

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

Henrique Faccin

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO
MARCADORES ANALÍTICOS EM EXTRATOS DE PLANTAS
MEDICINAIS DA AMAZÔNIA POR UHPLC-ESI-MS/MS**

Santa Maria, RS
2016

Henrique Faccin

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO MARCADORES
ANALÍTICOS EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA POR
UHPLC-ESI-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Santa Maria, RS
2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Faccin, Henrique
Determinação de compostos fenólicos como marcadores analíticos em extratos de plantas medicinais da Amazônia por UHPLC-ESI-MS/MS / Henrique Faccin.- 2016.
145 p. ; 30 cm

Orientador: Leandro Machado de Carvalho
Coorientador: Marcelo Barcellos da Rosa
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Naturais e Exatas, Programa de Pós-Graduação em Química, RS, 2016

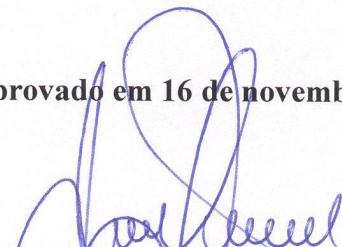
1. Compostos fenólicos 2. Plantas medicinais da Amazônia 3. Supressão iônica I. Machado de Carvalho, Leandro II. Barcellos da Rosa, Marcelo III. Título.

Henrique Faccin

**DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO MARCADORES
ANALÍTICOS EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA POR
UHPLC-ESI-MS/MS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Química**, área de concentração Química Analítica.

Aprovado em 16 de novembro de 2016:



Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)



Ionara Regina Pizzutti, Dra. (UFSM)



Diogo de Oliveira Silva, Dr. (UNIFESP)

Santa Maria, RS
2016

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, pelo desejo de proporcionarem aos filhos
a formação que não puderam receber.*

AGRADECIMENTOS

A concretização deste trabalho ocorreu somente com o apoio primordial desta instituição, a Universidade Federal de Santa Maria, através do Programa de Pós-Graduação em Química e do Laboratório de Análises Químicas (Lachem). Esta verdadeira segunda casa, recebe agora meus agradecimentos.

Também foram de extrema importância para obtenção deste grau a formação recebida ao longo dos anos através dos diversos professores dos quais fui aluno. Destaco aqui meu orientador, prof. Leandro Machado de Carvalho, e os demais professores do grupo de pesquisa: prof. Paulo Cícero do Nascimento, profa. Denise Bohrer, prof. Marcelo Barcellos da Rosa e profa. Carine Viana.

É importante destacar também o apoio fundamental das agências financiadoras deste trabalho: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs) e Embrapa Amazônia Oriental.

Meus agradecimentos também são direcionados às professoras Maria Teresa Galcerán Huguet e Encarnación Moyano Morcillo e aos professores Óscar Núñez Burcio e Francisco Javier Santos, todos extremamente responsáveis por me proporcionar uma sólida formação científica ao longo da minha estada na Universitat de Barcelona.

Por fim, agradeço ao apoio incondicional da minha família, seja emocional ou financeiro, ao carinho e compreensão da Roberta, à amizade dos amigos para toda a vida e à companhia dos colegas de trabalho.

*Voldria ser tan divers,
tan lliure i divers com l'aire,
conèixer tots els camins
i jeure en totes les cales.*

(Miquel Martí i Pol, *Cançó*, 2.7-10)

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS COMO MARCADORES ANALÍTICOS EM EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS DA AMAZÔNIA POR UHPLC-ESI-MS/MS

AUTOR: Henrique Faccin

ORIENTADOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

Um método para separação, identificação e quantificação de 24 compostos fenólicos utilizando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial (UHPLC-MS/MS) foi desenvolvido e validado. Seis espécies vegetais originárias da região amazônica brasileira e tradicionalmente utilizadas como plantas medicinais pela população local foram estudadas (*Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata*). Os analitos foram separados por uma coluna de fase reversa SB-C18 (2,1 × 50 mm, 1,8 µm) utilizando um gradiente de eluição composto por ácido acético 0,1% em água (v/v) e acetonitrila, a uma vazão constante de 0,8 mL min⁻¹. O limite de detecção variou entre 0,5 e 130,3 µg kg⁻¹. A repetibilidade e a precisão intermediária apresentaram resultados satisfatórios e as recuperações obtidas para os 24 analitos variaram entre 91,7 e 123,8% para as matrizes avaliadas. Ademais, um estudo sistemático das várias fontes de supressão iônica em análises por UHPLC-MS/MS foi realizado para os 24 compostos fenólicos em extratos das seis plantas medicinais. As contribuições para a supressão iônica global do método foram avaliadas pela ótica dos efeitos de matriz, dos aditivos de fase móvel, da coeluição de analitos e da competição por cargas elétricas durante a ionização. Neste âmbito, a influência dos aditivos de fase móvel sobre a eficiência de ionização mostrou-se muito pronunciada, onde efeitos de supressão iônica de aproximadamente 90% e efeitos de enriquecimento iônicos maiores que 400% puderam ser observados. Os efeitos negativos causados pela escolha errônea de padrões internos em estudos de quantificação foram também avaliados e discutidos a partir da perspectiva da supressão iônica. Este trabalho também mostrou a importância de se realizar estudos com tal abordagem mesmo para matrizes muito semelhantes, como variedades de uma mesma espécie vegetal, tendo em vista os diferentes efeitos de supressão iônica observados entre matrizes, para um mesmo analito. Além disso, ensaios de quantificação dos 24 analitos foram realizados pelo método de adição do padrão ($r > 0,99$) utilizando dados adquiridos pelo modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM). Rutina, apigenina e os ácidos vanílico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e *trans*-cinâmico foram determinados em todas as plantas estudadas em pelo menos um dos extratos analisados. Deve ser destacado o alto conteúdo de rutina nas variedades de *Bauhinia variegata* (até 2,52 mg g⁻¹ de planta), ácido clorogênico em espécies do gênero *Cecropia* (até 0,57 mg g⁻¹ de planta) e catequina em *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (1,77 mg g⁻¹ de planta). Possíveis marcadores analíticos e potenciais marcadores ativos para controle de qualidade de medicamentos fitoterápicos foram designados para cada espécie vegetal estudada.

Palavras-chave: Compostos fenólicos. Plantas medicinais da Amazônia. Supressão iônica.

ABSTRACT

DETERMINATION OF PHENOLIC COMPOUNDS AS ANALYTICAL MARKERS IN EXTRACTS OF AMAZONIAN MEDICINAL PLANTS BY UHPLC-ESI-MS/MS

AUTHOR: Henrique Faccin

ADVISOR: Prof. Dr. Leandro Machado de Carvalho

A method for separation, identification and quantification of 24 phenolic compounds using ultra-high performance liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (UHPLC-MS/MS) was developed and validated. Six plant species originating from the Brazilian Amazon region and traditionally used as medicinal plants by local people were studied (*Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, *Cecropia obtusa* and *Cecropia palmata*). The analytes were separated by a reversed phase SB-C18 column (2.1 × 50 mm, 1.8 μm) using a gradient elution composed of 0.1% acetic acid in water (v/v) and acetonitrile, at a constant flow rate of 0.8 mL min⁻¹. The limit of detection ranged between 0.5 and 130.3 μg kg⁻¹. Intra- and inter-day precision showed satisfactory results and the recoveries obtained for the 24 analytes varied between 91.7 and 123.8% for the evaluated matrices. Moreover, a systematic study on the various sources of ion suppression in UHPLC-MS/MS analysis was carried out for the 24 phenolic compounds in extracts of all the six medicinal plants. The contributions of matrix effects, mobile-phase additives, analyte co-elution and electric charge competition during ionization to the global ion suppression were evaluated. Herein, the influence of mobile-phase additives on the ionization efficiency was found to be very pronounced, where ion suppression of approximately 90% and ion enhancement effects greater than 400% could be observed. The negative effect caused by the wrong choice of internal standard (IS) on quantitative studies was also evaluated and discussed from the perspective of ion suppression. This work also shows the importance of performing studies with this approach even for very similar matrices, such as varieties of medicinal plants from the same species, because different effects were observed for the same analyte. Furthermore, quantification determinations of the 24 analytes were performed with the standard addition method ($r > 0.99$) using data acquired in selected reaction monitoring (SRM) mode. Rutin, apigenin, vanillic acid, caffeic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid and *trans*-cinnamic acid were found in all the studied plants in at least one of the analysed extracts. It should be emphasized the high content of rutin in varieties of *Bauhinia variegata* (up to 2.52 mg g⁻¹ of plant), chlorogenic acid in species of genus *Cecropia* (up to 0.57 mg g⁻¹ of plant) and catechin in *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* (1.77 mg g⁻¹ of plant). Possible analytical markers and potential active markers for quality control of herbal drugs were assigned to each plant species.

Keywords: Phenolic compounds. Amazonian medicinal plants. Ion suppression.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Evolução do número de publicações envolvendo compostos fenólicos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas, de 1990 aos dias atuais.....	28
Figura 2 – Evolução do número de publicações envolvendo compostos fenólicos, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) e espectrometria de massas, de 2007 aos dias atuais.	28
Figura 3 – Esquema das etapas envolvidas no processo de extração sólido-líquido de um analito em uma partícula sólida. (A) permeação do solvente nos poros da partícula; (B) desorção do analito; (C) difusão do analito através da matéria orgânica; (D) dissolução do analito no solvente; (E) difusão do analito no solvente para saída de dentro dos poros; e (F) saída do analito e completa dissolução deste no solvente.	35
Figura 4 – Representação esquemática das etapas de um método de extração em fase sólida. (A) Representação de um cartucho de SPE; (B) etapa de condicionamento do cartucho com um solvente adequado; (C) percolação da amostra ou extrato; (D) etapa de lavagem com um solvente adequado; e (E) eluição dos analitos retidos com um solvente de maior força eluotrópica.	36
Figura 5 – Eficiência de separação em função do diâmetro e tipo de partícula.	39
Figura 6 – Avaliação da evolução tecnológica em cromatografia líquida. (a-f) Cromatogramas representativos da separação de 5 substâncias sob um mesmo eluente e temperatura de eluição. (g-h) Detalhes das condições de análise referentes aos cromatogramas representados em (a-f).	40
Figura 7 – Esquema representando as possíveis espécies químicas a serem geradas durante o processo de ionização por elétrons em um espectrômetro de massas.	42
Figura 8 – Esquema genérico de um espectrômetro de massas.	44
Figura 9 – Representação esquemática de um quadrupolo linear composto por barras cilíndricas, destacando os diferentes potenciais aplicados às barras paralelas opostas entre si. (A) Seção transversal e (B) perfil das barras cilíndricas ao longo do eixo z.....	45
Figura 10 – Diagrama a_u versus q_u de estabilidade de um analisador quadrupolar mostrando quatro regiões de estabilidade (A-D) para movimentos ao longo das direções x e y	47
Figura 11 – Detalhe da metade superior da região A do diagrama a_u versus q_u de estabilidade de um analisador quadrupolar para movimentos ao longo das direções x e y	47

Figura 12 – Varredura de U e V , a uma razão U/V constante, de um quadrupolo linear. Uma maior razão a/q implica em uma maior resolução (R), conforme mostrado pela <i>scan line</i> . $R_1 > R_2 > R_3$	48
Figura 13 – Esquema de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. O primeiro (Q_1) e o último (Q_3) quadrupolos são analisadores de massa. O hexapolo central (q_2) é uma célula de colisão utilizada apenas com aplicação de radiofrequência para transmissão de todos os íons ali produzidos através da colisão com um gás inerte.	49
Figura 14 – Diferentes modos de leitura para um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.	49
Figura 15 – Representação esquemática do modo de leitura SRM em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.	50
Figura 16 – Representação esquemática da extremidade do capilar no qual o eluato da cromatografia é nebulizado e ionizado.	51
Figura 17 – Foto representando formação do cone de Taylor e a rápida expansão da nuvem de gotículas, formando uma névoa.....	52
Figura 18 – Representação esquemática da formação dos íons através da ionização por eletrospray.....	53
Figura 19 – Representação do mecanismo de ionização através da fonte de ionização por eletrospray.....	53
Figura 20 – Estudo da fragmentação do íon precursor do ácido <i>trans</i> -cinâmico (m/z 147). No detalhe, representação esquemática da fragmentação da molécula desprotonada $[M-H]^-$ de ácido <i>trans</i> -cinâmico, evidenciando a formação do íon produto de razão m/z 103, com uma energia de colisão ótima de 5 V. O íon produto de razão m/z 77 é formado quando uma energia de colisão maior que 15 V é aplicada à célula de colisão.	74
Figura 21 – Representação da correlação logarítmica existente entre a intensidade de supressão iônica (%) e a concentração molar dos aditivos avaliados. No gráfico estão expressos os dados experimentais para o analito galangina, utilizando como solvente ACN:H ₂ O (1:1, v/v).	77
Figura 22 – Separação cromatográfica obtida inicialmente para avaliação da necessidade de se utilizar uma eluição por gradiente (TIC SRM). Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min ⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna <i>Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD</i> , 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent).....	81
Figura 23 – Otimização da parte inicial do programa de eluição por gradiente (TIC SRM). De cima para baixo: concentração inicial de acetonitrila igual a 5, 10 e 15% (v/v). Fase	

móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent). 83

Figura 24 – Otimização do tempo de gradiente (TIC SRM). De cima para baixo: tempo de gradiente igual a 3, 9, 10, 14 e 16 min. Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent). 84

Figura 25 – Otimização da parte final do programa de eluição por gradiente (TIC SRM). Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent). 85

Figura 26 – Otimização da temperatura de separação. De cima para baixo: temperatura de separação igual a 40 e 50 °C. Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent). 85

Figura 27 – Cromatograma otimizado obtido da análise dos 24 analitos abordados por este estudo no modo de monitoramento de reações selecionadas (EIC SRM). (A) ácido gálico, (B) ácido clorogênico, (C) (+)-catequina, (D) ácido vanílico, (E) ácido cafeico, (F) 6-hidroxicumarina, (G) ácido *p*-cumárico, (H) ácido ferúlico, (I) rutina, (J) 4-hidroxicumarina, (K) ácido rosmarínico, (L) quercitrina, (M) miricetina, (N) fisetina, (O) resveratrol, (P) 3-acetilcumarina, (Q) ácido *trans*-cinâmico, (R) quercetina, (S) luteolina, (T) apigenina, (U) canferol, (V) 3,6-dihydroxiflavona, (W) crisina e (X) galangina. 86

Figura 28 – Otimização do volume de injeção. 88

Figura 29 – Otimização da vazão do gás de secagem da fonte de eletrospray. 88

Figura 30 – Otimização da temperatura do gás de secagem da fonte de eletrospray. ... 89

Figura 31 – Otimização da pressão do nebulizador da fonte de eletrospray. 89

Figura 32 – Otimização da voltagem do capilar da fonte de eletrospray. 90

Figura 33 – Otimização do tempo de leitura de cada transição de massa pelo espectrômetro de massas. 91

Figura 34 – Avaliação das recuperações de analitos obtidas pelo procedimento de extração em fase sólida. 94

Figura 35 – (A) Perfis de supressão iônica qualitativa obtidos por infusão dos compostos fenólicos depois da injeção de fase móvel (branco) e depois da injeção de extratos de plantas pré-tratados e não-fortificados. (B-G) Perfis do efeito de matiz calculado a partir dos perfis de

infusão de cada matriz com relação ao branco. (B) *Cecropia palmata*, (C) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (D) *Cecropia obtusa*, (E) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (F) *Mansoa alliacea* e (G) *Connarus perrottetii*. 96

Figura 36 – Resultados quantitativos para supressão ou enriquecimento iônicos para todos os analitos em todas as matrizes avaliadas. 97

Figura 37 – Resultados de supressão iônica por competição. O eixo horizontal representa o fator de diluição do extrato e o eixo vertical representa os analitos. A superfície representa a área dos picos normalizada e multiplicada pelo fator de diluição, conforme legenda. As matrizes avaliadas foram (A) *Cecropia palmata*, (B) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (C) *Cecropia obtusa*, (D) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (E) *Mansoa alliacea* e (F) *Connarus perrottetii*. 99

Figura 38 – Resultados de supressão iônica diferencial para 2-naftol como um potencial padrão interno. As razões entre as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno foram normalizadas com relação a uma solução analítica dos analitos em MeOH/CH₃COOH 0,2% (1:1, v/v), a qual é representada por (1). A zona cinza indica o intervalo de $\pm 15\%$ do valor obtido para a solução controle. As matrizes avaliadas foram (2) *Cecropia palmata*, (3) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (4) *Cecropia obtusa*, (5) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (6) *Mansoa alliacea* e (7) *Connarus perrottetii*. 101

Figura 39 – Gráfico representando a avaliação da linearidade para a curva analítica de ácido ferúlico. 106

Figura 40 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando extratos etanólicos de três diferentes coletas das plantas descritas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato etanólico seco. 112

Figura 41 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando extratos etanólicos de três diferentes coletas das plantas descritas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato etanólico seco. 113

Figura 42 – Cromatogramas do tipo “*fingerprint*” para infusões da primeira coleta das espécies analisadas obtidos por UHPLC(-)ESI-MS, em modo de varredura (*m/z* 135-620). (A) *Cecropia palmata*, (B) *Cecropia obtusa*, (C) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (D) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (E) *Mansoa alliacea* e (F) *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*. 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Listagem não exaustiva de estudos realizados nos últimos anos para a determinação de compostos polifenólicos nas mais variadas matrizes empregando cromatografia líquida.....	30
Tabela 2 – Tipos de analisadores de massas utilizados em espectrometria de massas.	42
Tabela 3 – Tempos de retenção (t_R) e parâmetros da análise por espectrometria de massas dos compostos fenólicos selecionados.	63
Tabela 4 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos de pH em fase móvel composta por metanol e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.....	75
Tabela 5 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos de pH em fase móvel composta por acetonitrila e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.....	76
Tabela 6 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos tamponantes em fase móvel composta por metanol e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.....	78
Tabela 7 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos tamponantes em fase móvel composta por acetonitrila e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.....	79
Tabela 8 – Supressão ou enriquecimento iônicos medidos em pares de analitos coeluídos. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.	92
Tabela 9 – Parâmetros de validação referentes à detectabilidade e linearidade instrumentais do método de UHPLC-ESI-MS/MS desenvolvido.	104
Tabela 10 – Precisão e exatidão instrumentais do método de UHPLC-ESI-MS/MS desenvolvido.....	105
Tabela 11 – Concentrações dos compostos fenólicos em <i>Cecropia palmata</i> determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$)......	107
Tabela 12 – Concentrações dos compostos fenólicos em <i>Cecropia obtusa</i> determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).	108

Tabela 13 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Bauhinia variegata* var. *variegata* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$)..... 108

Tabela 14 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Bauhinia variegata* var. *alboflava* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$)..... 109

Tabela 15 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Mansoa alliacea* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$)..... 110

Tabela 16 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$)..... 110

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Corrente alternada (do inglês <i>alternating current</i>)
Anvisa	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CID	Dissociação induzida por colisão (do inglês <i>collision-induced dissociation</i>)
DAD	Detector de arranjo de diodos (do inglês <i>diode array detector</i>)
DC	Corrente contínua (do inglês <i>direct current</i>)
EIC	Cromatograma de íons extraídos (do inglês <i>extracted-ion chromatogram</i>)
Embrapa	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
ESI	Ionização por eletrospray (do inglês <i>electrospray ionization</i>)
Fapergs	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul
FIA	Análise por injeção em fluxo (do inglês <i>flow injection analysis</i>)
FTICR	Analisador de massas do tipo ressonância ciclotrônica de íon por transformada de Fourier (do inglês <i>Fourier transform ion cyclotron resonance</i>)
FWHM	Largura à meia altura (do inglês <i>full width at half maximum</i>)
HESI	Ionização por eletrospray aquecida (do inglês <i>heated electrospray ionization</i>)
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high performance liquid chromatography</i>)
ILOD	Limite de detecção instrumental (do inglês <i>instrumental limit of detection</i>)
ILOQ	Limite de quantificação instrumental (do inglês <i>instrumental limit of quantification</i>)
Inmetro	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
IT	Analisador de massas do tipo armadilha de íons (do inglês <i>ion trap</i>)
LC	Cromatografia líquida (do inglês <i>liquid chromatography</i>)
LIT	Analisador de massas do tipo armadilha de íons linear (do inglês <i>linear ion trap</i>)
MS	Espectrometria de massas (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de massas sequencial
MS ⁿ	Espectrometria de massas de múltiplos estágios
PAD	Detector por amperometria pulsado (do inglês <i>pulsed amperometric detector</i>)
PDA	Arranjo de diodos (do inglês <i>photodiode array</i>)
PPSUS	Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde
PTFE	Politetrafluoretileno, Teflon [®]
Q	Analisador de massas do tipo quadrupolo
QqQ	Analisador de massas do tipo triplo quadrupolo

QqQ _{LIT}	Analisador de massas híbrido triplo quadrupolo-armadilha de íons linear
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
SRM	Monitoramento de reação selecionada (do inglês <i>selected reaction monitoring</i>)
TIC	Cromatograma de íons total (do inglês <i>total ion chromatogram</i>)
TOF	Analisador de massas do tipo tempo-de-voou (do inglês <i>time-of-flight</i>)
UFLC [®]	<i>Ultra Fast Liquid Chromatography</i>
UHPLC	Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (do inglês <i>ultra-high performance liquid chromatography</i>)
UPLC [®]	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>
UV	Ultra-violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	25
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
2.1 Determinação de compostos fenólicos em plantas.....	27
2.2 Espécies vegetais estudadas.....	29
2.3 Preparo de amostras.....	33
2.3.1 Extração sólido-líquido.....	34
2.3.2 Extração em fase sólida.....	35
2.4 Cromatografia líquida de ultra-alta eficiência.....	37
2.5 Espectrometria de massas.....	41
2.5.1 Analisador de massas do tipo quadrupolo.....	44
2.5.2 Espectrometria de massas sequencial.....	48
2.6 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.....	50
2.6.1 Ionização por eletrospray.....	51
2.6.2 Supressão iônica.....	54
3. OBJETIVOS.....	57
3.1 Objetivos específicos.....	57
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	59
4.1 Reagentes.....	59
4.2 Preparo de amostras.....	59
4.3 Determinação por UHPLC-ESI-MS/MS.....	61
4.4 Procedimentos analíticos.....	62
4.4.1 Avaliação de íons precursores dos analitos.....	62
4.4.2 Otimização das energias de colisão dos íons precursores dos analitos.....	62
4.4.3 Otimização das condições de injeção, ionização por eletrospray e de detecção.....	65
4.4.4 Avaliação da supressão iônica causada por aditivos à fase móvel.....	65
4.4.5 Avaliação da supressão iônica causada por coeluição de analitos.....	66

4.4.6 Avaliação qualitativa da supressão iônica causada por efeitos de matriz.....	67
4.4.7 Avaliação quantitativa da supressão iônica causada por efeitos de matriz.....	67
4.4.8 Avaliação da supressão iônica causada por competição	68
4.4.9 Avaliação da supressão iônica diferencial	68
4.4.10 Validação do método cromatográfico desenvolvido.....	69
4.5 Análise estatística dos dados.....	71
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
5.1 Otimização das condições de análise por espectrometria de massas	73
5.2 Supressão iônica por aditivos da fase móvel	74
5.3 Desenvolvimento do método de separação por UHPLC	80
5.4 Otimização das condições de injeção, ionização por eletrospray e de detecção.....	87
5.5 Supressão iônica por coeluição de analitos.....	91
5.6 Desenvolvimento de método para preparo de amostras por extração em fase sólida....	93
5.7 Supressão iônica pelo efeito de matriz.....	95
5.8 Supressão iônica por competição durante a ionização.....	98
5.9 Supressão iônica diferencial.....	100
5.10 Validação do método de análise.....	103
5.11 Aplicação dO MÉTODO na análise de extratos de plantas medicinais	106
6 CONCLUSÃO	117
BIBLIOGRAFIA	119
APÊNDICE A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ANALITOS ESTUDADOS.....	129
ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO.....	133

1 INTRODUÇÃO

A Amazônia é uma das regiões com maior biodiversidade do planeta e com maior potencial para descoberta de novas plantas medicinais (SILVA et al., 2007). Estudos etnobiológicos e etnofarmacológicos salientam que as populações indígenas detêm um avançado conhecimento medicinal sobre a riqueza botânica da região. Tal conhecimento é transmitido em nível familiar e é incrementado à medida em que novas enfermidades surgem (SCOLES, 2006). Entretanto, a ciência desconhece boa parte destas plantas, havendo poucos estudos de caracterização de seus compostos bioativos e de determinação de suas atividades farmacológicas. No outro extremo, porém, milhões de pessoas consomem plantas com apelo medicinal dada a forte divulgação da fitoterapia promovida pelos meios de comunicação (DE FREITAS e FERNANDES, 2006).

Diferentemente do que ocorre com as plantas originárias do bioma amazônico, várias plantas medicinais orientais e diversos alimentos que apresentam altas taxas de atividade antioxidante têm sido um importante foco de estudo da Química Analítica nos últimos anos. Dentre os objetivos estudados estão o desenvolvimento de métodos para caracterizar quimicamente tais plantas e/ou alimentos (BRAVO, GOYA e LECUMBERRI, 2007; CEYMANN et al., 2012; KECKES et al., 2013), a busca pela identificação dos compostos que possam conferir essa característica antioxidante citada (NUENGCHAMNONG, KRITTASILP e INGKANINAN, 2009; NUENGCHAMNONG, KRITTASILP e INGKANINAN, 2011; ZHANG et al., 2014), e a medição, em si, do poder antioxidante dos componentes das diversas matrizes estudadas (SPIGNO, TRAMELLI e DE FAVERI, 2007; BURSAL et al., 2013; KHLIFI et al., 2013).

No contexto da caracterização de compostos antioxidantes, uma das ferramentas que tem se destacado é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas. A técnica de LC-MS (do inglês *liquid chromatography coupled to mass spectrometry*) é capaz de conferir a alta seletividade exigida para a análise de matrizes complexas, tais como as matrizes vegetais. Ademais, a utilização da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC, do inglês *ultra-high performance liquid chromatography*) permite o aumento da eficiência das separações ao passo que os tempos de análise podem ser consideravelmente reduzidos. Somado a isso, a espectrometria de massas sequencial com analisadores do tipo triplo quadrupolo constitui uma poderosa ferramenta de quantificação (GROSS, 2011).

Nos últimos anos foram relatados na literatura estudos do teor de compostos antioxidantes em diversas matrizes, onde se destacam azeite, vinho, frutas, mel e ervas

comumente utilizadas na Medicina Tradicional Chinesa, sendo que, na grande maioria dos métodos desenvolvidos por LC-MS, a fonte de ionização por eletrospray (ESI, do inglês *electrospray ionization*) foi empregada. Entretanto, poucos são os trabalhos que mencionam investigações a respeito de efeitos adversos que causam interferência na análise de compostos antioxidantes em matrizes complexas (SUAREZ et al., 2008; ALARCÓN-FLORES, M. I. et al., 2012; BECERRA-HERRERA et al., 2014). Sabe-se, porém, que diversos efeitos de matriz atuam sobre o mecanismo de ionização da fonte ESI, tornando os métodos que a utilizam sujeitos a diversos erros (MÜLLER, C. et al., 2002; ANTIGNAC et al., 2005; STAHNKE, REEMTSMA e ALDER, 2009; BJORK et al., 2010; GALLART-AYALA, MOYANO e GALCERAN, 2010; LUCINI et al., 2012).

