incerteza (GRANA, 2014; TAVERNIERS et al., 2004; CHASIN et al., 1998); (II) comprovar a eficiência do método desenvolvido demonstrando, via documento, que o propósito a que se aplica, de fato atende os requisitos pretendidos para a finalidade desejada (SANTOS et al., 2014; PÉREZ-LOZANO et al., 2004; ANVISA, 2003) e, com isto (III) evitar que métodos inadequados para o fim previsto sejam acreditados (ROZET et al., 2011; HARTMANN et al., 1998). Para que este método seja considerado adequado à qualidade pretendida, deve apresentar resultados confiáveis e reprodutíveis (GRANA, 2014). Para isto, é indispensável, durante a validação, descrever os procedimentos necessários para que os parâmetros do desempenho, também conhecido como figuras do mérito analítico: seletividade, linearidade, intervalo, precisão, sensibilidade, limite de detecção e de quantificação, exatidão e robustez sejam suficientemente bem conhecidos (PASCHOAL et al., 2008; THOMPSON et al., 2006; TAVERNIERS et al., 2004).

1.17. Especificidade e seletividade

A especificidade e a seletividade estão relacionadas à detecção (INMETRO, 2011) e, embora, sejam vistos como sinônimos por alguns autores possuem significados diferentes (ABOUL-ENEIN, 2000; VESSMAN, 1996). A especificidade de um método está relacionada a sua capacidade de fornecer um único sinal e somente para o analito de interesse uma vez que esse método é capaz de ignorar as interferências e semelhanças químicas causadas pelos demais compostos presentes na amostra ou matriz (PASCHOAL et al., 2008; VESSMAN, 1996). Desta forma, dizer que um método é específico significa entender que ele absoluto, ou seja, é 100% seletivo (ápice da seletividade) para determinado analito ou grupo de analitos tendo em vista que a matriz em análise não causa interferência na medição da resposta (ROZET et al 2011; GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007; ABOUL-ENEIN, 2000; VESSMAN, 1996). Ainda sobre especificidade vale ressaltar que são muito raros os métodos considerados específicos, até mesmos os cromatográficos e, que em função disso, deve-se evitar o erro de considerar específico um método que é apenas seletivo (ABOUL-ENEIN, 2000) devendo, desta forma, dar preferência a terminologia “seletividade” quando nos referirmos a ela como uma figura do

mérito analítico (ROZET et al., 2011; CHASIN et al., 1998). Enfim, por seletividade entende-se a capacidade do método de analisar, diferenciar e quantificar com precisão o analito na presença de outros componentes interferentes presentes na matriz sendo, também, capaz de distinguir os sinais dos demais compostos detectados juntamente com o analito de interesse (TAVERNIERS et al., 2004; RIBANI, et al., 2004; ABOUL-ENEIN, 2000). Assim, métodos seletivos são aqueles que, embora produzam respostas para vários analitos, são capazes de distinguir o sinal de cada um deles (PASCHOAL et al., 2008; GONZÁLEZ & HERRADOR, 2007; THOMPSON et al., 2002). Pensar em seletividade de um método implica em minimizar as influências existentes na matriz que possam causar potenciais interferências no sinal da resposta comprometendo assim parâmetros como: linearidade, exatidão, precisão, etc. (RIBANI et al., 2004; VESMANN, 1998). No tocante a cromatografia líquida a otimização das técnicas aplicadas as etapas de extração e separação do analitos, também com o fim minimizar as interferências envolvidas nessa fase, é um importante e necessário procedimento para a melhoria da qualidade da seletividade que, de certa forma, dependerá, também, de aspectos relacionados ao recheio da coluna e composição da fase móvel (AOAC, 2012). Vale ressaltar ainda que em cromatografia trabalha-se com medições dinâmicas e, em termos de seletividade, tais medidas dividem-se em (I) seletividade de detecção, onde os componentes interferentes podem afetar as reações de detecção tanto na fase líquida quanto na fase gasosa e (II) seletividade de separação, onde as interações que ocorrem entre a(s) substância(s) em análise e as fases móveis e estacionárias podem ser influenciados por mudanças na composição dessas fases, bem como por materiais estranhos que mudam o caráter do sistema de separação (ABOUL-ENEIN, 2000). Em métodos cromatrográficos (com detector de arranjo de fotodiodos ou MS), testes de pureza de pico associado com tratamento quimiométrico permitem uma boa avaliação da seletividade pois garantem que a resposta do sinal do analito (avaliado no tempo de retenção característico) seja proveniente de si mesmo e não de outros interferentes presentes na amostra (ROZET et al., 2011; PASCHOAL et al., 2008; ABOUL-ENEIN, 2000). No caso do emprego de HPLC associada à MS/MS (HPLC-MS/MS), recomenda-se que seja também avaliado o efeito matriz de tal forma que a resposta de picos interferentes no tempo de retenção do analito seja inferior a 20% da resposta do limite de quantificação (PASCHOAL et al., 2008).

De modo geral, a seletividade de um método analítico pode ser avaliada através da análise de várias amostras da mesma matriz determinando o nível da proporção de interferências dos compostos presentes nessas matrizes (CHASIN, et al., 1998). Essa avaliação se dá por meio da análise da interferência (ausência de sinal) em, no mínimo, seis fontes em

branco diferentes oriundas da mesma matriz (ROZET et al., 2011; PASCHOAL et al., 2008; HARTMANN et al., 1998). Se verificada a ausencia de sinal procede-se ainda a fortificação desses brancos com os contaminantes em concentração máxima provável e a seletividade poderá ser aferida comparando-se o sinal da resposta desses brancos fortificados com o sinal do analito de interesse no limite inferior de quantificação também conhecido como menor limite de quantificação (LLOQ, do inglês, *lower limit of quantification*) (ROZET et al., 2011; PASCHOAL et al., 2008).

Para o tratamento estatístico da seletividade o teste *F* (Snedecor), que avalia a homogeneidade da variância, e o teste *t* (Student), que faz comparação entre médias podem ser usados e para tal devem-se dividir as amostras em dois grupos com concentrações iguais de analitos, mas somente um grupo deverá conter a matriz, sendo que o número de amostras deve ser maior ou igual a sete para que modelo estatístico seja adequado e, para que a matriz não exerça efeito significativo e cause interferência na detecção do método, em ambos os testes os valores calculados devem ser menores que os valores tabelados (INMETRO, 2011).

1.18. Faixa de Trabalho e Faixa Linear de Trabalho (Intervalo)

Faixa de trabalho é a faixa de concentração do analito no qual o método analítico pode ser aplicado (PASCHOAL et al., 2008; INMETRO, 2011). Essa faixa de concentração apresenta limites inferiores e superiores. O limite inferior é delimitado pelos valores dos limites de detecção e limite de quantificação enquanto a delimitação do limite superior depende do sistema de resposta do equipamento de medição. A resposta do sinal deve ter uma relação linear com o analito e é obtido a partir de uma faixa de resposta linear que por sua vez está inserida dentro da faixa de trabalho (INMETRO, 2011). A faixa linear de trabalho é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual é possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade aceitáveis quando aplicado a amostras contendo analito nos extremos da faixa e dentro da mesma (PASCHOAL et al., 2008; INMETRO, 2011). A faixa de resposta linear é definida como a faixa de concentrações na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2011).

1.19. Linearidade e sensibilidade

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito em uma análise dentro de uma determinada faixa de

aplicação em que é possível obter a relação entre as variáveis dependentes (medidas) e independentes (concentrações) (RIBEIRO et al., 2003; HARTMANN et al., 1998; CHASIN et al., 1998). É determinada pela análise de uma série de soluções calibradoras cujas diferentes concentrações abrangem toda a faixa de concentração desejada (CHASIN et al., 1998) afim de se conseguir expressar a correlação entre o sinal medido e a concentração da substância a ser quantificada (RIBANI et al., 2004). Tal correlação é obtida empiricamente, por meio de regressão linear através do método dos mínimos quadrados cujo foco é determinar os coeficientes da equação da reta que permite construir a curva analítica ou curva de calibração que, por conseguinte, nos possibilita gerar o recurso gráfico com o qual é possível verificar a existência ou não da linearidade (CUSTÓDIO et al., 1997). A elaboração da curva analítica se dá por meio de uma função polinomial do 1° grau conforme a equação 15 (MILLER & MILLER, 2010, RIBANI et al., 2004; CUSTÓDIO et al., 1997):

$$\mathrm{Y} = a\mathrm{X} + b \quad \textbf{eq}\ (15)$$

Onde, **Y** é a resposta medida (absorbância, altura ou área do pico, etc.), **X** é a concentração do analito, ***a*** é o coeficiente angular (inclinação da curva de calibração = sensibilidade), ***b*** é o coeficiente linear (interseção com o eixo y, quando x=0). Os coeficientes "***a***" e "***b***" são estimados por meio das equações 16 e 17 (MILLER & MILLER, 2010, CUSTÓDIO et al., 1997).

$$\mathbf{a} = \frac{\mathrm{N}\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xiyi} - \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi} \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{yi}}{\mathrm{N}\sum_{\mathrm{I}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi}^2 - \left(\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi}\right)^2} \quad \textbf{eq}\ (16)$$

$$\mathbf{b} = \frac{\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{yi} \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi}^2 - \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi} \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xiyi}}{\mathrm{N}\sum_{\mathrm{I}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi}^2 - \left(\sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{N}} \mathrm{xi}\right)^2} \quad \textbf{eq}\ (17)$$

O gráfico resultante da equação 8 demonstra os resultados do ensaio em função da concentração do analito e, uma vez constatado a relação linear aparente, os resultados deverão receber tratamento estatístico apropriado para a determinação do coeficiente de correlação (R), que é uma estimativa da qualidade da curva obtida, e quanto mais próximo de 1 (≥ 0,99), menor é a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados (RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003). O recomendado é que a linearidade seja determinada pela análise de, no mínimo, seis concentrações diferentes (CHASIN et al.,

1998). A variação da resposta em função da concentração do analito é demonstrada por meio da sensibilidade que está relacionada à capacidade de distinção entre duas concentrações com pequenas diferenças, e ao coeficiente angular da curva analítica (inclinação da curva de regressão linear de calibração) (PASCHOAL et al., 2008; RIBEIRO et al., 2003). A sensibilidade é determinada simultaneamente aos testes de linearidade e depende da natureza do analito e da técnica de detecção utilizada sendo expressa de acordo com a equação 18 (INMETRO, 2011).

$$S = \frac{dx}{dc} \quad \textbf{eq}\ (18)$$

Onde, S é a sensibilidade, *dx* é a variação da resposta e *dc* é a variação da concentração. A sensibilidade não é considerada como um parâmetro de validação por alguns órgãos reguladores por estar ligada a calibração do equipamento o que implica em variação de equipamento para equipamento não sendo por isso muito útil na validação. Porém, pode ser usado nos procedimentos de garantia de qualidade (PASCHOAL et al., 2008; HUBER, 2007; THOMPSON et al., 2002).

1.20. Limite de Detecção (LOD)

De forma geral o Limite de Detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) pode ser definido como a menor quantidade de analito que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada como um valor exato ou ainda, como a capacidade de diferenciar, com certa confiança, a concentração do analito presente na amostra do zero (branco de referência) ou do ruído de fundo (PASCHOAL et al., 2008; ANVISA, 2003; CHASIN et al., 1998). Corresponde a 3 vezes o desvio padrão de 7 a 10 replicatas de uma amostra (INMETRO, 2011). Para métodos instrumentais como HPLC e MS, o LOD pode ser estimado com base na relação de 3 vezes o ruído da linha de base e de acordo com a equação 19 (ANVISA, 2003):

$$LOD = \frac{DP_a \times 3}{IC} \quad \textbf{eq}\ (19)$$

Onde, IC é o coeficiente angular da curva de calibração (sensibilidade) e DP_a é o desvio padrão do coeficiente linear de 3 ou mais curvas de calibração contendo as concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. O DP_a pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco

(ANVISA, 2003). Durante a validação, além do LOD, deve-se distinguir o conceito de Limite de Detecção do Instrumento (LOD_I) e Limite de Detecção do Método (LOD_M). O LOD_I é definido como a concentração do analito que produz um sinal de três a cinco vezes a razão sinal/ruído do instrumento. O LOD_M é definido como a concentração mínima de uma substância medida e declarada com 95% ou 99% de confiança de que a concentração do analito é maior que zero (INMETRO, 2011; CHASIN et al., 1998). A relação entre esses termos pode ser dada por meio da equação 20:

$$\mathrm{LOD_M} = \frac{\mathrm{LOD_I}}{\text{Fator de concentração}} \quad \textbf{eq (20)}$$

Nesta equação o fator de concentração é igual ao número de vezes no qual o analito foi concentrado durante a extração. O LOD_I pode ser determinado a partir do sinal/ruído através da injeção de extratos da matriz fortificada com baixas concentrações do analito e também por meio de parâmetros da curva analítica de acordo com a equação 19 (RIBANI et al., 2004):

$$\mathrm{LOD} = 3{,}3 \times \left(\frac{s}{S}\right) \quad \textbf{eq (21)}$$

Onde, **s** é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica e **S** inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica (RIBEIRO et al., 2008; RIBANI et al., 2004). Vale ressaltar que não há necessidade de se determinar o LOD em metodologias cuja finalidade seja quantificar princípios-ativos em matérias-primas durante a validação.

1.21. Limite de Quantificação (LOQ)

O Limite de Quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantitation*) é a menor concentração do analito que, em um procedimento experimental, pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e veracidade (ROZET et al., 2007; RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2003). Corresponde normalmente ao padrão de calibração de menor concentração sem considerar o branco. Também é considerado como a concentração do analito correspondente ao valor da média do branco mais 5, 6 ou 10 desvios padrão (TAVERNIERS et al., 2004; INMETRO, 2011). O LOQ pode ser expresso de acordo com a equação 22 (RIBANI et al., 2004):

$$\mathrm{LOQ} = 10 \times \left(\frac{s}{S}\right) \textbf{ eq } (22)$$

Onde, *S* é o coeficiente angular da curva de calibração e *s* é o desvio padrão do coeficiente linear de 3 ou mais curvas de calibração contendo as concentrações do analito próximas ao suposto limite de quantificação. O **s** pode ainda ser obtido a partir da curva de calibração proveniente da análise de um número apropriado de amostras do branco. Também pode ser determinado pela determinação do ruído da linha de base onde o LOQ será a concentração que produza uma relação sinal-ruído superior a 10:1 (ROZET et al., 2007; ANVISA, 2003). Durante a validação, além do LOQ, deve-se distinguir o conceito de Limite de Quantificação do Instrumento (LOQ_I) e Limite de Quantificação do Método (LOQ_M). O LOQ_I é definido como a concentração do analito que produz um sinal 6 a 10 vezes a razão sinal/ruído do equipamento. O LOQ_M é determinado a partir do LOQ_I e do fator a que a amostra é concentrada durante o processo de extração, denominado fator de concentração (THOMPSON et al., 2002). Assim a relação entre esses termos pode ser dada por meio da equação 23:

$$\mathrm{LOQ_M} = \frac{\mathrm{LOQ_I}}{\text{Fator de concentração}} \textbf{ eq } (23)$$

1.22. Exatidão

A exatidão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre o valor encontrado e o valor que é convencionalmente aceito como verdadeiro ou como referência (PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004, BRAGA & POPPI, 2004) RIBEIRO et al., 2003; CHASIN et al., 1998). Entre os vários processos através dos quais se é possível verificar a exatidão, os quatro métodos principais são embasados no uso de materiais de referência certificados (MRC), em comparações com métodos de referência (CMR), em estudos colaborativos e no uso de ensaios de recuperação na matriz (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2003). Utilizar os MRC implica em analisar número suficiente de replicatas desse material e comparar os resultados obtidos com o valor certificado (RIBEIRO et al., 2003). Para esta comparação são suficientes o erro relativo (ER) e o teste de hipóteses, pois o *Z Score* e o Erro Normalizado (EN) estão mais associados ao laboratório do que a metodologia propriamente dita (INMETRO, 2011). A estimativa do ER é expresso em porcentagem, através da equação 24 (INMETRO, 2011):

$$ER = \frac{X_{lab} - X_v}{X_v} . 100 \quad \textbf{eq} \ (24)$$

Onde, X_{lab} é valor obtido experimentalmente ou média aritmética de valores obtidos é X_v é valor aceito como valor certificado do MRC. O teste de hipóteses visa evidenciar possíveis erros sistemáticos associados ao método. Pode-se, neste caso, ser aplicados os testes *F* (Snedecor) de homogeneidade de variâncias e o teste t (Student) de comparação de médias, ou então realizar a análise dos desvios em relação aos valores de referência (INMETRO, 2011). A determinação da exatidão por meio de CMR é estabelecida mediante a comparação entre os valores obtidos pelo método e os valores obtidos para as mesmas amostras obtidos por um método já validado, ou seja, com precisão e exatidão aferidos e confirmados. Entretanto, nem sempre se encontra métodos de referência pré-existente, impossibilitando a utilização desse tipo de proposta (RIBEIRO et al., 2003). A estimação da exatidão de um método por meio de estudos colaborativos implica na colaboração de no mínimo 8 laboratórios e, caso não seja possível o envolvimento desse número mínimo o estudo poderá ser conduzido com um número de laboratórios não menor do que 5. A maior dificuldade desse metodo consiste em manter a estabilidade do analito na amostra, ou seja, assegurar que a concentração do analito, a ser determinada, permaneça estável durante o decorrer do estudo. Nesse processo, a análise de variância (ANOVA) é o meio pelo qual é feito a determinação da existência de diferenças significativas entre os valores obtidos pelos laboratórios envolvidos (RIBEIRO et al., 2003). O ensaio de recuperação relaciona-se com a exatidão no sentido de refletir a quantidade de determinado analito, recuperado no processo, em relação à quantidade real presente na amostra. A recuperação se dá pelo processo de fortificação da amostra que consiste na adição de soluções com diferentes concentrações do analito de interesse seguida pela determinação da concentração do analito adicionado por meio da equação 25 (RIBEIRO et al., 2003).

$$Rec\ (\%) = \frac{\text{valor obtido} - \text{valor real}}{\text{valor real}} \text{ x } 100 \ \textbf{eq} \ (25)$$

Após a realização desse proceso deve-se realizar testes de significância através do teste "*t*" de Studenty conforme equação 26 (RIBEIRO et al., 2003):

$$t = \frac{Rec - 100}{\frac{S_{Rec}}{\sqrt{n-1}}} \ \textbf{eq} \ (26)$$

Onde, Rec é a média das recuperações obtidas para *n* repetições, 100 é a recuperação percentual desejada; *n* é o número de determinações (mínimo 5 repetições) e S_{Rec} é o desvio padrão das recuperações. O método será considerado exato se o valor obtido de *t* estiver dentro do intervalo estabelecido pelo valor tabelado para *n*-1 graus de liberdade em dado nível de significância (RIBEIRO et al., 2003).

1.23. Precisão

A precisão de um procedimento analítico expressa o grau de concordância entre uma série de medidas obtidas a partir da múltipla amostragem de uma amostra homogênea sob as condições prescritas, sendo estimada em três níveis distintos: a repetibilidade, a precisão intermediária e a reprodutibilidade (PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004, CHASIN et al., 1998). Geralmente é expressa como o desvio-padrão ou desvio-padrão relativo (coeficiente de variação) de uma série de medições (ROZET et al., 2007; RIBEIRO et al., 2003). O desvio padrão é definido pela equação 27 (RIBANI et al., 2004):

$$s = \sqrt{\frac{\sum(xi-\ddot{x})^2}{n-1}} \quad \textbf{eq (27)}$$

Onde, *xi* é a média aritmética de um pequeno número de medições, *ẍ* é o valor individual de uma medição e *n* é o número de medições. O desvio padrão relativo é dado pela equação 28 (RIBANI et al., 2004; RIBEIRO et al., 2003):

$$CV\% = \left(\frac{s}{\ddot{x}}\right) x\ 100 \quad \textbf{eq (28)}$$

Nesta equação S é o desvio padrão das recuperações e ẍ é a média das recuperações. A repetibilidade ou precisão intraensaio expressa a precisão nas mesmas condições de funcionamento ao longo de um curto intervalo de tempo sendo verificada por, no mínimo, 9 determinações, contemplando o intervalo linear do método, ou seja, 3 níveis de concentrações (baixa, média e alta) com 3 réplicas cada ou mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do teste (RIBANI et al., 2004). A precisão intermediária (intercorrida) expressa variações intralaboratórios: dias diferentes, diferentes analistas, diferentes equipamentos, etc. A reprodutibilidade expressa a precisão entre laboratórios, ou seja, estudos colaborativos geralmente aplicados à padronização de metodologias (PASCHOAL et al., 2008).

1.24. Robustez

O estudo da robustez visa verificar se o método é capaz de permanecer insensível a pequenas alterações propositais durante sua utilização mantendo, desta forma, constância na reprodução dos resultados face a mudanças nas condições operacionais de uso tais como: temperatura, pH, diferentes instrumentos e reagentes, diferentes dias, diferentes laboratórios e analistas, etc (PASCHOAL et al., 2008; RIBANI et al., 2004, RIBEIRO et al., 2003; CHASIN et al., 1998). A comprovação dessa capacidade do método de ser indiferente a essas variações durante seu uso atribui confiança ao método e aos resultados analíticos obtidos. Essa comprovação pode ser determinada pela análise individual ou simultâneas dos parâmetros mais sujeitos à variação através de experimentos estatísticos (RIBEIRO et al., 2003; CHASIN et al., 1998). Para metodologias baseadas em UHPLC os fatores que devem ser considerados durante a determinação da robustez são: variação do pH, composição e força iônica da fase móvel; concentração do solvente orgânico, colunas de diferentes tipos; volume de injeção, temperatura e fluxo da fase móvel. No que diz respeito ao preparo das amostras os fatores são a estabilidade das soluções analíticas e o tempo de extração (RIBANI et al., 2004; ANVISA, 2003; CHASIN et al., 1998).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho tem por objetivo desenvolver e validar um método de extração e quantificação de alcaloides aporfínicos da planta *Unonopsis duckei* R. E. Fr por meio de cromatografia líquida de ultra alta performance acoplada a espectrometria de massas sequencial. Para este propósito pretende-se também desenvolver um planejamento simplex-centroide cujo fim é a otimização da extração dos analitos a serem quantificados.

2.2 Objetivos específicos

- Desenvolver um planejamento experimental do tipo simplex-centroide com quatro componentes na otimização do solvente extrator para folhas da planta *U. duckei* R. E. Fr.
- Desenvolver um método de separação para os alcaloides aporfínicos anonaína, glaziovina, norglaucina e glaucina por meio de cromatografia líquida de ultra alta performance.
- Otimizar os parâmetros de voltagens do espectrômetro de massas como a transmissão e dissociação dos íons referentes aos analitos de interesse (alcaloides do item anterior) para o modo sequencial SRM.
- Aplicar o método desenvolvido para a quantificação dos analitos nas folhas de *U. duckei* R. E. Fr usando o melhor sistema extrator.
- Aplicar o método em uma amostra real do fitoterápico Envira.
- Realizar os ajustes matemáticos que definem o modelo em função das áreas de picos cromatográficos.
- Validar o método desenvolvido.

3 PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Reagentes

Os solventes utilizados no preparo dos extratos e nas análises cromatográficas em modo reverso de eluição estão relacionados na Tabela 6.

Tabela 6. Solventes utilizados no preparo dos extratos e nas análises cromatográficas.

SOLVENTE	MARCA	CARACTERÍSTICA	UTILIDADE
acetona	J. T. BAKER	GRAU PA ACS 99,5%	Preparo dos extratos de acordo com o SCD.
metanol	J. T. BAKER	GRAU PA ACS 99,5%	
n-hexano	J. T. BAKER	GRAU PA ACS 99,5%	
clorofórmio	J. T. BAKER	GRAU PA ACS 99,5%	
metanol	J. T. BAKER	GRAU HPLC 99,9%	Análise cromatográfica em fase reversa.
acetonitrila	J. T. BAKER	GRAU HPLC 99,9%	
água pura	--------	Milli-Q	

3.2 Obtenção do material botânico da planta *Unonopsis duckei* R. E. Fr

As amostras de partes aéreas (folhas) da espécie *U. duckei* utilizadas no desenvolvimento deste estudo são oriundas da Reserva Florestal Adolpho Ducke (Km 26 da rodovia AM-010) e foram gentilmente cedidas pelo pesquisador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). O material botânico foi seco em estufa de circulação de ar à 40ºC durante dois dias, sendo, em seguida, trituradas em moinho de quatro facas e pesadas.

3.3 Dados gravimétricos do material botânico da planta *Unonopsis duckei* R. E. Fr

Os dados gravimétricos do material botânico referente às partes aéreas da espécie *U. duckei* estão relacionados na Tabela 7. Para a obtenção desses dados enumerou-se 23 frascos e, em seguida, de forma aleatória, utilizando luvas de procedimentos, efetuou-se a pesagem de cerca de 1,0000g de amostra para posterior extração com as soluções preparadas de acordo com o planejamento experimental simplex-centroide (SCD).

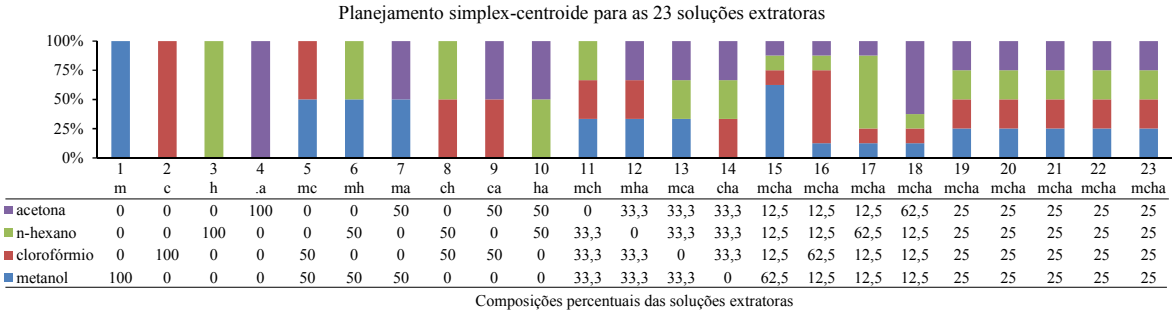
Tabela 7. Dados gravimétricos do material botânico da planta *U. duckei*.

Frascos	Ordem aleatória de pesagem	Massa do Frasco vazio (g)	Massa do frasco + amostra bruta (g)	Massa da amostra bruta (g)
1	5	70,9736	71,9869	1,0133
2	19	71,2407	72,2554	1,0147
3	3	70,2589	71,2736	1,0147
4	15	70,3287	71,3433	1,0146
5	20	71,0019	72,0165	1,0146
6	1	70,2533	71,2686	1,0153

7	9	71,1242	72,1395	1,0153
8	8	70,6469	71,6617	1,0148
9	22	70,4594	71,4773	1,0179
10	4	70,1222	71,1383	1,0161
11	2	70,7858	71,8038	1,0180
12	12	71,3830	72,3982	1,0152
13	18	70,5420	71,5550	1,0130
14	21	70,4163	71,4356	1,0193
15	6	70,2896	71,3067	1,0171
16	16	70,4058	71,4231	1,0173
17	7	70,8103	71,8241	1,0138
18	10	70,6939	71,7113	1,0174
19	11	69,8162	70,8314	1,0152
20	17	70,2507	71,2703	1,0196
21	13	70,2126	71,2274	1,0148
22	23	71,0292	72,0435	1,0143
23	14	70,2305	71,2469	1,0164

3.4 Planejamento experimental das soluções extratoras

Para o preparo das soluções extratoras desenvolveu-se um planejamento SCD modificado com quatro componentes: acetona (a), clorofórmio (c), n-hexano (h) e metanol (m). Este planejamento resultou em 23 soluções extratoras distintas. Todas as combinações em termos de proporções para cada ponto estão representadas na Figura 13.



	1 m	2 c	3 h	4 .a	5 mc	6 mh	7 ma	8 ch	9 ca	10 ha	11 mch	12 mha	13 mca	14 cha	15 mcha	16 mcha	17 mcha	18 mcha	19 mcha	20 mcha	21 mcha	22 mcha	23 mcha
acetona	0	0	0	100	0	0	50	0	50	50	0	33,3	33,3	33,3	12,5	12,5	12,5	62,5	25	25	25	25	25
n-hexano	0	0	100	0	0	50	0	50	0	50	33,3	0	33,3	33,3	12,5	12,5	62,5	12,5	25	25	25	25	25
clorofórmio	0	100	0	0	50	0	0	50	50	0	33,3	33,3	0	33,3	12,5	62,5	12,5	12,5	25	25	25	25	25
metanol	100	0	0	0	50	50	50	0	0	0	33,3	33,3	33,3	0	62,5	12,5	12,5	12,5	25	25	25	25	25

Figura 13. Representação em gráfico de barras do planejamento SCD das 23 soluções extratoras. Cada ponto foi preparado aleatoriamente de acordo com a seguinte ordem: 2, 1, 3, 4, 6, 7, 10, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 11, 12, 14, 5, 8, 9, 16. Legenda: **a** – acetona, **h** – n-hexano, **c** – clorofórmio, **m** – metanol.

3.5 Preparo dos extratos

Os 23 extratos de *U. duckei* foram preparadas pesando-se cerca 1,0000g do material botânico previamente seco e triturado adicionando-se, em seguida, 20 mL de solução extratora preparadas segundo o SCD. Cada mistura foi submetida a banho ultrassônico por 15 minutos ficando, em seguida, em repouso por 48 horas. Após o repouso foram filtradas em filtro de fibra de vidro e transferidos para frascos limpos. Os solventes em cada frasco foram evaporados usando gás nitrogênio. As massas dos extratos secos foram aferidas e registradas na Tabela 8.

Tabela 8. Dados gravimétricos em ordem decrescente de percentual de rendimento dos extratos secos.

Ordem	Massa (g)	Extrato seco (g)	Rendimento (%)
5	1,0133	0,0702	6,928
9	1,0153	0,0636	6,264
6	1,0171	0,0519	5,103
18	1,013	0,0509	5,025
1	1,0153	0,0441	4,344
20	1,0146	0,0415	4,090
12	1,0152	0,0412	4,058
16	1,0173	0,0400	3,932
2	1,018	0,0396	3,890
11	1,0152	0,0389	3,832
13	1,0148	0,0387	3,814
23	1,0143	0,0373	3,677
17	1,0196	0,0358	3,511
14	1,0164	0,0341	3,355
7	1,0138	0,0318	3,137
22	1,0179	0,0249	2,446
10	1,0174	0,0223	2,192
19	1,0147	0,0222	2,188
4	1,0161	0,0213	2,096
8	1,0148	0,0206	2,030
21	1,0193	0,0205	2,011
15	1,0146	0,0200	1,965
3	1,0147	0,0040	0,394

3.6 Preparo das soluções para as análises exploratórias e quantitativas

Foram preparadas 23 soluções metanólicas de concentração 1 mg/mL referente as massas dos extratos obtidas a partir das soluções extratoras. Essas soluções foram filtradas utilizando-se filtro de membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, 0,45 μm) e transferidas para frascos pequenos sendo, em seguida, armazenadas em geladeira a 5 °C para posterior análise.

A Figura 14 é um esquema de todo o processo envolvido nas preparações dos pontos desde a pesagem até as soluções para análises.

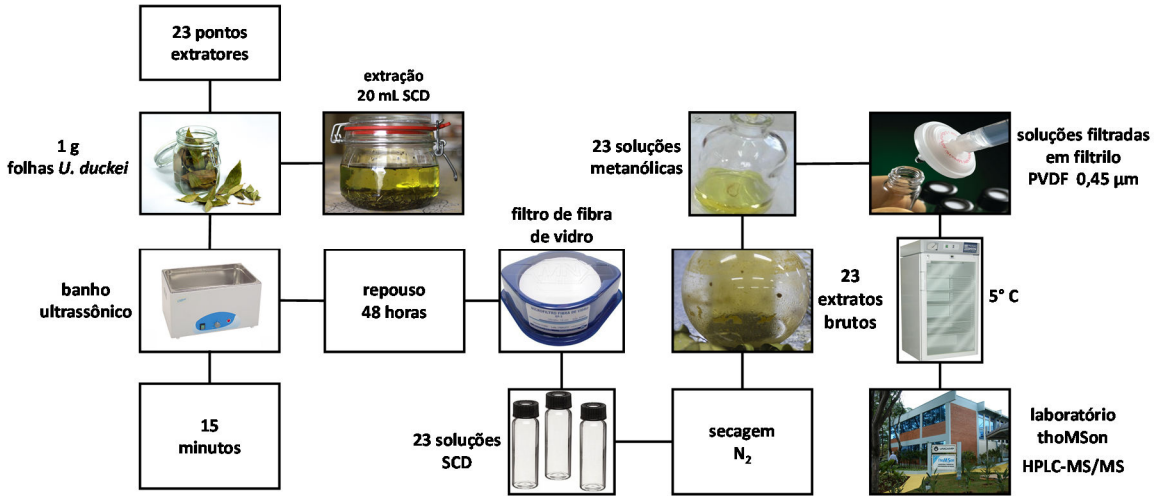


Figura 14. Preparo dos 23 pontos segundo as massas obtidas de acordo com SCD para análise UHPLC-MS/MS.

3.7 Análises exploratórias e quantitativas

As análises exploratórias iniciais foram realizadas via UHPLC acoplada a MS utilizando-se um sistema de UHPLC-MS A6550 iFunnel^{TM} (Agilent), consistindo de um cromatógrafo líquido de ultra alta performance, um espectrômetro de massas de alta resolução com uma fonte de ESI operando no modo positivo de polaridade. O espectrômetro utilizado possui geometria do tipo quadrupolo-tempo-de-voo (Q-TOF). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se uma coluna de sílica fase reversa (C18, Poroshell 120EC-C18, 4.6 mm x 50 mm, 2.7 µm) e acetonitrila como fase móvel. As análises quantitativas foram realizadas em um sistema 8040 de UHPLC-MS/MS da Shimadzu (1040) constituído de um cromatógrafo de ultra-alta performance e um espectrômetro de massas com geometria do tipo triplo-quadrupolo (QqQ). A técnica de ionização foi a ESI e os parâmetros de ionização adaptados das análises exploratórias. A separação dos compostos foi realizada em uma coluna C18 Shimpack (2.0 mm x 50 mm, 2.2 µm). Foram utilizados os solventes água (Milli-Q) e acetonitrila grau HPLC para as separações. As identificações foram realizadas por meio da comparação com padrões puros dos alcaloides de interesse. Tanto as análises exploratórias quanto as quantitativas foram feitas no laboratório Thomson de espectrometria de massas da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) sob a coordenação do Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

3.8 Preparo das soluções padrões para construção das curvas analíticas para o estudo da linearidade, exatidão e precisão.

Para a construção das curvas analíticas foram preparadas soluções estoques de 1 mL de volume a partir de padrões puros dos alcaloides anonaína, glaziovina, norglaucina e glaucina. A concentração dessa solução foi de 1mg/mL e o solvente metanol. A faixa de concentração da curva abrangeu o intervalo de 10 ng L^{-1} a 1000 ng L^{-1}. As soluções foram preparadas a partir de diluições conforme especificado na Tabela 9.

Tabela 9. Volumes extraídos das soluções estoques para o preparo das soluções da faixa de concentração da curva analítica.

Alcaloides	Solução Estoque	Volumes em µL extraído da Solução Estoque					
		10 ng L^{-1}	25 ng L^{-1}	50 ng L^{-1}	250 ng L^{-1}	500 ng L^{-1}	1000 ng L^{-1}
anonaína	1mg/mL	0,01	0,025	0,05	0,25	0,5	1
glaziovina	1mg/mL	0,01	0,025	0,05	0,25	0,5	1
norglaucina	1mg/mL	0,01	0,025	0,05	0,25	0,5	1
glaucina	1mg/mL	0,01	0,025	0,05	0,25	0,5	1
Volume de metanol µL		**999,99**	**999,975**	**999,95**	**999,75**	**999,50**	**999,00**

Preparou-se, em seguida, uma solução metanólica 1mg/mL a partir do extrato seco das folhas de *U. duckei* correspondente ao ponto do SCD cuja solução extratora foi metanol 100%. A 990 µL desta solução adicionou-se 10 µL dos padrões para cada nível de concentração. As soluções finais foram homogeneizadas e filtradas com membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF, 0,45 µm). As análises foram realizadas em triplicata e o volume injetado no cromatógrafo foi de 10 µL.

3.9 Otimização dos parâmetros instrumentais do UHPLC

A otimização das condições cromatográficas para a presente metodologia está especificada na Tabela 10.

Tabela 10. Otimizações instrumentais utilizados na corrida cromatográfica das análises quantitativas.

Coluna	Modelo: Ascentis Express RP-AMIDE 15 cm x 2.1 mm, 2.7 um (SUPELCO). Temperatura: 30° C Fluxo de compensação de calor: 0,5000 mL /min Corrida cromatográfica: 15 min Modo gradiente: H_2O/ACN: 0-10min: 70% ; 10-12min: 100% ; 12-15min: 30%
ESI	Tensão capilar: 3,5 kV; Temperatura do bloco de calor: 250 °C;

Temperatura da linha de dessolvação, 250 °C;
Fluxo de gás de secagem (N_2): 15 L / min;
Fluxo de gás de nebulização (N_2): 3 L / min;
Gás de colisão induzida por dissociação (Ar): 224 kPa.

Os parâmetros referentes a MS foram otimizados de forma automatizada pelo software LabSolutions v.5.53 SP2, sendo eles a voltagem do quadrupolo de seleção Q1 (V), a energia de colisão (Ev), a voltagem do quadrupolo de seleção Q3 e o tempo de monitoramento de cada transição (do inglês, *dwell time*) conforme visualizado na Tabela 11.

Tabela 11. Otimização das transições SRM (Tensão pré-polarização (V) Q1, Tensão pré-polarização Q3 (V) e energia de colisão (V)).

Composto	**Precursor (*m/z*)**	**Transição (*m/z*)**	***dwell time***	**Q1 (V)**	**CE (V)**	**Q3 (V)**
Anonaína	266	249[a)]	100 ms	-27	-14	-30
Glaziovina	398	267[b)]	100 ms	-30	-16	-20
		235[c)]	100 ms	-20	-20	-27
Norglaucina	342	325	100 ms	-23	-10	-18
		294	100 ms	-16	-21	-16
Glaucina	356	325	100 ms	-24	-16	-25
		294	100 ms	-24	-23	-22

a) Transição única da anonaína, independente da energia de colisão, utilizada tanto para a qualificação quanto para a quantificação. **b)** Para cada alcaloide as transições com maior *m/z* são utilizadas na qualificação. **c)** Para cada alcaloide as transições com menor *m/z* são utilizadas na quantificação.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Planejamentos experimentais simplex-centroide

Experimentos com misturas ME (do inglês, *mixture experiments*) fazem parte de uma ciência maior denominada Design of Experiments (DOE) que é um dos pilares da quimiometria. Na literatura é comum encontrar publicações diversas cuja metodologia quimiométrica para extração, caracterização e quantificação de produtos naturais se fundamenta em experimentos com misturas. (CHEONG et al., 2016; PAULI et al., 2016; WEI et al., 2015; SOARES et al., 2012; BERTOL et al., 2011; SOARES et al., 2009; DELAROZA & SCARMINIO, 2008; SOARES et al., 2008; SOARES et al., 2007). Sabe-se que em processos de extração o rendimento do extrato bruto está mais relacionado às proporções com as quais os solventes extratores estão misturados (GARCIA et al., 2010). Neste sentido, em processos de extração de produtos naturais, são ideais a utilização de experimentos que possibilitam a investigação das interações sinérgicas ou antagônicas entre diferentes solventes extratores (GARCIA et al., 2010).