Neste trabalho, um novo, rápido e seletivo método para separar, identificar e quantificar simultaneamente 24 compostos fenólicos utilizando UHPLC-ESI-MS/MS foi desenvolvido e validado. Uma avaliação sistemática completa das diversas causas de interferência na determinação dos analitos por espectrometria de massas foi realizada. O método foi aplicado à análise de extratos vegetais de seis diferentes plantas medicinais oriundas da região amazônica (*Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata*). Pela primeira vez identificou-se em tais espécies vários compostos fenólicos potencialmente bioativos dentre os mais relatados na literatura científica. Também foi criada a base para se atribuir potenciais marcadores analíticos para o controle de qualidade de drogas vegetais que venham a ser desenvolvidas com tais espécies. Por fim, cabe salientar que este trabalho integra o escopo de dois grandes projetos de pesquisa. O primeiro deles foi executado em convênio com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa Amazônia Oriental), localizada em Belém (PA). O segundo projeto foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (Fapergs), através do Programa Pesquisa para o Sistema Único de Saúde (PPSUS), dentro da linha temática “Pesquisa da eficácia e segurança de plantas medicinais nativas”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM PLANTAS

Os compostos fenólicos compõem uma das principais classes de metabólitos secundários de plantas, sendo importantes para o seu crescimento e reprodução, atuando também como antipatógenos e repelentes de consumidores tróficos. Tais compostos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxila, incluindo seus derivados funcionais (ésteres, metil ésteres, glicosídeos, etc.) (HO, 1992). Inseridas nesta definição estão diversas famílias de substâncias, tais como fenóis simples substituídos, fenilpropanóides, derivados do ácido benzoico, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanos e ligninas (SHAHIDI e NACZK, 2003).

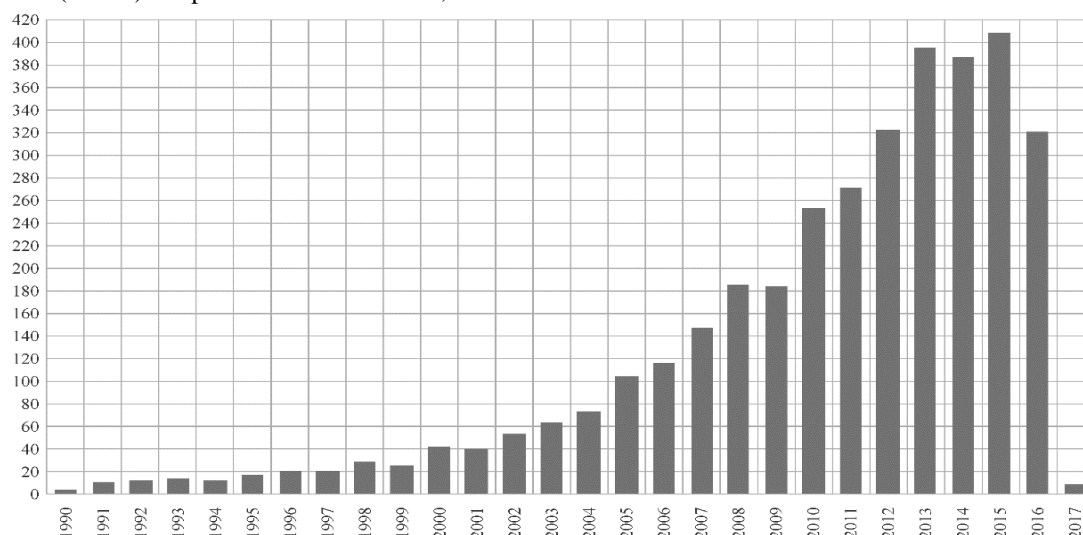
Ao contrário da maioria das substâncias necessárias à nutrição humana, que possuem funções geralmente específicas, os compostos (poli)fenólicos apresentam ações pleiotrópicas devido aos efeitos aditivos e sinérgicos existente entre os compostos dessa classe (FRAGA, 2009). Diversos estudos têm sido relatados associando uma dieta rica em compostos fenólicos com uma redução da incidência de doenças degenerativas. Isso ocorre porque tais compostos atuam diretamente na eliminação de radicais livres, que são os responsáveis por gerar o estresse oxidativo (desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigênio e sua desintoxicação por sistemas biológicos) (DAAYF e LATTANZIO, 2009).

Neste contexto é que há um interesse crescente no conhecimento da composição das plantas quanto às substâncias (poli)fenólicas. Nos últimos anos diversos métodos analíticos envolvendo técnicas de separação foram publicadas para a determinação de compostos fenólicos nas mais variadas matrizes. Dentre os principais avanços pode-se citar o uso de técnicas cromatográficas de ultra-alta eficiência, como UHPLC. O uso de partículas de suporte das colunas cromatográficas com diâmetro inferior a 2 μm tem tido um incremento considerável, visto a necessidade de se aumentar a resolução de cromatogramas frente às complexas matrizes vegetais (NOVAKOVA et al., 2010; LUO et al., 2015). Entretanto, o número de publicações utilizando UHPLC ainda é bastante reduzido quando comparado à técnica predecessora, a HPLC (do inglês *high performance liquid chromatography*). Uma comparação pode ser feita analisando a Figura 1 frente à Figura 2.

Adicionalmente, a espectrometria de massas tem mostrado ser uma ferramenta imprescindível neste campo de estudo devido sua alta seletividade. Os mais variados analisadores de massa disponíveis no mercado têm sido utilizados, tais como quadrupolos,

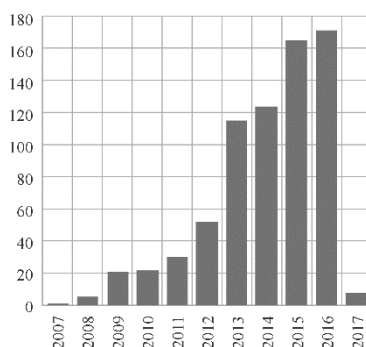
triplos quadrupolos, armadilha de íons, armadilha de íons linear, tempo de voo, Orbitrap[®], e inclusive ressonância ciclôtrônica de íons com transformada de Fourier. Entretanto, nos dias atuais, poucos são os trabalhos que consideram a complexidade das matrizes estudadas como causa de possíveis interferências analíticas no acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas (YAOA et al., 2005; SONG, J. Z. et al., 2010; RAMIREZ-AMBROSI et al., 2013). Sendo assim, muitos trabalhos não abordam uma adequada etapa de preparo e limpeza de amostras, trazendo apenas como problemática a caracterização química das matrizes estudadas.

Figura 1 – Evolução do número de publicações envolvendo compostos fenólicos, cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e espectrometria de massas, de 1990 aos dias atuais.



Fonte: Relatório de citações obtido do website Web of ScienceTM para os tópicos *phenol* AND "HPLC" AND MS*, em 16/11/2016.

Figura 2 – Evolução do número de publicações envolvendo compostos fenólicos, cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) e espectrometria de massas, de 2007 aos dias atuais.



Fonte: Relatório de citações obtido do website Web of ScienceTM para os tópicos *phenol* AND (UHPLC OR UPLC OR UFLC) AND MS*, em 16/11/2016.

Entretanto, a maior parte das publicações na área de determinação de compostos fenólicos em matrizes vegetais está distante das tecnologias mais avançadas de separação e detecção. A Tabela 1 mostra um sumário de alguns métodos publicados mais recentemente que empregam técnicas de alta eficiência, alta resolução e/ou alta seletividade para determinação de compostos fenólicos.

2.2 ESPÉCIES VEGETAIS ESTUDADAS

No ano de 2009, com o intuito de nortear estudos farmacológicos e fitoquímicos, o Ministério da Saúde brasileiro publicou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS). Esta relação consiste em uma listagem de 71 espécies vegetais que apresentam potencial para gerar produtos de interesse ao sistema público de saúde brasileiro, tal como medicamentos fitoterápicos. Dentre as espécies citadas, parte delas está presente naturalmente no bioma amazônico, ressaltando a importância deste no cenário da medicina botânica. Integrante na listagem da RENISUS, a *Bauhinia variegata* (popularmente conhecida como pata-de-vaca) é uma das espécies vegetais abordadas por este trabalho, a qual é tradicionalmente utilizada por seu efeito hipoglicemiante (COELHO-FERREIRA, 2009). Escassos relatos na literatura confirmam a atividade antidiabética da *B. variegata* e de outras espécies do gênero, a qual se deve provavelmente pela ação de seus flavonoides (DA SILVA e FILHO, 2002).

Outras espécies medicinais da Amazônia são tradicionalmente utilizadas na medicina popular do norte brasileiro e, por essa razão, fazem parte deste trabalho. *Cecropia palmata* (embaúba vermelha) e *Cecropia obtusa* (embaúba branca) são relatadas como tendo ações tranquilizante e antirreumática, além de atuar contra a doença arterial coronariana (GIORGETTI, NEGRI e RODRIGUES, 2007; SILVA et al., 2007). *Connarus perrottetii* (barbatimão do Pará) é citada no tratamento de infecções do trato genitourinário e de problemas do útero, como cistos ovarianos e corrimento vaginal, sendo inclusive relatada por apresentar atividade citotóxica contra a linhagem de células cancerígenas KM-12 de adenocarcinoma de cólon humano. Seu uso para atenuação dos sintomas da gripe com tosse e congestão nasal, além de dor de cabeça, também é relatado (SUFFREDINI et al., 2007; COELHO-FERREIRA, 2009). Por fim, *Mansoa alliacea* (cipó-alho) é tradicionalmente utilizada no tratamento de reumatismo, além de também ser usada contra febre e gripe. Estudos indicam que *M. alliacea* também possui ações anti-inflamatória, antifúngica, antiviral e antimicrobiana (CÉLINE et al., 2009; RUIZ et al., 2011; SANZ-BISET e CAÑIGUERAL, 2011).

Tabela 1 – Listagem não exaustiva de estudos realizados nos últimos anos para a determinação de compostos polifenólicos nas mais variadas matrizes empregando cromatografia líquida.

(continua)

Analitos	Matriz	Preparo de amostras	Técnica analítica	Analizador de massas	Tempo de análise	Referência
29 compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides e cumarinas	Chá	Filtração e diluição	UHPLC-PDA	–	20 min	NOVAKOVA et al. (2010)
10 compostos fenólicos	<i>Radix Salviae Miltiorrhizae</i>	Filtração	UHPLC-UV-ESI-MS/MS	Q-TOF	14 min	SONG, J. Z. et al. (2010)
67 antocianinas, 102 flavonóis e 40 derivados do ácido hidroxicinâmico	<i>Brassica juncea</i> var. <i>Coss</i>	Centrifugação e filtração	UHPLC-PDA-ESI-MS ⁿ	LIT-Orbitrap [®]	65 min	LIN et al. (2011)
Polifenóis	<i>Salvia officinalis</i> L.	Filtração	UHPLC-UV-ESI-MS/MS	QqQ	34 min	ZIMMERMANN et al. (2011)
12 polifenóis, incluindo catequinas, ácidos fenólicos e procianidinas	Maçãs	Filtração e diluição	UHPLC-ESI-MS	Q	10 min	CEYMANN et al. (2012)
21 compostos fenólicos	<i>Spondias purpúrea</i> L.	Cromatografia preparativa	UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	QqQLIT	23 min	ENGELS et al. (2012)
39 compostos fenólicos	Maçã	Centrifugação e filtração	UHPLC-DAD-ESI-MS	Orbitrap [®]	21 min	DE PAEPE et al. (2013)
17 polifenóis	Mel	Filtração	UHPLC-HESI-MS/MS	LIT-Orbitrap [®]	9 min	KECKES et al. (2013)
32 polifenóis, incluindo ácidos fenólicos	<i>Cistus incanus</i>	Extração em fase sólida	HPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	IT	80 min	RIEHLE, VOLLMER e ROHN (2013)
40 compostos fenólicos	Maçãs	Filtração e diluição	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	12 min	ALARCÓN-FLORES, María Isabel et al. (2014)
25 polifenóis identificados, dentre os quais 12 foram quantificados	<i>Polygonum aviculare</i> L.	Filtração e diluição	UHPLC-DAD e UHPLC-ESI-MS	IT	23 min	GRANICA (2015)
14 compostos fenólicos	Avelãs, amêndoas e pistache	Filtração	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	13 min	GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN et al. (2015)

Tabela 1 – Listagem não exaustiva de estudos realizados nos últimos anos para a determinação de compostos polifenólicos nas mais variadas matrizes empregando cromatografia líquida.

(continuação)						
Analitos	Matriz	Preparo de amostras	Técnica analítica	Analizador de massas	Tempo de análise	Referência
27 compostos fenólicos	<i>Penthorum chinense</i>	Filtração	HPLC-ESI-MS/MS	FTICR	70 min	GUO et al. (2015)
20 polifenóis	<i>Lycium barbarum</i> L.	Extração em fase sólida	UHPLC-MS/MS	QqQLIT	11 min	MAGIERA e ZARĘBA (2015)
16 compostos bioativos, incluindo ácidos fenólicos, flavonoides, terpenoides e ácidos graxos	<i>Myristica fragrans</i>	Filtração e diluição	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQLIT	9,4 min	PANDEY, R., RAMESHKUMAR e KUMAR (2015)
178 compostos, incluindo 21 flavonas	BuChang NaoXinTong (suplemento composto por 16 plantas)	Filtração	UHPLC-DAD-ESI-MS ⁿ	LIT-Orbitrap [®]	26 min	SONGSONG et al. (2015)
22 compostos fenólicos	Mel	Extração em fase sólida	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	33,2 min	WABAI DUR et al. (2015)
9 compostos fenólicos	<i>Hedyosmum brasiliense</i>	Diluição	UHPLC-ESI-MS/MS	LIT-Orbitrap [®]	30 min	AMOAH et al. (2015)
22 compostos fenólicos	Frutas tropicais brasileiras	Filtração	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	11 min	BATAGLION et al. (2015)
12 compostos fenólicos	Plantas medicinais da Amazônia	Filtração e diluição	HPLC-PAD	–	70 min	DA SILVEIRA et al. (2015)
12 compostos fenólicos	Azeitonas	Filtração	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	9,5 min	MELLIU, ZWEIGENBAUM e MITCHELL (2015)
8 compostos da classe das catequinas	Chás preto, verde e branco	Filtração e diluição	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQ	3,2 min	SVOBODA, VLCKOVA e NOVAKOVA (2015)
10 compostos fenólicos	<i>Hydrocotyle sibthorpioides</i>	Centrifugação e filtração	UHPLC-ESI-MS/MS	Q-Orbitrap [®]	10 min	KUMARI et al. (2016)
15 compostos fenólicos, incluindo 8 flavonóis	Fruto de <i>Prunus persica</i> L.	Extração em fase sólida	HPLC-ESI-MS ⁿ	IT	105 min	MOKRANI et al. (2016)

Tabela 1 – Listagem não exaustiva de estudos realizados nos últimos anos para a determinação de compostos polifenólicos nas mais variadas matrizes empregando cromatografia líquida.

(continuação)

Analitos	Matriz	Preparo de amostras	Técnica analítica	Analizador de massas	Tempo de análise	Referência
25 compostos fenólicos	<i>Pyrus communis</i>	Cromatografia preparativa	HPLC-PDA-HESI-MS/MS	Q-Orbitrap®	35 min	SIMIRGIOTIS et al. (2016)
16 compostos fenólicos	Espécies do gênero <i>Ocimum</i>	Filtração e diluição	UHPLC-ESI-MS/MS	QqQLIT	13 min	PANDEY, Renu et al. (2016)
16 compostos derivados do ácido cinâmico e 16 flavonoides	<i>Artemisia annua</i> L.	Filtração	HPLC-ESI-MS/MS	QqQLIT	65 min	SONG, Y. et al. (2016)
12 compostos fenólicos	Frutos de <i>Copaifera langsdorffi</i>	Filtração	HPLC-DAD-FLD	–	55 min	BATISTA et al. (2016)
9 compostos fenólicos	<i>Capparis spinosa</i> L.	Filtração e diluição	HPLC-DAD-ESI-MS	Q	20 min	FRANCESCA et al. (2016)
52 compostos fenólicos, sendo 8 os compostos quantificados	<i>Scutellaria indica</i> L.	Filtração	UHPLC-PDA-ESI-MS/MS	Q-TOF	20 min	HE et al. (2016)

Fonte: Do autor.

Alguns trabalhos prévios que abordam a caracterização química destas espécies vegetais foram publicados. DA SILVEIRA et al. (2015) avaliaram a presença de 12 diferentes compostos fenólicos por meio de cromatografia líquida com detecção por amperometria pulsada utilizando β -ciclodextrina como modificador da fase móvel. Neste estudo, foram analisados extratos obtidos com diferentes solventes (água, etanol, n-butanol e acetato de etila) das seis espécies mencionadas. Dentre os principais analitos determinados, encontram-se ácido gálico e catequina para *Connarus perrottetii*, ácido clorogênico para as espécies do gênero *Cecropia*, ácidos ferúlico e *p*-cumárico para *Mansoa alliacea* e rutina para as variedades de *Bauhinia variegata* abordadas pelo estudo. Outro estudo de caracterização realizado para *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* foi feito por MÜLLER, L. S. et al. (2015), utilizando eletroforese capilar de zona como técnica de separação. Dentre os 14 analitos investigados, rutina e catequina foram determinados nos extratos avaliados da referida espécie vegetal.

Por fim, GOBO et al. (2016) investigaram a presença de compostos triterpenoides nas espécies *Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata*. O método desenvolvido utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas sequencial por meio de fotoionização foi capaz de determinar 6 diferentes compostos triterpênicos, cujas concentrações variaram desde 0,42 mg kg⁻¹, para ácido ursólico, até 371,96 mg kg⁻¹, para β -amirina.

2.3 PREPARO DE AMOSTRAS

A análise de substâncias orgânicas está condicionada ao uso de métodos de determinação que não alterem os compostos objeto (ou que os alterem de forma controlada), seja na etapa instrumental de determinação destes, ou mesmo ao longo do método aplicado para o preparo das amostras, visando a posterior introdução nos instrumentos de análise. Como são poucos os métodos de detecção específicos (ou muito seletivos) para a análise de compostos orgânicos, a maior dificuldade do processo analítico acaba por recair sobre o preparo das amostras, que engloba, em geral, etapas de extração, pré-concentração e limpeza (*clean-up*), as quais podem ser realizadas em série ou simultaneamente (CÂMARA et al., 2002).

O objetivo dessas diferentes etapas de preparo acaba por ser a obtenção dos analitos em maior grau de pureza. Assim, a primeira etapa a ser aplicada no preparo de amostras geralmente é a extração das substâncias a serem analisadas, separando-as da matriz. Se o procedimento de extração não for eficiente, parte do analito seguirá unido à matriz, provocando erros de análise.

Para evitar tal tipo de problema, extrações sucessivas são feitas de forma a aumentar a eficiência global da extração.

No entanto, em grande parte, as extrações não são específicas e os analitos acabam por ser extraídos juntamente com outras substâncias que podem vir a dificultar ou impedir a determinação dos analitos alvo. Assim, após a etapa de extração pode ser necessário aplicar uma etapa de limpeza dos extratos obtidos, de forma a tentar eliminar as substâncias interferentes à análise oriundas da matriz (MOLDOVEANU e DAVID, 2002). Infelizmente, é difícil atingir uma situação ideal onde apenas os analitos sejam isolados. O grau de dificuldade aumenta quando se trabalha com métodos de análise abrangendo compostos orgânicos de diferentes classes ou famílias (em termos de estrutura química). Isso ocorre porque dificilmente as condições químicas e físicas utilizadas durante o preparo de amostras atendem de maneira ideal a todos os analitos estudados. Deve-se, portanto, alcançar uma condição experimental otimizada de compromisso entre todos os analitos alvo estudados para permitir uma etapa de preparo de amostras que seja a mais representativa e eficiente possível.

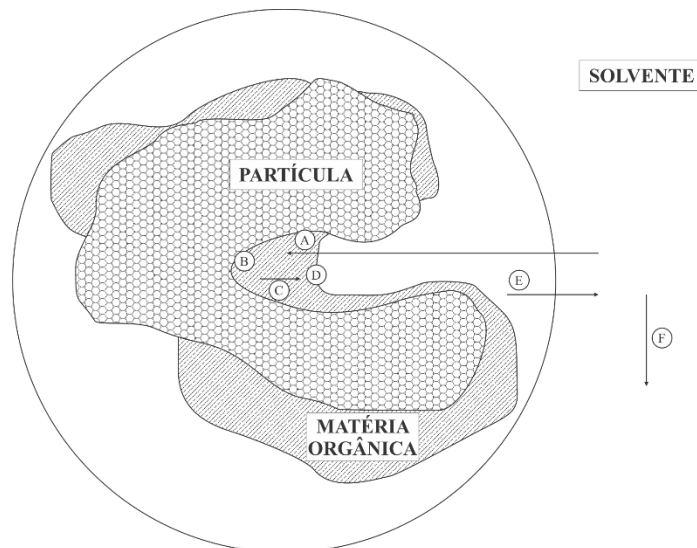
2.3.1 Extração sólido-líquido

Provavelmente a extração sólido-líquido é o processo de extração mais utilizado para a análise de compostos orgânicos em amostras sólidas. Para tal, a amostra sólida é colocada em contato com uma determinada quantidade de um solvente adequado, seguindo a máxima *similia similibus solvuntur* (semelhante dissolve semelhante). Ou seja, procura-se utilizar um solvente com polaridade semelhante à polaridade dos analitos a serem determinados posteriormente pelo método de análise (CÁMARA et al., 2002). Outro fator importante a ser levado em consideração é a semelhança do caráter hidrofílico/lipofílico entre analitos e solventes.

O processo de extração sólido-líquido é baseado no enfraquecimento das interações analito-matriz (fase sólida), ao passo em que se procura incrementar a força das interações analito-solvente (fase líquida). O mecanismo de extração é representado esquematicamente na Figura 3, onde as diferentes etapas que ocorrem durante a extração são abordadas. Inicialmente, o solvente permeia os poros das partículas da matriz/amostra (A) para dessorver o analito que está interagindo com os pontos ativos da matriz (B). Na sequência, o analito difunde através da matéria orgânica aderida à superfície das partículas de amostra (C) e inicia o processo de dissolução no solvente empregado (D). Novamente o analito difunde através do solvente para

sair dos poros das partículas (E) e então é arrastado pelo solvente para o exterior da partícula (F).

Figura 3 – Esquema das etapas envolvidas no processo de extração sólido-líquido de um analito em uma partícula sólida. (A) permeação do solvente nos poros da partícula; (B) desorção do analito; (C) difusão do analito através da matéria orgânica; (D) dissolução do analito no solvente; (E) difusão do analito no solvente para saída de dentro dos poros; e (F) saída do analito e completa dissolução deste no solvente.



Fonte: Adaptado de CÁMARA et al. (2002).

É importante salientar que o uso de etapas sucessivas de extração aumenta a eficiência global de extração. Isso se deve a que o equilíbrio químico envolvido no enfraquecimento das interações analito-matriz é alterado a cada renovação do solvente empregado, visto que a concentração dos analitos presos à matriz também sofre alteração a cada renovação de solvente. Entretanto, à medida em que processos de extração mais exaustivos são aplicados, simultaneamente se extraem maior número de compostos interferentes.

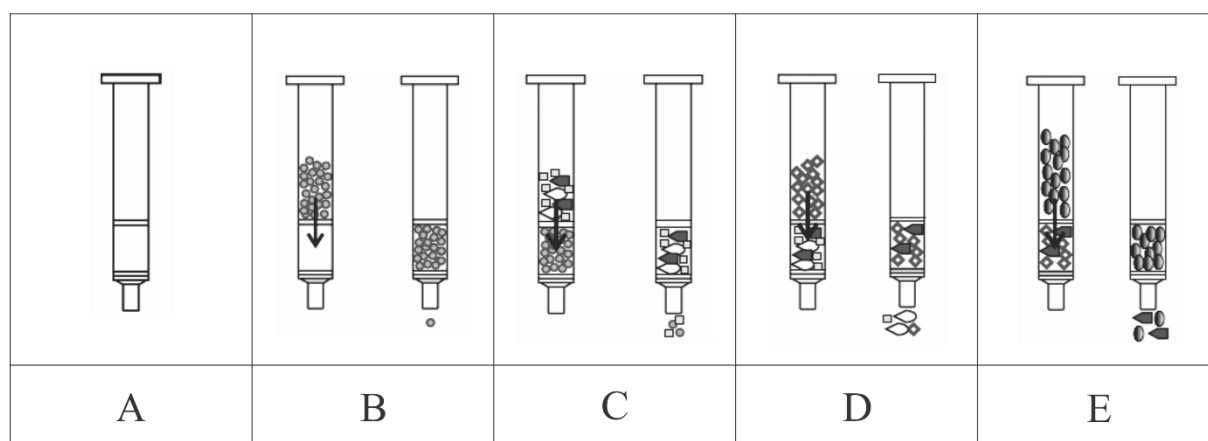
2.3.2 Extração em fase sólida

A extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é um método de extração baseado nas diferenças de afinidade que os analitos e/ou substâncias presentes na matriz apresentam entre uma fase sólida e a própria matriz ou extrato líquido. Dessa forma, quando uma amostra líquida entra em contato com um sorvente sólido, alguns compostos ficarão retidos no sorvente enquanto outros não sofrerão influência da fase sólida. Em outras palavras, a extração em fase sólida pode ser vista como um processo de distribuição dos analitos entre uma fase móvel e uma fase estacionária (MOLDOVEANU e DAVID, 2002).

A forma mais usual da extração em fase sólida se dá através de cartuchos de polietileno, semelhantes ao corpo de uma seringa, nos quais o sorvente está assentado (Figura 4 A). Na prática, o uso da SPE em cartuchos se assemelha a uma separação por cromatografia líquida, onde solventes de diferentes polaridades são percolados através de uma coluna muito curta contendo fase estacionária (sorvente). Entretanto, a SPE não é capaz de efetuar uma separação das substâncias entre si, tais como nos métodos de cromatografia líquida, visto que uma coluna de SPE pode ter um número de pratos apenas inferior a 100 (comparado a alguns milhares de pratos para colunas analíticas de cromatografia líquida) (CÁMARA et al., 2002).

Os métodos desenvolvidos para se utilizar a técnica de SPE geralmente compreendem uma primeira etapa onde o sorvente é condicionado com um solvente de características semelhantes à amostra, tais como pH, força iônica e polaridade (Figura 4 B). Na sequência, um dado volume da amostra é percolado pelo sorvente já condicionado, havendo uma retenção diferencial dos analitos (Figura 4 C). Uma etapa de lavagem é realizada com a finalidade principal de eliminação de interferentes (Figura 4 D). Para tal, solventes com diferentes polaridades e pH podem ser utilizados, sempre procurando-se evitar que os compostos de interesse eluam. Como última etapa, é realizada a eluição dos analitos retidos utilizando um solvente de maior força eluotrópica (Figura 4 E).

Figura 4 – Representação esquemática das etapas de um método de extração em fase sólida. (A) Representação de um cartucho de SPE; (B) etapa de condicionamento do cartucho com um solvente adequado; (C) percolação da amostra ou extrato; (D) etapa de lavagem com um solvente adequado; e (E) eluição dos analitos retidos com um solvente de maior força eluotrópica.



Fonte: Adaptado de SUPELCO (1998).

As características dos solventes utilizados dependem, em maior grau, do tipo de sorvente adotado. Este, por sua vez, é escolhido de acordo com os analitos de interesse abordados pelo método a ser desenvolvido. De acordo com o sorvente e os solventes utilizados,

diferentes mecanismos de extração são empregados (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009). Na maioria dos casos, utiliza-se um sorvente apolar, do tipo C18, e solventes como água, acetonitrila e/ou metanol. Neste exemplo específico, o mecanismo de retenção principal é o equilíbrio de partição. Entretanto, outros mecanismos podem ser utilizados, como adsorção, troca iônica, exclusão molecular e bioafinidade.

Os sorventes apolares do tipo C18 são constituídos por partículas sólidas de sílica recobertas por cadeias alquílicas, contendo 18 átomos de carbono, quimicamente ligadas ao suporte sólido. Esse tipo de sorvente é bastante adequado para a retenção de compostos orgânicos presentes em amostras líquidas polares. Quando a amostra ou o extrato passam através desse tipo de sorvente, os analitos interagem com a fase quimicamente ligada através de interações de Van der Waals e interações hidrofóbicas, mantendo-se retidos. A eluição acontece, então, por meio da percolação de solventes adequados de maior caráter apolar, como acetonitrila e metanol (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009). A etapa intermediária de lavagem é realizada com solventes de força eluotrópica tal que não sejam capazes de eluir os analitos, mas tenham força eluotrópica suficiente para eluir os compostos interferentes.

2.4 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ULTRA-ALTA EFICIÊNCIA

Nos últimos anos, têm-se dado maior atenção às separações cromatográficas rápidas baseadas em preceitos da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência. A UHPLC difere de sua antecessora tecnológica, a cromatografia líquida de alta eficiência, principalmente por três razões que, quando combinadas, aumentam drasticamente sua eficiência de separação: o uso de partículas de fase estacionária com menor diâmetro e/ou especialmente desenvolvidas para UHPLC, o uso de maiores temperaturas de separação e o uso de pressões bastante elevadas para levar à cabo separações cromatográficas (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009).

A eficiência de uma separação cromatográfica é explicada por uma vasta teoria desenvolvida ao longo dos anos (COLLINS, BRAGA e BONATO, 2006) e que pode ser resumida através da Equação de van Deemter:

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu \quad (1)$$

onde H se refere à altura de prato da separação cromatográfica, A é o termo que explica a difusão de Eddy, B é o termo que explica a difusão longitudinal, C é o termo que aborda a resistência à transferência de massa e u é a velocidade linear da fase móvel.

A teoria de pratos nos diz que quanto menor for a altura dos pratos (H), maior número de pratos (N) possuirá uma dada coluna, ou seja, maior será sua eficiência de separação. A equação (1) também pode ser representada da seguinte forma:

$$H = H_E + H_L + (H_{SP} + H_{MP} + H_{SMP}) \quad (2)$$

onde, H_E se refere à altura de prato devido à difusão de Eddy, H_L à altura de prato devido à difusão longitudinal, H_{SP} à altura de prato devido à transferência de massa na fase estacionária, H_{MP} à altura de prato devido à transferência de massa na fase móvel e H_{SMP} à altura de prato devido à transferência de massa na fase móvel estagnada.

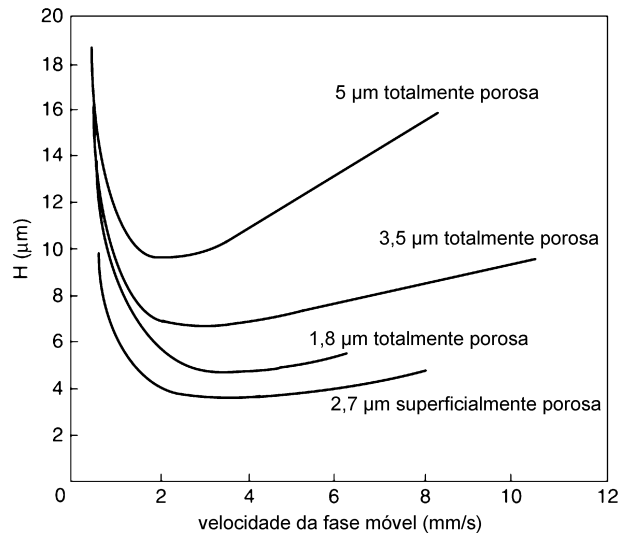
Cada um dos termos que compõem a equação (2) é detalhado a seguir (CELA, LORENZO e CASAIS, 2002):

$$H = 2\lambda d_p + 2\gamma D_m \frac{1}{u} + \left(q \frac{k}{(1+k)^2} \frac{d_f^2}{D_s} + \omega \frac{d_p^2}{D_M} + \frac{(1-\varphi+k)^2}{30(1-\varphi)\gamma_p(1+k)^2} \frac{d_p^2}{D_M} \right) u \quad (3)$$

onde, λ é um fator que diz respeito à estrutura do recheio da coluna cromatográfica, d_p é o diâmetro de partícula, γ é um fator de obstrução da coluna, D_m é o coeficiente de difusão do soluto (analito) na fase móvel, u é a velocidade linear da fase móvel, q é um fator de configuração ou forma do líquido dispersado na fase estacionária, k é o fator de retenção do analito, d_f é a espessura da cobertura líquida da fase estacionária, D_s é o coeficiente de difusão do soluto na fase estacionária, ω é um fator empírico que corrige a difusão radial e φ é a fração da fase móvel total no espaço intra-particular.

De acordo com a equação (3), e conforme exemplificado pela Figura 5, pode-se observar que, para uma mesma condição de eluição cromatográfica, tanto o diâmetro de partícula como a espessura da cobertura líquida da fase estacionária são os parâmetros que mais afetam o valor global da altura de prato (H). Em outras palavras, à medida em que o diâmetro de partícula é reduzido de 5 para 1,8 μm , a altura de prato (H) ótima também decresce – o que corresponde a um aumento da eficiência da coluna. Conclui-se, então, que o principal avanço tecnológico na busca de melhores eficiências de separação para a UHPLC é o desenvolvimento de partículas de fase estacionária com diâmetros cada vez menores.

Figura 5 – Eficiência de separação em função do diâmetro e tipo de partícula.



Fonte: Adaptado de SNYDER, KIRKLAND e DOLAN (2009).

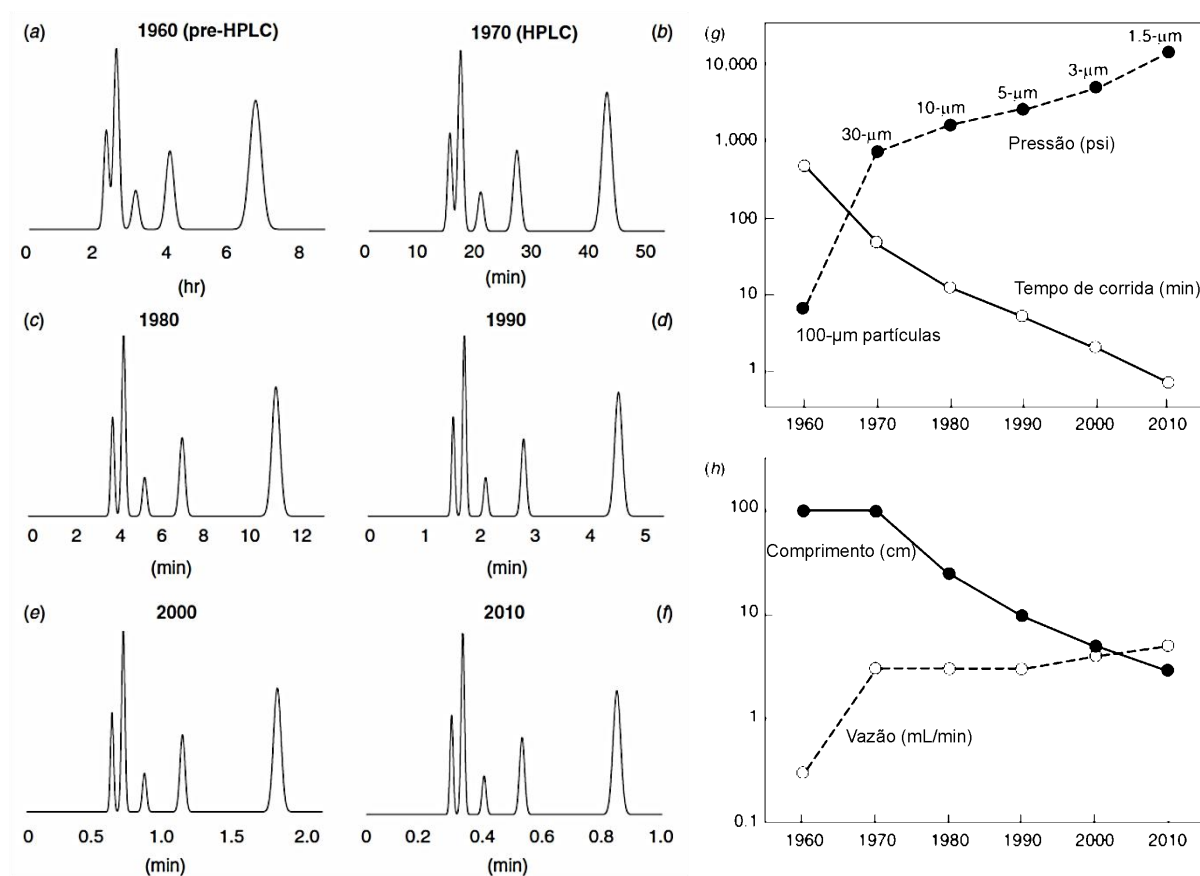
O uso de partículas de menor tamanho, porém, imprime uma maior resistência à passagem de fase móvel pela coluna empacotada, exigindo maiores pressões de operação dos sistemas cromatográficos para UHPLC. A Figura 6 retrata, de 1960 a 2010, como a redução do diâmetro das partículas de fase estacionária incrementou as pressões necessárias para se realizar as separações cromatográficas, bem como exigiu a diminuição do tamanho das colunas de separação. Por outro lado, o tempo de análise foi reduzido drasticamente e a vazão de eluente utilizada não sofreu alterações consideráveis nas últimas décadas.

Como mostrado, uma pressão muito mais elevada deve ser utilizada para se manter uma vazão de fase móvel praticamente constante utilizando colunas com menores partículas. A vantagem do uso de partículas com diâmetros inferiores a 2 μm é que não ocorrem perdas consideráveis em resolução e eficiência de separação à medida em que as vazões de eluente são aumentadas (Figura 5). Ademais, a Figura 6 (a-f) exemplifica como a diminuição do tamanho de partícula de fase estacionária melhora a eficiência de separação, o que pode ser constatado pela largura de base dos picos cromatográficos mostrados (em unidades de tempo), sem perdas para a resolução das separações.

Entretanto, na prática, quando as pressões utilizadas ultrapassam o limite de 5.000 psi (~340 bar), a fase móvel começa a ter sua viscosidade aumentada de acordo com o aumento da pressão (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009). Em outras palavras, pode-se dizer que a pressão do sistema não aumenta de forma proporcional ao aumento da vazão de fase móvel. Outro efeito do aumento da pressão do sistema é o aumento do atrito entre a fase móvel e a fase

estacionária que preenche a coluna, de forma que calor é gerado neste processo. Uma vez que estes efeitos não sejam controlados de forma eficiente pela instrumentação cromatográfica, a eficiência da separação pode vir a ser afetada por variações nos coeficientes de difusão dos analitos e alterações na viscosidade da fase móvel.

Figura 6 – Avaliação da evolução tecnológica em cromatografia líquida. (a-f) Cromatogramas representativos da separação de 5 substâncias sob um mesmo eluente e temperatura de eluição. (g-h) Detalhes das condições de análise referentes aos cromatogramas representados em (a-f).



Fonte: Adaptado de SNYDER, KIRKLAND e DOLAN (2009).

Uma maneira prática e eficiente de contornar tal problema é o uso de temperaturas de separação maiores que a temperatura ambiente. Dessa forma, a viscosidade da fase móvel diminui consideravelmente e o coeficiente de difusão dos analitos aumenta, permitindo que maiores vazões de fase móvel sejam utilizadas mantendo-se a pressão em níveis mais baixos. O aumento da temperatura favorece com que os equilíbrios entre analito-fase estacionária aconteçam de forma mais rápida, levando a uma maior eficiência na separação (CELA, LORENZO e CASAIS, 2002). Porém, se o aquecimento não se der tanto no eluente como na coluna cromatográfica, gradientes radiais de temperatura podem ocorrer. Para evitar estes

efeitos danosos, procura-se utilizar colunas cromatográficas de menor diâmetro interno, as quais garantem com que o equilíbrio térmico seja atingido de forma mais rápida.

A diminuição do tamanho de partículas e do comprimento das colunas cromatográficas, bem como de seu diâmetro interno, levou a um outro problema para UHPLC que até então, em HPLC, não era tão pronunciado: a sobrecarga da coluna, tanto em termos de massa como de volume. Com a diminuição das dimensões das colunas, uma menor área superficial de fase estacionária fica disponível para interação com as moléculas de analitos presentes nas amostras. Dessa forma, a capacidade limitada em reter os analitos faz com que a coluna rapidamente seja sobrecarregada quando uma concentração (e conseqüentemente uma massa) muito alta de analitos for injetada. O principal resultado da ocorrência de tal fenômeno é a formação de caudas frontais nos picos cromatográficos (SNYDER, KIRKLAND e DOLAN, 2009). Por outro lado, os sintomas observados quando ocorre uma sobrecarga devido a um volume exagerado de injeção são o alargamento dos picos cromatográficos, devido ao alargamento da banda de injeção. Em casos extremos, os picos cromatográficos das substâncias que eluem mais rapidamente inclusive podem apresentar um topo plano, descaracterizando a forma gaussiana ideal de um pico cromatográfico.

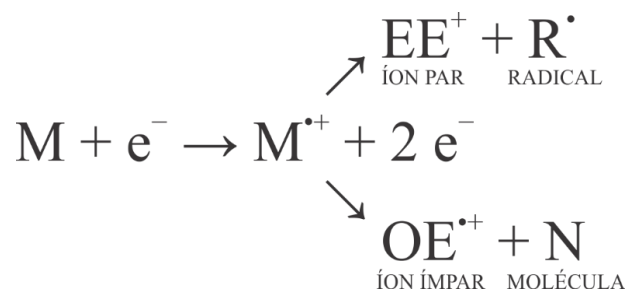
2.5 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) tem como princípio fundamental a geração de íons de compostos orgânicos ou inorgânicos em fase gasosa; a posterior separação destes íons de acordo com suas razões massa-carga (m/z); e, finalmente, a detecção de tais íons, qualitativa e quantitativamente, segundo suas respectivas m/z e abundâncias. A separação dos íons é efetivada por meio de campos elétricos ou magnéticos, sejam eles estáticos ou dinâmicos, bem como através de diferenças de velocidades entre íons em regiões livres de qualquer campo atuante (GROSS, 2011).

A primeira etapa de uma análise espectrométrica de massas é sempre a produção de íons dos analitos em fase gasosa, a qual recebe o nome de ionização. Tal processo de geração de íons pode ser brando ou de alta energia, podendo resultar em fragmentações das substâncias originalmente introduzidas na fonte do espectrômetro de massas. De acordo com a energia disponível na etapa de ionização, diferentes espécies químicas podem ser produzidas, como um íon molecular, ou fragmentos tais como radicais, moléculas neutras, ou outros íons com número

par ou ímpar de elétrons. A Figura 7 mostra um esquema das possíveis espécies a serem produzidas por um dado processo de ionização.

Figura 7 – Esquema representando as possíveis espécies químicas a serem geradas durante o processo de ionização por elétrons em um espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado de HOFFMANN e STROOBANT (2007).

Uma vez gerado os íons dos analitos de interesse, estes são submetidos ao processo de separação de acordo com suas m/z . Atualmente, diversos analisadores de massa estão disponíveis no mercado. Dentre eles, os mais conhecidos são os analisadores do tipo quadrupolo, armadilha de íons, tempo-de-voo, setores elétricos e magnéticos, Orbitrap® e ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier. Cada um destes analisadores de massa citados opera com um diferente princípio de separação de razões m/z . A Tabela 2 lista os diferentes analisadores de massa disponíveis no mercado e seus princípios de separação.

Tabela 2 – Tipos de analisadores de massas utilizados em espectrometria de massas.

Tipo de analisador	Sigla	Princípio de separação
Setor elétrico	E	Energia cinética
Setor magnético	B	Momento linear
Quadrupolo	Q	m/z (estabilidade da trajetória)
Armadilha de íons	IT	m/z (frequência de ressonância)
Tempo-de-voo	TOF	Velocidade (tempo do voo)
Ressonância ciclotrônica de íons com transformada de Fourier	FTICR	m/z (frequência de ressonância)
Orbitrap®	-	m/z (frequência de ressonância)

Fonte: Adaptado de HOFFMANN e STROOBANT (2007).

Em uma etapa final, os íons separados pelo analisador de massas chegam ao detector, o qual tem a função de fazer a contagem de tais íons, determinando a abundância para cada m/z . Em geral, os detectores de espectrometria de massas se baseiam na geração e amplificação de elétrons secundários produzidos a partir do impacto de partículas energéticas sobre a superfície de um metal ou de um semicondutor. As partículas energéticas que desencadeiam a produção

dos elétrons secundários podem ser tanto espécies neutras, elétrons ou fótons, e não apenas os íons separados pelo analisador de massas que chegam ao detector.

É importante salientar que todos os espectrômetros de massas devem operar em condições de alto vácuo. Baixas pressões são necessárias para permitir com que os íons gerados pelo espectrômetro de massas alcancem o detector sem que ocorram colisões com outras moléculas gasosas. Colisões indesejadas ao longo da trajetória dos íons podem produzir um desvio em suas trajetórias de modo tal que a carga dos íons possa ser perdida por meio de choques dos íons com as paredes do instrumento, impossibilitando a detecção. Ademais, colisões com outras moléculas podem favorecer reações indesejadas em fase gasosa, tornando o espectro de massas mais complexo para ser interpretado.

Com base nisso, a intensidade do vácuo necessário para permitir um caminho livre para os íons pode ser calculada pela teoria cinética dos gases, onde o caminho livre L (em m) é dado por:

$$L = \frac{kT}{\sqrt{2}p\sigma} \quad (4)$$

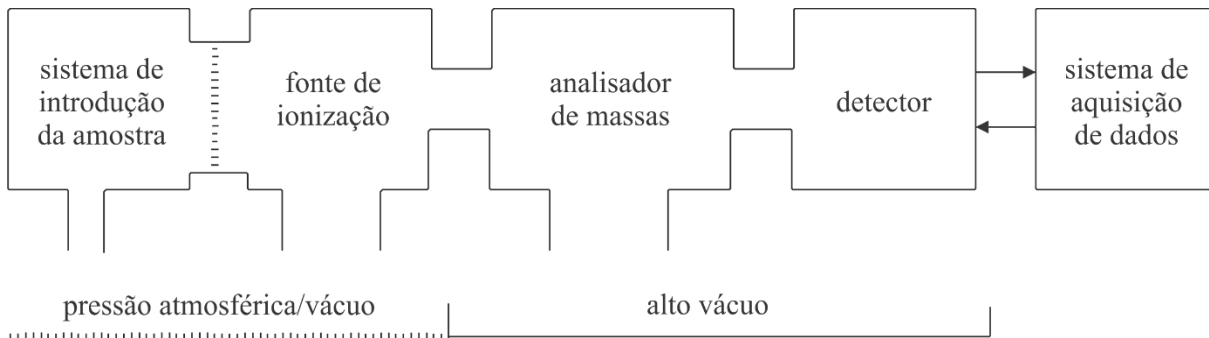
onde k é a constante de Boltzmann ($1,38 \times 10^{21} \text{ J K}^{-1}$), T é a temperatura (em K), p é a pressão (em Pa) e σ é a área da seção transversal da região de colisão (em m^2). Algumas aproximações podem ser feitas ($T \approx 300 \text{ K}$, $\sigma \approx 45 \times 10^{-20} \text{ m}^2$) de modo a definir o caminho livre L (em cm) em função da pressão p (em mTorr), como segue (HOFFMANN e STROOBANT, 2007):

$$L = \frac{4,95}{p} \quad (5)$$

Tendo em vista as etapas envolvidas na análise espectrométrica de massas, bem como algumas exigências fundamentais para a correta operação do sistema, pode-se traçar um esquema genérico de um espectrômetro de massas da forma como representado na Figura 8.

Adicionalmente, o sistema de controle/aquisição de dados de um espectrômetro de massas deve ser rápido o suficiente para ser capaz de sincronizar a operação do analisador de massas com a operação do detector, tendo em vista que o primeiro é responsável pela separação dos íons (informação qualitativa) e o segundo pela determinação da abundância de tais íons (função apenas quantitativa). Apenas com plena sintonia entre o analisador de massas e o detector é que será possível a obtenção dos espectros de massa.

Figura 8 – Esquema genérico de um espectrômetro de massas.



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

2.5.1 Analisador de massas do tipo quadrupolo

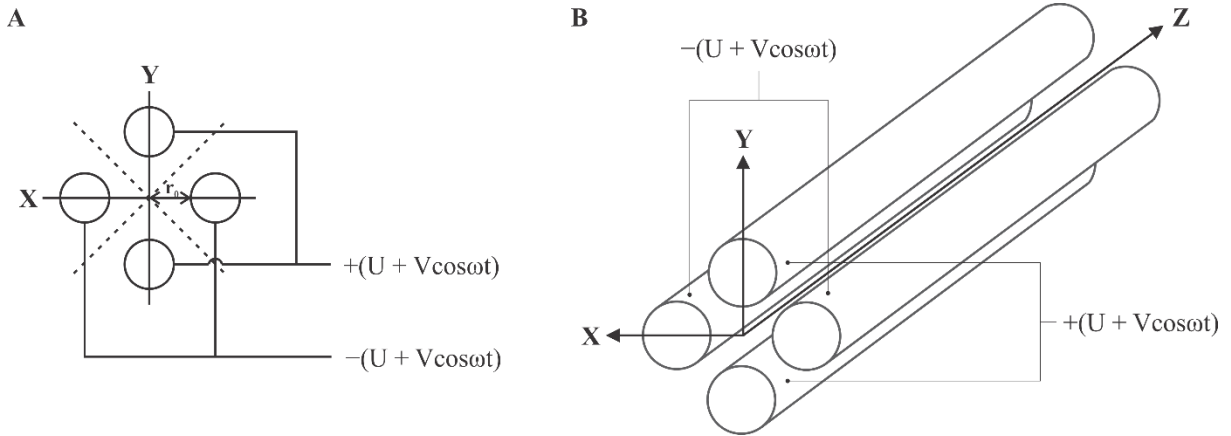
Desde o desenvolvimento da espectrometria de massas, os analisadores do tipo quadrupolo se tornaram os mais difundidos em todo o mundo. Algumas vantagens de tais analisadores são a alta capacidade de transmissão dos íons, a rápida velocidade de leitura e o fato de constituírem espectrômetros de massas de tamanhos relativamente pequenos e de menor custo de aquisição.

Um analisador quadrupolar é basicamente composto por 4 barras cilíndricas ou de seção hiperbólica, dispostas em um arranjo quadrático (plano xy), de forma que estejam perfeitamente paralelas entre si ao longo do eixo z . Cada par de barras opostas entre si no plano xy está sob efeito do mesmo potencial, o qual é composto por uma componente de corrente contínua (DC, do inglês *direct current*), U , e uma componente de corrente alternada (AC, do inglês *alternating current*), V . O potencial global (Φ_0) aplicado às barras do quadrupolo é dado por:

$$\Phi_0 = +(U + V \cos \omega t) \text{ e } -\Phi_0 = -(U + V \cos \omega t) \quad (6)$$

A Figura 9 mostra a representação esquemática de um quadrupolo linear e os diferentes potenciais aplicados às barras cilíndricas que o compõe.

Figura 9 – Representação esquemática de um quadrupolo linear composto por barras cilíndricas, destacando os diferentes potenciais aplicados às barras paralelas opostas entre si. (A) Seção transversal e (B) perfil das barras cilíndricas ao longo do eixo z.



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

Quando um íon adentra no quadrupolo na direção z, uma força coulômbica de atração é exercida sobre o íon pelas barras que possuem carga oposta à carga do íon. Tendo em vista que a voltagem aplicada às barras é governada pela componente de corrente alternada, ao longo do tempo acabam por se alternar forças de atração e repulsão nas direções x e y, de forma que os íons passam a ser acelerados nestas duas direções (ESTEBAN, 1993). As forças induzidas pelos campos elétricos desenvolvidos são dadas por:

$$F_x = m \frac{d^2 x}{dt^2} = -ze \frac{\partial \Phi}{\partial x} \quad (7)$$

$$F_y = m \frac{d^2 y}{dt^2} = -ze \frac{\partial \Phi}{\partial y} \quad (8)$$

onde Φ é uma função de Φ_0 :

$$\Phi_{(x,y)} = \Phi_0 (x^2 - y^2) / r_0^2 = (x^2 - y^2) (U - V \cos \omega t) / r_0^2 \quad (9)$$

Derivando-se as equações (7) e (8) e rearranjando os termos obtém-se as equações do movimento dos íons no interior do quadrupolo (equação de Paul):

$$\frac{d^2 x}{dt^2} + \frac{2ze}{mr_0^2} (U - V \cos \omega t) x = 0 \quad (10)$$

$$\frac{d^2y}{dt^2} - \frac{2ze}{mr_0^2}(U - V \cos \omega t)y = 0 \quad (11)$$

A trajetória de um íon no interior do quadrupolo somente será estável se os valores de x e y nunca forem iguais ou maiores que r_0 em um dado tempo. Caso contrário, o íon se chocaria contra as barras do quadrupolo, perdendo sua carga. Para se obter os valores de x e y durante o tempo, as equações (10) e (11) precisam ser integradas. Tal tipo de equação diferencial se assemelha à teoria das equações de Mathieu (GROSS, 2011), de forma que as equações (10) e (11) podem ser escritas da seguinte maneira:

$$\frac{d^2x}{d\tau^2} + (a_x + 2q_x \cos 2\tau)x = 0 \quad (12)$$

$$\frac{d^2y}{d\tau^2} + (a_y + 2q_y \cos 2\tau)y = 0 \quad (13)$$

onde os parâmetros a , q e τ podem ser então obtidos por comparação das equações (12) e (13) com as equações (10) e (11):

$$a_u = a_x = -a_y = \frac{8zeU}{m\omega^2r_0^2} \Rightarrow U = a_u \frac{m\omega^2r_0^2}{z8e} \quad (14)$$

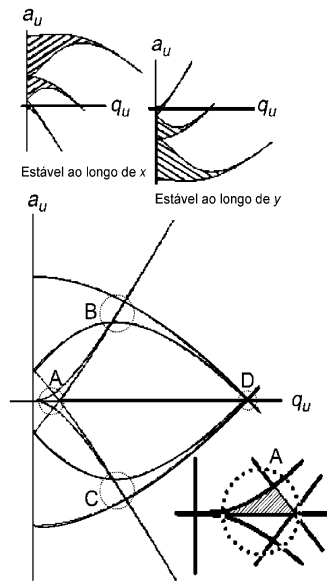
$$q_u = q_x = -q_y = \frac{4zeV}{m\omega^2r_0^2} \Rightarrow V = q_u \frac{m\omega^2r_0^2}{z4e} \quad (15)$$

$$\tau = \frac{\omega t}{2} \quad (16)$$

$$\tau^2 = \frac{\omega^2 t^2}{4} \quad (17)$$

Tais equações estabelecem uma relação entre as coordenadas de um íon no interior do quadrupolo ao longo do tempo. É importante observar que tais coordenadas dependem dos potenciais U e V aplicados às barras e da razão m/z dos íons em questão, visto que para um dado analisador de massas do tipo quadrupolo r_0 é constante e ω é mantido constante. Um diagrama a_u versus q_u (Figura 10) é capaz de mostrar as áreas de estabilidade para a trajetória de íons de uma dada m/z . Nestas áreas de estabilidade os valores de U e V são tais de modo que x e y não alcancem valores iguais ou maiores que o valor de r_0 .