A metodologia de planejamentos do tipo simplex-centroide design (SCD) é um segmento do ME onde os componentes que compõem uma mistura estão combinados entre si em proporções iguais de acordo com as restrições impostas pelas equações 1 e 2 descritas na introdução desta dissertação e tendo na equação 3 a condição determinante do número de experimentos a ser realizado para a análise pretendida. Os resultados descritos a seguir são consequentes de um cuidadoso planejamento experimental SCD idealizado para otimizar o processo de extração e quantificação de alcaloides aporfínicos encontradas em partes aéreas da espécie botânica *Unonopsis duckei* R. E. Fr *(U. duckei)*.

4.2 Resultados do Planejamento Simplex-Centroide Design

A Tabela 12 resume os dados experimentais obtidos a partir das soluções extratoras preparadas conforme o planejamento SCD descrito na sessão 3.4. O processo de identificação e quantificação foi realizado nas condições experimentais descritas na sessão 3.7.

Tabela 12. Proporções entre as soluções extratoras, áreas dos picos cromatográficos (dividido por 1000) dos alcaloides de interesse e seus respectivos percentuais de rendimento em termos de extrato seco.

Amostras	metanol	Clorofórmio	n-hexano	acetona	anonaína	glaziovina	norglaucina	glaucina	Rendimento
1	100	0	0	0	77,030	45,390	436,885	1284,023	4,3
2	0	100	0	0	7,696	9,042	14,692	44,163	3,9
3	0	0	100	0	7,247	16,660	14,972	19,908	0,4
4	0	0	0	100	5,942	5,645	18,493	14,935	2,1
5	50	50	0	0	88,077	58,913	570,706	1836,909	6,9
6	50	0	50	0	37,793	26,069	237,988	885,089	5,1
7	50	0	0	50	50,180	20,604	335,974	1562,757	3,1
8	0	50	50	0	5,201	7,055	17,079	12,332	2,0
9	0	50	0	50	7,881	10,935	31,611	111,792	6,3
10	0	0	50	50	11,900	10,425	30,131	126,639	2,2
11	33,3	33,3	33,3	0	36,939	22,432	323,102	1168,317	3,8
12	33,3	33,3	0	33,3	22,145	11,489	163,895	597,821	4,1
13	33,3	0	33,3	33,3	34,608	21,590	207,014	992,604	3,8
14	0	33,3	33,3	33,3	4,887	7,701	19,574	36,251	3,4
15	62,5	12,5	12,5	12,5	29,176	13,642	189,422	663,029	2,0
16	12,5	62,5	12,5	12,5	26,575	18,051	154,434	358,940	3,9
17	12,5	12,5	62,5	12,5	19,025	12,016	127,287	727,857	3,5
18	12,5	12,5	12,5	62,5	14,958	13,386	100,337	355,676	5,0
19	25	25	25	25	25,994	12,025	123,443	593,512	2,2
20	25	25	25	25	26,662	21,008	214,115	815,442	4,1
21	25	25	25	25	24,801	21,773	288,674	1249,216	2,0
22	25	25	25	25	25,163	11,470	200,019	811,600	2,4
23	25	25	25	25	21,809	11,026	183,000	599,106	3,7

A Figura 15 é a representação gráfica da distribuição percentual em ordem decrescente de rendimento dos 23 extratos da planta *U. duckei*.

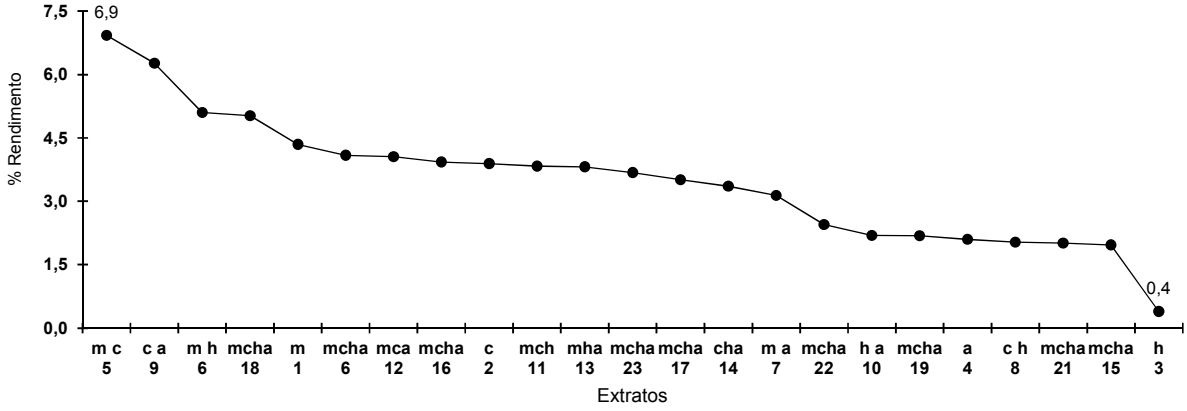


Figura 15. Percentual de rendimento em ordem decrescente obtidos dos extratos de *U. duckei* de acordo com o SCD. Legenda: **m –** metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona. As amostras 5 e 3 destacam-se com o maior e menor percentual de rendimento respectivamente.

Dos 23 extratos as amostras 5 e 9, extraídas com as misturas binárias metanol/clorofórmio e clorofórmio/acetona respectivamente, apresentaram os maiores rendimentos enquanto que a amostra 3, extraída com o solvente puro n-hexano, apresentou o menor rendimento. Para os quatro alcaloides plotou-se em dois gráficos (para facilitar a visualização dos dados) a distribuição dos resultados em função das áreas dos picos cromatográficos. O primeiro gráfico (Figura 16) é a representação gráfica das distribuições dos picos dos alcaloides anonaína e glaziovina.

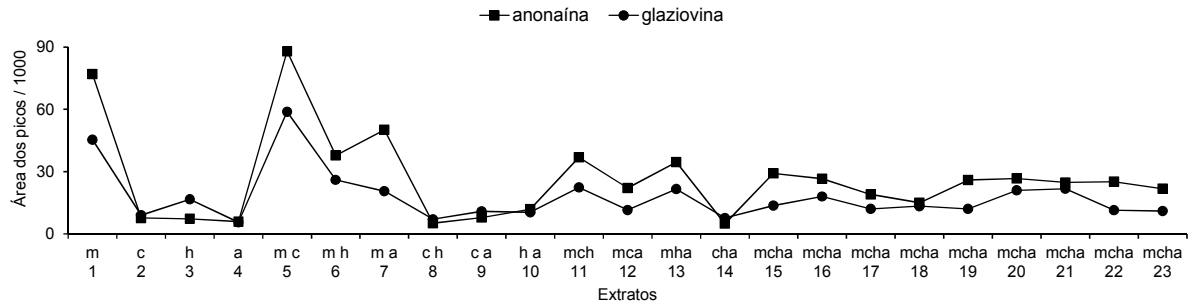


Figura 16. Distribuição dos picos cromatográficos da anonaína e glaziovina obtidos dos extratos de *U. duckei* a partir do planejamento SCD. Para esses alcaloides a magnitude das áreas dos picos é aproximadamente a mesma. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

Nesta figura a similaridade entre as distribuições desses alcaloides indicam que seus respectivos planejamentos possuem capacidade extratora aproximadamente iguais. O ponto 5, extraído com a mistura binária metanol/clorofórmio, foi o ponto que apresentou a maior área de pico para ambos alcaloides. No planejamento da anonaína as replicatas apresentam um comportamento mais uniforme e no planejamento da glaziovina, as replicatas 20 e 21 apresentaram valores mais elevado dos que as outras. O segundo gráfico (Figura 17) é a

representação gráfica da distribuição das áreas dos picos cromatográficos para os alcaloides norglaucina e glaucina.

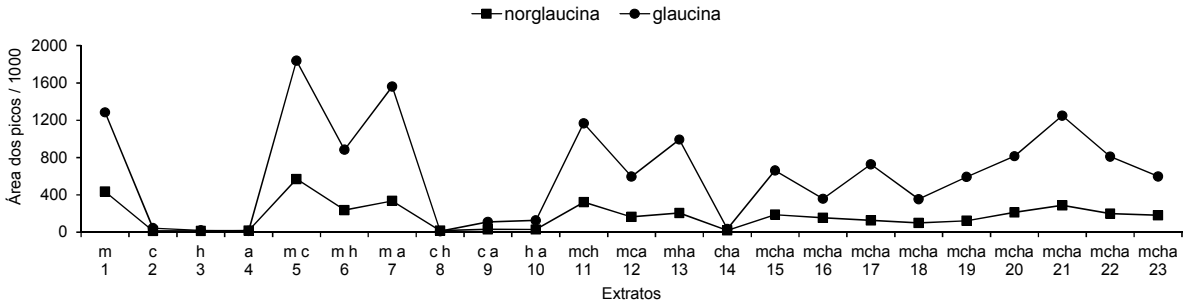


Figura 17. Distribuição dos picos cromatográficos da norglaucina e glaucina obtidos dos extratos de *U. duckei* a partir do planejamento SCD. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

Para estes alcaloides, em termos quantitativos, as áreas dos picos indicam que seus planejamentos, especialmente o da glaucina, foram os que apresentaram maior poder de extração. Nota-se uma similaridade entre suas respectivas distribuições, até mesmo entre o comportamento das replicatas sendo que a amostra 21, quando comparada às demais, apresenta valores maiores.

Testou-se os modelos linear, quadrático e cúbico especial para o rendimento e áreas dos picos. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para avaliar a significância estatística e a falta de ajuste na validação dos modelos testados. O erro padrão foi estimado pelo erro experimental determinado pelas cinco replicatas no ponto central.

4.2.1 Rendimento

Para os dados de rendimento em termo de extrato bruto constatou-se, a nível de 95% de confiança, falta de significância estatística para todos os modelos testados. Desta forma, não é possível fazer previsões a partir desses dados. A média e o desvio padrão dos rendimentos entre as amostras é de 2,88 e 0,93 respectivamente. Para 8 das 23 amostras (como por exemplo as amostras 10,15, 19, 20 e 21) o valor da média é superior ao valor do rendimento obtido por seus respectivos planejamentos. Para as amostras de 11 a 14 (misturas ternárias do planejamento) o desvio padrão é superior ao desvio entre esses pontos. O ponto 5 (mistura binária metanol/clorofórmio) apresentou o maior rendimento enquanto o ponto 3 (solvente puro n-hexano) apresentou o menor rendimento extraindo uma quantidade inferior a 0,004 g em 1,0 g de folhas. Para os alcaloides de interesse não existe uma relação direta entre o rendimento e o poder de extração, ou seja, as amostras com maior rendimento não necessariamente apresentam

maiores quantidades para todos os alcaloides. Por exemplo, conforme a Figura 15 a amostra 9 (mistura binária clorofórmio/acetona) apresenta o segundo maior rendimento. Utilizando-se a anonaína como referência nota-se que desse alcaloide a amostra 9 extrai uma quantidade inferior às amostras com menor rendimento.

4.2.2 Anonaína

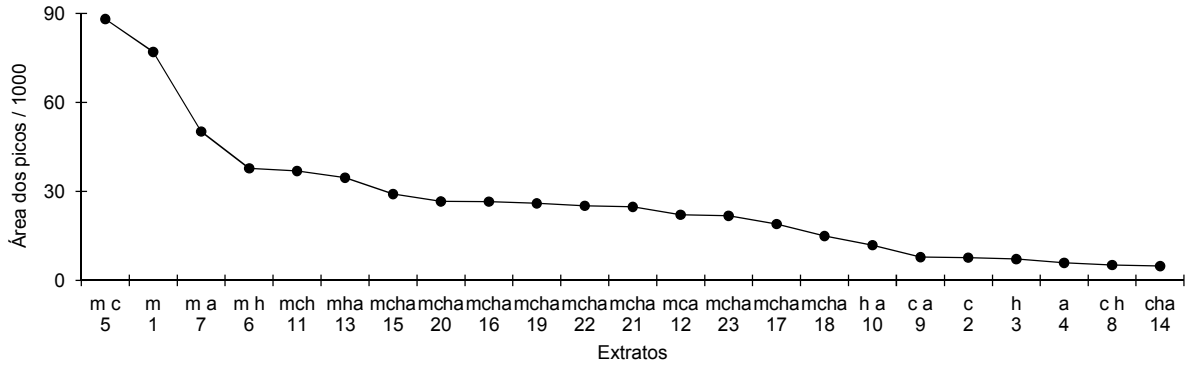


Figura 18. Distribuição dos picos de área cromatográficos da anonaína em ordem decrescente. Quanto mais alto o pico maior o poder de extração da solução extratora. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

Para a anonaína, embora todos os modelos tenham sido significativos houve falta de ajuste a nível de 95% de confiança. De acordo com a distribuição dos picos cromatográficos da anonaína (Figura 18) pode-se fazer as seguintes observações: dentre os 23 pontos, a mistura binária metanol/clorofórmio (amostra 5) apresenta a maior capacidade extratora devido a interação sinérgica entre si. Dentre os solventes puros, o metanol (amostra 1) apresenta a maior capacidade de extração enquanto que a menor capacidade é apresentada pela a acetona, porém, com magnitude próxima a do clorofórmio e do n-hexano. A mistura ternária clorofórmio/n-hexano/acetona (amostra 14) apresenta um efeito antagônico às demais misturas apresentando a menor capacidade de extração.

4.2.3 Glaziovina

Para a glaziovina escolheu-se o modelo cúbico especial devido à significância de um termo de interação ternário. Para os dados desse alcaloide a equação 29 foi ajustada com os termos lineares e apenas com os coeficientes de interação que se mostraram significativos a nível de 95% de confiança.

$$Gz = \mathbf{41,42m} + 10,17c + 16,61h + 7,22a + \mathbf{123,22mc - 532,59mca}\ \mathbf{eq}\ (29)$$
$$(\mp 7,08) \quad (\mp 7,08) \quad (\mp 7,08) \quad (\mp 7,08) \quad (\mp 35,40) \quad (\mp 221,615)$$

Os termos destacados em negrito são significativos a nível de 95% de confiança. A validação do modelo se deu através da análise de variância e os dados estão resumidos na Tabela 13. Para o ajuste da glaziovina o coeficiente de determinação (R^2) foi de 0,85.

Tabela 13. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial às áreas de pico da glaziovina.

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F*calculado
Modelo	2887,06	13	222,08	4,1941
Resíduos	476,63	9	52,95	
Falta de ajuste	358,62	5	71,72	2,4311
Erro puro	118,01	4	29,50	
Total	3363,70	22	152,89	

* Valor de F para significância do modelo dado por MQ_R/MQ_r e para falta de ajuste MQ_{faj}/MQ_{ep}. Valores críticos de F correspondentes no nível de 95% de confiança são $F_{13,9}$= 3,04 e $F_{5,4}$ = 6,25.

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 2,43, o valor da distribuição F com 5 e 4 graus de liberdade é 6,25 a nível de 95% de confiança. Uma vez que o valor de F tabelado é muito maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} pode-se afirmar que não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. O modelo foi considerado significativo uma vez que o valor de 4,19 da razão MQ_R/MQ_r é maior que o valor de 3,04 da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (13 e 9) a nível de 95% de confiança. A determinação do R^2 é obtida pela razão SQ_R/SQ_T.

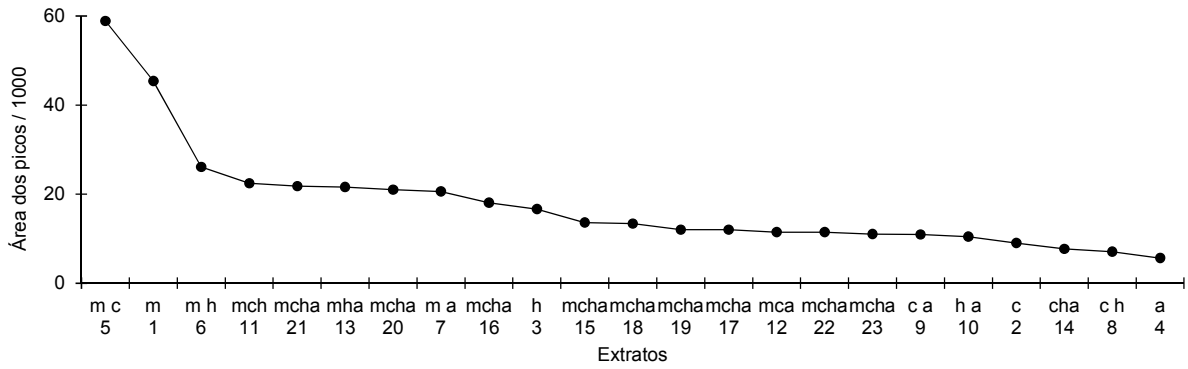


Figura 19. Distribuição das áreas de picos cromatográfico da glaziovina em ordem decrescente. Quanto mais alto o ponto maior o poder de extração da solução extratora. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

A Figura 19 é uma representação gráfica da distribuição dos picos em ordem decrescente de capacidade extratora. A equação do modelo cúbico especial mostra, conforme pode-se observar nesta figura, que somente o coeficiente linear do metanol é significativo. Entre as misturas binárias a única que ocorre com sinergismo é a mistura metanol/clorofórmio (amostra 5). A mistura ternária entre os solventes metanol, clorofórmio e acetona (amostra 12) apresenta um coeficiente de interação significativo, porém com efeito antagônico diminuindo em 19,33 a quantidade de glaziovina. A equação 30 evidencia que para a glaziovina a melhor capacidade extratora se dá com a mistura metanol/clorofórmio e alternativamente a esta mistura pode-se utilizar também o solvente metanol puro.

$$Gz = 41{,}42(1/2) + 10{,}17\ (1/2) + 123{,}22\ (1/2)(1/2) = 56{,}6 \textbf{ eq} \quad (30)$$

Para esta equação o valor previsto de 56,6 está em concordância com o valor experimental de 58,91 evidenciando o bom ajuste do modelo. Na Figura 20 estão representadas as curvas de nível para este ajuste.

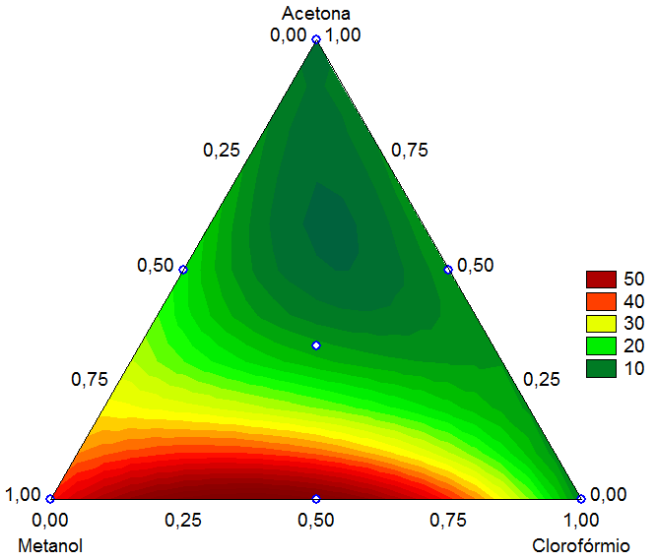


Figura 20. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da glaziovina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões.

As curvas representadas nesta figura concordam com a equação 29 indicando que a melhor capacidade de extração da glaziovina é obtida pela mistura binária metanol/clorofórmio em proporção 1:1. Observa-se ainda que a adição do solvente acetona a esta mistura produz um decréscimo (efeito de interação antagônico) na resposta cromatográfica.