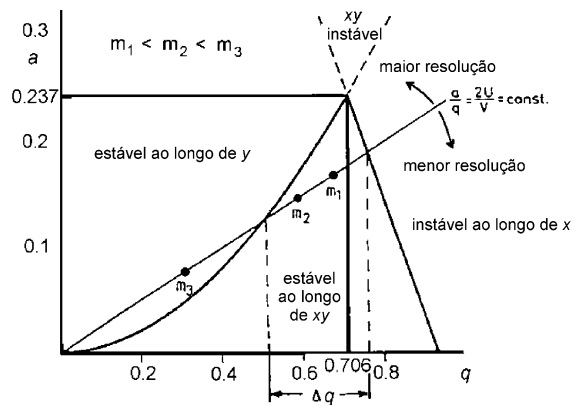
Figura 10 – Diagrama a_u versus q_u de estabilidade de um analisador quadrupolar mostrando quatro regiões de estabilidade (A-D) para movimentos ao longo das direções x e y .



Fonte: Adaptado de HOFFMANN e STROOBANT (2007).

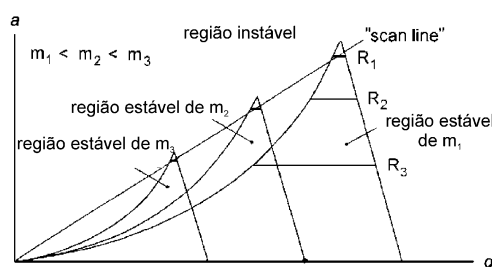
A Figura 11 traz em detalhe a região A mostrada na Figura 10, sendo esta a região mais usual para a separação de massas em um quadrupolo. Nesta figura é possível observar que reduzindo U (a_u) relativamente a V , um intervalo cada vez maior de m/z pode ser transmitido simultaneamente pelo quadrupolo. Dessa forma, a largura Δq da região xy estável determina a resolução do analisador de massas. Fazendo-se uma varredura da magnitude de U e V a uma razão U/V constante (*scan line*), é possível fazer uma varredura de m/z cada vez maiores capazes de percorrer o quadrupolo seguindo uma trajetória estável (Figura 12). É com base nesse tipo de operação que o quadrupolo é comumente chamado de “filtro de massas”.

Figura 11 – Detalhe da metade superior da região A do diagrama a_u versus q_u de estabilidade de um analisador quadrupolar para movimentos ao longo das direções x e y .



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

Figura 12 – Varredura de U e V , a uma razão U/V constante, de um quadrupolo linear. Uma maior razão a/q implica em uma maior resolução (R), conforme mostrado pela *scan line*. $R_1 > R_2 > R_3$.



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

2.5.2 Espectrometria de massas sequencial

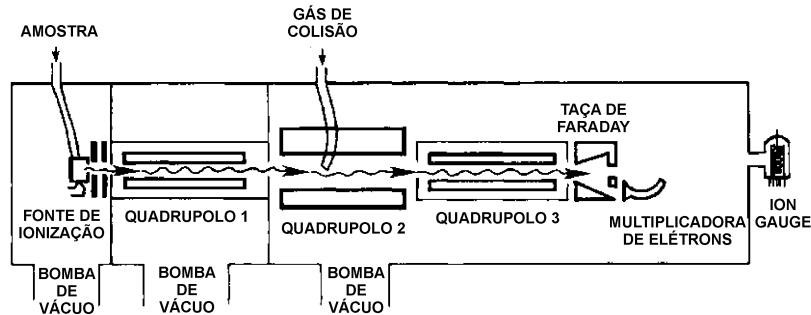
É comum em espectrometria de massas o uso de espectrômetros híbridos, compostos geralmente por dois analisadores de massas dispostos em série, sejam eles de mesmo princípio de funcionamento ou não. A esses instrumentos diz-se que realizam uma espectrometria de massas sequencial no espaço, de forma que os íons analisados pelo primeiro analisador são encaminhados para um segundo analisador, geralmente após uma etapa de fragmentação forçada entre esses analisadores. Tal modo de operação, chamado de MS/MS (quando dois analisadores são utilizados), aumenta a seletividade.

Dentre as várias combinações de analisadores de massa disponíveis comercialmente, os espectrômetros do tipo triplo quadrupolo (dois analisadores quadrupolares em série) estão entre os mais difundidos. Embora tais instrumentos sejam compostos por dois quadrupolos em série, recebem o nome de triplo quadrupolo pois possuem, entre os dois analisadores de massa, um hexapolo que constitui uma célula de colisão.

O princípio de funcionamento de um hexapolo é muito semelhante ao de um quadrupolo. Entretanto, esse apresenta um maior intervalo útil de massas para transmissão simultânea dos íons (HOFFMANN e STROOBANT, 2007). Nos espectrômetros do tipo QqQ, como são chamados, um gás inerte de alta pureza (nitrogênio ou argônio) é injetado no interior do hexapolo que constitui a célula de colisão (q_2) a uma pressão que varia de 0,1 a 0,3 Pa (Figura 13). Dessa forma, a energia interna das moléculas do gás inerte é transferida aos íons, que viajam através do q_2 , por meio de colisões mecânicas, convertendo uma fração de suas energias cinéticas em energia interna. Como consequência, os íons que sofreram colisões acabam por se fragmentar, gerando íons de menor m/z , chamados de íons produto. Tais fragmentos produzidos

durante a colisão induzida são separados pelo segundo analisador de massas, o Q_3 , e direcionados para o detector.

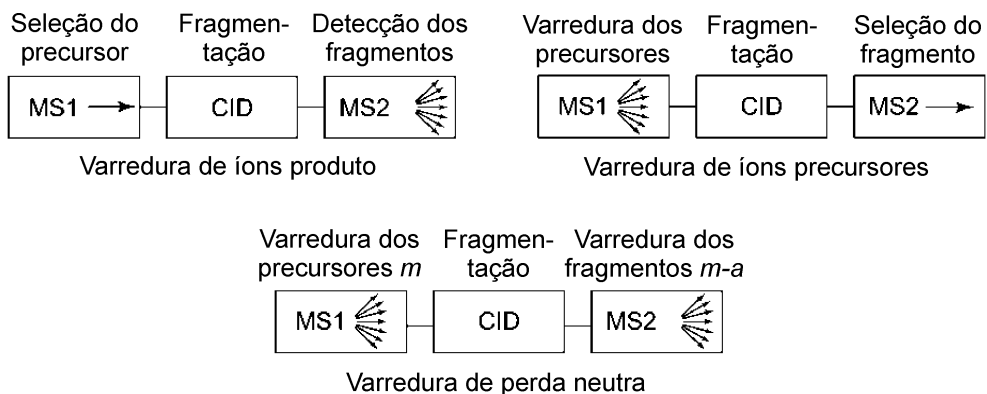
Figura 13 – Esquema de um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo. O primeiro (Q_1) e o último (Q_3) quadrupolos são analisadores de massa. O hexapolo central (q_2) é uma célula de colisão utilizada apenas com aplicação de radiofrequência para transmissão de todos os íons ali produzidos através da colisão com um gás inerte.



Fonte: GROSS (2011).

Os espectrômetros de massas do tipo triplo quadrupolo podem trabalhar em diferentes modos de leitura de m/z . A Figura 14 exemplifica três desses modos: varredura de íons produto, varredura de íons precursores e varredura de perda neutra. O primeiro modo de varredura se baseia na seleção de um íon com dada m/z no primeiro analisador quadrupolar (Q_1), o qual é fragmentado na célula de colisão (q_2), e tem todos os seus produtos analisados pelo Q_3 . O segundo modo de varredura mostrado na Figura 14, por sua vez, se baseia na leitura de um único íon produto com dada m/z , o qual pode ser gerado a partir de qualquer íon precursor analisado no Q_1 . Por fim, o modo de varredura de perda neutra se baseia em varreduras de m/z consecutivas nos dois analisadores de massa, havendo, entretanto, um delta de m/z constante entre os íons precursores e os íons produto.

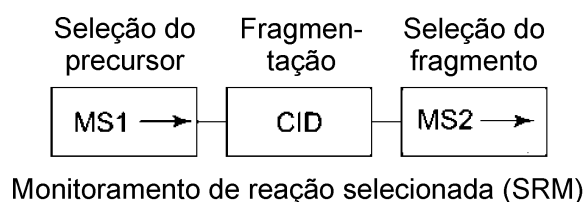
Figura 14 – Diferentes modos de leitura para um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.



Fonte: Adaptado de HOFFMANN e STROOBANT (2007).

Os modos de varredura mais seletivos, no entanto, não estão exemplificados na Figura 14. Trata-se do modo de leitura SRM (do inglês *selected reaction monitoring*). Eles se baseiam na seleção de um único íon com dada m/z no Q_1 , sendo este fragmentado na célula de colisão e, posteriormente, um único íon produto gerado na fragmentação, com dada razão m/z , é selecionado no Q_3 (Figura 15). Tal modo de varredura reduz drasticamente o número de compostos orgânicos a serem detectados, uma vez que para um dado íon ser separado pelos analisadores de massa, se faz necessário existir uma transição de massas $m_1 \rightarrow m_2$ específica.

Figura 15 – Representação esquemática do modo de leitura SRM em um espectrômetro de massas do tipo triplo quadrupolo.



Fonte: Adaptado de HOFFMANN e STROOBANT (2007).

6 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A união entre as técnicas de cromatografia líquida e de espectrometria de massas originou uma das ferramentas mais poderosas da química analítica atual, eliminando algumas importantes limitações existentes no acoplamento entre cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Dentre as barreiras derrubadas com o advento do acoplamento LC-MS estão a possibilidade de analisar amostras com baixa volatilidade; utilizar alíquotas aquosas sem prévia extração ou troca de solvente; e possuir, como analitos, compostos que são termolábeis a temperaturas usuais em fornos de cromatografia gasosa (MCMMASTER, 2005).

Entretanto, tal acoplamento não é trivial. As dificuldades se originam no fato de que a espectrometria de massas opera em baixíssimas pressões e com os analitos em fase gasosa ionizados, sendo que a cromatografia líquida gera um eluato líquido que precisa ser vaporizado e ionizado para ser introduzido no espectrômetro de massas. Porém, como no processo de evaporação os solventes sofrem uma grande expansão de seus volumes, se todo o eluato produzido pela cromatografia líquida for vaporizado e introduzido no espectrômetro de massas, as capacidades das bombas de vácuo serão ultrapassadas e qualquer análise será impossibilitada de ser realizada.

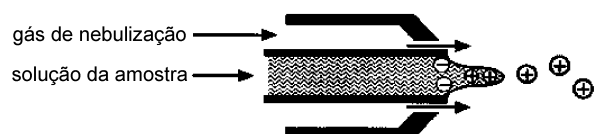
Se faz necessário, então, o uso de uma interface capaz de remover grande parte do solvente e dos aditivos que compõem o eluato da cromatografia líquida, sem que sejam removidos os analitos de interesse. Ademais, os analitos devem sofrer um processo de ionização para estarem susceptíveis à análise por espectrometria de massas. Todos esses fatores são alcançados por meio de um uso combinado de gases para nebulização do eluato, aquecedores para vaporização da fase líquida e pressão reduzida para introdução dos compostos de interesse no espectrômetro de massas. O processo de ionização dos analitos é realizado através de diferentes mecanismos, tais como por eletrospray, ionização química e fotoionização.

2.6.1 Ionização por eletrospray

A interface que realiza a ionização por meio do eletrospray é a mais utilizada dentre as fontes de ionização comercializadas. Em termos de aplicabilidade, seu uso é bastante amplo, sendo empregada tanto para analitos ionizados ou ionizáveis como para analitos que apresentam um certo caráter polar (MCMMASTER, 2005). A ionização por eletrospray é, também, o mecanismo de ionização ideal para moléculas de alta massa molecular (>1.000 Da), porém também mantém sua eficiência de ionização inclusive para moléculas de pequena massa.

O princípio de ionização por eletrospray se baseia na aplicação de uma alta voltagem (3-5 kV) na ponta de um tubo capilar pelo qual flui, por exemplo, o eluato oriundo da separação cromatográfica (ESTEBAN, 1993). É usual que tal tubo capilar seja alocado, de forma concêntrica, no interior de um outro tubo pelo qual flui um gás inerte que auxilia no processo de nebulização do eluato (Figura 16).

Figura 16 – Representação esquemática da extremidade do capilar no qual o eluato da cromatografia é nebulizado e ionizado.

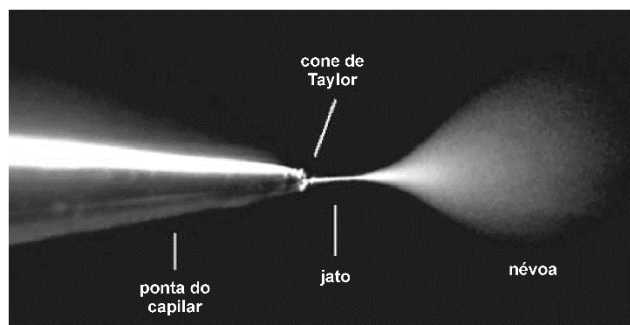


Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

Uma vez que o alto potencial aplicado se concentra na ponta do capilar da fonte de ionização, o líquido que emerge por tal capilar é exposto a um alto campo elétrico, capaz de gerar uma separação de cargas no eletrólito (eluato). Ocorre, então, a formação de um jato

líquido contendo um excesso de íons com uma carga de mesmo sinal, gerando uma situação instável de repulsão coulômbica. Tal fenômeno é nomeado cone de Taylor, e pode ser observado na Figura 17. Devido à instabilidade, o jato se desintegra em finas gotículas carregadas, as quais posteriormente se repulsam e dão uma forma de névoa ao *spray* formado.

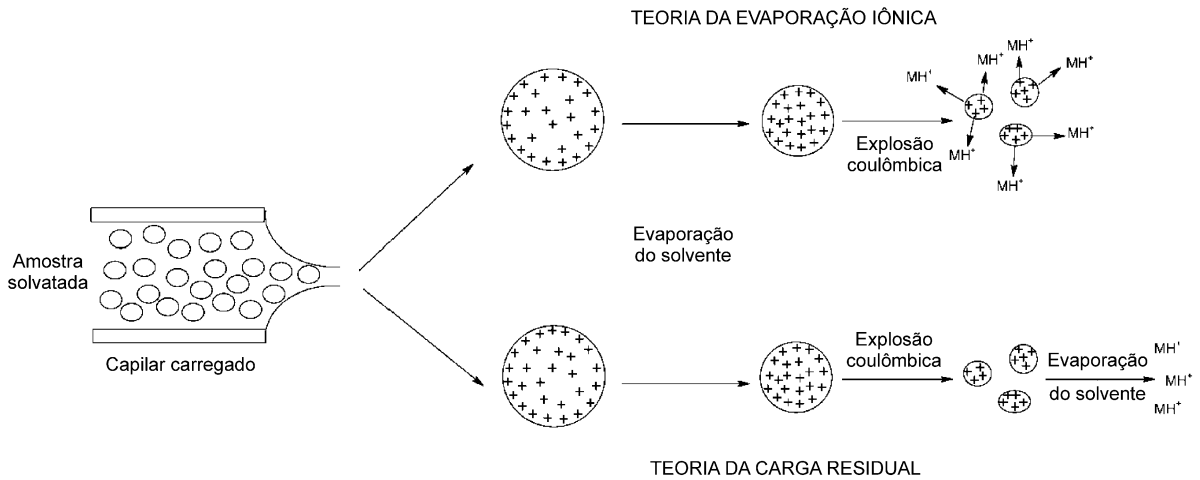
Figura 17 – Foto representando formação do cone de Taylor e a rápida expansão da nuvem de gotículas, formando uma névoa.



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

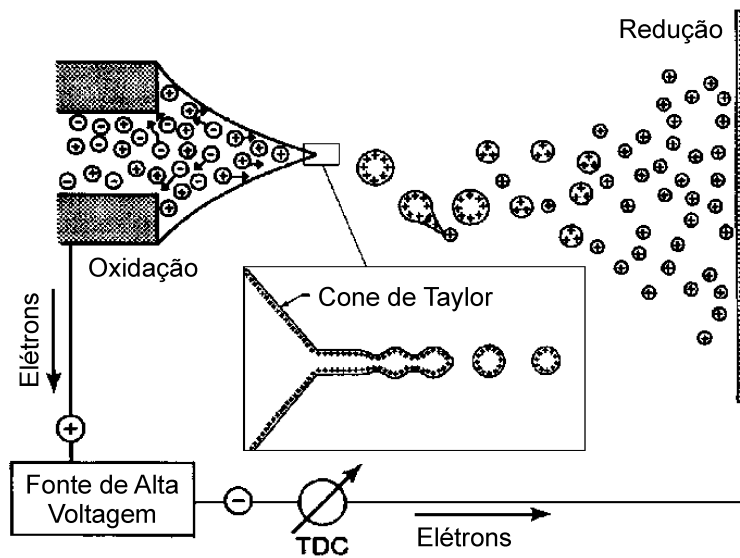
Ao passo em que as gotículas formadas são evaporadas pelo gás de secagem que flui em contracorrente, a densidade de cargas na superfície das gotas aumenta de forma crescente. Em um dado momento, as forças repulsivas entre as cargas presentes na superfície da gota superam as forças coesivas de tensão superficial do solvente que compõe a gota, resultando em uma desintegração da gotícula em gotículas de menor tamanho. Tal fenômeno ocorre sucessivamente até o momento em que todo o solvente é evaporado e a carga é transferida ao analito em fase gasosa (HOFFMANN e STROOBANT, 2007), sendo este modelo teórico explicado pela Teoria da Carga Residual. Outra abordagem do fenômeno de ionização por eletrospray é dada pela Teoria da Evaporação Iônica (EL-ANEED, COHEN e BANOUB, 2009), a qual preconiza que devido às elevadas forças repulsivas existentes entre os íons na superfície das gotículas parcialmente evaporadas, alguns destes íons passam a ser desorvidos na fase gasosa. A Figura 18 reproduz esquematicamente a formação dos íons durante a ionização por eletrospray, de acordo com ambas teorias citadas. Por sua vez, a Figura 19 traz uma representação de todo o processo de ionização dos analitos, compreendendo a formação do *spray* carregado, a desintegração em cadeia das gotas geradas e a evaporação das menores gotículas com a consequente transferência de carga aos analitos.

Figura 18 – Representação esquemática da formação dos íons através da ionização por eletrospray.



Fonte: Adaptado de EL-ANEED, COHEN e BANOUB (2009).

Figura 19 – Representação do mecanismo de ionização através da fonte de ionização por eletrospray.



Fonte: Adaptado de GROSS (2011).

Uma das principais desvantagens da ionização por eletrospray é o conhecido efeito de supressão iônica. Tal efeito, em geral, ocorre devido aos diferentes raios de solvatação e/ou às diferenças em volatilidade das moléculas presentes em solução no eluato da cromatografia. Dessa forma, ao passo em que as gotículas de solvente carregadas se desintegram em gotículas menores, as moléculas com maior raio de hidratação permanecem dissolvidas no interior de gotículas maiores. Ao longo do processo de ionização, tais gotículas maiores demoram mais tempo para serem evaporadas, levando a um decréscimo da taxa de ionização destes analitos com maior raio de hidratação. Por sua vez, os analitos com menor volatilidade também tardam

mais em passar à fase gasosa abstraindo uma carga elétrica, o que também reduz a taxa de ionização de tais compostos.

2.6.2 Supressão iônica

O efeito de supressão iônica se caracteriza pelo decréscimo do sinal do analito na matriz, quando comparado a uma mesma concentração deste analito em um meio constituído apenas por solventes. Ao contrário da supressão iônica, um enriquecimento iônico também pode ser observado. Além de causar prejuízos à detectabilidade, a supressão iônica também pode ser responsável por desvios na repetibilidade e na exatidão de métodos analíticos (LAW, W. S. et al., 2008). Supressões de sinal muito pronunciadas podem trazer um resultado falso negativo, ou no caso de uso de padrões internos, uma supressão desigual entre o padrão interno e o analito pode vir a causar um resultado falso positivo.

Existem diversos mecanismos propostos que justificam a supressão iônica, sendo mais difundida a teoria de que componentes da matriz competem com analitos no momento da evaporação das gotículas formadas pelo eletrospray, de forma que somente alguns compostos atingem a superfície das gotículas e passam para a fase gasosa (FUREY et al., 2013). Além disso, interferentes podem modificar a viscosidade ou tensão superficial das gotas produzidas pelo eletrospray, afetando a eficiência da ionização. Competição por cargas elétricas disponíveis também pode ocorrer em matrizes complexas, justificando possíveis diferenças observadas entre sinais obtidos com matrizes e soluções analíticas preparadas em solventes puros.

Entretanto, a supressão iônica não deve ser considerada apenas como um efeito de matriz. Efeitos de supressão inclusive podem ser provocados por analitos que coeluem, de forma que suas áreas podem não corresponder à soma de suas respostas individuais, indicando que pode haver um limite prático de concentração de compostos que podem ser ionizados ao mesmo tempo (LAW, B. e TEMESI, 2000). Causas exógenas à matriz, como a constituição da fase móvel (LIM e LORD, 2002; ANNESLEY, 2003; HOLCAPEK et al., 2004; GALLART-AYALA, MOYANO e GALCERAN, 2010) ou a presença de contaminantes do sistema de análise (LAW, W. S. et al., 2008), também podem contribuir para uma supressão ou enriquecimento iônico.

São relatadas na literatura diferentes formas isoladas de avaliação da supressão iônica. MALLET, LU e MAZZEO (2004) fazem uma avaliação a respeito da influência de aditivos da

fase móvel sobre a intensidade de sinais de fármacos ácidos e básicos. Em seu estudo foi observado que, na grande maioria dos casos, um aumento da concentração de aditivos à fase móvel causa uma redução de sinal dos analitos. Entretanto, casos anômalos podem ocorrer. Por sua vez, REMANE et al. (2010) publicaram um estudo em que investigam a influência de fármacos coeluídos sobre efeitos de supressão iônica e enriquecimento iônico. Para os autores, os estudos de supressão não devem ser feitos apenas levando em conta os componentes das matrizes analisadas, já que uma série de fatores físico-químicos dos analitos podem influenciar na quantificação, levando a erros de interpretação de resultados.

A influência da composição da matriz foi estudada por CHICO, VAN HOLTHOON e ZUIDEMA (2012), os quais avaliaram diferentes preparos de amostra na análise de tetraciclina em razão. Tanto ensaios qualitativos como quantitativos foram realizados, indicando supressões próximas a 70% e enriquecimentos por volta de 20%, quando comparados a análises de soluções analíticas dos analitos. Mais recentemente, MIRNAGHI et al. (2013) realizaram estudos nos quais avaliam as respostas dos analitos quando submetidos à diferentes diluições das amostras, numa tentativa de medir a supressão iônica causada pela competição por cargas elétricas durante a ionização. Por fim, AVERY (2003) levanta a questão da supressão iônica diferencial que pode ocorrer devido à má escolha de um padrão interno. O estudo feito por ele compara como varia a razão entre as áreas dos sinais do analito e do padrão interno em uma série de lotes de uma matriz. Ademais, o autor confronta tais resultados com um controle comercial, avaliando os desvios observados e definindo o melhor padrão interno para o método analítico.

3. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho é desenvolver um método analítico empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência acoplada à espectrometria de massas que seja capaz de caracterizar quimicamente espécies vegetais da flora amazônica quanto aos seus teores de compostos fenólicos.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver um método de separação empregando UHPLC-ESI-MS/MS para os analitos (+)-catequina, 3,6-dihydroxiflavona, 3-acetilcumarina, 4-hidroxycumarina, 6-hidroxycumarina, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido *p*-cumárico, ácido rosmarínico, ácido *trans*-cinâmico, ácido vanílico, apigenina, canferol, crisina, fisetina, galangina, luteolina, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol e rutina.
- Desenvolver um método de preparo de amostras visando o adequado tratamento de extratos vegetais para posterior análise por UHPLC-ESI-MS/MS.
- Analisar sistematicamente as diferentes causas de interferências por supressão iônica na análise de extratos de plantas medicinais utilizando UHPLC-ESI-MS/MS.
- Caracterizar quimicamente as espécies *Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var *variegata*, *Bauhinia variegata* var *alboflava*, *Connarus perrottetii* var *angustifolius*, *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata* quanto ao teor dos 24 analitos fenólicos abordados como possíveis marcadores analíticos por este estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 REAGENTES

Os padrões de (+)-catequina, 2-naftol, 3-acetilcumarina, 3,6-dihidroxi-flavona, 4-hidroxicumarina, 6-hidroxicumarina, apigenina, canferol, crisina, fisetina, galangina, luteolina, miricetina, quercetina, quercitrina, resveratrol, rutina e ácidos clorogênico, gálico, *p*-cumárico, rosmarínico, *trans*-cinâmico e vanílico foram adquiridos de Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os padrões dos ácidos cafeico e ferúlico foram adquiridos de Fluka Analytical (Buchs, Suíça). Todos os padrões eram de grau analítico, com no mínimo 95% de pureza, e foram utilizados sem prévia purificação.

Água ultrapura foi obtida através de sistema Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Alemanha). Os solventes metanol e acetonitrila, ambos em grau LC-MS, foram obtidos de Panreac (Castellar del Vallès, Espanha). Ácido acético, ácido fórmico, acetato de amônio, formiato de amônio e hidróxido de amônio foram obtidos de Sigma-Aldrich. As soluções estoque dos padrões (1.000 mg L⁻¹) foram preparadas pela dissolução de quantidades apropriadas das substâncias em metanol grau LC-MS, e então armazenadas em frascos de vidro âmbar a uma temperatura de -30 °C até o momento das análises. As soluções de trabalho dos compostos antioxidantes foram preparadas pela diluição das soluções estoque em solventes escolhidos de acordo com o experimento realizado.

4.2 PREPARO DE AMOSTRAS

O material vegetal das plantas medicinais *Mansoa alliacea* (Lam.) A. H. Gentry (depósito n° IAN 1843394), *Bauhinia variegata* var *variegata* (depósito n° IAN 185932), *Connarus perrottetii* var *angustifolius* (Radlk) (depósito n° IAN 184393), *Bauhinia variegata* var *alboflava* (depósito n° IAN 185831), *Cecropia obtusa* Trécul (depósito n° IAN 185555) e *Cecropia palmata* Willd (depósito n° IAN 185556) foi cedido pelo herbário da Embrapa Amazônia Oriental (Belém, PA). O herbário localiza-se nas coordenadas geográficas correspondentes a 1°27'21" de latitude Sul e 48°30'14" de longitude Oeste. Todas as plantas foram coletadas durante a estação chuvosa na região Norte do Brasil, em três diferentes coletas ao longo de 2 anos (de 2012 a 2014).

As plantas recém colhidas foram limpas, secas em estufa ventilada a 40°C por 12h e moídas até obtenção de um pó fino. *Connarus perrottetii* var *angustifolius* foi recebida como um pó seco obtido da casca desta espécie. Todas as demais espécies vegetais foram recebidas como um pó seco obtidos das folhas das respectivas espécies. As amostras secas foram armazenadas em dessecadores sob vácuo, à temperatura ambiente, até posterior utilização.

Extratos das plantas estudadas foram obtidos por maceração à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) do material vegetal fornecido. Para tal, 450 g de material vegetal seco moído foi mantido em 4 litros de uma solução de EtOH:H₂O (70:30; v/v) por sete dias, com agitação eventual do banho de maceração. O solvente foi renovado semanalmente, e o procedimento descrito acima foi repetido por três vezes, totalizando uma extração de quatro semanas. Após o término do processo de maceração, uma porção dos extratos obtidos foi filtrada em um filtro de papel qualitativo e posteriormente evaporada à pressão reduzida utilizando um evaporador rotatório. Como resultado desse processo se obteve um extrato etanólico bruto de cada espécie vegetal, os quais foram subsequentemente liofilizados a fim de se produzir extratos sólidos para melhor armazenamento.

Para a análise cromatográfica, uma massa de cerca de 0,06 g de cada um dos extratos em pó foi ressuspensa em 3 mL de metanol. Tal solução foi sonicada em banho de ultrassom convencional até completa dissolução (5 min) e diluída com 12 mL água ultrapura. Posteriormente, ácido acético foi adicionado até uma concentração final de 0,1% (v/v). Os extratos foram então filtrados através de membranas de PTFE (politetrafluoretileno) hidrofílico com um diâmetro de poro igual a 0,2 µm.

Extratos das plantas supracitadas também foram obtidos por infusão de 1,50 g de material vegetal em 50 mL de água ultrapura, a uma temperatura de 90 °C, por um tempo de 10 min. Os extratos obtidos foram então filtrados em membrana de PTFE hidrofílico (diâmetro de poro igual a 0,2 µm) e diluídos com metanol até uma proporção de 1:4 (MeOH:H₂O, v/v), sendo posteriormente acidificados com ácido acético a uma proporção final de 0,1% (v/v).

Os extratos líquidos finais obtidos por ambos métodos foram submetidos a uma etapa de *clean-up* utilizando extração em fase sólida (SPE). Cartuchos do tipo Strata C-18E, 500 mg, 3 mL (Phenomenex, Torrance, EUA) foram condicionados com 6 mL de uma solução de MeOH:CH₃COOH 0,2% (1:1; v/v) e então equilibrados com 6 mL de uma solução de CH₃COOH 0,1% (v/v) em água. Um volume fixo de 2 mL dos extratos obtidos com composição MeOH:H₂O:CH₃COOH (20:80:0,1; v/v) foi percolado a uma vazão de 2 mL min⁻¹, sendo seguido por uma lavagem com 2 mL da solução de CH₃COOH 0,1% (v/v). Por último, os analitos retidos foram eluídos com 2 mL de MeOH.

Momentos antes da análise cromatográfica, o eluato obtido pelo procedimento de SPE foi diluído 10 vezes com uma solução de MeOH:CH₃COOH 0,2% (1:1; v/v). Para a quantificação das amostras foi utilizado o método de adição do padrão, sendo que as curvas analíticas foram construídas com 7 níveis de concentração igualmente espaçados (desde a concentração do ILOQ até 7 vezes esta), em adição ao extrato branco. Os pontos da curva analítica foram determinados em triplicata.

4.3 DETERMINAÇÃO POR UHPLC-ESI-MS/MS

As separações foram feitas através de um sistema de cromatografia líquida de ultra-alta eficiência *1260 Infinity Binary* (Agilent, Santa Clara, EUA), capaz de operar em pressões de até 600 bar, utilizando uma coluna de fase reversa *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent), mantida sob aquecimento a 40 °C. O volume de injeção adotado foi de 5 μL, sendo que as alíquotas para injeção foram ajustadas para uma composição final de MeOH:H₂O:CH₃COOH igual a 50:50:0,1 (v/v). A mistura de antioxidantes foi separada por meio de um gradiente de eluição composto por ácido acético 0,1% (A) e acetonitrila (B), a uma vazão constante de 800 μL min⁻¹, conforme o seguinte programa de eluição: 8,0% B (0,00-0,10 min); 8,0-25,8% B (0,10-3,45 min); 25,8-54,0% B (3,45-6,90 min); 54,0-100,0% B (6,90-7,00 min); 100,0% B (7,00-9,00 min). 2-naftol foi utilizado como padrão interno.

O efluente cromatográfico gerado até o tempo de 7,00 min foi ionizado por meio de uma fonte de ionização por eletrospray, a qual teve seus parâmetros otimizados de forma a se obter a melhor resposta dos analitos, tanto em intensidade como em estabilidade de sinal. Como condição otimizada de operação da fonte de ionização obteve-se: vazão de gás (N₂) igual a 11 L/min; pressão do nebulizador igual a 30 psi; voltagem do capilar igual a ± 2,4 kV e temperatura do gás de secagem (N₂) igual a 250°C. Os compostos de interesse foram subsequentemente analisados por meio de um espectrômetro de massas Agilent *6430 Triple Quadrupole*, operando no modo de monitoramento de reações selecionadas (SRM), com uma resolução de 0,7 *m/z* (FWHM). Nitrogênio de alta pureza (99,999%), fornecido por Linde (Munique, Alemanha), foi utilizado como gás de colisão induzida. As energias de colisão foram otimizadas para cada analito e estão demonstradas na Tabela 3, a qual também indica as transições de massa monitoradas bem como os tempos de retenção dos analitos estudados. As transições de quantificação foram divididas em três diferentes segmentos temporais de aquisição e o tempo de leitura para cada transição foi otimizado em 20 ms. O efluente cromatográfico gerado entre

7,00 e 9,00 min foi descartado, sem ser introduzido no sistema MS/MS, caracterizando uma etapa de limpeza da coluna cromatográfica. Após o fim do ciclo de gradiente, foi adotado um tempo pós-corrída de 4,00 min, a fim de permitir o completo reequilíbrio do sistema, tendo como base o reestabelecimento da pressão de operação inicial. Os dados adquiridos foram analisados com o uso do *MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis* (versão B.04.00, *build* 4.0.479.0, *Agilent Technologies, Inc. 2011*).

4.4 PROCEDIMENTOS ANALÍTICOS

4.4.1 Avaliação de íons precursores dos analitos

Para todos os analitos estudados foi feita uma identificação prévia dos seus íons precursores gerados através da ionização por eletrospray. Para tal, soluções dos analitos em MeOH:H₂O (1:1, v/v) com concentrações próximas a 500 µg L⁻¹ foram infundidas diretamente no espectrômetro de massas a uma vazão igual a 10 µL min⁻¹. Parâmetros não otimizados foram utilizados para a ionização, como: vazão e temperatura do gás de secagem (N₂) iguais a 6 L min⁻¹ e 200 °C, respectivamente, pressão do nebulizador igual a 15 psi e voltagem do capilar igual a ± 4,0 kV.

Os espectros foram adquiridos no modo de varredura completa (*full scan*), variando-se a razão *m/z* entre 50 e 700, tanto nas polaridades positiva e negativa de ionização. Cada solução foi infundida por cerca de 60 segundos, de forma a se obter um espectro de massas médio de cada analito neste intervalo de tempo. Os íons mais abundantes e com massas próximas à massa exata de cada analito foram assignados como íons precursores. Também foi avaliada a possibilidade de formação de adutos com sódio (Na) ou moléculas de solvente.

4.4.2 Otimização das energias de colisão dos íons precursores dos analitos

Após a identificação dos íons precursores de cada analito, foi feito um estudo da fragmentação destes íons através da espectrometria de massas sequencial. Um volume de 10 µL de cada solução analítica com concentração próxima à 500 µg L⁻¹ foi injetado no sistema cromatográfico descrito em 3.3, substituindo-se a coluna cromatográfica por uma união de volume morto, e utilizando uma vazão igual a 200 µL min⁻¹ de MeOH:H₂O (1:1, v/v).

Tabela 3 – Tempos de retenção (t_R) e parâmetros da análise por espectrometria de massas dos compostos fenólicos selecionados.

								(continuação)
Segmento de SRM	Tempo (min)	Analito	t_R (min)	Polaridade ESI	Energia do fragmentor (V)	Íon precursor (m/z)	Íon produto (quantificação/confirmação) (m/z)	Energia de colisão (V)
3	5,0-7,0	Ácido trans-cinâmico	4,35	–	90	147,0 [M-H] ⁻	103,2 [M-H-CO ₂] ⁻ 77,1 [M-H-C ₃ H ₂ O ₂] ⁻	5 15
		Quercetina	4,60	–	126	301,0 [M-H] ⁻	151,1 [M-H-C ₈ H ₆ O ₃] ⁻ 179,0 [M-H-C ₇ H ₆ O ₂] ⁻	17 15
		Luteolina	4,65	–	162	285,0 [M-H] ⁻	133,2 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ 151,1 [M-H-C ₈ H ₆ O ₂] ⁻	27 27
		Apigenina	5,29	–	136	269,0 [M-H] ⁻	117,1 [M-H-C ₇ H ₄ O ₄] ⁻ 149,0 [M-H-C ₈ H ₈ O] ⁻	29 20
		Canferol	5,35	–	164	285,0 [M-H] ⁻	239,0 [M-H-CH ₂ O ₂] ⁻ 117,2 [C ₈ H ₅ O] ⁻	29 31
		3,6-dihidroxi flavona	6,38	–	126	253,1 [M-H] ⁻	197,0 [M-H-C ₂ O ₂] ⁻ 208,0 [M-H-CHO ₂] ⁻	20 21
		Crisina	6,58	–	130	253,1 [M-H] ⁻	143,1 [C ₁₀ H ₇ O] ⁻ 106,9 [M-H-C ₉ H ₆ O ₂] ⁻	25 25
		Galangina	6,74	–	156	269,0 [M-H] ⁻	169,1 [M-H-C ₄ H ₄ O ₃] ⁻ 211,2 [M-H-C ₂ H ₂ O ₂] ⁻	30 29

Fonte: Do autor.

A obtenção dos dados espectrais foi feita pelo modo de varredura de íons produto, assumindo como íon precursor os íons identificados através do procedimento 3.4.1, e variando-se as energias de colisão de 0 a 35 V, em intervalos de 5 V. Na região de valores de energia de colisão entre os quais houve um aumento considerável do número de fragmentos e o íon precursor sofreu uma redução drástica de intensidade, a energia de colisão foi variada e avaliada em intervalos de 2 V. Os espectros foram obtidos desde uma razão m/z igual a 50 até uma razão m/z 30 unidades superior à razão m/z do íon precursor avaliado.

Foram adotados como ótimos os valores de energia de colisão em que foram obtidas as maiores intensidades para os íons produto, ao passo em que ainda houvesse uma pequena abundância do íon precursor.

4.4.3 Otimização das condições de injeção, ionização por eletrospray e de detecção

Uma vez desenvolvido o método de separação, uma série de análises foi realizada para se determinar as condições ótimas de injeção, ionização e detecção do método. As condições ótimas foram definidas com base nos valores normalizados das áreas dos picos cromatográficos dos analitos para cada variação de parâmetro, mantendo-se os demais parâmetros sem variações.

Foram avaliados sequencialmente os seguintes parâmetros do método: volume de injeção (1 a 5 μL , em incrementos de 1 μL); vazão do gás de secagem (5 a 13 L min^{-1} , em incrementos de 2 L min^{-1}); pressão do nebulizador (20 a 60 psi, em incrementos de 10 psi); voltagem do capilar ($\pm 2,0$ a $\pm 5,0$ kV, em incrementos de $\pm 0,2$ kV); temperatura do gás de secagem (200 a 350 $^{\circ}\text{C}$, em incrementos de 50 $^{\circ}\text{C}$); e tempo de leitura para cada transição de massas (10 a 50 ms, em incrementos de 10 ms).

4.4.4 Avaliação da supressão iônica causada por aditivos à fase móvel

Análises quantitativas da supressão iônica causada por aditivos à fase móvel foram realizadas por meio de injeção em fluxo (FIA, do inglês *flow injection analysis*) utilizando o sistema cromatográfico já descrito. Entretanto, a coluna cromatográfica foi substituída por uma conexão de volume morto. Neste estudo foram avaliadas as influências de ácido acético, ácido fórmico, hidróxido de amônio, formiato de amônio e acetato de amônio.

O experimento foi realizado a uma vazão de fase móvel de $200 \mu\text{L min}^{-1}$, injetando-se um volume de $10 \mu\text{L}$ dos padrões devidamente diluídos e enriquecidos com 0,05; 0,1; 0,5 e 1,0% de ácido fórmico. Tal procedimento foi idêntico para os *vials* fortificados com ácido acético e hidróxido de amônio. Para a avaliação da influência causada por formiato de amônio e acetato de amônio as concentrações de adição foram de 5, 10, 20 e 50 mM.

Os procedimentos foram repetidos tanto em eluente composto por MeOH:H₂O (1:1, v/v) como por ACN:H₂O (1:1, v/v). Ionizações por eletrospray com cargas positiva e negativa foram também comparadas. A aquisição de dados se deu em triplicata, utilizando o modo *full scan* (m/z 100-650) com um tempo de leitura de 250 ms. Cada analito foi medido como a média das áreas dos sinais obtidas em cromatogramas de íon extraído (EIC, do inglês *extracted-ion chromatogram*). As injeções realizadas sem a presença de aditivos foram utilizadas como referência zero, sendo que os efeitos de supressão observados foram reportados com porcentagens relativas negativas e os efeitos de enriquecimento iônico foram reportados com valores positivos.

4.4.5 Avaliação da supressão iônica causada por coeluição de analitos

A supressão ou enriquecimento iônico causados por coeluição de analitos foi avaliada quantitativamente dividindo-se os compostos fenólicos estudados em quatro diferentes grupos, todos contendo as mesmas concentrações para cada analito ($0,5 \text{ mg L}^{-1}$), os quais foram analisados por meio do método cromatográfico descrito na seção 4.3. O grupo I foi constituído por todos os 24 compostos fenólicos abrangidos neste trabalho. Os pares de analitos coeluídos foram divididos em grupos, denominados II, III e IV, de forma que em um mesmo grupo não ocorresse nenhuma coeluição.

A intensidade dos efeitos de supressão ou enriquecimento iônicos foram calculadas de forma relativa para ambos os analitos dos pares coeluídos, utilizando a seguinte equação (REMANE et al., 2010):

$$\text{Supressão iônica (\%)} = \left[\frac{Y}{X} - 1 \right] \times 100 \quad (18)$$

onde X é área dos analitos A ou B quando o outro analito do par de coeluição não está presente (grupos II, III ou IV), e Y é a área dos analitos A ou B quando o outro analito do par de coeluição está presente (grupo I).

Da mesma forma que no item anterior, os efeitos de supressão observados foram reportados com porcentagens negativas e os efeitos de enriquecimento iônico foram reportados com valores positivos. A aquisição de dados se deu em triplicata, utilizando o modo SRM.

4.4.6 Avaliação qualitativa da supressão iônica causada por efeitos de matriz

A supressão iônica causada por influência da matriz foi avaliada de forma qualitativa através de um sistema de infusão pós-coluna, o qual foi acoplado por meio de uma conexão T ao sistema cromatográfico descrito no item 4.3.

Durante as análises cromatográficas, ao mesmo tempo em que foram injetados os extratos das plantas em estudo (após a etapa de SPE), uma solução de 5 mg L⁻¹ dos analitos foi constantemente infundida a uma vazão de 10 µL min⁻¹. Uma linha de base referência foi obtida através da injeção de fase móvel no sistema cromatográfico.

As transições de todos os analitos foram monitoradas no sistema MS/MS pelo modo SRM, de modo que decréscimos na intensidade de sinal, quando comparados à linha de base, indicam componentes da matriz que causam supressão iônica.

4.4.7 Avaliação quantitativa da supressão iônica causada por efeitos de matriz

A supressão iônica causada pelo efeito de matriz foi avaliada quantitativamente, em triplicata, a partir da análise cromatográfica de soluções analíticas dos analitos em concentrações de 0,5 mg L⁻¹, as quais foram comparadas com a análise de extratos de plantas fortificados com uma mesma concentração de padrões (MATUSZEWSKI, CONSTANZER e CHAVEZ-ENG, 2003). Devido à inexistência de amostras brancas para estas plantas medicinais em termos de compostos polifenólicos, os sinais de base dos analitos nas matrizes tiveram de ser desconsiderados. Portanto, foi feita a subtração das áreas obtidas em triplicata nas análises das matrizes sem adição de padrões.

A supressão iônica foi calculada de forma relativa para os 24 analitos, nas seis plantas medicinais em estudo, utilizando a seguinte equação:

$$\text{Supressão iônica (\%)} = \left[\frac{A_{(\text{matriz}+\text{padrões})} - A_{\text{matriz}}}{A_{\text{padrões}}} - 1 \right] \times 100 \quad (19)$$

onde A é a área do pico cromatográfico, sendo que as denominações $A_{(\text{matriz}+\text{padrões})}$, $A_{(\text{matriz})}$ e $A_{(\text{padrões})}$ referem-se aos sinais de, respectivamente, matriz adicionada de padrões, somente matriz e somente padrões.

4.4.8 Avaliação da supressão iônica causada por competição

A supressão iônica oriunda da competição entre íons durante a ionização foi mensurada pela análise cromatográfica dos extratos finais, fortificados com padrões, em diferentes fatores de diluição. Foram avaliadas as proporções de 1:2, 1:6, 1:10, 1:16, 1:32, 1:66 e 1:166 (extrato/fase móvel, v/v) em triplicata.

Para cada matriz estudada foi plotado um gráfico de contorno onde o eixo horizontal representa o fator de diluição do extrato e o eixo vertical, os diferentes analitos estudados. A superfície do gráfico representa as áreas dos picos normalizadas e multiplicadas pelo fator de diluição. Uma vez que não haja efeito de supressão iônica sobre os analitos, a coloração do gráfico deve se manter constante para cada analito à medida em que o fator de diluição aumente.

4.4.9 Avaliação da supressão iônica diferencial

A supressão iônica diferencial foi avaliada para o padrão interno em estudo a partir da análise cromatográfica de soluções analíticas dos analitos em uma concentração de 1 mg L^{-1} , as quais foram comparadas com a análise de extratos de plantas fortificados com uma mesma concentração de padrões. Todas as alíquotas utilizadas no estudo foram adicionadas de 0.5 mg L^{-1} de padrão interno. Os dados foram adquiridos em triplicata, no modo SRM, e a supressão diferencial foi calculada segundo a razão expressa a seguir:

$$\text{Supressão iônica diferencial} = \frac{[A_{(\text{matriz}+\text{padrões})}/A_{PI} - A_{\text{matriz}}/A_{PI}]}{[A_{\text{padrões}}/A_{PI}]} \quad (20)$$

onde A é a área do pico cromatográfico, sendo que as denominações $A_{(\text{matriz+padrões})}$, $A_{(\text{matriz})}$, $A_{(\text{padrões})}$ e A_{PI} referem-se aos sinais de, respectivamente, matriz adicionada de padrões, somente matriz, somente padrões e padrão interno.

A ocorrência de supressão iônica diferencial foi evidenciada quando os resultados encontrados ultrapassam em $\pm 15\%$ o valor assumido como referência.

4.4.10 Validação do método cromatográfico desenvolvido

O método cromatográfico desenvolvido foi validado atendendo ao protocolo proposto pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (Inmetro), publicado sob a forma do documento de caráter orientativo DOQ-CGCRE-008 (INMETRO, 2010). Parâmetros como limites de detecção e limites de quantificação, linearidade, faixa de trabalho, repetibilidade, precisão intermediária, robustez e recuperação foram avaliados para determinar a performance do método proposto.

4.4.10.1 Limites de detecção e quantificação

Os limites instrumentais de detecção (ILODs, do inglês *instrumental limits of detection*) foram determinados visualmente a partir de uma razão sinal-ruído de 3:1 quando baixas concentrações de analitos foram injetadas. As regiões antes e após o pico cromatográfico de cada analito foram consideradas para calcular o ruído de fundo. Da mesma forma, os limites instrumentais de quantificação (ILOQs, do inglês *instrumental limits of quantification*) para cada analito foram determinados a partir de uma razão sinal-ruído de 10:1 (GALLART-AYALA et al., 2011).

4.4.10.2 Linearidade e faixa de trabalho

A linearidade foi avaliada por meio de curvas analíticas traçadas a partir das áreas dos picos cromatográficos em 10 diferentes concentrações dos padrões analíticos igualmente espaçadas. As concentrações avaliadas variaram desde a concentração do ILOQ de cada analito

até 10 vezes esta. Os diferentes pontos da curva analítica foram analisados em triplicata e em ordem arbitrária.

Foram determinados como intervalos lineares as regiões das curvas analíticas entre os pontos que apresentaram coeficiente de correlação (r) maior que 0,99. Ademais, foram avaliados os gráficos plotados entre as áreas relativas dos picos cromatográficos (área do pico/concentração analisada) *versus* a concentração correspondente em escala logarítmica (ARAGÃO, VELOSO e ANDRADE, 2009). Os valores nas extremidades dos gráficos que excederam a média dos resultados em $\pm 5\%$ foram considerados como sendo não-lineares.

4.4.10.3 Repetibilidade e precisão intermediária

Para avaliar a repetibilidade, cinco replicatas de soluções analíticas foram analisadas em sequência, sendo mantidos constantes o operador, as amostras analisadas, a fase móvel e as demais condições operacionais. Para determinar a precisão intermediária, 20 replicatas foram analisadas em cinco dias consecutivos (quatro replicatas por dia), sendo que a cada dia a fase móvel foi renovada e o operador e as amostras analisadas foram mantidos sem variação. Os experimentos de repetibilidade e precisão intermediária foram realizados para três diferentes níveis de concentração e em todas as determinações, os desvios padrão relativos foram calculados tanto em termos das áreas dos picos como dos tempos de retenção.

4.4.10.4 Robustez

A robustez do método foi avaliada pela abordagem de Youden (CÉSAR e PIANETTI, 2009), tanto para a reposta dos analitos como para seus tempos de retenção. Sete diferentes parâmetros foram estudados usando uma combinação fatorial, de maneira tal que foram considerados os parâmetros otimizados do método e uma pequena e factível variação destes. Os parâmetros avaliados foram: composição da fase móvel (0,1% CH_3COOH /0,07% CH_3COOH ; condição otimizada/variação), vazão da fase móvel ($800 \mu\text{L min}^{-1}$ / $820 \mu\text{L min}^{-1}$), temperatura de separação ($40 \text{ }^\circ\text{C}$ / $42 \text{ }^\circ\text{C}$), temperatura do gás de secagem da fonte de ionização ($250 \text{ }^\circ\text{C}$ / $255 \text{ }^\circ\text{C}$), pressão do nebulizador (30 psi/32 psi), voltagem do capilar de eletrospray ($\pm 2,4 \text{ kV}$ / $\pm 2,5 \text{ kV}$) e vazão do gás de secagem (11 L min^{-1} / 12 L min^{-1}). Para interpretação da robustez a partir do teste de Youden, valores maiores que

$s \cdot \sqrt{2}$ foram considerados significantes, onde s é o desvio padrão entre resultados obtidos para cada grandeza avaliada.

4.4.10.5 Recuperação

Ensaio de recuperação foram realizados em seis diferentes matrizes por meio da fortificação das amostras ($n=1$) com quantidades conhecidas de padrões dos analitos estudados. As concentrações quantificadas pelo método de adição do padrão foram diretamente comparadas às concentrações adicionadas no início do estudo. A recuperação foi calculada por meio da fórmula:

$$\text{Recuperação (\%)} = \left[\frac{C_{\text{determinada}}}{C_{\text{adicionada}}} \right] \times 100 \quad (21)$$

onde $C_{\text{determinada}}$ é a concentração de analito quantificada através de uma curva analítica elaborada pelo método de adição do padrão e $C_{\text{adicionada}}$ é a concentração de analito inicialmente adicionada à amostra.

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os dados obtidos pelos procedimentos analíticos descritos, quando determinados através de replicatas, foram interpretados através das médias aritméticas simples acompanhadas dos respectivos desvios padrão relativos. Valores extremos (*outliers*) foram devidamente avaliados através do teste de Grubbs e, caso necessário, desconsiderados.

Todos os cálculos utilizados foram realizados através do software Microsoft® Excel® 2013, versão 15.0.4797.1000, 64 bits.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

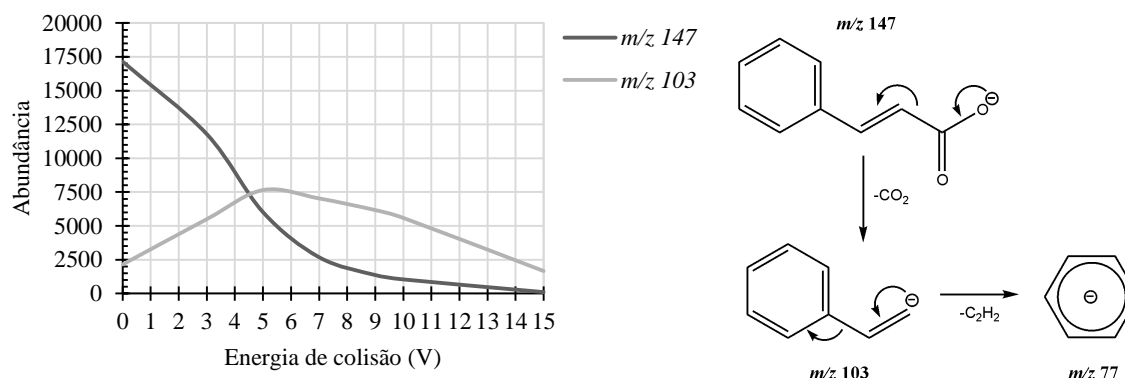
5.1 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE ANÁLISE POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

O comportamento dos 24 analitos abordados por este trabalho frente à espectrometria de massas foi estudado de acordo com os procedimentos descritos nas seções 4.4.1 e 4.4.2. Para os espectros obtidos em modo *full scan* com ionização em polaridade positiva, a maioria dos analitos apresentou apenas os *clusters* isotópicos referentes às moléculas protonadas $[M+H]^+$. De modo semelhante, para a polaridade negativa, a maioria dos compostos foi observado na forma de moléculas desprotonadas $[M-H]^-$. Neste último caso, os espectros obtidos apresentaram melhor relação sinal-ruído frente aos espectros relativos às moléculas protonadas. A exceção foi para o composto 3-acetilcumarina, o qual apenas foi detectado como aduto com sódio, $[M+Na]^+$, no modo positivo de ionização.