4.2.4 Norglaucina

Para a norglaucina, o modelo quadrático apresentou um significativo termo de interação a nível de 95% de significância, no entanto, o modelo cúbico especial apresentou um termo de interação ternário próximo ao limite de significância sendo por isso, ignorados do modelo todos os termos binários e ternários cujos coeficientes eram inferiores ao próprio erro padrão. Escolheu-se, portanto, o modelo cúbico especial (equação 31) por apresentar um melhor ajuste e por adicionar um termo significativo a mais do que o modelo quadrático.

$$Ng = \underset{(\mp 46,81)}{\boldsymbol{433,44m}} + \underset{(\mp 46,81)}{22,50c} + \underset{(\mp 40,35)}{39,62h} + \underset{(\mp 42,62)}{65,55a} + \underset{(\mp 267,11)}{\boldsymbol{1308,44mc}} \underset{(\mp 1501,30)}{\boldsymbol{- 3385,28mca}} \quad \text{eq (31)}$$

Os termos destacados em negrito são significativos a nível de 95% de confiança. Os dados da validação (ANOVA) referente as áreas dos picos da norglaucina estão resumidos na Tabela 14. Para o ajuste deste modelo o R^2 foi de 0,87.

Tabela 14. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial às alturas de pico da substância Norglaucina.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média Quadrática	Fcalculado*
Modelo	409064,0	5	81812,80	22,5153
Resíduos	61772,1	17	3633,65	
Falta de ajuste	47576,9	13	3659,76	1,0313
Erro puro	14195,2	4	3548,79	
Total	470836,1	22	21401,64	

* Valor de F para significância do modelo dado por MQ_R/MQ_r e para falta de ajuste MQ_{faj}/MQ_{ep}. Valores críticos de F correspondentes no nível de 95% de confiança são $F_{5,17}$= 2,81 e $F_{13,4}$ = 5,89.

O valor da razão da MQ_{faj}/MQ_{ep} é 1,03, o valor da distribuição F com 13 e 4 graus de liberdade é 5,89 a nível de 95% de confiança. Uma vez que o valor de F tabelado é muito maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} pode-se afirmar que não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. O modelo foi considerado significativo uma vez que o valor de 22,51 da razão MQ_R/MQ_r é maior que o valor de 2,81 da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (5 e 17) a nível de 95% de confiança. Para este ajuste o R^2 é calculado pela razão SQ_R/SQ_T.

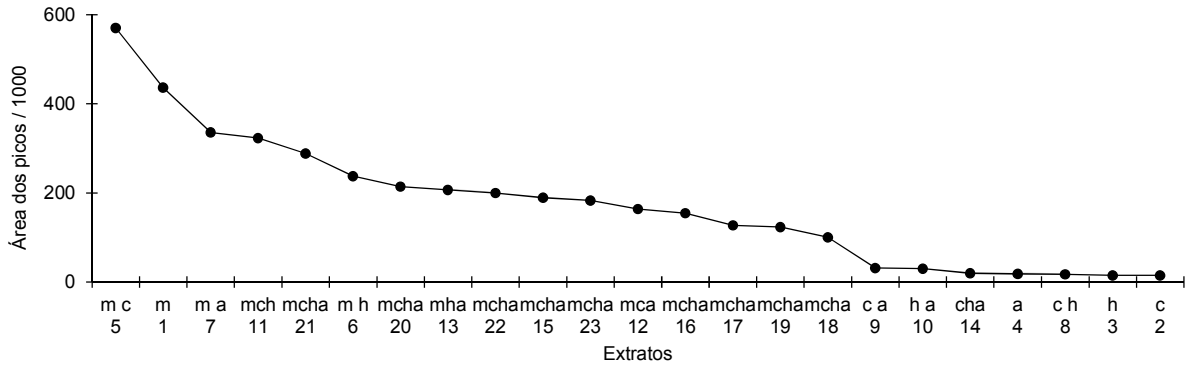


Figura 21. Distribuição das áreas de pico cromatográficos da norglaucina em ordem decrescente. As amostras 5 e 1 apresentaram maior capacidade de extração. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

A Figura 21 é a representação gráfica da distribuição dos picos em ordem decrescente de capacidade extratora para a norglaucina. Para este alcaloide, dentre os solventes puros e de acordo com a equação 30, apenas o metanol (amostra 1) se mostrou significativo a nível de 95% com uma área de pico estimada de 433,44. Semelhante aos demais planejamentos, a mistura metanol/clorofórmio (amostra 5) apresenta a melhor resposta extratora, e caso esta mistura seja associada ao solvente acetona também observa-se um efeito de interação ternária antagônico. Para este modelo, a área de pico prevista de 555,08 (equação 32) para a amostra 5 é concordante com o valor 570,7 obtido experimentalmente.

$$Ng = 433,44(1/2) + 22,50(1/2) + 1308,44(1/2)\ (1/2)\ \textbf{eq}\ (32)$$

Na Figura 22 estão representadas as curvas de nível para o ajuste do modelo da norglaucina.

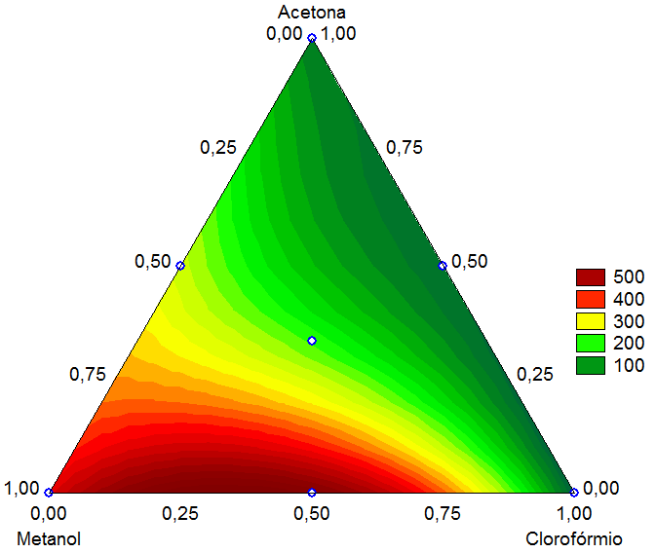


Figura 22. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da norglaucina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões.

A análise visual das curvas representadas na figura evidencia a mistura binária metanol/clorofórmio com a maior capacidade de extração para a norglaucina e, semelhante a glaziovina pode-se utilizar o solvente metanol puro como um meio alternativo de extração.

4.2.5 Glaucina

Para a glaucina, o modelo quadrático apresentou dois termos significativos de interação a nível de 95% de significância sendo um linear e o outro binário. Para o mesmo nível de significância, o modelo cúbico especial apresentou um termo de interação binário e, além dos dois termos do modelo quadrático, apresentou um termo ternário próximo ao limite de significância. A equação 33 expressa o modelo cúbico especial para a glaucina ignorando todos os termos binários e terciários não significativos, ou seja, aqueles cujos coeficientes eram muito inferiores ao próprio erro padrão.

$$G = \underset{(\mp 226,94)}{\boldsymbol{1220,1m}} + \underset{(\mp 202,64)}{41,8c} + \underset{(\mp 174,50)}{288,5h} + \underset{(\mp 202,64)}{75,9a} + \underset{(\mp 1165,7)}{\boldsymbol{4720,5mc}} + \underset{(\mp 1165,7)}{\boldsymbol{3516,0ma}} \underset{(\mp 7006,7)}{\boldsymbol{-17014,8mca}} \quad \textbf{eq (33)}$$

A validação do modelo resultou em um coeficiente de determinação de 0,82 e os dados relativos a análise de variância estão resumidos na Tabela 15.

Tabela 15. Análise da variância para o ajuste do modelo cúbico especial aplicado às áreas de pico do alcaloide glaucina.

Fonte de Variação	Soma quadrática	Graus de liberdade	Média quadrática	F*calculado
Modelo	5116155	6	852692,4	12,6131
Resíduos	1081580	16	67598,7	
Falta de ajuste	797365	12	66447,1	0,9351
Erro puro	284215	4	71053,8	
Total	6197734	22	281715,2	

* Valor de F para significância do modelo dado por MQ_R/MQ_r e para falta de ajuste MQ_{faj}/MQ_{ep}. Valores críticos de F correspondentes no nível de 95% de confiança são $F_{6,16}$= 2,74 e $F_{12,4}$ = 5,91.

O valor da razão MQ_{faj}/MQ_{ep} é 0,93, o valor da distribuição F com 12 e 4 graus de liberdade é 5,91 a nível de 95% de confiança. Uma vez que o valor de F tabelado é muito maior que a razão MQ_{faj}/MQ_{ep} pode-se afirmar que não há indicação de falta de ajuste para o modelo cúbico especial. O modelo foi considerado significativo uma vez que o valor de 12,61 da razão MQ_R/MQ_r é muito maior que o valor de 2,74 da distribuição F com o mesmo número de graus de liberdade (6 e 16) a nível de 95% de confiança. Para este ajuste o R^2 é 0,82 e é calculado pela razão SQ_R/SQ_T.

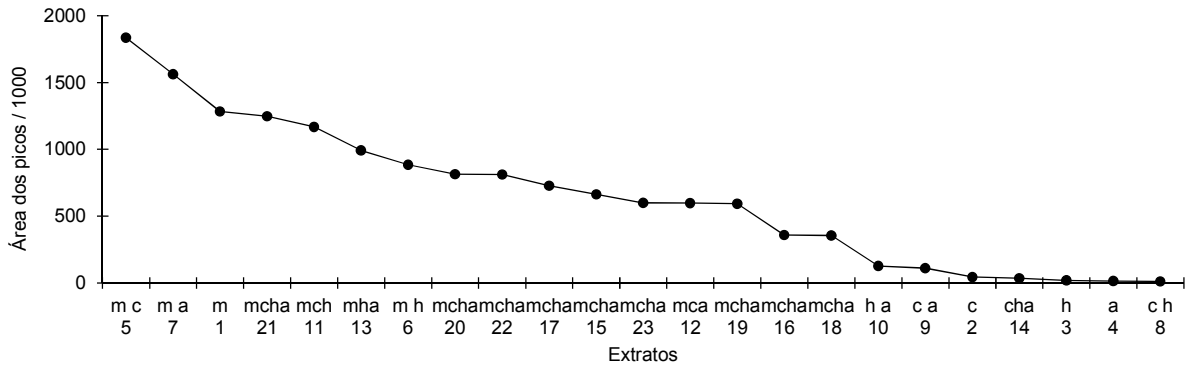


Figura 23. Distribuição dos picos cromatográficos da glaucina em ordem decrescente. As amostras 5 e 7 apresentaram maior capacidade de extração. Legenda: **m** – metanol, **c** – clorofórmio, **h** – n-hexano, **a** – acetona.

A Figura 23 é a representação gráfica da distribuição dos picos em ordem decrescente de capacidade extratora para a glaucina. A equação 34 evidencia que dos quatro coeficientes lineares apenas o metanol (amostra 1) é significativo e que, conforme pode-se observar na Figura 23 (amostras 5 e 7), este solvente interage sinergicamente com os solventes clorofórmio e acetona. Semelhante aos planejamentos dos demais alcaloides a interação ternária entre esses solventes provoca um efeito de interação antagônico na resposta instrumental para glaucina o que acarreta em uma menor capacidade de extração. Para a mistura binária metanol/clorofórmio

a área de pico prevista foi 1811,08 (equação 35) enquanto que para a mistura metanol/acetona foi de 1527,0 (equação 36). A redução da área de pico para 730,92 (equação 37) evidencia o efeito antagônico para a interação ternária entre esses solventes.

$$G_{(mc)} = 1220,1(1/2) + 41,8(1/2)\ 4720,5(1/2)(1/2)$$ **eq** (35)

$$G_{(ma)} = 1220,1(1/2) + 75,9(1/2) + 3516,0(1/2)(1/2)$$ **eq** (36)

$$G_{(mca)} = 1220,1(1/3) + 41,8(1/3) + 75,9(1/3) + 4720,5(1/3)(1/3) + 3516,0(1/3)(1/3) - 17014,8(1/3)(1/3)(1/3)$$ **eq** (37)

Na Figura 24 estão representadas as curvas de nível para o modelo cúbico especial aplicado as áreas de pico da glaucina.

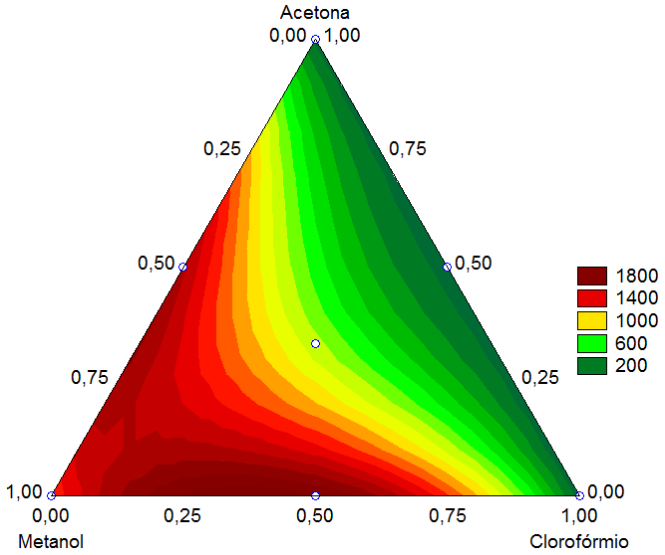


Figura 24. Superfície de resposta para os componentes metanol, clorofórmio e acetona, aplicada às áreas dos picos da glaucina. O componente n-hexano foi igualado a zero para representar a superfície em apenas duas dimensões.

A análise visual das curvas representadas nesta figura evidencia a mistura binária metanol/clorofórmio e metanol/acetona em proporção 1:1 são as mais indicadas para a extração de glaucina.

No contexto geral verificou-se que, para todos os alcaloides de interesse, misturas binárias do tipo metanol/clorofórmio em proporção 1:1 são as mais indicadas como soluções extratoras. O solvente puro metanol pode ser uma alternativa para extração dos alcaloides anonaína, glaziovina e norglaucina e misturas binárias do tipo metanol/acetona em proporção 1:1 pode ser uma medida alternativa na extração de glaucina. Vale ressaltar a importância do desenvolvimento de planejamentos experimentais bem como a adequação do melhor ajuste às

equações que caracterizam esses planejamentos a fim de se otimizar processos de extração obtendo, desta forma, resultados mais satisfatórios e consistentes.

4.3 Análise das componentes principais e análise hierárquica de agrupamentos

Para as análises das componentes principais (PCA, do inglês *Principal Componente Analyses*) utilizou-se uma matriz composta 23 colunas e 6211 linhas cujos valores foram obtidos a partir dos dados experimentais dos 23 extratos extraídos de acordo com o planejamento SCD. Nesta matriz as colunas correspondem aos números de amostras e as linhas correspondem as variáveis, ou seja, áreas dos picos cromatográficos. O tempo total da corrida cromatográfica foi de 15 minutos. Para este tipo de análise os dados referentes a matriz foram centrados na média. Conforme pode-se observar no gráfico de escores (Figura 25) as componentes principais 1 e 2 explicam sozinhas 90,90% da variância total sendo que 5,60% é explicada pela componente 2 e 85,30% explicada pela componente 1.

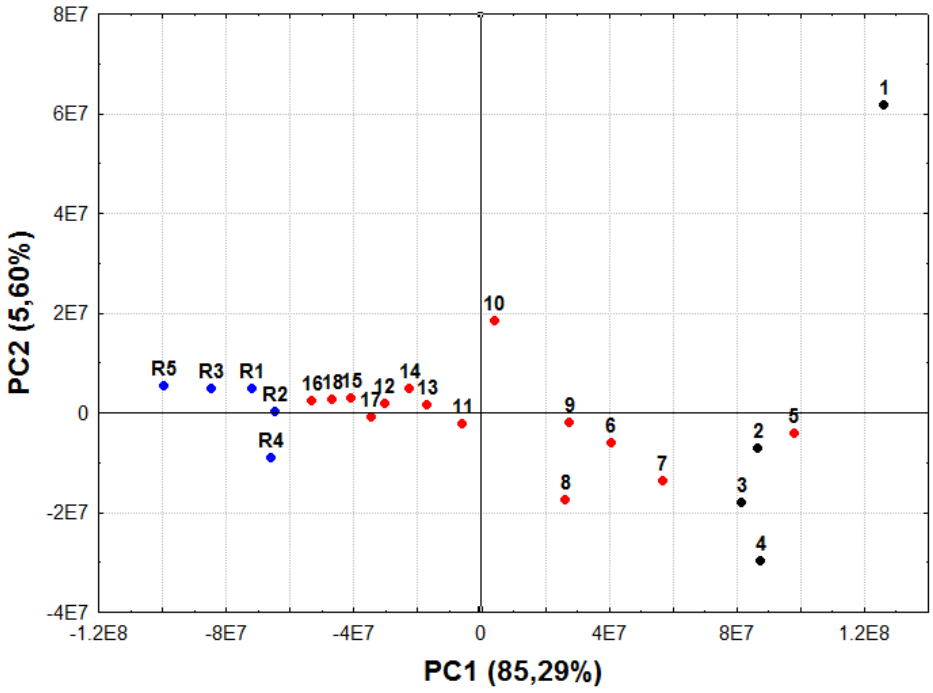


Figura 25. Gráfico dos escores das componentes principais obtidos dos dados cromatográficos dos 23 extratos das partes aéreas da planta *U. duckei*.

Neste gráfico, os extratos obtidos a partir de solventes puros e de misturas binárias são discriminados em virtude da variância da PC1. Pode-se observar que o quadrante direito pode ser dividido em três regiões distintas: a primeira região, que fica no lado mais positivo da PC1, é composta somente pela primeira amostra, cujo solvente extrator é o solvente puro metanol. A

segunda região é composta pelas amostras cujos solventes extratores foram os demais solventes puros juntamente com a mistura binária metanol/clorofórmio. Este grupo fica em uma posição intermediária em relação ao ponto zero. A terceira região, a que fica mais próxima do zero, é composta pelos escores relacionados aos extratos das amostras 6, 7, 8 e 9 cujas soluções extratoras eram misturas binárias. No quadrante esquerdo, a parte negativa da PC1, encontram-se distribuídas os escores dos extratos cujas soluções extratoras eram misturas ternárias e quaternárias. Na região mais negativas encontram-se os escores do ponto central do planejamento simplex-centroide. Os escores dos extratos quaternários estão em uma região intermediária e na região mais próxima do zero estão as misturas ternárias. Com relação a PC2 pode-se observar uma clara separação entre os escores da amostra 1 e amostra 4 cuja solução extratora é acetona puro. Uma representação gráfica dos loadings da CP1 pode ser vista na Figura 26. Nela estão apresentados somente os loadings da PC1 no intervalo de 9 a 14 minutos pois os loadings com tempo de retenção abaixo de 9 minutos apresentaram variáveis com baixo peso e por isso são irrelevantes.