A fragmentação dos compostos em estudo foi otimizada variando-se manualmente as energias de colisão, de forma a se obter um maior número de fragmentações, mantendo-se uma pequena abundância do íon precursor. Para todos os analitos foram traçados gráficos de abundância dos íons produto *versus* energia de colisão, tal como representado na Figura 20 para o analito ácido *trans*-cinâmico. A energia de colisão considerada como ótima foi aquela na qual o íon produto de maior intensidade apresentou um máximo de abundância. Nas situações em que o máximo de abundância do íon produto principal ocorreu em uma energia de colisão tal que não apresentasse abundância do íon precursor, foi considerado como ótimo um valor de energia de colisão um pouco inferior ao valor onde ocorreu o máximo de abundância do íon produto principal.

Na ocorrência de dois ou mais íons produto oriundos de um mesmo íon precursor, a transição do íon precursor para o íon produto de maior abundância foi nomeada de transição de quantificação. Esta transição foi utilizada para os estudos de *screening*, otimização do método de separação e, posteriormente, para a quantificação dos analitos nas amostras. O segundo íon produto de maior abundância foi escolhido para definir a transição de confirmação, sendo esta responsável por introduzir maior seletividade ao método. Todas as condições de fragmentação otimizadas, bem como os fragmentos observados para cada analito, foram relatadas na Tabela 3 (página 63).

Figura 20 – Estudo da fragmentação do íon precursor do ácido *trans*-cinâmico (m/z 147). No detalhe, representação esquemática da fragmentação da molécula desprotonada $[M-H]^-$ de ácido *trans*-cinâmico, evidenciando a formação do íon produto de razão m/z 103, com uma energia de colisão ótima de 5 V. O íon produto de razão m/z 77 é formado quando uma energia de colisão maior que 15 V é aplicada à célula de colisão.



Fonte: Do autor.

5.2 SUPRESSÃO IÔNICA POR ADITIVOS DA FASE MÓVEL

Os efeitos de supressão iônica causados por fontes exógenas às matrizes foram avaliados. Uma das estratégias adotadas foi o estudo da influência da fase móvel e de possíveis aditivos às respostas dos analitos frente à ionização por ESI. Tal estudo foi realizado antes mesmo de o método de separação ser desenvolvido. Desta forma, foi possível avaliar solventes e aditivos que afetassem negativamente a ionização dos analitos, dando prioridade ao uso, durante o desenvolvimento do método de separação, aos que causassem menor supressão iônica.

A eficiência de ionização da fonte ESI está diretamente ligada à composição da fase móvel. O pH é um importante fator a ser considerado na escolha da fase móvel, uma vez que as moléculas já podem chegar à fonte ionizadas, em fase líquida. Outro fator é a viscosidade, a qual influencia fortemente o eletrospray, facilitando ou não tanto a nebulização quanto a evaporação da fase móvel. Também já se é conhecido que determinados aditivos são capazes de suprimir totalmente a ionização, como é o caso do ácido trifluoroacético (TFA), o qual inibe a detecção de analitos no modo negativo de ionização e apresenta fortes influências também no modo positivo (LAW, B. e TEMESI, 2000; LIM e LORD, 2002; ANNESLEY, 2003; FUREY et al., 2013). Este fenômeno se deve à excelente capacidade do íon trifluoroacetato em atuar como reagente formador de par iônico, neutralizando assim a carga formal de espécies iônicas que poderiam vir a ser formadas durante a ionização por eletrospray.

Neste estudo foram avaliadas as influências de metanol e acetonitrila na composição da fase móvel, na presença de aditivos que alteram o pH do meio (Tabela 4 e Tabela 5).

Tabela 4 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos de pH em fase móvel composta por metanol e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.

	Metanol/água (1:1, v/v)											
	Ácido fórmico				Ácido acético				Hidróxido de amônio			
	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%
<i>Polaridade positiva</i>												
3-acetilcumarina	27 (1,1)	10 (1,9)	-11 (0,6)	-19 (0,7)	45 (2,2)	42 (1)	16 (1,4)	5 (1,1)	-93 (2,5)	-93 (1,5)	-94 (2,6)	-96 (11,7)
<i>Polaridade negativa</i>												
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	-54 (17,6)	-58 (11,4)	-63 (23,6)	-62 (10,8)	9 (2,6)	14 (2,8)	8 (4,9)	-8 (17,2)	231 (6,0)	232 (1,9)	172 (0,6)	202 (1,8)
4-hidroxicumarina	-36 (1,8)	-45 (1,3)	-64 (3,2)	-70 (3,7)	-19 (2,0)	-26 (0,9)	-40 (2,2)	-46 (4,4)	72 (2,1)	65 (0,3)	33 (1,6)	27 (0,7)
6-hidroxicumarina	-36 (1,8)	-45 (1,3)	-64 (3,2)	-70 (3,7)	-19 (2,0)	-26 (0,9)	-40 (2,2)	-46 (4,4)	72 (2,1)	65 (0,3)	33 (1,6)	27 (0,7)
Ácido <i>p</i> -cumárico	-31 (5,9)	-43 (10,6)	-61 (5,8)	-66 (10,8)	-40 (5,3)	-40 (5,3)	-41 (4,6)	-46 (4,9)	71 (2,8)	70 (4,1)	50 (3,6)	45 (2,6)
Ácido vanílico	-45 (3,1)	-59 (5,3)	-80 (6,9)	-86 (21,0)	-1 (5,2)	-6 (4,8)	-5 (7,5)	-22 (6,8)	472 (3,7)	449 (6,9)	336 (3,4)	299 (3,5)
Ácido gálico	-50 (7,3)	-54 (8,8)	-63 (9,9)	-73 (7,6)	-43 (9,6)	-45 (5,9)	-64 (11,2)	-68 (12,9)	-77 (6,1)	-73 (7,0)	-69 (7,5)	-68 (1,7)
Ácido cafeico	-29 (2,1)	-35 (7,9)	-43 (5,5)	-45 (5,3)	-48 (6,7)	-50 (8,2)	-45 (6,9)	-45 (3,6)	-19 (5,6)	-48 (4,2)	-80 (5,5)	-84 (5,9)
Ácido ferúlico	-21 (2,6)	-28 (8,3)	-57 (2,9)	-62 (17,7)	-19 (5,6)	-17 (7,1)	-13 (7,2)	-15 (8,1)	280 (4,3)	287 (4,7)	236 (4,2)	255 (2,2)
Resveratrol	-8 (3,6)	-20 (10,4)	-42 (5,4)	-50 (6,3)	-14 (4,7)	-14 (4,7)	-25 (4,7)	-30 (6,6)	19 (3,8)	12 (1,8)	-14 (1,6)	-25 (1,6)
3,6-dihidroxi-flavona	-24 (7,4)	-22 (6,6)	-41 (9,7)	-50 (8,6)	-4 (2,1)	-7 (1,3)	-15 (4,2)	-16 (5,4)	98 (2,0)	103 (3,3)	84 (0,6)	85 (2,2)
Crisina	-24 (7,4)	-22 (6,6)	-41 (9,7)	-50 (8,6)	-4 (2,1)	-7 (1,3)	-15 (4,2)	-16 (5,4)	98 (2,0)	103 (3,3)	84 (0,6)	85 (2,2)
Apigenina	-25 (3,3)	-29 (10,9)	-49 (5,2)	-57 (6,2)	-21 (4,1)	-24 (7,8)	-32 (6,6)	-37 (12,9)	50 (2,4)	41 (1,9)	5 (2,4)	-2 (1,4)
Galangina	-25 (3,3)	-29 (10,9)	-49 (5,2)	-57 (6,2)	-21 (4,1)	-24 (7,8)	-32 (6,6)	-37 (12,9)	50 (2,4)	41 (1,9)	5 (2,4)	-2 (1,4)
Luteolina	-26 (7,3)	-35 (3,7)	-49 (4,5)	-61 (5,6)	-36 (4,1)	-38 (12,2)	-45 (7,4)	-55 (7,7)	-5 (3,1)	-14 (1,8)	-36 (2,0)	-52 (6,7)
Canferol	-26 (7,3)	-35 (3,7)	-49 (4,5)	-61 (5,6)	-36 (4,1)	-38 (12,2)	-45 (7,4)	-55 (7,7)	-5 (3,1)	-14 (1,8)	-36 (2,0)	-52 (6,7)
Fisetina	-26 (7,3)	-35 (3,7)	-49 (4,5)	-61 (5,6)	-36 (4,1)	-38 (12,2)	-45 (7,4)	-55 (7,7)	-5 (3,1)	-14 (1,8)	-36 (2,0)	-52 (6,7)
(+)-catequina	18 (2,3)	7 (2,5)	-3 (5,4)	-27 (10,0)	5 (9,7)	7 (2,3)	13 (3,9)	-7 (4,1)	-80 (12,6)	-85 (12,5)	-86 (16,7)	-87 (14,3)
Quercetina	-29 (8,9)	-34 (7,7)	-43 (6,1)	-54 (4,5)	-38 (8,9)	-38 (5,6)	-47 (9,9)	-57 (5,3)	-69 (4,9)	-67 (4,7)	-65 (5,3)	-73 (6,4)
Miricetina	-83 (4,3)	-85 (11)	-87 (9,3)	-86 (26,4)	-77 (4,6)	-79 (7,6)	-85 (8,8)	-93 (12,4)	-59 (5,1)	-61 (7,1)	-56 (4,3)	-59 (9,6)
Ácido clorogênico	8 (4,0)	-11 (11,5)	-41 (9,8)	-43 (2,4)	41 (9,8)	14 (12,4)	-37 (2,7)	-65 (29,7)	165 (5,7)	120 (4,1)	34 (7,7)	-20 (6,0)
Ácido rosmarínico	58 (9,2)	38 (17,0)	17 (5,5)	-7 (37,6)	-7 (18,7)	-1 (15,5)	-32 (19,0)	-51 (8,0)	-84 (6,0)	-79 (7,1)	-60 (7,5)	-42 (9,3)
Quercitrina	-13 (5,9)	-17 (5,3)	-41 (8,1)	-52 (4,6)	-47 (6,0)	-42 (2,2)	-44 (2,8)	-50 (4,8)	80 (6,4)	66 (4,6)	46 (2,9)	19 (5,3)
Rutina	63 (2,4)	50 (4,6)	24 (5,7)	-1 (2,6)	-11 (1,9)	-4 (4,2)	14 (4,5)	-5 (6,0)	192 (4,6)	162 (5,0)	123 (3,5)	57 (4,0)

Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

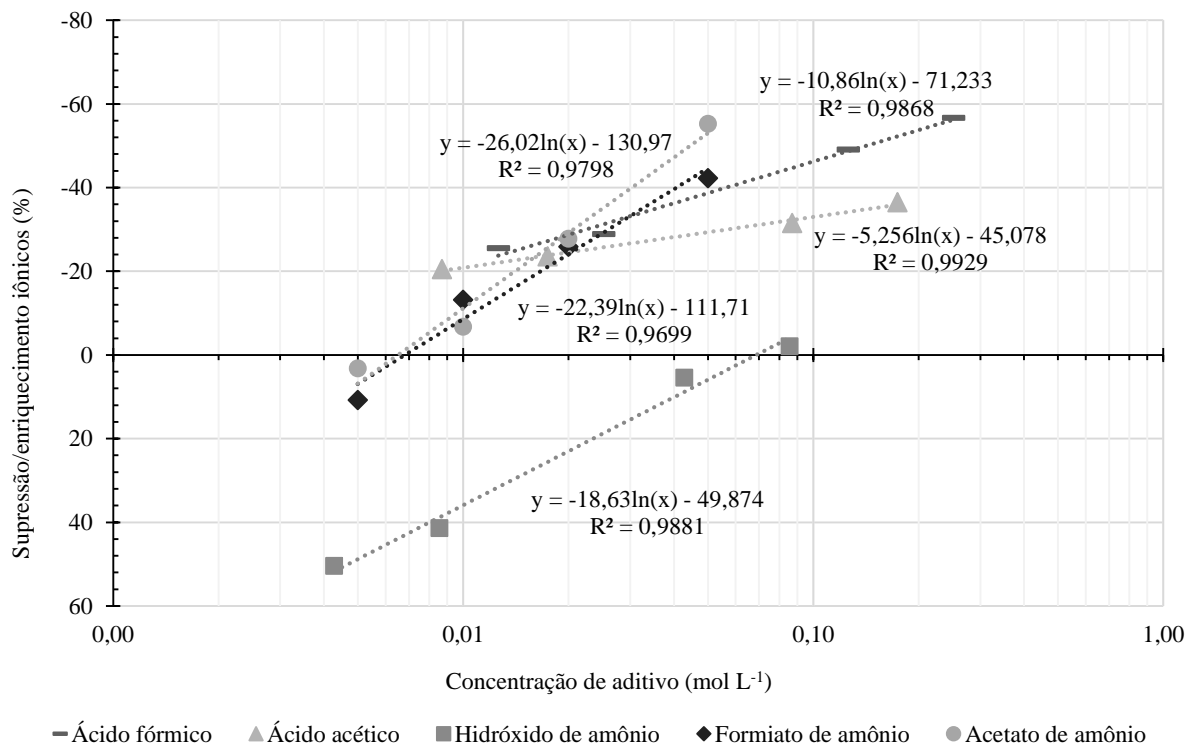
Tabela 5 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos de pH em fase móvel composta por acetonitrila e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.

	Acetonitrila/água (1:1, v/v)											
	Ácido fórmico				Ácido acético				Hidróxido de amônio			
	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%	0,05%	0,1%	0,5%	1,0%
<i>Polaridade positiva</i>												
3-acetilumarina	8 (0,4)	-4 (0,2)	-21 (1,3)	-27 (0,6)	18 (3,2)	18 (0,4)	3 (1,2)	-7 (2,5)	-95 (3,1)	-94 (2,0)	-95 (5,2)	-97 (19,2)
<i>Polaridade negativa</i>												
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	-66 (6,5)	-69 (2,0)	-78 (7,4)	-82 (5,9)	-8 (4,9)	-13 (5,3)	-23 (8,9)	-29 (4,2)	92 (4,1)	140 (3,8)	237 (1,9)	253 (3,3)
4-hidroxicumarina	-39 (2,2)	-47 (2,2)	-63 (1,8)	-70 (2,2)	-25 (1,5)	-29 (0,6)	-43 (1,7)	-48 (3,3)	37 (0,4)	38 (2,0)	45 (1,1)	38 (0,8)
6-hidroxicumarina	-39 (2,2)	-47 (2,2)	-63 (1,8)	-70 (2,2)	-25 (1,5)	-29 (0,6)	-43 (1,7)	-48 (3,3)	37 (0,4)	38 (2,0)	45 (1,1)	38 (0,8)
Ácido <i>p</i> -cumárico	-39 (6,1)	-44 (5,2)	-59 (6,1)	-67 (10,0)	-48 (7,8)	-45 (4,6)	-47 (3,2)	-51 (4,5)	42 (3,0)	52 (2,7)	76 (5,9)	70 (2,4)
Ácido vanílico	-65 (5,5)	-71 (11,4)	-84 (24,9)	-88 (5,1)	-33 (6,5)	-28 (6,6)	-30 (4,2)	-40 (10,7)	243 (4,9)	281 (5,5)	362 (4,6)	300 (3,2)
Ácido gálico	-37 (2,4)	-45 (3,8)	-65 (4,4)	-73 (6,3)	-33 (4,5)	-35 (4,3)	-42 (5,2)	-56 (8,6)	-72 (8,5)	-67 (9,9)	-55 (3,6)	-52 (7,9)
Ácido cafeico	-27 (1,2)	-29 (0,8)	-37 (3,1)	-34 (6,3)	-46 (2,2)	-46 (6,0)	-42 (5,7)	-44 (1,9)	-12 (4,4)	-40 (2,3)	-72 (9,3)	-76 (7,3)
Ácido ferúlico	-33 (5,3)	-41 (5,6)	-61 (5,3)	-65 (7,5)	-38 (7,6)	-42 (5,5)	-38 (5,6)	-42 (4,3)	155 (1,5)	197 (1,2)	293 (0,6)	310 (2,9)
Resveratrol	-37 (0,9)	-43 (2,8)	-61 (2,1)	-67 (5,4)	-40 (4,5)	-44 (3,7)	-47 (9,8)	-53 (5,6)	-12 (2,9)	-14 (1,7)	-16 (6,3)	-22 (2,6)
3,6-dihidroxi-flavona	-28 (2,9)	-31 (0,6)	-40 (3,1)	-50 (5,7)	-3 (0,7)	-5 (1,7)	-13 (1,5)	-21 (2,9)	59 (0,7)	65 (1,3)	91 (3,1)	96 (0,5)
Crisina	-28 (2,9)	-31 (0,6)	-40 (3,1)	-50 (5,7)	-3 (0,7)	-5 (1,7)	-13 (1,5)	-21 (2,9)	59 (0,7)	65 (1,3)	91 (3,1)	96 (0,5)
Apigenina	-32 (2,8)	-39 (1,2)	-52 (8,0)	-60 (1,2)	-17 (0,6)	-22 (4,4)	-32 (5,3)	-39 (5,2)	16 (1,9)	8 (2,2)	7 (1,9)	0 (0,9)
Galangina	-32 (2,8)	-39 (1,2)	-52 (8,0)	-60 (1,2)	-17 (0,6)	-22 (4,4)	-32 (5,3)	-39 (5,2)	16 (1,9)	8 (2,2)	7 (1,9)	0 (0,9)
Luteolina	-34 (0,7)	-37 (3,0)	-54 (5,1)	-62 (2,3)	-31 (2,2)	-33 (3,7)	-46 (7,0)	-53 (3,7)	-32 (1,0)	-32 (1,9)	-34 (1,5)	-48 (2,3)
Canferol	-34 (0,7)	-37 (3,0)	-54 (5,1)	-62 (2,3)	-31 (2,2)	-33 (3,7)	-46 (7,0)	-53 (3,7)	-32 (1,0)	-32 (1,9)	-34 (1,5)	-48 (2,3)
Fisetina	-34 (0,7)	-37 (3,0)	-54 (5,1)	-62 (2,3)	-31 (2,2)	-33 (3,7)	-46 (7,0)	-53 (3,7)	-32 (1,0)	-32 (1,9)	-34 (1,5)	-48 (2,3)
(+)-catequina	-31 (11,8)	-34 (5,4)	-46 (4,7)	-51 (9,2)	-43 (13,3)	-35 (3,0)	-38 (9,0)	-43 (5,5)	-91 (9,9)	-90 (15,1)	-89 (17,3)	-89 (14,7)
Quercetina	-37 (3,2)	-41 (4,4)	-50 (4,7)	-61 (10,8)	-35 (12,1)	-36 (4,3)	-44 (2,0)	-52 (10,5)	-73 (4,1)	-68 (1,0)	-57 (2,1)	-64 (3,4)
Miricetina	-88 (9,2)	-89 (11,6)	-93 (15)	-94 (20,8)	-62 (10,2)	-68 (10,0)	-81 (3,9)	-97 (15,5)	-58 (5,2)	-55 (5,4)	-41 (8,4)	-45 (0,8)
Ácido clorogênico	39 (17,4)	9 (11,4)	-34 (5,6)	-57 (9,6)	59 (4,7)	54 (2,3)	21 (6,5)	-26 (1,2)	133 (6,6)	131 (3,6)	88 (0,7)	10 (5,3)
Ácido rosmarínico	-25 (5,3)	-17 (3,4)	-28 (2,6)	-36 (3,6)	-16 (4,4)	-19 (3,4)	-43 (6,0)	-56 (5,1)	-90 (4,5)	-87 (18,5)	-68 (7,6)	-53 (12,5)
Quercitrina	-25 (2,7)	-32 (5,2)	-47 (1,4)	-55 (6,9)	-54 (4,6)	-52 (2,7)	-52 (3,4)	-59 (7,0)	57 (0,4)	64 (0,3)	76 (1,0)	50 (4,7)
Rutina	-13 (10,3)	-8 (6,9)	-28 (6,0)	-46 (10,4)	-47 (6,0)	-48 (6,8)	-38 (4,9)	-51 (5,3)	84 (2,1)	94 (4,6)	98 (1,4)	44 (3,4)

Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Embora diferentes comportamentos de supressão iônica puderam ser observados para cada analito quando utilizada uma fase móvel composta por $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v) comparada a uma fase móvel de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v), não foi possível encontrar uma razão genérica para tais diferenças. Entretanto, foi observado que a supressão iônica (%) tem uma forte correlação logarítmica com a concentração molar dos aditivos testados (Figura 21), sendo esta uma afirmação válida tanto para MeOH como para ACN. Corroborando com estes resultados, LAW, B. e TEMESI (2000) também observaram um aumento da supressão iônica quando ocorreu um aumento das concentrações de aditivos.

Figura 21 – Representação da correlação logarítmica existente entre a intensidade de supressão iônica (%) e a concentração molar dos aditivos avaliados. No gráfico estão expressos os dados experimentais para o analito galangina, utilizando como solvente $\text{ACN}:\text{H}_2\text{O}$ (1:1, v/v).



Fonte: Do autor.

A avaliação do uso de aditivos tamponantes (Tabela 6 e Tabela 7) mostrou uma supressão iônica mais evidente quando comparado ao uso dos respectivos ácidos conjugados em uma concentração similar. Tal supressão foi causada muito provavelmente por uma alta concentração de ânions acetato e formiato completamente dissociados, os quais suprimiram a ionização dos analitos no modo negativo de ionização (YAMAGUCHI et al., 1999). Para a maioria dos analitos, o formiato de amônio teve uma maior contribuição para a supressão iônica comparado ao acetato de amônio. A possível razão para isso é a menor volatilidade do formiato

de amônio (ponto de ebulição igual a 180 °C), o que resulta na formação de gotas de fase móvel ricas em ânions formiato durante a ionização por eletrospray. Adicionalmente, hidróxido de amônio também foi avaliado como um aditivo, sendo que para muitos analitos, um importante efeito de enriquecimento iônico foi observado no modo negativo de ionização. A possível causa para tal efeito foi o aumento considerável do pH e a consequente desprotonação dos analitos com caráter ácido antes mesmo destes chegarem à fonte de ionização (PERIAT et al., 2013).

Tabela 6 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos tamponantes em fase móvel composta por metanol e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.

	Metanol/água (1:1, v/v)							
	Formiato de amônio				Acetato de amônio			
	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM
<i>Polaridade positiva</i>								
3-acetilcumarina	-80 (1)	-88 (2)	-92 (2)	-96 (2)	-51 (3)	-62 (1)	-74 (2)	-80 (2)
<i>Polaridade negativa</i>								
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	-41 (7)	-62 (13)	-70 (12)	-83 (30)	-27 (7)	-39 (4)	-63 (10)	-83 (7)
4-hidroxycumarina	-22 (0)	-38 (3)	-47 (1)	-60 (2)	-15 (3)	-28 (1)	-45 (4)	-65 (5)
6-hidroxycumarina	-22 (0)	-38 (3)	-47 (1)	-60 (2)	-15 (3)	-28 (1)	-45 (4)	-65 (5)
Ácido <i>p</i> -cumárico	-35 (7)	-52 (13)	-62 (5)	-74 (3)	-42 (4)	-54 (6)	-64 (6)	-80 (17)
Ácido vanílico	-55 (5)	-70 (11)	-79 (9)	-90 (7)	-45 (6)	-57 (2)	-69 (16)	-88 (29)
Ácido gálico	-25 (3)	-35 (11)	-38 (11)	-37 (15)	-5 (9)	-20 (13)	-20 (6)	-47 (17)
Ácido cafeico	-36 (6)	-42 (15)	-51 (12)	-60 (16)	-25 (2)	-39 (12)	-47 (5)	-66 (4)
Ácido ferúlico	-20 (4)	-46 (6)	-62 (8)	-77 (8)	-29 (3)	-47 (3)	-64 (4)	-85 (32)
Resveratrol	23 (5)	-5 (4)	-25 (4)	-53 (3)	35 (1)	12 (6)	-20 (1)	-60 (11)
3,6-dihidroxi flavona	15 (3)	-2 (8)	-13 (9)	-30 (4)	29 (7)	18 (1)	-10 (4)	-39 (8)
Crisina	15 (3)	-2 (8)	-13 (9)	-30 (4)	29 (7)	18 (1)	-10 (4)	-39 (8)
Apigenina	11 (3)	-13 (9)	-26 (4)	-42 (7)	3 (7)	-7 (9)	-28 (8)	-55 (14)
Galangina	11 (3)	-13 (9)	-26 (4)	-42 (7)	3 (7)	-7 (9)	-28 (8)	-55 (14)
Luteolina	-5 (9)	-21 (3)	-34 (5)	-45 (10)	-3 (7)	-17 (14)	-30 (14)	-46 (8)
Canferol	-5 (9)	-21 (3)	-34 (5)	-45 (10)	-3 (7)	-17 (14)	-30 (14)	-46 (8)
Fisetina	-5 (9)	-21 (3)	-34 (5)	-45 (10)	-3 (7)	-17 (14)	-30 (14)	-46 (8)
(+)-catequina	25 (10)	-7 (12)	-30 (13)	-52 (14)	6 (9)	-15 (3)	-34 (9)	-63 (6)
Quercetina	-3 (5)	-11 (5)	-29 (5)	-42 (1)	0 (11)	-24 (4)	-31 (11)	-59 (11)
Miricetina	-21 (9)	-15 (4)	-29 (12)	-34 (10)	-40 (7)	-58 (14)	-67 (5)	-89 (6)
Ácido clorogênico	-12 (12)	-17 (11)	-27 (11)	-34 (3)	-21 (8)	-40 (5)	-45 (9)	-68 (19)
Ácido rosmarínico	54 (6)	32 (8)	3 (13)	-30 (21)	29 (7)	5 (11)	-23 (5)	-64 (14)
Quercitrina	-7 (4)	-23 (7)	-38 (5)	-55 (2)	-16 (7)	-28 (3)	-46 (6)	-62 (20)
Rutina	48 (3)	26 (8)	-4 (3)	-33 (19)	26 (11)	8 (9)	-33 (14)	-44 (3)

Fonte: Adaptada de FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Tabela 7 – Efeitos de supressão e enriquecimento iônicos (%) para aditivos tamponantes em fase móvel composta por acetonitrila e água. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.