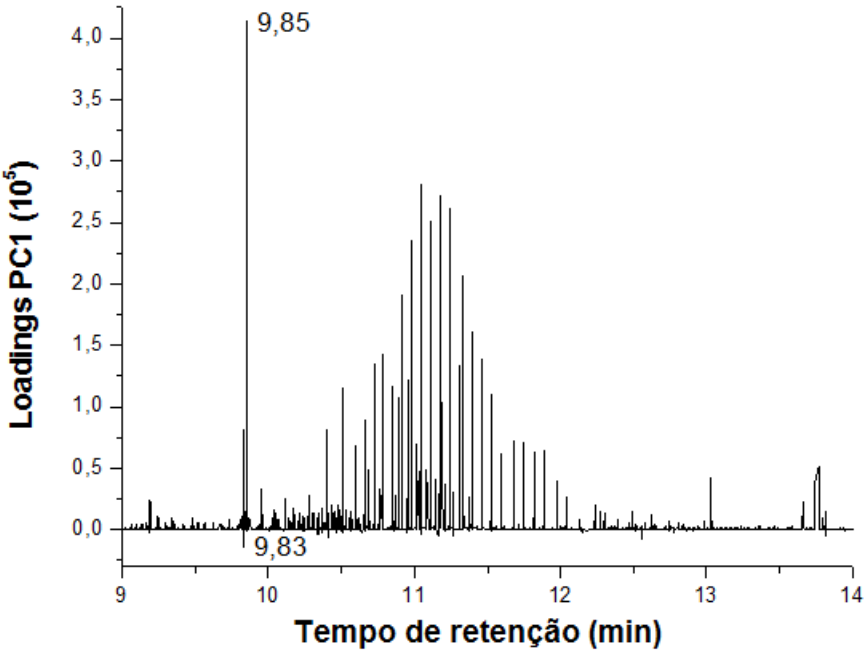


Figura 26. Gráfico dos loadings da CP1 para os dados cromatográficos dos 23 extratos de partes aéreas da planta *U. duckei* no intervalo de tempo de retenção de 9 a 14 minutos

Como pode-se observar, o alto valor positivo de loading na PC1 é característico da substância com tempo de retenção de 9,85 minutos. Sendo assim, a substância com tempo de retenção de 9,85 minutos é extraída em maior quantidade com os solventes extratores puros especialmente o metanol. No lado negativo da PC1 há apenas uma variável de maior peso, ou

seja, a substância com tempo de retenção de 9,83 minutos. Ela influencia as misturas quaternárias fazendo com que apresentem uma menor quantidade de substâncias com esse tempo de retenção. Essa influência se dá em virtude dessa substância ser a mesma variável com valor positivo. A Figura 27 abaixo é a representação gráfica da PC2 no mesmo intervalo de tempo de retenção da PC1.

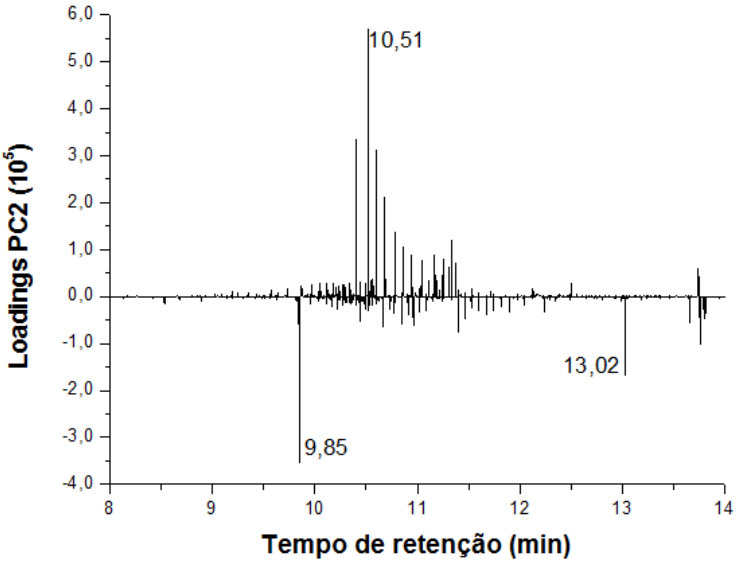


Figura 27. Gráfico dos loadings da CP2 para os dados cromatográficos dos 23 extratos de partes aéreas a planta *U. duckei* no mesmo intervalo de tempo de retenção da PC1.

Os loadings apresentados neste gráfico indicam que o extrato 1, cujo solvente extrator foi o solvente puro metanol, por estar na região mais positiva, apresenta maior quantidade da substância com tempo de retenção de 10,51 minutos enquanto que o extrato 4, que está na região mais negativa e cujo solvente extrator foi a acetona pura, apresenta maior quantidade das áreas cromatográficas com tempo de retenção em 9,85 e 13,02 minutos conforme pode ser visualizado sobrepondo os cromatogramas do metanol e acetona conforme a Figura 28 abaixo.

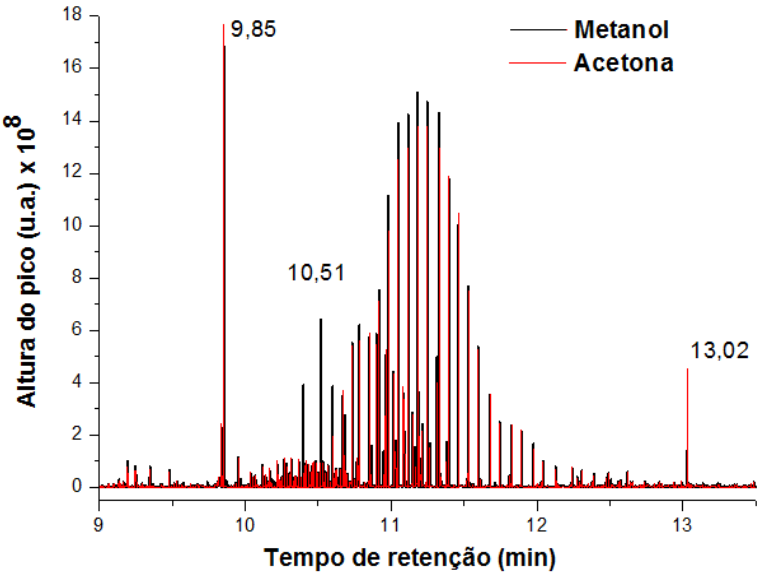


Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas dos extratos cujos solventes extratores foram os solventes puros metanol e acetona.

A confirmação desses resultados foi obtida por meio da análise hierárquica de agrupamentos (HCA, do inglês *Hierarchical Cluster Analysis*) da matriz de dados utilizados na PCA. O método utilizado foi o de ligação completo (*complete linkage*). A Figura 29 abaixo é o dendograma da matriz de dados. No valor de distância de $7x10^7$ observam-se os mesmos agrupamentos formados na PCA.

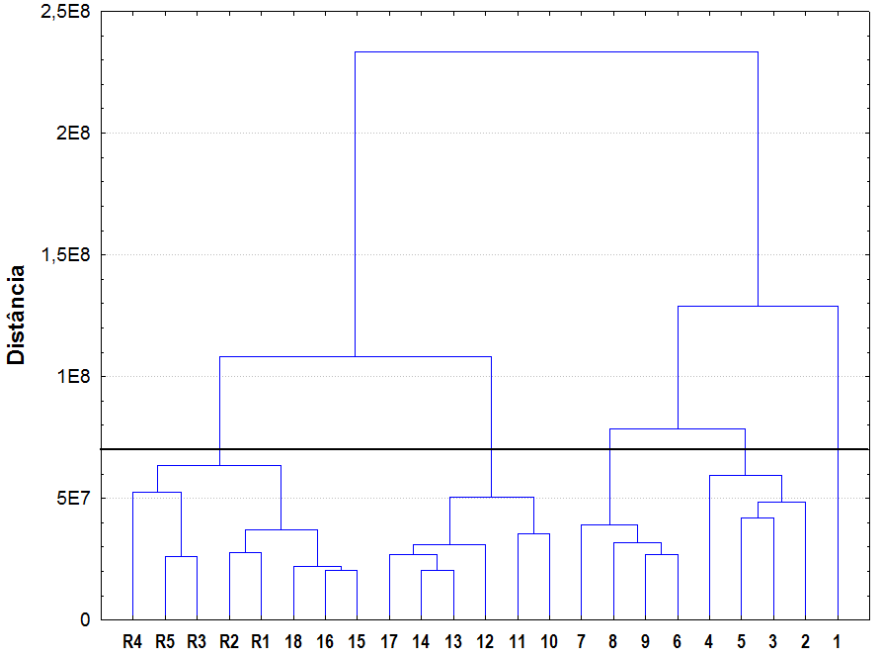


Figura 29. Dendograma baseado nos dados cromatográficos dos extratos de partes aéreas da planta *U. duckei* obtido pelo método de ligação completo.

Das análises dos resultados obtidos via PCA e HCA pode-se concluir que os extratos obtidos de partes aéreas da planta *U. duckei* apresentam diferentes perfis cromatográficos para as diferentes soluções de misturas extratoras. Entretanto, essa diferença aparenta ser mais quantitativa do que qualitativa o que viabiliza a otimização das substâncias de interesse.

4.4 Validação da metodologia

4.4.1 Seletividade

Para que fosse garantida a seletividade, optou-se por utilizar o modo de aquisição em MS por monitoramento seletivo de reação (SRM, do inglês, *selected reaction monitoring*). Esta forma de operação do espectrômetro permite que diferentes analitos sejam precisamente quantificados, uma vez que a resposta da detecção não sofre interferência de efeitos de supressão iônica ou simplesmente efeitos de matriz. Isso ocorre devido ao fato de que em um experimento em modo SRM é possível monitorar cada transição de íons (par precursor/fragmento) dentro de uma faixa de *m/z* onde a intensidade do sinal é registrada, isto em função da eluição na escala de tempo cromatográfica, o que produz picos extraídos únicos para cada analito (WAKSMUNDZKA-HAJNOS & SHERMA, 2011; LANGE, et al., 2008). Essa capacidade de seletividade deve-se ao fato de que no modo SRM trabalha-se com dois estágios de análises de massas, onde o primeiro estágio (Q_1) funciona como um filtro, o que impossibilita íons precursores de diferentes *m/z* sejam direcionados à cela de colisão (q_2). Nesta cela são formados os íons fragmentos (transições) e em seguida direcionados ao segundo estágio de análise de *m/z* (Q_3). Neste último, ao invés de uma varredura para a verificação dos fragmentos formados, opta-se pelo monitoramento de transições específicas (filtro). Neste trabalho, o monitoramento em modo SRM dos íons utilizados como transições de qualificação (de maior *m/z*) e quantificação (de menor *m/z*) foram estabelecidos baseando-se em rotas de fragmentação dos alcaloides de interesse previamente descritas (SILVA et al., 2013). A Figura 30 apresenta o cromatograma de íons extraídos (XIC do inglês, *extracted ion chromatogram*) para as transições de quantificação e qualificação dos analitos deste trabalho.

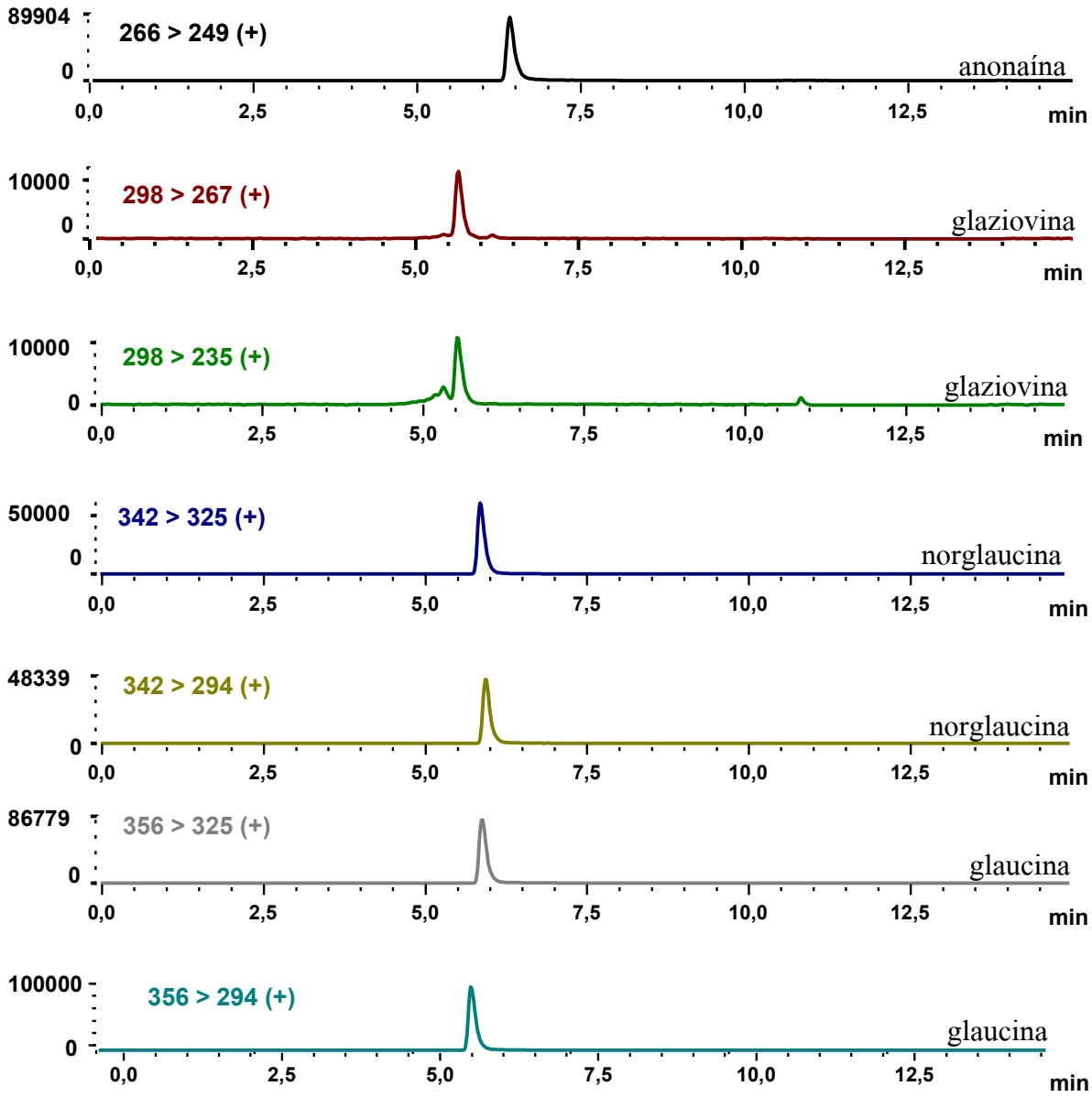


Figura 30. Cromatogramas, em modo SRM para uma corrida total de 15 minutos, dos alcaloides de interesse obtidos a partir de padronização externa das soluções preparados de acordo com o planejamento SCD dos extratos brutos das amostras da planta *U. duckei* utilizando a geometria UHPLC-ESI$^+$-QqQ/MS. A corrida foi realizada na modalidade de análise rápida de acordo com as condições especificadas na sessão 3.8. Com exceção da anonaína, são mostradas as transições de qualificação e quantificação para os demais alcaloides. O t*r* do método é inferior a 7 minutos. A anonaína possui o maior t*r* com 6,5 minutos e a glaucina o menor t*r* com 5,5 minutos.

No desenvolvimento das condições cromatográficas para a separação dos alcaloides no sistema UHPLC buscou-se, inicialmente, utilizar condições mais simples e reprodutíveis, isto é, sem ajuste do pH e eluição gradiente. Porém, estas condições não foram suficientes para promover a separação completa entre todos os compostos estudados uma vez que optou-se por um método de análise rápido onde o tempo de análise é inferior a 10 minutos. Praticamente não foi possível obter separação entre glaucina (tr 5,5, *m/z* 356) e norglaucina (tr 6,0, *m/z* 342). Este fato não interferiu na validação da metodologia empregada, uma vez que as transições

escolhidas e/ou os íons precursores das espécies que coeluiram não são os mesmos. Para o composto anonaína foi necessária uma adaptação da metodologia, uma vez que este analito quando submetido a CID apresenta apenas uma única fragmentação, isto é, apenas um íon fragmento. Isto se deve a simplicidade estrutural deste alcaloide (ausência de grupos periféricos), o que conduz a uma única perda de amônia (- 17 Da, NH_3). Para este caso, optou-se por utilizar a mesma *m/z* para identificação e quantificação deste analito.

4.4.2 Linearidade

A linearidade foi avaliada através da construção de uma curva analítica com seis níveis de concentração que abrangeu a faixa de 10, 25, 50, 250, 500 e 1000 ng L^{-1} preparadas em metanol. As respectivas áreas dos picos cromatográficos para as *m/z* extraídas referentes aos íons fragmentos de quantificação foram submetidos a análise de regressão pelo método de mínimos quadrados (MMQ), de modo a se construir curvas de calibração para cada analito conforme as Figuras 31 e 32[1]. A partir das curvas geradas, foi possível estabelecer a sensibilidade (coeficiente angular), o coeficiente linear e os coeficientes de correlação (R) e determinação (R^2) do método desenvolvido para os analitos escolhidos. Também realizou-se por meio do MMQ a determinação do intervalo de confiança para os coeficientes de regressão, bem como a confecção dos gráficos de resíduos estatísticos de cada alcaloide aporfínico analisado (Figura 32) a fim de se averiguar a qualidade das curvas analíticas construídas (PASCHOAL et al., 2008). A faixa linear foi determinada ao se plotar em um gráfico o log da concentração no eixo das abcissas versus a razão entre a resposta analítica e a concentração no eixo da ordenadas (DE ARAGÃO et al., 2009). A confirmação e aceitabilidade da linearidade depende do R^2, ao qual espera-se um valor superior a 0,99 (DE ARAGÃO et al., 2009), além de uma distribuição aleatória entre valores positivos e negativos dos pontos residuais (PASCHOAL et al., 2008) oriundos da regressão pelo MMQ (Figura 33). Se essa distribuição é aleatória, o referido gráfico não apresenta tendências de dispersão dos resíduos, sendo por isso, um indicativo de que a linearidade é satisfatória (PASCHOAL, et al., 2008). Os resultados obtidos a partir da regressão por meio do MMQ para o estudo da linearidade podem ser observados na Tabela 16.

[1] A Figura 32 é composta tanto pelos gráficos das curvas analíticas de cada alcaloide quanto por seus respectivos gráficos de dispersão de resíduos.

Tabela 16. Dados de linearidade obtidos pela regressão pelo método de mínimos quadrados.

ANALITO	EQUAÇÃO DA RETA		R	R^2	Faixa linear ng L^{-1}
	COEFICIENTE ANGULAR	COEF. LINEAR			
anonaína	y = 1151,6x (± 25,6)	+ 29964 (± 116,3)	0,99736	0,99473	10-1000
glaziovina	y = 204,28x (± 2,3)	+ 9158,6 (± 10,3)	0,99935	0,9987	10-1000
norglaucina[a)]	y = 711,25x (± 5,6)	+ 21285 (± 27,6)	0,99925	0,9985	10-1000
glaucina	y = 2103,7x (±19,6)	+ 33365 (± 89,3)	0,99953	0,9991	10-1000

[a)] Valores da curva analítica para 5 níveis de concentração.

A partir dos resultados obtidos, observou-se que o R^2 da norglaucina, conforme pode ser visto na Figura 31a, mostrou-se inferior a 0,99 e que o ponto a nível de concentração de 500 ng L^{-1} mostrou-se discrepante em relação aos demais. Após identificação e eliminação da resposta analítica anômala (rejeitado a nível de 90% pelo teste Q de rejeição de resultados) o valor médio das respostas não anômalas não foi suficiente para resultar em um R^2 superior a 0,99. Diante desse fato optou-se por eliminar o ponto discrepante, conforme pode-se observar na Figura 31b, tendo em vista que tal eliminação não prejudicaria a linearidade pois ainda restaria pelo menos cinco níveis de concentração que é a quantidade mínima especificada na literatura para construção de uma curva analítica (PASCHOAL et al., 2008). Na Figura 31c pode-se observar que os resíduos estatísticos da curva da norglaucina se distribuem aleatoriamente ao longo do eixo das abcissas evidenciando desta forma a linearidade da curva para este alcaloide.

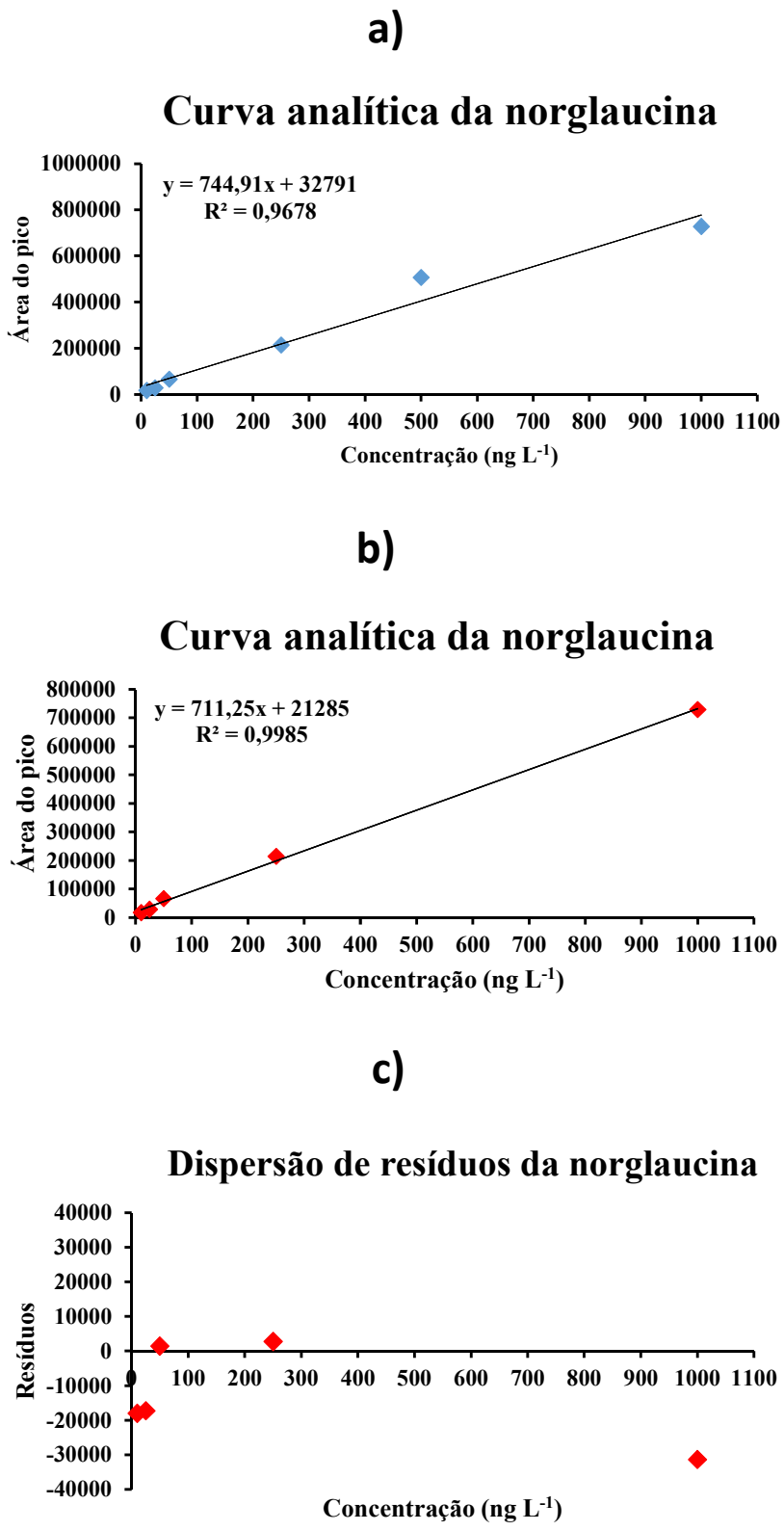


Figura 31. Gráficos das curvas analíticas e dispersão de resíduos estatísticos da norglaucina obtidos nas condições instrumentais descritas na sessão 3.8. **a)** Curva com 6 níveis de concentração. **b)** Curva analítica com 5 níveis de concentração. **c)** dispersão de resíduos estatísticos para uma curva com cinco níveis de concentração.

A Figura 32 abaixo é a representação gráfica das curvas analíticas e da dispersão de resíduos estatísticos dos alcaloides: anonaína (a), glaziovina (b), norglaucina (c) e glaucina (d).

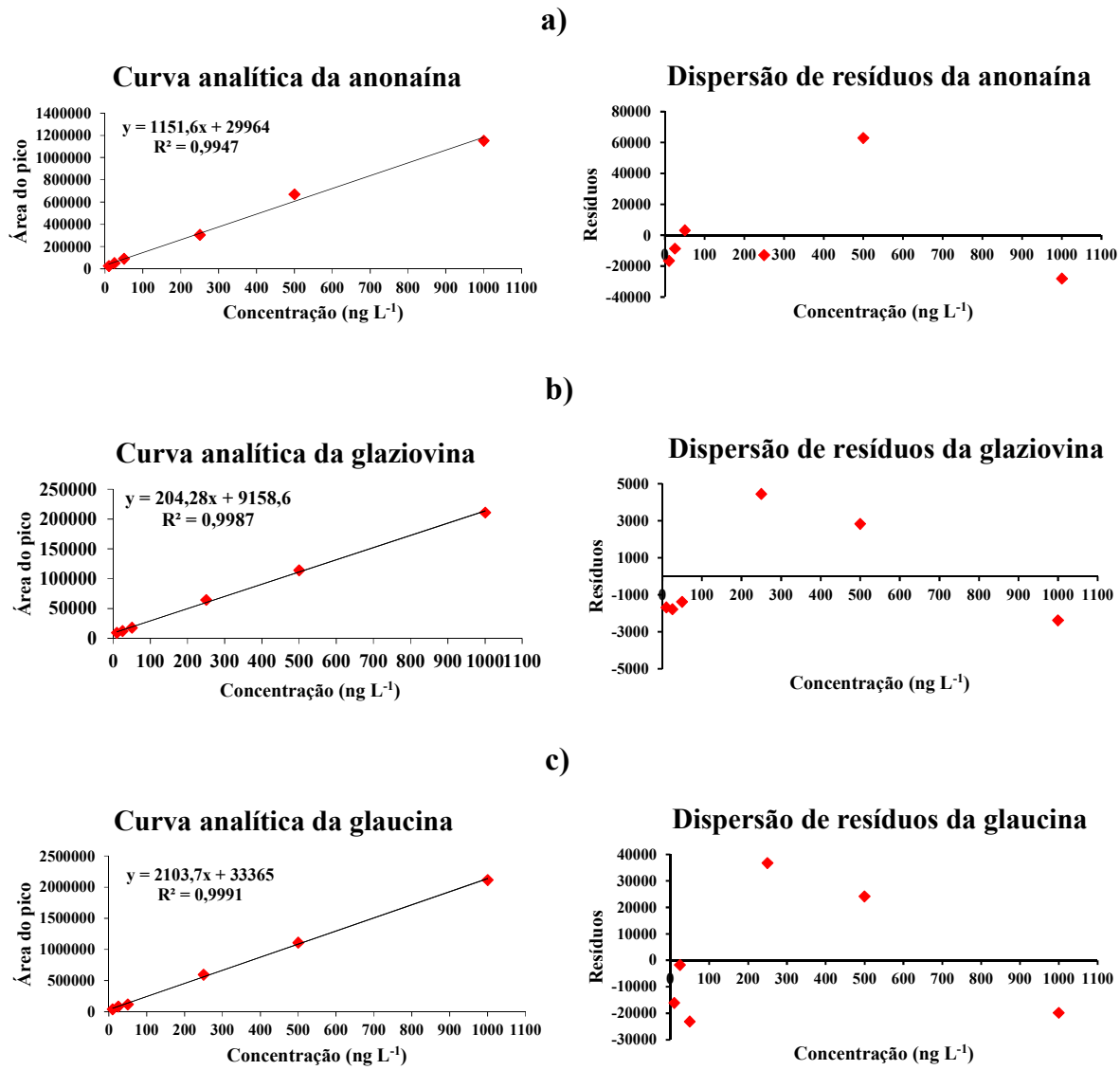


Figura 32. Gráfico das curvas analíticas e gráficos das dispersões de resíduos estatísticos obtidos conforme as condições instrumentais descritas na sessão 3.8: a) anonaína. b) glaziovina. c) glaucina. Nos gráficos de dispersão, a distribuição aleatória dos pontos residuais indica a aceitabilidade da curva e a qualidade da linearidade do método.

A análise visual das curvas analíticas, bem como dos gráficos de dispersão de resíduos estatísticos dos alcaloides representados nesta figura indicam que a linearidade das respectivas curvas analíticas se mostraram satisfatórias pois, para todos os analitos, o R^2 é superior a 0,99 e as dispersões residuais apresentaram um padrão de distribuição aleatória ao longo do eixo das abcissas. A Figura 33 é a representação gráfica das respectivas faixas de trabalho linear para os alcaloides de interesse. Neste tipo de gráfico, a faixa de trabalho considerada linear é aquela

cujos pontos se distribuam horizontalmente ao longo de um intervalo que compreende o limite inferior de 95% da menor razão entre a área do pico e a concentração e o limite superior de 105% da maior razão sem extrapolá-los (PASCHOAL et al., 2008). Caso não haja extrapolação desses limites toda a faixa de concentração será considerada linear (PASCHOAL et al., 2008).

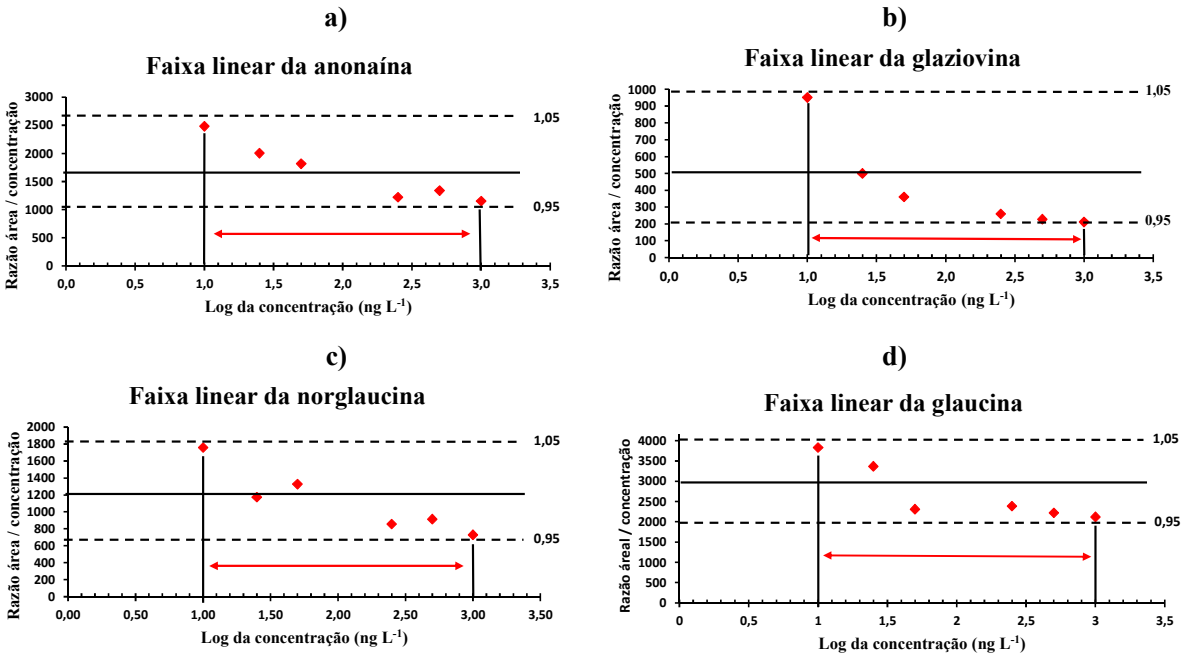


Figura 33. Faixas lineares das curvas analíticas dos alcaloides de interesse obtidos pela plotagem da razão entre o sinal analítico e a concentração versus o log da concentração. a) anonaína. b) glaziovina. c) norglaucina. e) glaucina. As setas vermelhas indicam as faixas de trabalho linear das curvas.

Da análise visual desta figura conclui-se que as curvas analíticas dos alcaloides de interesse se mostram linear em toda sua faixa de concentração uma vez que não houve extrapolação dos limites superior e inferior em nenhum dos respectivos gráficos.

4.4.3 Limites de detecção e quantificação

Os limites de detecção (LoD) e quantificação (LoQ) foram avaliados segundo os parâmetros da curva analítica de cada alcaloide de interesse. Para esta metodologia a glaucina foi o analito que apresentou os menores valores de LoD e LoQ, 0,44 e 1,33 ng L^{-1}, respectivamente, enquanto que a glaziovina apresentou os maiores (4,51 a 13,66 ng L^{-1}). Os resultados obtidos para todos os alcaloides de interesse podem ser observados na Tabela 17.

Tabela 17. LoQ e LoD obtidos pela via geometria UHPLC-ESI(+)-QqQ/MS.

Alcaloide	LoD ng L^{-1}	LoQ ng L^{-1}	Tempo de retenção (min)
Glaziovina	4,51	13,66	6,0
norglaucina	1,29	3,92	6,0
anonaína	0,80	2,42	6,5
glaucina	0,44	1,33	5,5

Esses resultados foram comparados com os resultados de outras metodologias descritas na literatura, e resumidas na Tabela 17, ao qual pôde-se evidenciar que os resultados obtidos são superiores em comparação aos previamente descritos. Nesta metodologia foram obtidos valores de LoD e LoQ na ordem de ng L^{-1}, enquanto que as demais metodologias descritas apresentam resultados cerca de duas a três ordens de magnitude acima (µg L^{-1}). O método ainda mostra maior eficiência quando comparado a outras metodologias que também apresentam resultados em ng L^{-1} conforme pode ser visto na Tabela 18. Nesta tabela pode-se observar uma série sistemas instrumentais de diversas geometrias utilizados na quantificação de alcaloides aporfínicos e quimicamente semelhantes.

Tabela 18. Algumas referências de quantificação (LoQ) para os alcaloides aporfínicos.

ALCALOIDE	TIPO	GÊNERO FAMÍLIA	MÉTODO	T. RET (MIN)	LOQ	REFERENCIA
magnoflorina, isocoridina, **glaucina**	Aporfínico	Menispermaceae	UHPLC-QqQ_{LIT}-MS	<10	0,26 - 2,58 ng L^{-1}	SINGH et al., 2016
boldina	Aporfínico	Monimiaceae	HPLC-UV	20	3,2 µg mL^{-1}	TEIXEIRA et al., 2016
norboldina, boldina, reticulina, isoboldina, isocoridina, laurotetanina, N-metillaurotetanina.	Aporfínico	Lauraceae	HPLC–ESI-IT-TOF-MS^n	30	55,5- 1033,2 ng mL^{-1}	ZHANG et al., 2015
oxoisoaporphina, menisporfina, 6-O-dimetilmenisporfina bianfugedina, bianfugecina, dauriporfina, dauriporfinolina	Oxiaporfínico	Menispermaceae	UHPLC-MS/MS	10	0,067-1,521 ng mL^{-1}	WEI, et al., 2015
nuciferina, N.nornuciferina, O.nornuciferina, **anoanína,** roemerina	Aporfínico	Nelumbonaceae	HPLC-DAD-MS/MS	16	<0,47 µg mL^{-1}	CHEN et al., 2013
magnoflorina, menisperina, menisporphina,	Aporfínico, Oxiaporfínico, Dehydroaporfínico,	Menispermaceae	UHPLC-DAD-MS	22	0,010 – 0,526 µg mL^{-1}	LIU et al., 2013

6-O dimetilmenisporfina dauriporfina, Dauricina	Isoquinolínico					
tetrandrina, fangchinolina, magnoflorina	Bisbenziliso quinolínico, Aporfínico	Aristolochiaceae	UHPLC-DAD UHPLC-ESI-MS/MS	<10	0,05 – 0,10 μg mL^{-1}	SIM et al., 2013
dicentrina	Aporfínico	Menispermaceae	HPLC-UV	30	10 μL mL^{-1}	RAFAMANTANANA et al., 2012
Glaucina	Aporfínico	Papaveraceae	HPLC-UV/VIS	15	não determinado	BOGDANOV et al., 2012
nuciferina, N.nornuciferina, O.nornuciferina, roemerina	Aporfínico	Nelumbonaceae	HPLC-DAD-ESI/MS	20	0,09 - 0,27[a)] ng mL^{-1}	LUO et al., 2005
boldina, actinodafina, cassitina, dicentrina, norneolitsina, neolitsina, cassitidina	Aporfínico	Lauraceae	HPLC-UV-MS	80	20 μg mL^{-1}	STÉVIGNY et al., 2004
magnoflorina	Aporfínico	Berberidacea	HPLC-UV	<10	15–75[b)] ng mL^{-1}	WOLDEMARIAM et al., 1997

a) b) LOQ obtidos pelo produto 3xLOD pois, o autor não estimou o LOQ.

Para o alcaloide anonaína, CHEN et al., 2013, utilizando o mesmo sistema descrito anteriormente, obteve um LoQ de ordem 0,47 μg mL^{-1} para um t*r* de 10,17 minutos. A diferença entre os t*r* não é significativa, porém, a diferença de magnitude do LoQ obtido por nosso método é de ordem 2,42 ng L^{-1} o que torna nosso método mais eficiente quando comparado ao método de CHEN et al. Para o alcaloide glaucina, SINGH et al., 2016, utilizando um sistema de geometria UHPLC-ESI-QqQ_{LIT}-MS (LIT do inglês, *Linear Quadrupole Ion Traps*) obteve um LoQ de ordem 2,8 ng L^{-1} para um t*r* de dois minutos. Embora nosso método tenha apresentado um t*r* de 5,5minutos, que na prática não representa uma diferença significativa, o LoQ obtido foi de ordem 1,33 ng L^{-1} sendo desta forma mais eficiente quando comparado ao LoQ obtido por SINGH et al. Uma referência de quantificação baseado em sistemas LC-UV/DAD foi encontrada na literatura para a glaucina. BOGDANOV et al., 2012, utilizando um sistema HPLC/UV, quantificou este alcaloide sem que fosse determinado as figuras do mérito, LoD e LoQ. Entretanto, como a magnitude de sua curva analítica é de ordem μg mL^{-1} pode-se deduzir que, caso fossem determinados, os resultados de LoD e LoQ obtidos por seu método seriam na mesma ordem de magnitude. Sendo assim, devido a diferença de magnitude, a eficiência de quantificação deste alcaloide pelo método proposto neste trabalho é superior quando comparado ao método de BOGDANOV et al.

Semelhantemente aos alcaloides de interesse buscou-se também comparar os mesmos parâmetros com métodos utilizados na quantificação de alcaloides quimicamente semelhantes

resumidos na Tabela 17. SIM et al., 2013, utilizando um sistema composto pelas geometrias UHPLC-DAD e UHPLC-ESI-MS/MS, obteve um valor de LoQ de ordem 0,07 μg mL^{-1} para o alcaloide tetrandrina (de estrutura bisbenzilisoquinolínica) em um t*r* inferior a sete minutos. Embora exista similaridade entre os t*r,* a diferença de magnitude de nosso método é de ordem ng L^{-1} para qualquer alcaloide de interesse tido como referência e desta forma, caso nosso método fosse utilizado na quantificação deste alcaloide, apresentaria maior eficiência. ZHANG et al., 2015, utilizando um sistema de geometria HPLC-ESI-IT-TOF-MS^n, obteve um valor de LoQ de ordem 314,37 ng mL^{-1}para o alcaloide reticulina (de estrutura benzilisoquinolínica) em um t*r* de 17,2 minutos. A diferença de magnitude do LoQ de nosso método é de ordem ng L^{-1} para qualquer alcaloide tido como referência e caso fosse aplicado à quantificação deste alcaloide apresentaria maior eficiência. Considerando a magnitude dos resultados de LoQ e LoQ obtidos por nosso método conforme descrito na Tabela 17 e as análises comparativas com os métodos descritos na Tabela 18 pode-se concluir que a geometria utilizada em nosso sistema instrumental permiti-nos conseguir uma satisfatória capacidade de detecção e eficiência de quantificação.