	Acetonitrila/água (1:1, v/v)							
	Formiato de amônio				Acetato de amônio			
	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM	5 mM	10 mM	20 mM	50 mM
<i>Polaridade positiva</i>								
3-acetilcumarina	-60 (1)	-76 (1)	-83 (1)	-91 (4)	-51 (1)	-61 (1)	-73 (1)	-79 (2)
<i>Polaridade negativa</i>								
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	-28 (5)	-58 (4)	-72 (8)	-88 (4)	-14 (6)	-40 (15)	-65 (7)	-81 (10)
4-hidroxicumarina	-38 (1)	-51 (1)	-60 (1)	-68 (0)	-35 (1)	-49 (2)	-60 (1)	-67 (3)
6-hidroxicumarina	-38 (1)	-51 (1)	-60 (1)	-68 (0)	-35 (1)	-49 (2)	-60 (1)	-67 (3)
Ácido <i>p</i> -cumárico	-38 (2)	-55 (8)	-65 (6)	-75 (9)	-47 (3)	-62 (4)	-71 (8)	-78 (6)
Ácido vanílico	-51 (10)	-69 (4)	-79 (8)	-91 (41)	-49 (1)	-63 (4)	-79 (9)	-88 (9)
Ácido gálico	40 (14)	46 (3)	48 (7)	46 (2)	54 (5)	33 (6)	1 (8)	-36 (6)
Ácido cafeico	-22 (6)	-32 (5)	-44 (10)	-52 (10)	-15 (5)	-36 (5)	-50 (6)	-66 (10)
Ácido ferúlico	-15 (0)	-40 (6)	-62 (7)	-78 (17)	-27 (8)	-46 (8)	-68 (2)	-84 (17)
Resveratrol	6 (2)	-25 (1)	-47 (1)	-71 (5)	16 (2)	-14 (6)	-41 (3)	-67 (7)
3,6-dihidroxiavona	-9 (2)	-27 (3)	-41 (5)	-57 (5)	2 (3)	-18 (4)	-34 (3)	-50 (7)
Crisina	-9 (2)	-27 (3)	-41 (5)	-57 (5)	2 (3)	-18 (4)	-34 (3)	-50 (7)
Apigenina	-26 (5)	-40 (3)	-51 (6)	-66 (7)	-25 (2)	-39 (2)	-55 (10)	-64 (6)
Galangina	-26 (5)	-40 (3)	-51 (6)	-66 (7)	-25 (2)	-39 (2)	-55 (10)	-64 (6)
Luteolina	-1 (1)	-11 (4)	-23 (3)	-35 (6)	10 (5)	-14 (4)	-38 (17)	-52 (2)
Canferol	-1 (1)	-11 (4)	-23 (3)	-35 (6)	10 (5)	-14 (4)	-38 (17)	-52 (2)
Fisetina	-1 (1)	-11 (4)	-23 (3)	-35 (6)	10 (5)	-14 (4)	-38 (17)	-52 (2)
(+)-catequina	-9 (3)	-38 (4)	-52 (8)	-70 (6)	-24 (3)	-36 (8)	-57 (9)	-72 (12)
Quercetina	26 (1)	14 (0)	-2 (4)	-4 (3)	33 (4)	-1 (5)	-38 (5)	-62 (7)
Miricetina	62 (4)	54 (11)	26 (3)	32 (4)	39 (3)	-20 (14)	-66 (17)	-93 (24)
Ácido clorogênico	12 (8)	7 (6)	-6 (9)	-14 (8)	-18 (9)	-34 (17)	-68 (29)	-83 (10)
Ácido rosmarínico	28 (4)	14 (6)	-5 (10)	-24 (10)	20 (3)	-9 (8)	-35 (10)	-58 (15)
Quercitrina	-14 (8)	-31 (6)	-39 (8)	-60 (11)	-1 (3)	-23 (3)	-38 (15)	-58 (10)
Rutina	24 (7)	28 (20)	-16 (6)	-37 (9)	17 (9)	4 (3)	-23 (11)	-50 (3)

Fonte: Adaptada de FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Para o desenvolvimento do método de separação adotou-se uma fase móvel com caráter ácido a fim de facilitar a retenção dos analitos em cromatografia líquida de fase reversa. Dessa forma, optou-se por utilizar ácido acético como aditivo de fase móvel por causar, em linhas gerais, menor supressão iônica que os demais aditivos testados. Neste âmbito, ácido fórmico não foi utilizado no desenvolvimento do método de separação por este apresentar um pK_a mais baixo que o ácido acético, o que poderia favorecer a ionização de interferentes com algum caráter básico na análise de plantas medicinais.

Por outro lado, um valor de pH apropriado para a fase móvel poderia ser atingido usando uma menor concentração de ácido fórmico que a concentração de ácido acético adotada (0,05% (v/v) para ácido fórmico, ao invés de 0,1% (v/v) para ácido acético). Entretanto, a esta concentração de ácido fórmico, os efeitos de supressão iônica observados para vários analitos

foram muito próximos àqueles causados por ácido acético a uma concentração de 0,1% (v/v). Adicionalmente, a robustez do método poderia ser afetada com o uso de ácido fórmico, devido à maior volatilidade deste ácido e às possíveis mudanças de composição na fase móvel ao longo de várias análises em sequência.

5.3 DESENVOLVIMENTO DO MÉTODO DE SEPARAÇÃO POR UHPLC

Neste estudo foi utilizada uma coluna cromatográfica de fase reversa (C18) para a separação de 24 compostos fenólicos, os quais foram escolhidos como analitos tendo por base a frequência com que são reportados em estudos de caracterização química de plantas e alimentos com relevada importância medicinal. Para se desenvolver e otimizar o método de separação dos analitos utilizando cromatografia líquida foi seguido o planejamento experimental proposto por SNYDER, KIRKLAND e DOLAN (2009), o qual se baseia nas seguintes etapas:

1. Definição da técnica cromatográfica a ser utilizada;
2. Realização de um experimento inicial para definição do modo de eluição a ser utilizado (isocrático ou gradiente).

No caso de adoção do modo de eluição por gradiente:

3. Otimização do fator de retenção (k) dos analitos;
4. Otimização do fator de separação (α) dos analitos;
5. Ajuste do intervalo e perfil do gradiente de eluição;
6. Otimização da eficiência (N);
7. Determinação do tempo de reequilíbrio da coluna cromatográfica.

Para avaliar a necessidade de uma separação com eluição por gradiente, a teoria descrita por SNYDER, KIRKLAND e DOLAN (2009) foi aplicada. Esta teoria propõe o estabelecimento de um gradiente inicial cuja composição de solvente orgânico varia de 5 a 100%, em um tempo de gradiente (t_G) variável conforme o volume morto (V_m) calculado para a coluna cromatográfica em uso. O volume morto, em mL, pode ser estimado pela seguinte equação:

$$V_m = 5 \times 10^{-4} L d_c^2 \quad (22)$$

onde L é o comprimento da coluna, em mm, e d_c é o diâmetro da coluna, também em mm. Então, conforme a equação (22), a coluna utilizada neste trabalho (seção 4.3) possui um volume morto calculado igual a 0,11 mL.

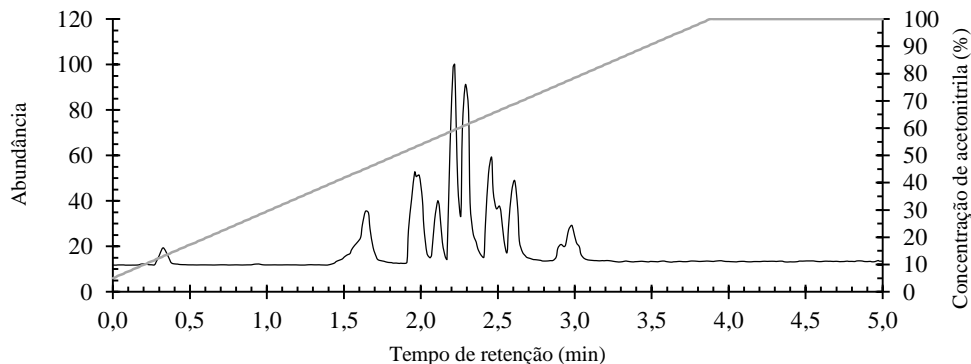
A partir dessa estimativa é possível então calcular o tempo de gradiente necessário para que todos os analitos tenham um fator de retenção máximo próximo a 5, evitando uma análise excessivamente longa. A equação que nos dá tal estimativa é:

$$t_G = \frac{23V_m\Delta\phi}{F} \quad (23)$$

onde V_m é o volume morto, $\Delta\phi$ é o intervalo de variação da composição de fase móvel, em termos do solvente orgânico, e F é a vazão da fase móvel utilizada. Dessa forma, então, o tempo de gradiente ideal para se fazer uma primeira avaliação da separação cromatográfica é de 3 min, considerando uma variação da concentração de acetonitrila de 5 para 100%, a uma vazão de fase móvel igual a 0,8 mL min⁻¹.

Sob estas condições, utilizando ácido acético a uma concentração de 0,1% (v/v) como fase móvel A do gradiente de eluição, foi obtida a separação cromatográfica mostrada a seguir (Figura 22), onde o primeiro analito foi eluído a um tempo de retenção igual a 0,35 min e o último analito foi eluído a 3,03 min.

Figura 22 – Separação cromatográfica obtida inicialmente para avaliação da necessidade de se utilizar uma eluição por gradiente (TIC SRM). Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, 2,1 × 50 mm, 1,8 μm (Agilent).



Fonte: Do autor.

Ainda de acordo com SNYDER, KIRKLAND e DOLAN (2009), a razão $\Delta t_r/t_G$ indica a necessidade de uma separação por gradiente sempre que seu valor for superior a 0,40, onde

Δt_r é a diferença entre os tempos de retenção do primeiro e último picos cromatográficos. Através dos dados experimentais obtidos inicialmente, a razão calculada foi de 0,89, indicando claramente a necessidade da utilização de um gradiente de eluição para obtenção de uma separação cromatográfica adequada.

As informações qualitativas obtidas a partir desse primeiro experimento também indicam três diferentes problemas: primeiro, um dos analitos é eluído em um tempo de análise muito curto; segundo, há um grupo de três picos que são eluídos tardiamente; e, por fim, há um grande bloco de analitos que eluem em um intervalo de tempo bastante restrito. Os três fatores juntos são o suficiente para caracterizar uma separação como complexa, visto os diferentes comportamentos de interação entre todos os 24 analitos e a coluna cromatográfica.

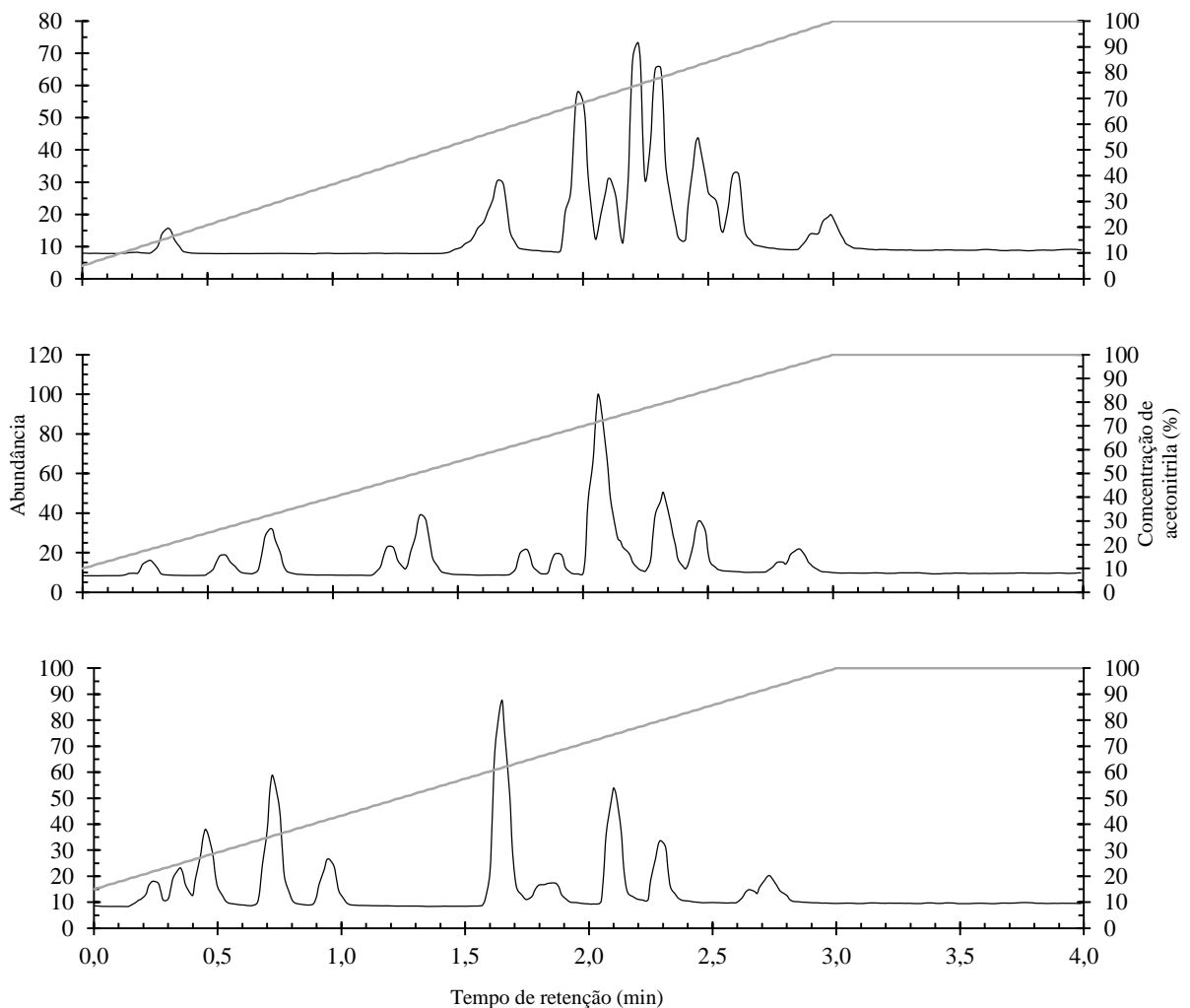
Na sequência se procedeu à otimização do fator de retenção dos analitos, onde a composição inicial da fase móvel foi testada frente à diferentes proporções de AcOH 0,1% (v/v) e ACN. Foram testados gradientes de eluição com t_G igual a 3 min, os quais foram iniciados com 10 e 15% de ACN compondo a fase móvel e concluídos a uma concentração de ACN igual a 100%, mantendo sempre a vazão de fase móvel igual a 0,8 mL min⁻¹. A Figura 23 indica que houve uma condição mais favorável de eluição dos 24 analitos quando a composição da fase móvel inicial está entre 5 e 10% de ACN.

Uma sequência de análises permitiu otimizar a concentração inicial de ACN que compõe o gradiente de eluição. Foram testados os valores de 6, 7, 8, e 9% (v/v), sendo que a concentração inicial de 8% de ACN (v/v) foi a que melhor permitiu uma separação dos analitos que compunham o início do cromatograma, ainda permitindo um leve atraso na eluição do primeiro analito. Como o uso de concentrações de ACN inferiores a 8% (v/v) afetaram a separação de outros analitos ao longo do gradiente de eluição, optou-se por manter uma etapa isocrática inicial para permitir uma maior separação entre os picos iniciais. Tendo em vista que o tempo de atraso entre o início do gradiente de eluição e a sua chegada à coluna cromatográfica (*gradient delay*) é de 2 min para o sistema cromatográfico utilizado, o tempo adotado para esta etapa isocrática foi de apenas 0,1 min no programa de eluição. No entanto, pode-se dizer que, embora virtualmente, a condição isocrática perdura por cerca de 2 min ao longo da separação cromatográfica.

Dando prosseguimento à otimização da separação o tempo de gradiente foi variado, a fim de modificar os fatores de separação dos diversos analitos. Mantendo-se a condição isocrática inicial, foram testados os tempos de gradiente igual a 3, 9, 10, 14 e 16 min (Figura 24). Em todos os casos citados, a composição de acetonitrila variou de 8 a 100% (v/v) no intervalo de tempo considerado. A última das condições avaliadas (t_G igual a 16 min) teve

melhor desempenho quanto à separação dos analitos comparada às demais. Entretanto, foi percebido que os analitos eram eluídos muito antes da finalização do programa de eluição. Dessa forma, a parte final da eluição foi otimizada, interrompendo-se o programa de eluição em 8 min, a uma concentração de acetonitrila igual a 54%, sem prejuízos à separação (Figura 25).

Figura 23 – Otimização da parte inicial do programa de eluição por gradiente (TIC SRM). De cima para baixo: concentração inicial de acetonitrila igual a 5, 10 e 15% (v/v). Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e a uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, $2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,8 \text{ }\mu\text{m}$ (Agilent).



Fonte: Do autor.

Figura 24 – Otimização do tempo de gradiente (TIC SRM). De cima para baixo: tempo de gradiente igual a 3, 9, 10, 14 e 16 min. Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de 0,8 mL min⁻¹ e a uma temperatura de 40 °C. Coluna Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD, 2,1 × 50 mm, 1,8 µm (Agilent).

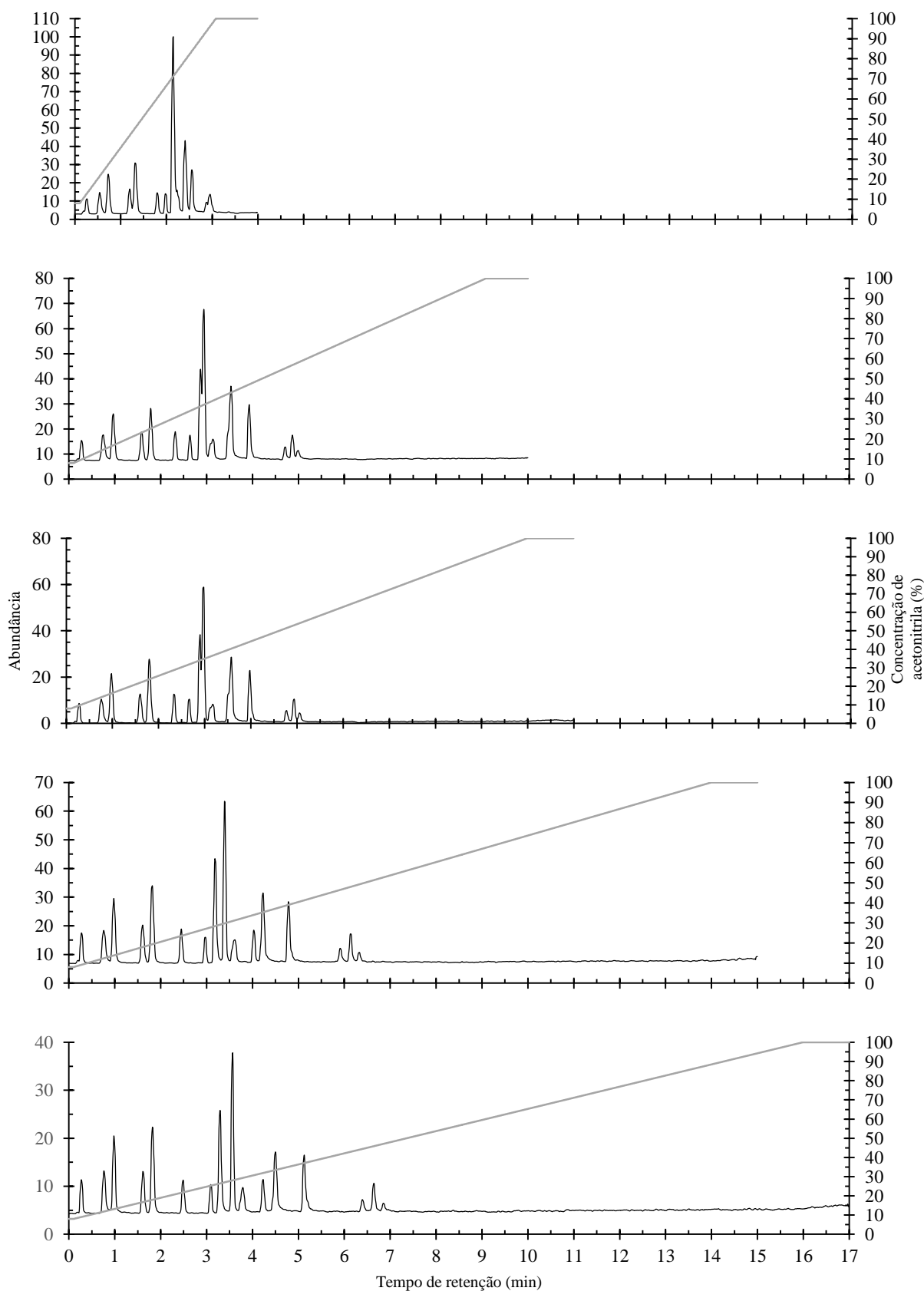
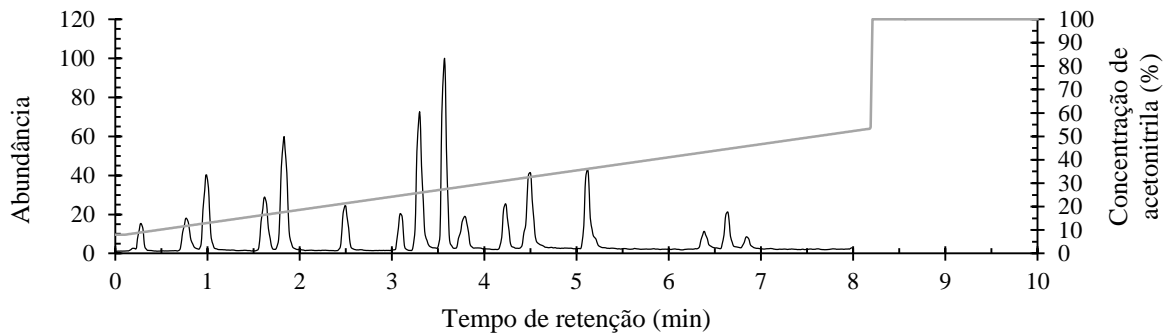


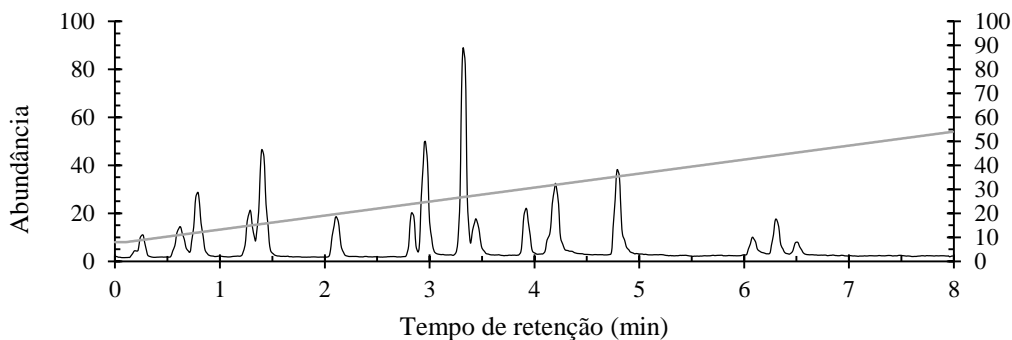
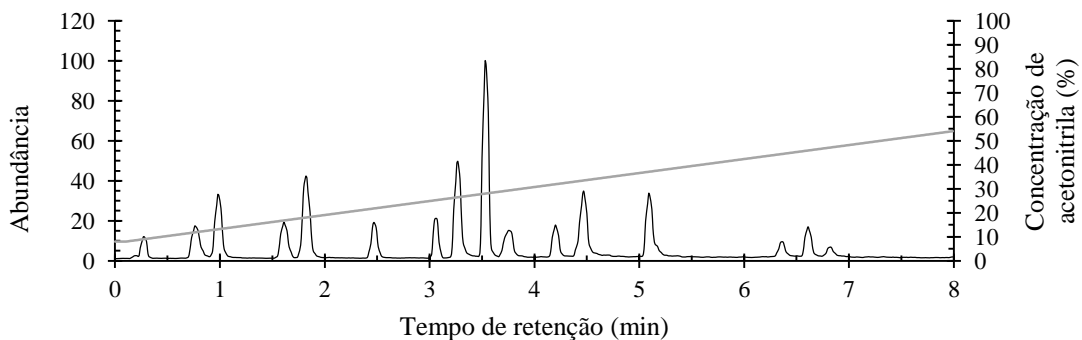
Figura 25 – Otimização da parte final do programa de eluição por gradiente (TIC SRM). Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e a uma temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, $2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,8 \text{ }\mu\text{m}$ (Agilent).



Fonte: Do autor.

Para avaliar uma possível mudança na seletividade da coluna cromatográfica, variou-se a temperatura de separação em $10 \text{ }^\circ\text{C}$ (de 40 para $50 \text{ }^\circ\text{C}$). A nova condição avaliada modificou o tempo de retenção de alguns analitos, porém, não demonstrou possíveis melhoras na resolução entre os picos obtidos (Figura 26). Dessa forma, optou-se por manter a temperatura de separação em $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Uma temperatura menor não foi avaliada por causar aumento da viscosidade da fase móvel e consequente aumento da pressão de operação do sistema cromatográfico.

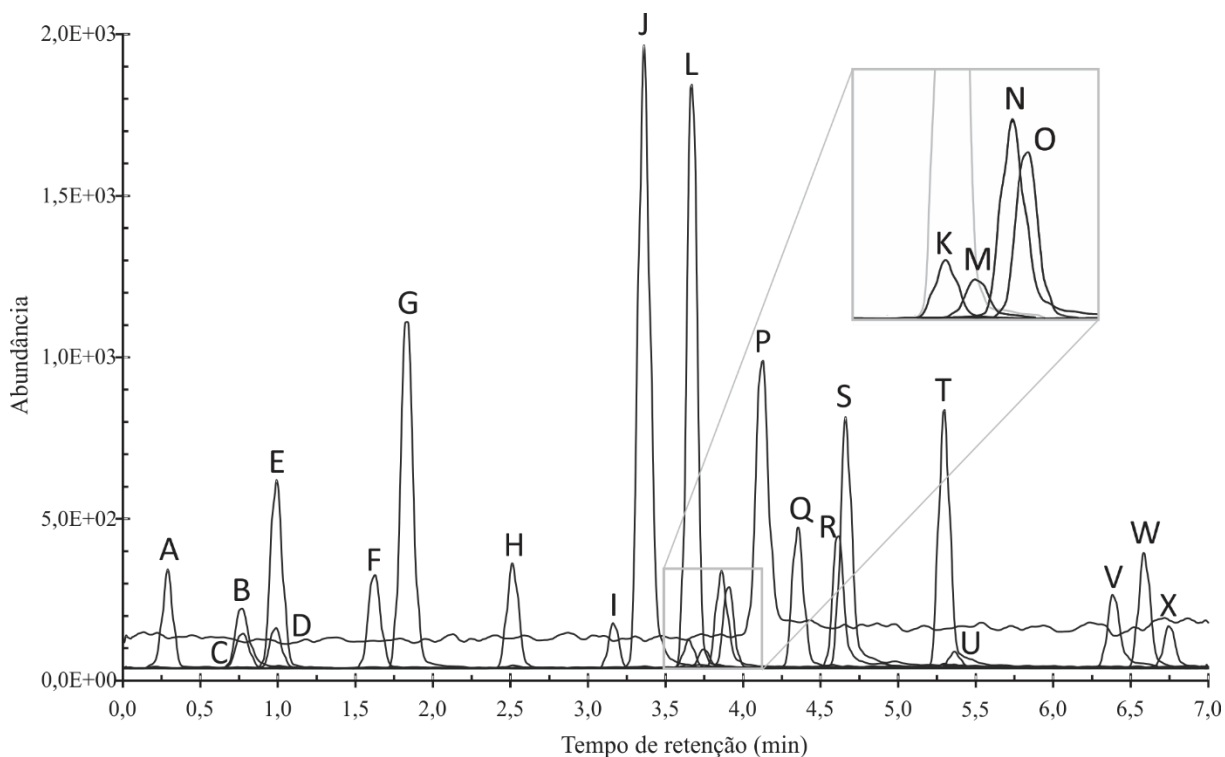
Figura 26 – Otimização da temperatura de separação. De cima para baixo: temperatura de separação igual a 40 e $50 \text{ }^\circ\text{C}$. Fase móvel composta por ácido acético 0,1% (v/v) e acetonitrila, a uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$. Coluna *Zorbax SB-C18, Rapid Resolution HD*, $2,1 \times 50 \text{ mm}$, $1,8 \text{ }\mu\text{m}$ (Agilent).