4.4.4 Precisão e exatidão

A precisão do método foi avaliada através do coeficiente de variação (CV) das áreas médias dos picos cromatográficos extraídos obtidos a partir das curvas analíticas construídas com os padrões puros dos alcaloides de interesse durante o estudo da linearidade. Desta forma o ensaio da precisão interdia e da linearidade do método foram simultaneamente realizados. Os padrões foram preparados conforme descrito na sessão 3.7 e injetados em triplicata. A partir das respostas obtidas foi possível determinar os CV conforme descrito na introdução deste trabalho. Os dados de CV obtidos para cada faixa de concentração estão resumidos na Tabela 19. A aceitabilidade da precisão está condicionada a um CV inferior a 20% (RIBANI et al., 2004) e conforme pode-se verificar, para toda a faixa de concentração os resultados calculados ficaram abaixo de 20% indicando que o método desenvolvido apresenta repetitividade e precisão satisfatórias.

Tabela 19. Coeficientes de variação das áreas médias dos picos cromatográficos.

Concentração ng L^{-1}	ALCALOIDES			
	anonaína	**glaziovina**	**norglaucina**	**glaucina**
10	5,18	7,45	4,93	1,81
25	2,83	3,77	4,85	0,75
50	2,32	2,37	1,21	0,47
250	0,59	9,56	0,43	0,58
500	4,67	0,84	8,72	0,06
1000	17,42	0,38	0,15	0,07

A exatidão da metodologia foi avaliada em termos do percentual de recuperação de soluções fortificadas da faixa de trabalho linear. Para esta faixa, as concentrações controles para a determinação do percentual de recuperação foi estabelecida a nível de baixa (50 ng L^{-1}), média (500 ng L^{-1}) e alta (1000 ng L^{-1}) concentração. Semelhante ao ensaio de precisão, o ensaio da exatidão ocorreu simultaneamente ao ensaio da linearidade. Para cada nível de concentração controle determinou-se os percentuais de recuperação a partir dos dados de regressão de suas respectivas curvas analíticas e das áreas médias de seus respectivos picos cromatográficos. Na Tabela 20 estão expressas as concentrações calculadas a partir das curvas analíticas e os percentuais de recuperação calculados conforme descrito na introdução deste trabalho.

Tabela 20. Concentrações calculadas a partir das curvas de controle de baixa, média e alta concentração e os percentuais de recuperação dos alcaloides de interesse.

Concentração controle ng. L^{-1}	anonaína		glaziovina		norglaucina		glaucina	
	concent. curva	% rec	concent. Curva	% rec	concent. Curva	% rec	concent. curva	% rec
50 baixa	52,79	105,58	43,19	86,37	63,32	126,64	39,02	78,05
500 média	554,80	110,96	513,79	102,76	271,01	108,40	511,46	102,29
1000 alta	975,59	97,56	988,32	98,83	994,58	99,46	990,55	99,06

Para os ensaios de exatidão espera-se que o percentual de recuperação calculado esteja dentro do intervalo de 70 a 120% de recuperação. Em algumas situações, esse intervalo pode variar de 50 a 150%, dependendo da complexidade analítica ou da amostra, desde que a precisão seja até ± 15% (RIBANI et al., 2004). Para fins deste estudo buscou-se preferencialmente obter um percentual de recuperação que esteja dentro do intervalo de 80 a 120% de recuperação. A Figura 34 é a representação gráfica do percentual de recuperação calculado a nível de baixa concentração. Para este nível de controle os alcaloides anonaína, e glaziovina apresentaram um percentual de recuperação satisfatório uma vez que se ajustaram dentro do intervalo de

recuperação previsto. O alcaloide norglaucina apresentou um percentual de recuperação ligeiramente superior a 120%, enquanto que a glaucina apresentou um percentual ligeiramente inferior a 80%, o que de modo geral não compromete a exatidão do método.

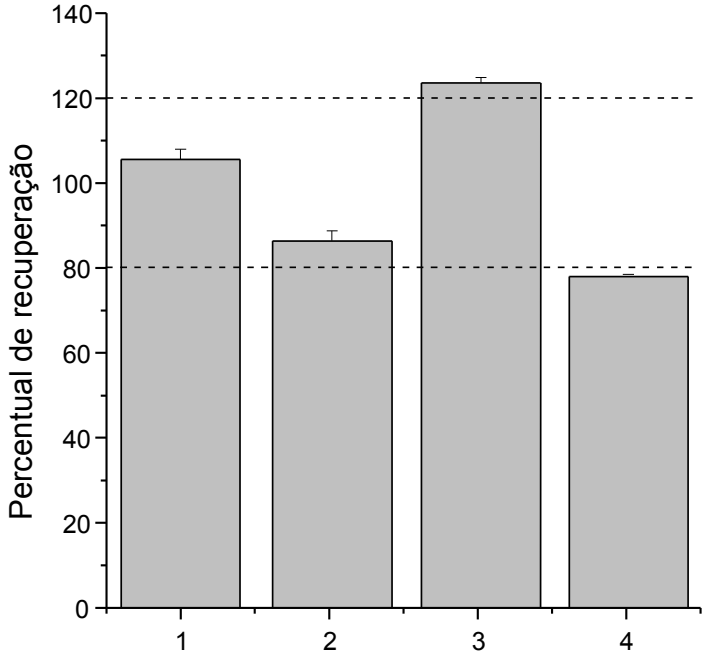


Figura 34. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de baixa concentração (50 ng L^{-1}) apara os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina.

As Figuras 35 e 36 são as representações gráficas dos percentuais de recuperação calculados a nível de média e alta concentração respectivamente. Para estes níveis de controle todos os alcaloides apresentaram um satisfatório percentual de recuperação uma vez que se ajustaram dentro intervalo previsto. Considerando que os resultados de CV obtidos durante o ensaio de precisão em termos de repetitividade interdia foram inferiores a 20% e que os resultados obtidos para o ensaio de exatidão em termos de percentual de recuperação mantiveram-se dentro do intervalo previsto, conforme preconizado na literatura (RIBANI et al., 2004), conclui-se que o método apresenta satisfatória precisão e exatidão garantindo desta forma confiabilidade aos resultados obtidos pelo método proposto.

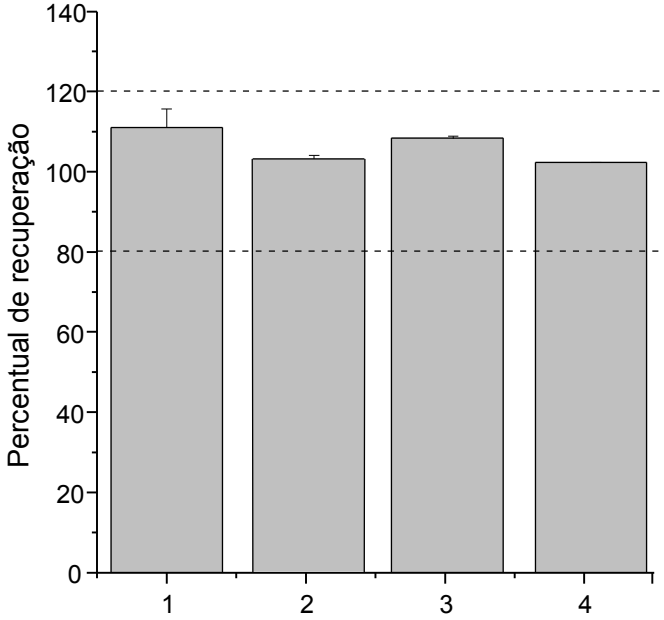


Figura 35. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de média concentração (500 ng L^{-1}) apara os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina. Para este gráfico a glaucina não apresentaram intensidade de erro perceptível.

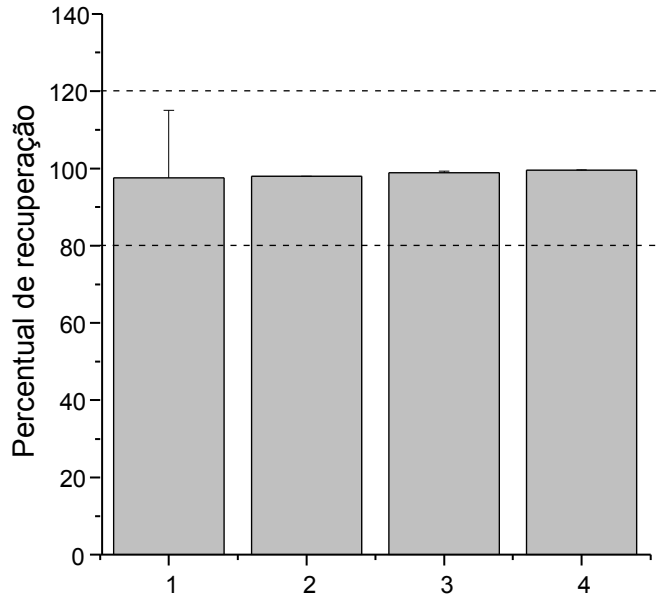


Figura 36. Gráfico dos percentuais de recuperação a nível de alta concentração (1000 ng L^{-1}) para os alcaloides: 1) anonaína, 2) glaziovina, 3) norglaucina e 4) glaucina. Para este gráfico apenas a anonaína e norglaucina apresentaram intensidade de erro perceptível. As intensidades dos erros dos demais alcaloides foram demasiados pequenos para serem perceptíveis.

4.5 Aplicação e quantificação do método

Uma vez validado o método aplicou-se a metodologia a uma amostra. Os dados experimentais obtidos indicaram quem em algumas situações os resultados apresentaram certa divergência em relação aos resultados esperados. A princípio esperava-se que o melhor resultado fosse para a quantificação da glaucina enquanto que os menores resultados

esperavam-se para a anonaína e glaziovina. A anonaína, conforme esperado, apresentou a menor eficiência de quantificação. Em relação a glaucina, por exemplo, sua eficiência quantitativa é cerca de 72% inferior. Também conforme esperado, foi melhor extraída pela mistura de composição binária metanol/clorofórmio seguida do solvente puro metanol sendo que a mistura, em relação ao solvente, é cerca de 24% superior em termos quantitativos. As demais composições binárias juntamente com a mistura ternária metanol/clorofórmio/n-hexano são menos eficientes do que o solvente metanol puro, portanto, na ausência de clorofórmio o solvente metanol é a opção alternativa mais adequada para a quantificação da anonaína. Para a glaziovina esperava-se resultados quantitativos semelhantes a anonaína. Esperava-se ainda a melhor resposta para mistura metanol/clorofórmio seguida do solvente metanol puro. Entretanto, ao contrário do esperado apresentou a maior capacidade de quantificação entre os alcaloides de interesse e a melhor resposta foi obtida pela mistura de composição binária metanol/acetona seguida do metanol, como esperado. Em relação ao metanol, a eficiência quantitativa da mistura metanol/acetona é cerca de 13% superior. As demais composições apresentaram-se menos eficiente do que o metanol, portanto, conforme esperado, na ausência de acetona o solvente metanol puro é a opção alternativa mais adequada para quantificação da glaziovina. Para a norglaucina esperava-se resultados quantitativos inferiores aos da glaucina. Esperava-se ainda a melhor resposta para a mistura binária metanol/clorofórmio seguida do solvente metanol puro. De fato, estas soluções extratoras apresentaram as melhores respostas, entretanto, diferente do esperado, a eficiência quantitativa do metanol foi cerca de 2% superior em relação a mistura metanol/clorofórmio. Quantitativamente, as composições binárias associadas ao metanol juntamente com a mistura ternária metanol/clorofórmio/n-hexano apresentaram-se mais eficiente do que o solvente puro acetona, entretanto, não faz sentido utilizar tais composições haja vista a dependência do metanol que sozinho apresenta a melhor eficiência quantitativa. Além disso, a acetona apresenta-se mais eficiente do que as composições não associadas ao metanol. Portanto, na ausência de metanol e clorofórmio o solvente acetona puro é a opção alternativa mais indicada para quantificação da norglaucina sendo que a quantificação fica em média reduzida a 70,8% em relação ao metanol puro e a mistura metanol/clorofórmio. Para a glaucina, como já mencionado, esperava-se o maior resultado quantitativo, porém, este fato não foi observado. Esperava-se ainda a melhor resposta para a mistura de composição binária metanol/clorofórmio seguida da mistura metanol/acetona. De fato, estas misturas obtiveram as melhores respostas, entretanto, diferente do esperado, a eficiência quantitativa da mistura metanol/acetona foi cerca de 15% superior em relação a outra mistura. Observou-se que a mistura ternária metanol/clorofórmio/n-hexano apresentou mais eficiência quantitativa em relação as demais composições associadas e não associadas ao metanol inclusive ao metanol puro. Obviamente não faz sentido utilizar esta composição haja vista sua inferioridade em relação as composições na qual o metanol está associado ao clorofórmio e a acetona. Portanto, na impossibilidade de associar o metanol à acetona ou ao clorofórmio, o solvente puro metanol é uma opção alternativa mais adequada para a quantificação da glaucina sendo que, neste caso, a

quantificação fica reduzida em média cerca de 29% em elação as misturas em que esteja associado a acetona e ao clorofórmio. Na Tabela 21 estão resumidos os valores quantitativos, em ordem decrescente de quantificação, obtidos pela aplicação do método validado a uma amostra de *U. duckei*. Os resultados apresentados nesta tabela são consequentes das curvas de calibração descritas na Tabela 16.

Tabela 21. Aplicação do método na quantificação de uma amostra de *U. duckei*.

Alcaloide	ng mL^{-1}	µg g^{-1} de ext. seco	µg g^{-1} de folha
glaziovina	1892,43	1892,43	131,10
norglaucina	585,69	585,69	40,58
glaucina	292,21	292,21	20,54
anonaína	98,03	98,03	6,79

5 CONCLUSÃO

Foi desenvolvido um planejamento experimental para otimização da extração, identificação e quantificação dos alcaloides aporfínicos anonaína, glaziovina, norglaucina e glaucina, ambos das partes aéreas de *U. dukei*. As análises exploratórias inicias foram realizadas com intuito meramente confirmativo tendo em vista que já era de prévio conhecimento a presença desses metabólitos de interesse. Dos 23 extratos brutos a amostra número 5, cuja solução extratora foi a mistura binária metanol/clorofórmio, apresentou o maior rendimento seguido da amostra 9, cuja solução extratora foi a mistura clorofórmio/acetona. O menor rendimento foi obtido pelo extrato da amostra número 3 obtido com o solvente n-hexano puro. Não observou-se uma relação direta entre rendimento e poder de extração. Para os cinco alcaloides aporfínicos as maiores áreas de pico cromatográfico foram resultantes da amostra número 5 sendo que entre os alcaloides de interesse a maior área de pico foi a da glaucina. Testou-se o ajuste do modelo linear, quadrática e cúbica especial. Em relação ao rendimento os ajustes testados não apresentaram significância a nível de 95%. Para a anonaína a análise de variância indicou falta de ajuste para todos os modelos testados. Para os demais alcaloides o modelo cúbico especial apresentou o melhor ajuste em relação aos demais modelos. As análises de PCA e HCA indicam que a diferença entre os diferentes perfis cromatográficos dos extratos é mais quantitativa do que qualitativa o que viabiliza a otimização dos alcaloides de interesse. O método foi validado apresentando satisfatória seletividade, linearidade, exatidão e reprodutibilidade. A linearidade foi confirmada em toda a faixa de trabalho linear do método, as superposições dos picos cromatográficos foram superadas pelo modo SRM do espectrômetro de massas e o tempo de retenção dos alcaloides de interesse verificou-se estar abaixo de 7 minutos. Os resultados alcançados neste trabalho foram comparados com os resultados de outros trabalhos levando em conta a mesma geometria e geometrias diferentes. Para os mesmos alcaloides ou alcaloides quimicamente semelhantes, verificou-se que a metodologia desenvolvida apresentou melhor eficiência quantitativa tendo em vista que a magnitude de seu LoQ está a nível de ng L^{-1} enquanto que o LoQ dos métodos comparados são de 2 a 3 níveis de magnitude acima. Quando aplicado a uma amostra os dados experimentais obtidos mostram-se satisfatórios. No contexto geral, o método atende aos objetivos para o qual foi desenvolvido possibilitando a identificação e quantificação dos alcaloides de interesse podendo ser aplicado não somente para estes alcaloides, mas também para quimicamente semelhantes.

REFERÊNCIAS

ABOUL-ENEIN, H. Y. Selectivity versus specificity in chromatographic analytical methods. Accreditation and Quality Assurance. *Springer*. 2000. V. 5, 180 – 181.

ALMEIDA, A. A. de.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design optimization of extraction media and mobile phase compositions for the characterization of green tea. *Journal of Separation Science*. 2007. V. 30, 4141 – 420.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology, and Applications. Elsevier. 3th ed. 2015.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução - RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada - RDC n° 48, de 31 de março de 2010.

ARDUCA, E.; MASTROMATTEO, M.; SALVADOR, D. de.; SEGUINI, G.; LENARDI, C.; NAPOLITANI, E.; PEREGO, M. Synthesis and characterization of Pδ-layer in SiO_2 by monolayer doping. *Nanotechnology*. 2016. V. 27, 1 – 5.

ARDREY, R. E. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction. Series Analytical Techniques in the Sciences AnTS. John Wiley & Sons, Ltd. 2003.

ASARA, J. M.; SCHWEITZER, M. H. Response to Comment on "Protein Sequences from *Mastodon* and *Tyrannosaurus rex* Revealed by Mass Spectrometry". *Science*. 2008, V. 319, 04 January: 33 – 34.

AOAC International. Association of Official Analytical Chemists. Appendix K. Part I: Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 2012.

AVERY, V. M.; FERNANDEZ, L. S.; SYKES, M. L.; ANDREWS, K. T. Antiparasitc activity of alkaloids from plant species of Papua New Guinea and Australia. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2010. V. 36, n. 3, 275 – 279.

BARROS NETO, B. de.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. Química Nova. 2006. V. 29, 1401 – 1406.

BARROS NETO, B. de.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. Como fazer Experimentos: Pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria. Porto Alegre: Bookman, 4° ed. 2010.

BERG, J. M. T.; LUBERT, J. Bioquímica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 6º Ed. 2008.

BERTOL, Gustavo.; FRANCO, Luzia.; OLIVEIRA, B. H. de. HPLC Analysis of Oxindole Alkaloids in *Uncaria Tomentosa*: Sample Preparation and Analysis Optimisation by Factorial Design. *Phytochemical Analysis*. 2013. V. 23, 143 – 151.

BOGDANOV, M. G.; SVINYAROV, Ivan.; KEREMEDCHIEVA, R.; SIDJIMOV, A. Ionic liquid-supported solid–liquid extraction of bioactive alkaloids. I. New HPLC method for

quantitative determination of glaucine in *Glaucium flavum* Cr. Papaveraceae. *Separation and Purification Technology*. 2012. 97, 221 – 227.

BRAGA, J. W. B.; POPPI, R. J. Figures of merit for determination of the polymorphic purity of carbamazepine by infrared spectroscopy and multivariate calibration. *Journal of Pharmaceutical Science*. 2004. V.93, n. 8, 2124 – 2134.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova. 2010. V. 33, n. 1, 229 – 239.

BRUNS, Roy E.; FAIGLE, J. F. G. Quimiometria. Química Nova. 1985. V. 2, nº 8, 84 – 99.

BRYANT, V. M. Invisible Clues to New World Plant Domestication. *Science*. 2003, V. 299, 14 February: 1029 – 1030.

CERNY, C.; SCHLICHTHERLE-CERNY, H.; AFFOLTER, M. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Mass Spectrometry of Small Polar Compounds in Food Analysis. *Analytical Chemistry*. 2003. V. 75, n. 10, 2349 – 2354.

CHAMPE, P. C.; HARVEY, R. A.; FERRIER, D. R. Bioquímica Ilustrada. Porto Alegre: Artmed. 4º. ed. 2008.

CHEN, S.; ZHANG, H.; LIU, Y.; FANG, J.; LI, S. Determination of Lotus Leaf Alkaloids by Solid Phase Extraction Combined with High Performance Liquid Chromatography with Diode Array and Tandem Mass Spectrometry Detection. *Analytical Letters*, 2013. V. 462846 – 2859.

CHEONG, A. M.; TAN, K. W.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. Improvement of physical stability properties of kenaf (*Hibiscus cannabinus L.*) seed oil-in-water nanoemulsions. *Industrial Crops and Products*. 2016. V. 80, 77 – 85.

CHOI, J. S., JUNG, H. A., MIN, BYUNG-SUN., YOKOZAWA, T., LEE, JE-HYUN., KIM, Y. S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of Coptidis rhizoma alkaloids. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 2009. V. 32, n. 8, 1433 – 1438.

COETZER, R. L. J.; FOCKE, W. W. Optimal designs for estimating the parameters in weighted power-mean-mixture models. *Journal of Chemometrics*. 2010. V. 24, 34 – 42.

CORNELL, John. A. Experiments with mixtures: A review. *Technometrics*. 1973. V. 15, n. 3, 437 - 455.

CORNELL, J. A. Mixture experiments. John Wiley & Sons, Ltd. 3th ed. 2002.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. Química Nova. 2006. V. 29, n. 2, 287 – 292.

CROSIER, Ronald B. Mixture experiments: geometry and pseudocomponents. *Technometrics*. 1984. V. 26, n. 3, 209 – 216.

CROZIER, A.; CLIFFORD, M. N.; ASHIHARA, H. Plant Secondary Metabolites: Occurrence, Structure and role in the Human Diet. Blackwell Publishing Ltd. 1st ed. 2006.

CUSTÓDIO, R.; ANDRADDE, J. C. de.; AUGUSTO, F. O ajuste de funções matemáticas a dados experimentais. Química Nova. 1997. V. 20, n. 2, 219 – 225.

CZELUSNIAK, K. E.; BROCCO, A.; PEREIRA, D. F.; FREITAS, G. B. L. Farmacobotânica, fitoquímica e farmacologia do Guaco: revisão considerando Mikania glomerata Sprengel e Mikania laevigata Schulyz Bip. ex Baker. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2012. V. 14, n. 2, 400 – 409.

DAUPHAS, N.; REMUSAT, L.; CHEN, J. H.; ROSKOSZ, M.; PAPANASTASSIOU, D. A.; STODOLNA, J.; EILER, J. M. Neutron-Rich Chromium Isotope Anomalies in Supernova Nanoparticles. *The Astrophysical Journal*. 2010. V. 720, 1577–1591.

DA SILVA, D. B.; SIQUEIRA, J. M. de.; MATOS, M. de F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. da S. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de annonaceae. Química Nova. 2007. V. 30, n. 8, 1809 – 1812.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. John Wiley & Sons, Ltd. 3nd ed. 2009.

DELAROZA, F.; SCARMINIO, I. Spacino. Mixture design optimization of extraction and mobile phase media for fingerprint analysis of Bauhinia variegata L. *Jounal Separation Science*. 2008. V. 31, 1034 – 1041.

DOWNARD, K. M. Mass Spectrometry: A Foundation Course. *The Royal Societyof Chemistry*. 2004.

EKMAN, R.; SILBERRING, J.; WESTMAN-BRINKMALM, A.; KRAJ, A. MASS SPECTROMETRY: Instrumentation, Interpretation, and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. 1st ed. 2009.

FERREIRA, M. M. C.; ANTUNES, A. M.; MELGO, M. S.; VOLPE, P. L. O. Quimiometria I: um tutorial. Química Nova. 1999. V. 22, n. 5, 724 – 731.

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. Química Nova. 2010. V. 33, n. 9, 1829.

GAD, Haidy A.; EL-AHMADY, S. H.; ABOU-SHOER, M. I.; AL-AZIZI, M. M. Application of Chemometrics in Authentication of Herbal Medicines: A Review. *Phytochemical Analysis*. 2013. V. 24, 1 – 24.

GARCIA, L. M. Z.; OLIVEIRA, T. F. de.; SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design - Principal component determination of synergic solvent interactions for natural product extractions. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*. 2010. V. 103, 1 – 7.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. Química Nova. 2007. V. 30, 374 – 381.

GONZÁLEZ, A. G.; HERRADOR, M. Á. A practical guide to analytical method validation, including measurement uncertainty and accuracy profiles. *Trends in Analytical Chemistry*. 2007. V. 26, n. 3, 227 – 238.

GRANA, R. P. Validación in-house y determinación de grasa por gravimetría en conservas de raciones de combate del Ejército de Tierra. *Sanidad Militar*. 2014. V. 70, n. 2, 88 – 94.

GUPTA, P.; BHATNAGAR, I.; KIM, S.; VERMA, A. K.; SHARMA, A. In-vitrocancer cell cytotoxicity and alpha amylase inhibition effect of seven tropical fruit residues. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2014. V. 4, 665 – 671.

GROSS, Jürgen H. Mass Spectrometry: A Textbook. SPRINGER. 1st ed. 2004.

HAM, B. M. Even electron mass spectrometry with biomecule applications. John Wiley & Sons, Ltd. 1st ed. 2008.

HAN, B. H.; PARK, M. H. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of Zizyphus vulgaris var. spinosus. *Archives of Pharmacal Research*. 1987. V. 10, n. 4, 203 – 207.

HARTMANN, C.; SMEYERS-VERBEKE, J.; MASSART, D. L.; MCDOWAL, R. D. Validation of bioanalytical chromatographic methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1998. V. 17, 193 – 218.

HATTORI, M.; ZHANG, C.; NAKAMURA, N.; TEWTRAKUL, S.; SUN, Q.; WANG, Z.; FUJIWARA, T. Sesquiterpenes and Alkaloids from Lindera chunii and their inhibitory activities against HIV-1 Integrase. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 2002. V. 50, n. 9, 1195 – 1200.

HOFFMANN, E. de., STROOBANT, Vincent. Mass Spectrometry: Principles and Applications. John Wiley & Sons, Ltd. 3th ed. 2007.

HUBER L. Validation on Qualification in Analytical Laboratories. Taylor & Francis Group. 2nd ed. 2007.

INMETRO. Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Industrial. DOQ-CGCRE-008 - Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos Revisão 04 – julho/2011.

KALTASHOV, I. A.; EYLES, S. J. Mass spectrometry in biophysics: conformation and dynamics of biomolecules. John Wiley & Sons, Ltd.1st ed. 2005.

KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; AGNIHOTRI, V. K.; ELSOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; JOSHI, V. C.; SMILLIE, T. Constituents of Nelumbo nuciferaleaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochemistry Letters*. 2008. V. 1, n. 2, 89 – 93.

LIMA, A. M. S.; ARAÚJO, D. G. G. R.; FERREIRA, S. L. C. Use of tartaric acid–citric acid–sucrose as chemical modifier for the determination of lead in several matrices employing ET AAS. *Microchemical Journal*. 2016. V. 126, 368–372.

LIU, Y.; SONG, X.; YAN, R.; LI, T.; CHAI, X.; QI, A.; WANG, Y.; JIANG, Z. Development and validation of a UPLC-DAD-MS method for characterization and quantification of alkaloids in Menispermi Rhizoma and its prep. *Journal of food and drug analysis*. 2013. V. 21, 206 – 218.

LUO, X. B.; CHEN, B.; LIU, J. J.; YAO, S. Z. Simultaneous analysis of N-nornuciferine, O-nornuciferine, nuciferine, and roemerine in leaves of *Nelumbo nucifera Gaertn* by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection-electrospray mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*. 2005. V. 538, 129 – 133.

MARCHI, J.; BRESSIANI, J. C.; BRESSIANI, A. H. A. Mixture Design and Response Surface Analysis of Densification of Silicon Carbide Ceramics with SiO_2-Dy_2O_3-Al_2O_3 Additives. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. 2010. V. 7, 493 – 501.

MAGNO, F.; LAVAGNINI, I.; SERAGLIA, R.; TRALDI, P. Quantitative Applications of Mass Spectrometry. John Wiley & Sons, Ltd. 1st ed. 2006.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. Química Nova. 2008. V. 31, n. 5, 1218 – 1223.

MILLER, J. N.; MILLER. J. C. Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry. Pearson Education Limited. 6th ed. 2010.

MCLAFFERTY, Fred W.; FRIDRIKSSON, E. K.; HORN, D. M.; LEWIS, M. A.; ZUBAREV, R. A. Biomolecule Mass Spectrometry. *Science*. 1999, V. 284, 21 May: 1289-1290.

MORAES, M. C. B.; LAGO, C. L. do. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray" aplicada ao estudo de espécies inorgânicas e organometálicas. Química Nova. 2003. V. 26, n. 4, 556-563.

NIESSEN, W. M. A. Liquid Chromatography - Mass Spectrometry. Taylor & Francis Group. 3th ed. 2006.

PAULI, E. D.; SCARMINIO, I. S.; TAULER, R. Analytical investigation of secondary metabolites extracted from Camellia sinensis L. leaves using a HPLC-DAD-ESI/MS data fusion strategy and chemometric methods. *Journal of Chemometrics*. 2016. V. 30. 75 – 85.

PEREIRA, P. C. de S.; FREITAS, C. F. de.; CHAVES, C. S.; ESTEVÃO, B. M.; PELLOSI, D. S.; TESSARO, A. L.; BATISTELA, V. R.; SCARMIN, I. S.; CAETANO, W.; HIOKA, N. A quimiometria nos cursos de graduação em química: Proposta do uso da análise multivariada na determinação de pKa. Química Nova. 2014. V. 37, n. 8, 1417 – 1425.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. 2012. V. 3, n. 4, 146 – 152.

PÉREZ-LOZANO, P.; GARCÍA-MONTOYA, E.; ORRIOLS, A.; MIÑARRO, M.; TICÓ, J.R.; SUÑÉNEGRE, J. M. Development and validation of a new HPLC analytical method for the determination of alprazolam in tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2004. V. 34, n. 5, 979 – 987.

RAFAMANTANANA, M. H.; DEBRUS, B.; RAOELISON, G. E.; ROZET, E.; LEBRUN, P.; UVERG-RATSIMAMANGA, S.; HUBERT, P.; QUETIN-LECLERCQ, J. Application of design of experiments and design space methodology for the HPLC-UV separation optimization of aporphine alkaloids from leaves of *Spirospermum penduliflorum Thouars*. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2012. V. 62, 23 – 32.

RASKIN, I.; GRAZIOSE, R.; RATHINASABAPATHY, T.; LATEGAN, C.; POULEV, A.; SMITH, P. J.; GRACE, M.; LILA, M. A. Antiplasmodialactivity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera L*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2011. V. 133, n. 1. 26 – 30.

PASCHOAL, J. A. R.; RATH, S.; AIROLDI, F. P. da S.; REYES, F. G. R. Validação de métodos cromatográficos para a determinação de resíduos de medicamentos veterinários em alimentos. Química Nova. 2008. V. 31, n. 5, 1190 – 1198.

RIBEIRO, M. L.; POLESE, L.; JUNIOR, O. P. de A.; BRITO, N. M. Validação de Métodos Analíticos: Estratégia e Discussão. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*. 2003. V. 13, 129 – 146.

REIS, C.; ANDRADE, J. C. de. Planejamento experimental para misturas usando cromatografia em papel. Química Nova. 1996. V. 19 n. 3, 313 – 319.

ROZET, E.; MARIN, R. D.; ZIEMONS, E.; BOULANGER, B.; HUBERT, P. Advances in validation, risk and uncertainty assessment of bioanalytical methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2011. V. 55, 848–858.

SANTOS, L. G.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; CABRAL, D. L.V.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia analítica para determinação de taninos pelo método de difusão radial. Revista Brasileira de Plantas Medicinais. 2014. V.16, n. 4, 881 – 885.

SCHEFFÉ, H. Simplex-centroid designs for experiments with Mixtures. *Journal of Royal Statistical Society*. 1963. Series B, V. 25, 235 – 263.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; MILITÃO, G. C. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALBUQUERQUE, S.; SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*. 2009. V. 16, n. 11, 1059 – 1063.

SILVA, F. M. A. da.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A. de.; SOUZA, A. D. L. de.; PINHEIRO, M. L. B. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-MS/MS. Química Nova. 2012. V. 35, n. 5, 944 – 947.

SILVA, F. M. A. da. Estudo fitoquímico e biológico de *Unonopsis guatterioides* e *Unonopsis duckei*. Manaus, 2011. 117f. Dissertação (Mestrado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química - PPGQ. Instituto de Ciências Exatas. Universidade Federal do Amazonas, 2011.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Spectrometric identification of Organic Compounds. John Wiley & Sons, Ltd. 7th ed. 2005.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design – principal component optimization for selective compound extraction from plant material. *Analytica Chimica Acta*. 2007. V. 30, 3302 – 3310.

SOARES, P. K.; SCARMINIO, I. S. Multivariate Chromatographic Fingerprint Preparation and Authentication of Plant Material from the Genus Bauhinia. *Phytochemical Analysis*. 2008. V. 19, 78 – 85.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Statistical mixture design investigation of fractionated and total extracts from *Erythrina speciosa Andrews leaves*. *Journal of Separation Science*. 2009. V. 32. 644 – 652.

SOARES, P. K.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. Principal component and Tucker3 analyses of high performance liquid chromatography with diode-array detection fingerprints of crude extracts of *Erythrina speciosa Andrews leaves*. *Analytica Chimica Acta*. 2012. V. 736, 36 – 44.

SIM, Hee-Jung.; KIM, J. H.; LEE, K. R.; Hong, J. Simultaneous Determination of Structurally Diverse Compounds in Different Fangchi Species by UHPLC-DAD and UHPLC-ESI-MS/MS. *Jornal Molecules*. 2013. V. 18, 5235 – 52507.

SINGH, A.; BAJPAI, V.; KUMAR, S.; KUMAR, K. B. R.; KUMAR, B. Simultaneous quantification of protoberberine and aporphine alkaloids in diferente plant parts of *Coscinium fenestratum Gaertner Colebr*. By liquid chromatography-hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometer. *Journal of Medicinal Plants Studies*. 2016. V. 4, n. 3, 144 – 148.

SOUZA, A. M. de.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para análise exploratória de óleos vegetais comestíveis por espectroscopia no infravermelho médio e análise de componentes principais: um tutorial, parte I. Química Nova. 2012. V. 35, n.1, 223 – 229.

SOUZA, E. B. R. de.; SILVA, R. R. da.; AFONSO, S.; SCARMINIO, I. S. Enhanced extraction yields and mobile phase separations by solvent mixtures for the analysis of metabolites in *Annona muricata L. Leaves*. *Journal of Separation Science*. 2009. V. 32, 4176 – 4185.

STAFFORD JUNIOR, T. W.; SEMKEN JUNIOR, H. A.; GRAHAM, R. W.; KLIPPEL, Walter F.; SOUTHON, SMIRNOV, John. Nikol G.; MARKOVA, A. First accelerator mass spectrometry 14C dates documenting contemporaneity of nonanalog species in late Pleistocene mammal communities. *Geology*. 1999. V. 27. n. 10, 903 – 906.

STÉVIGNY, C.; WAUTIER, Marie-Caroline.; JIWAN, Jean-Louis H.; CHIAP, P.; HUBERT, P. QUENTIN-LECLERCQ, J. Development and Validation of a high Performance Liquid Chromatographic method for Quantitative Determination of Aporphine Alkaloids from Diferente Samples of *Cassytha filiformis. Planta Medica*. 2004. V. 70, 764 – 770.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents. 2005. V. 5, n. 2, 173 – 182.

TAVERNIERS, Isabel.; LOOSE, M. D.; BOCKSTAELE, E. V. Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. *Trends in Analytical Chemistry*. 2004. V. 23, n. 8, 535 – 552.

TAYZ, L.; ZEIGER, E. Fisiologia vegetal. Artmed. 3ed. Porto Alegre: 2004.

TEIXEIRA, C. C. C.; CABRAL, T. P. de F.; DE SOUSA, J. P. B.; TEIXEIRA, S. de P.; BASTOS, J. K.; DE FREITAS, L. A. P. Study of Quality Assurance For *Peumus Boldus M* Products By Botanic Profiling, Extraction Optimization, HPLC Quantification and Antioxidant Assay. *Pharmacognosy Journal*. 2016. V. 8, 264 – 272.

THOMPSON, M.; ELLISON, S. L. R.; WOOD, R. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation Of Methods Of Analysis. *Pure and Applied Chemistry*. 2002. V. 74, n. 5, 835 – 855.

THOMPSON, Michael., ELLISON, Stephen L. R., WOOD, Roger. The International Harmonized Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories. 2006. V. 78, n. 1, 145 – 196.

TIWARI, V. K.; KISHORE, N.; MISHRA, B. B.; TRIPATHI, V. Alkaloids as potential antitubercular agents. *Fitoterapia*. 2009. V. 80, n. 3, 149 – 163.

SUESS, David T.; PRATHER, Kimberly A. Mass Spectrometry of Aerosols. *Chemical Reviews*. 1999. V. 99, 3007 – 3035.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Ângelo C.; MACIEL, Maria A. M. Plantas medicinais: cura segura? Química Nova. 2005. V. 28, n. 3, 519 – 528.

VESMANN, Jörgen. Selectivity or specificity? Validation of analytical methods from the perspective of an analytical chemist in the pharmaceutical industry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*.1996. V. 14, 867 – 869.

WAJNER, Moacir.; BARSCHAK, Alethéa G.; LUFT, Ana Paula.; PIRES, Ricardo.; GRILLO, Eugênio.; LOHR, Alfredo.; FUNAYAMA, Carolina.; SANSEVERINO, TERESA Maria.; GIUGLIANI, Roberto.; VARGAS, Carmen R. Organic aciduria: diagnosis in high-risk Brazilian patients. Jornal de Pediatria. 2001. V. 77, n. 5, 401 – 406.

WATSON, J. T.; SPARKMAN, O. D. Introduction to Mass Spectrometry Instrumentation, Applications and Strategies for Data Interpretation. John Wiley & Sons, Ltd. 4th ed. 2007.

WEI, Jinxia.; JIANG, Zhen.; CUI, Zhi.; GUO, Xingjie. Rapid determination of eight oxoisoaporphine alkaloids in Rhizoma Menispermi by the optimal homogenate extraction followed by UPLC-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2015. V. 407, 5535 – 5540.

WOLDEMARIAM, Tibebe Z.; BETZ, Joseph M.; HOUGHTON, Peter J. Analysis of aporphine and quinolizidine alkaloids from *Caulophyllum thalictroides* by densitometry and HPLC. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997. V. 15, 839 – 843.

WILSON, K.; WALKER, J. M. Principles and techniques of biochemistry and molecular biology. Cambridge University Press. 7th ed. 2010.

WU, Shengji.; UDDIN, Azhar.; NAGANO, Saori.; OZAKI, Masaki.; SASAOKA, Eiji. Fundamental Study on Decomposition Characteristics of Mercury Compounds over Solid Powder by Temperature-Programmed Decomposition Desorption Mass Spectrometry. *Energy Fuels*. 2011. V. 25, 144 – 153.

ZHAO, Y.; ZHAO, Q.; WANG. K. Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia Chen*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2006. V. 106 n. 3, 408 – 413.

ZHANG, Shuiying.; ZHANG, Qian.; GUO, Qiang.; ZHAO, Yunfang.; GAO, Xiaoli.; CHAI, Xingyun.; TU1, Pengfei. Characterization and simultaneous quantification of biological aporphine alkaloids in *Litsea cubeba* by HPLC with hybrid ion trap time-of-flight mass spectrometry and HPLC with diode array detection. *Journal of Separation Science*. 2015. V. 38, 2614 – 2624.