Fonte: Do autor.

Uma vez definidas as condições iniciais e finais do programa de eluição por gradiente, foram otimizadas as etapas intermediárias da eluição. Para favorecer a separação dos analitos que eluíam mais rapidamente, a inclinação inicial da rampa de gradiente foi diminuída, de forma a aumentar os fatores de retenção destes analitos. Por conseguinte, a inclinação da rampa de gradiente para os últimos analitos do cromatograma foi aumentada, acelerando a eluição de todos os analitos e encurtando o tempo de análise cromatográfica. A melhor condição foi obtida em uma separação de 7,00 min, utilizando um gradiente de separação em etapas lineares no qual a concentração de acetonitrila variou desde 8% até 54%, com uma mudança de inclinação na rampa de gradiente em 3,45 min (o programa completo de eluição por gradiente está descrito na seção 4.3, página 61). Nestas condições, entretanto, coeluições completas ocorreram entre ácido clorogênico/(+)-catequina e ácido vanílico/ácido cafeico, não ocorrendo interferências isobáricas nestes casos. A Figura 27 mostra um cromatograma obtido após a otimização da separação dos 24 analitos estudados.

Figura 27 – Cromatograma otimizado obtido da análise dos 24 analitos abordados por este estudo no modo de monitoramento de reações selecionadas (EIC SRM). (A) ácido gálico, (B) ácido clorogênico, (C) (+)-catequina, (D) ácido vanílico, (E) ácido cafeico, (F) 6-hidroxicumarina, (G) ácido *p*-cumárico, (H) ácido ferúlico, (I) rutina, (J) 4-hidroxicumarina, (K) ácido rosmarínico, (L) quercitrina, (M) miricetina, (N) fisetina, (O) resveratrol, (P) 3-acetilcumarina, (Q) ácido *trans*-cinâmico, (R) quercetina, (S) luteolina, (T) apigenina, (U) canferol, (V) 3,6-dihidroxi-flavona, (W) crisina e (X) galangina.



Fonte: Do autor.

Por fim, foi determinado experimentalmente que o tempo de equilíbrio da coluna cromatográfica necessário para realização de análises em sequência era de 4 min. Tal valor foi definido com base no restabelecimento integral da pressão inicial de operação do sistema.

5.4 OTIMIZAÇÃO DAS CONDIÇÕES DE INJEÇÃO, IONIZAÇÃO POR ELETROSPRAY E DE DETECÇÃO

Após o método de separação ter sido desenvolvido demandando esforços apenas às otimizações de eficiência cromatográfica, retenção e separação, foi realizada a otimização de determinados parâmetros experimentais que não afetam diretamente o resultado da separação cromatográfica. Dentre tais parâmetros podemos citar o volume de injeção, as condições de operação da fonte de ionização e a velocidade de leitura do espectrômetro de massas.

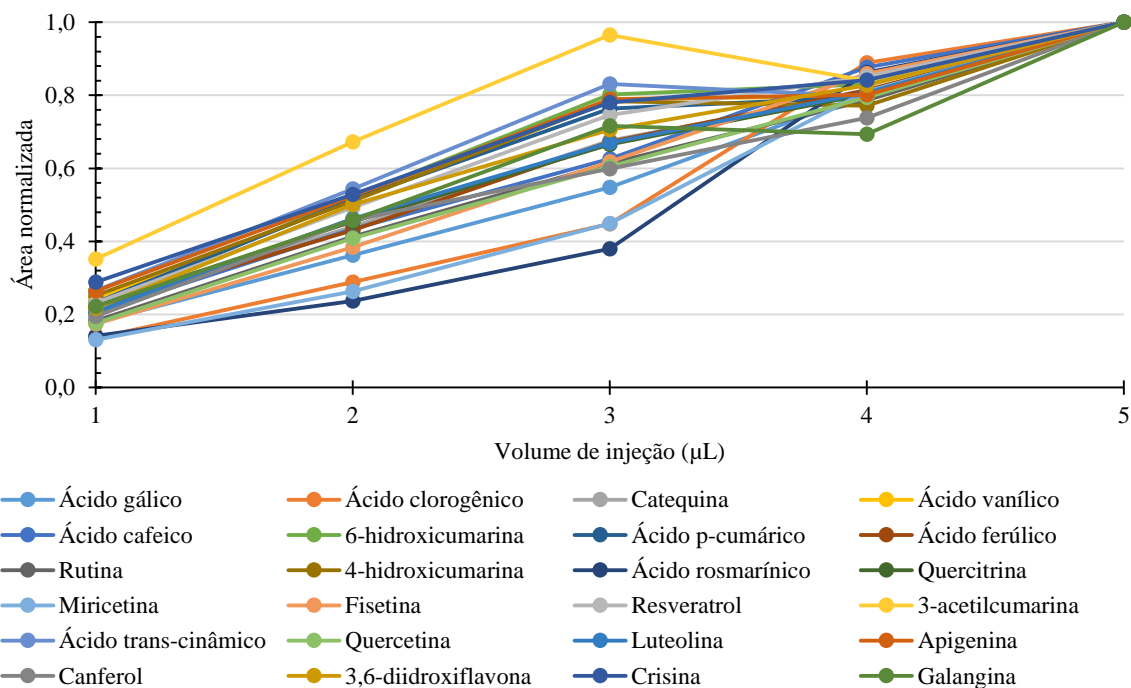
Embora conceitualmente a fonte de ionização por eletrospray seja uma fonte sensível à concentração e não à massa, otimizou-se o volume de injeção. Foram avaliados volumes de 1 a 5 μL , variando-se de 1 em 1 μL . Como pode ser observado na Figura 28, ocorre um aumento da área dos picos cromatográficos à medida em que se aumenta o volume de injeção, sendo que foi considerado como ótimo o volume de 5 μL face à sua maior resposta comparado aos outros valores avaliados. Volumes maiores que 5 μL não foram testados por se tratarem de volumes que podem começar a trazer prejuízos quanto à forma dos picos, devido à sobrecarga da coluna cromatográfica, conforme já abordado na seção 2.5.

Os parâmetros da fonte de ionização também foram otimizados. Dado que a eficiência da ionização é fortemente afetada pela composição da fase móvel, é fundamental que a otimização dos parâmetros operacionais da fonte de ionização seja realizada após o método de separação estar otimizado. Quando se utiliza uma eluição por gradiente tal cuidado torna-se ainda mais crítico, visto que a composição da fase móvel se altera ao longo do tempo.

Embora usualmente a maioria dos parâmetros da fonte de ionização por eletrospray seja mantido de forma constante ao longo de toda análise cromatográfica, é importantíssimo fazer uma análise de otimização nas condições reais de separação e, ademais, englobando todos os analitos. A otimização, então, deve ser entendida como uma situação de compromisso entre todos os analitos, e não necessariamente como a melhor condição para cada um deles. As figuras a seguir mostram o comportamento dos 24 analitos em solução analítica frente à variação da vazão e temperatura do gás de secagem, da pressão do nebulizador e da voltagem do capilar de eletrospray. As condições finais e otimizadas foram descritas na seção 4.3 (vazão

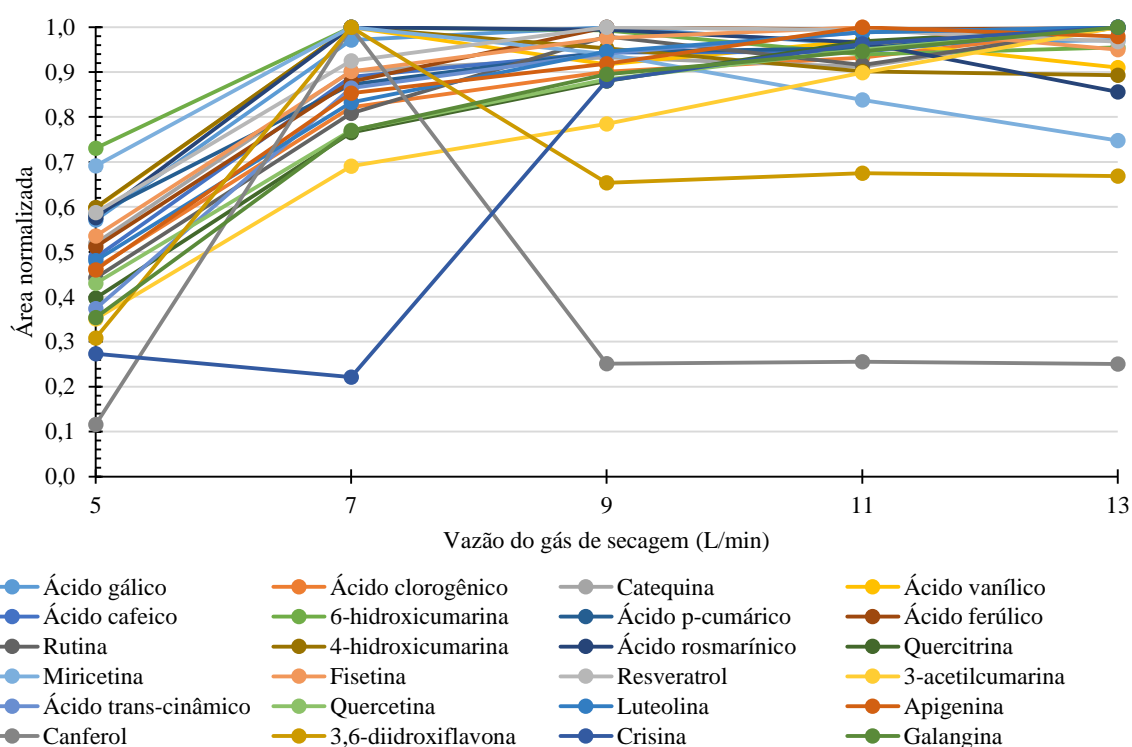
e temperatura do gás de secagem igual a 11 L/min e 250 °C; pressão do nebulizador igual a 30 psi e voltagem do capilar igual a $\pm 2,4$ kV).

Figura 28 – Otimização do volume de injeção.



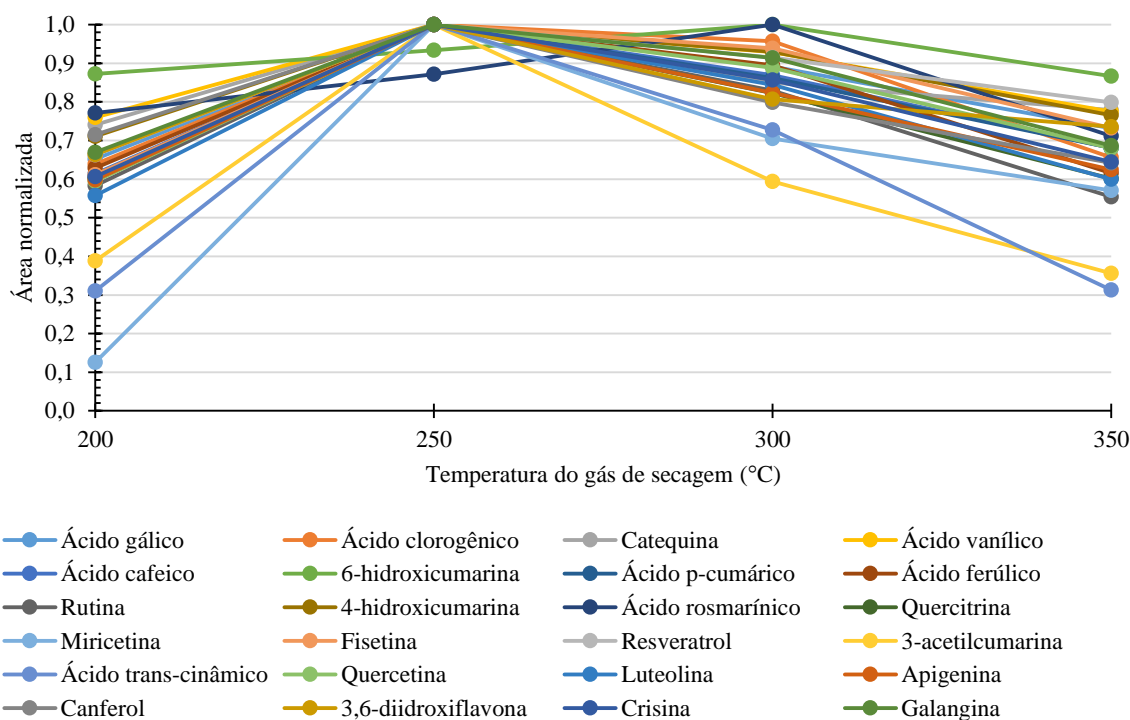
Fonte: Do autor.

Figura 29 – Otimização da vazão do gás de secagem da fonte de eletrospray.



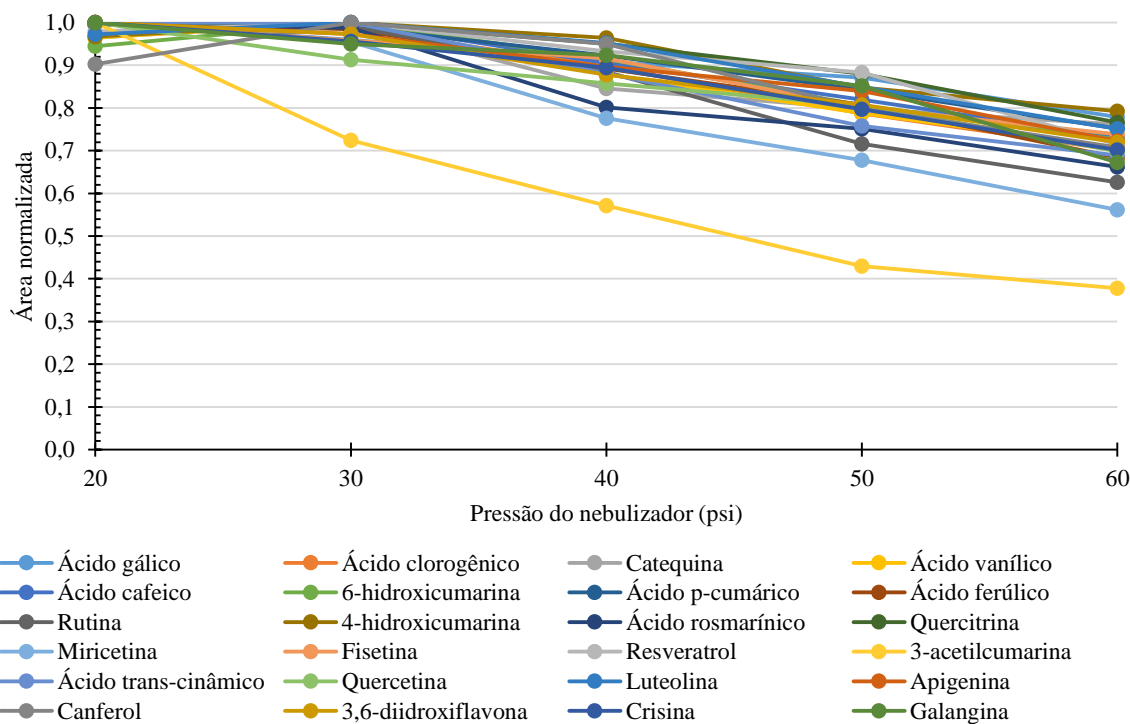
Fonte: Do autor.

Figura 30 – Otimização da temperatura do gás de secagem da fonte de eletrospray.



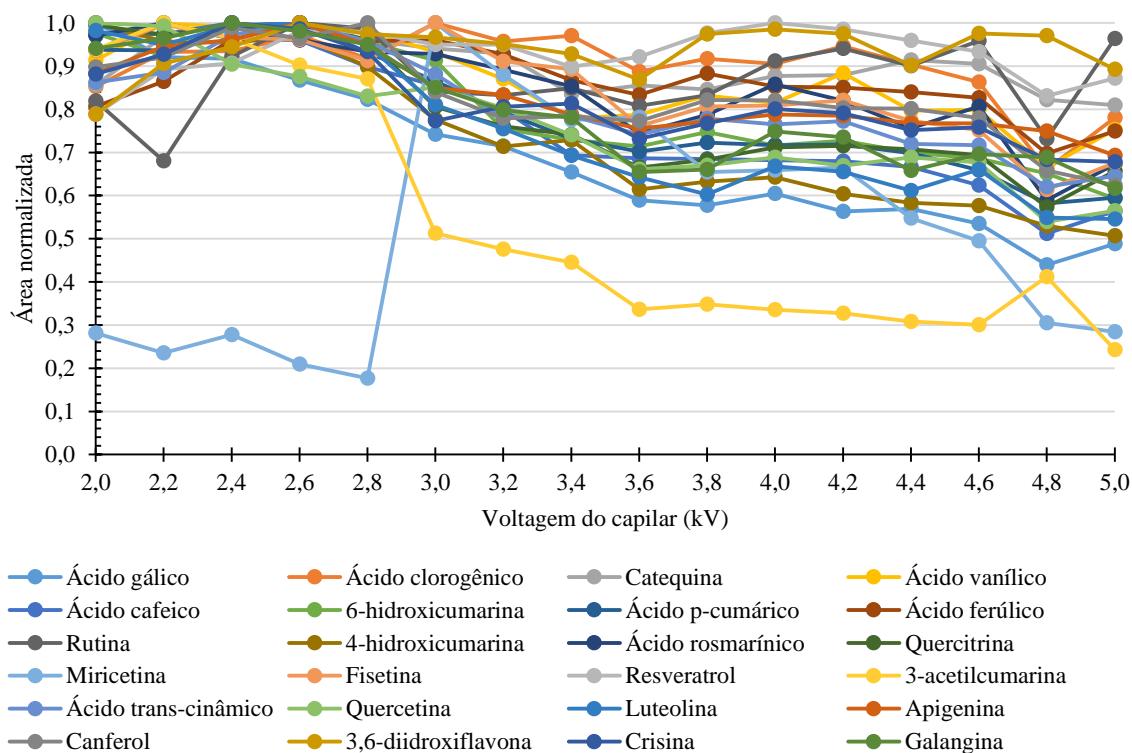
Fonte: Do autor.

Figura 31 – Otimização da pressão do nebulizador da fonte de eletrospray.



Fonte: Do autor.

Figura 32 – Otimização da voltagem do capilar da fonte de eletrospray.

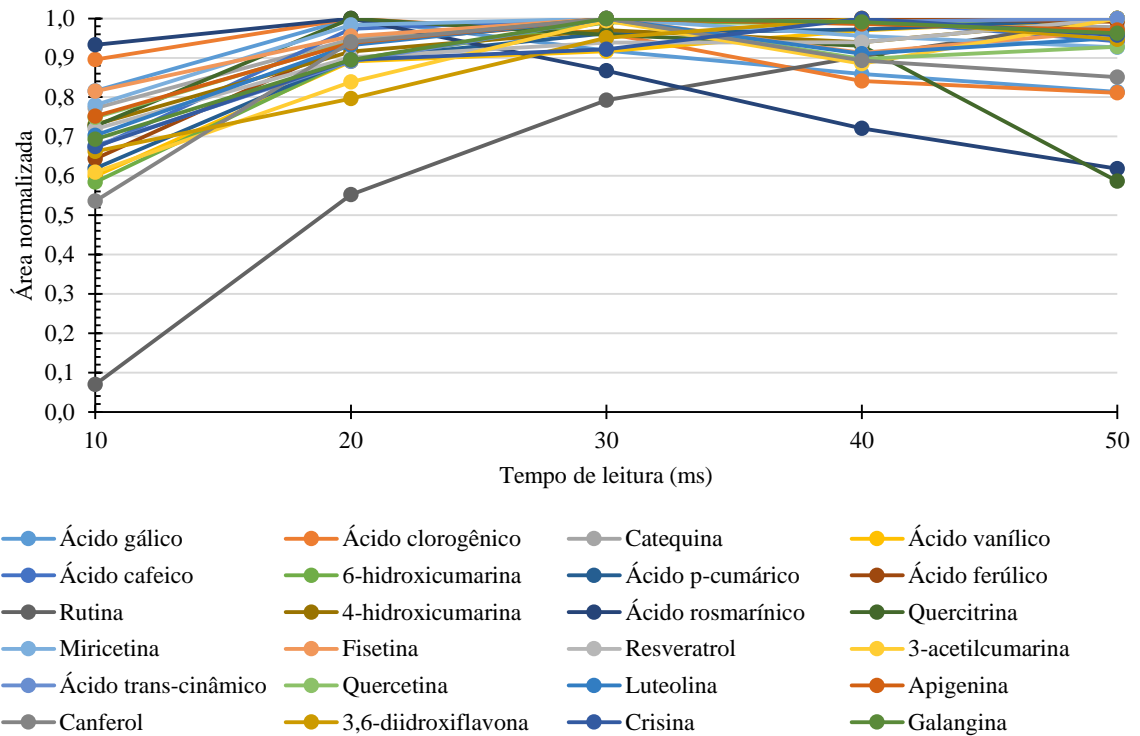


Fonte: Do autor.

A velocidade de leitura do espectrômetro de massas também é um importante fator a ser otimizado, principalmente quando um número grande de transições é monitorado simultaneamente. Uma vez que seja dedicado um tempo de leitura muito grande para cada transição de massas, certos picos cromatográficos extremamente finos poderiam passar despercebidos pelo espectrômetro de massas até que o ciclo de leitura de transições fosse finalizado. Nesse âmbito, é importante confirmar que cada pico cromatográfico possua entre 8 e 12 pontos de leitura, como mínimo. Dessa forma, se garante um pico bem definido e sem perda de informações.

Por outro lado, se o tempo de leitura dedicado à cada transição for demasiadamente pequeno, a intensidade final dos picos cromatográficos poderá ser drasticamente reduzida, visto que apenas uma parcela dos íons gerados é separada pelos analisadores e finalmente detectada. A Figura 33 mostra a otimização do tempo de leitura para todos os 24 analitos estudados. Assumiu-se como ótimo o tempo de leitura igual a 20 ms. Embora a área dos picos fosse relativamente superior com um tempo de leitura de 30 ms, os picos obtidos nessa condição possuíam no máximo 9 pontos de leitura cada.

Figura 33 – Otimização do tempo de leitura de cada transição de massa pelo espectrômetro de massas.



Fonte: Do autor.

5.5 SUPRESSÃO IÔNICA POR COELUIÇÃO DE ANALITOS

Em métodos de separação que abrangem classes distintas de analitos em uma mesma análise, a resolução de possíveis coeluições é condicionada à escolha de parâmetros experimentais otimizados que, muitas vezes, são eleitos em detrimento a uma ou a outra classe de analitos. Cria-se uma situação de perda e ganho que deve ser rigorosamente administrada, visto que como consequência pode-se ter uma coeluição parcial ou total entre alguns analitos. Entretanto, em métodos que utilizam a cromatografia de líquidos acoplada à espectrometria de massas este fato pode não se caracterizar como um problema grave, já que a espectrometria de massas confere um alto grau de seletividade às análises, podendo resolver os casos de coeluição.

Embora a espectrometria de massas confira uma maior seletividade às análises, a coeluição em análises por LC-MS pode apresentar um comportamento totalmente anômalo quando comparado a outros métodos de detecção. Um exemplo pode ser facilmente traçado para uma análise levada a cabo por HPLC/UV-Vis, na qual a área dos picos coeluídos é muito próxima à soma das áreas destes mesmos picos analisados isoladamente, para um mesmo comprimento de onda. No caso de análises por LC-MS, as áreas dos picos obtidos

individualmente podem não ser iguais às áreas destes picos quando determinadas em uma situação de coeluição. Este fenômeno é conhecido como efeito de supressão iônica de analitos coeluídos (REMANE et al., 2010).

A Tabela 8 apresenta os resultados do estudo de supressão ou enriquecimento iônicos feitos neste trabalho para os analitos que coeluem total ou parcialmente no método de separação desenvolvido. É possível observar que, salvo uma exceção, em todos os casos em que ocorreram coeluição os sinais foram influenciados por um efeito de enriquecimento iônico. Em outras palavras, em quase nenhum dos casos estudados a coeluição afeta a detectabilidade dos analitos, pelo contrário, alguns deles têm seus sinais aumentados na ordem de 90%.

Tabela 8 – Supressão ou enriquecimento iônicos medidos em pares de analitos coeluídos. O desvio padrão relativo (n=3, %) é dado entre parênteses.

Par de analitos coeluídos		Analito A influenciado pelo B	Analito B influenciado pelo A
<i>Analito A</i>	<i>Analito B</i>	Média (%)	Média (%)
Ácido clorogênico	(+)-catequina	97,5 (22)	-2,5 (26)
Ácido vanílico	Ácido cafeico	3,8 (50)	7,0 (37)
Ácido rosmarínico	Quercitrina	40,4 (16)	18,3 (5)
Quercitrina	Miricetina	18,3 (5)	31,9 (36)
Fisetina	Resveratrol	59,2 (21)	6,1 (13)
Quercetina	Luteolina	56,0 (4)	20,9 (2)
Apigenina	Canferol	16,6 (1)	49,9 (2)
Crisina	Galangina	92,4 (1)	45,7 (4)

Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Sabe-se que tal fenômeno é fruto de efeitos sinérgicos que atuam sobre o mecanismo de ionização, tais como alterações na viscosidade e tensão superficial das gotas, além de variações do eluato quanto à sua afinidade por cargas elétricas (GOSETTI et al., 2010). Tendo em vista que este estudo de supressão iônica causada pela coeluição de analitos foi realizado usando soluções analíticas, foi, então, eliminada a influência de qualquer componente de matriz nos resultados obtidos. Dessa forma, a coeluição de dois ou mais analitos com caráter ácido pode favorecer um maior acúmulo de cargas negativas na extremidade do capilar, região também denominada como cone de Taylor. Este maior acúmulo de cargas também ocorre nas gotas geradas durante a ionização por eletrospray, as quais são constituídas por acetonitrila, água, ácido acético e os analitos coeluídos. À medida em que tais gotas secam, as forças repulsivas entre os ânions superam a tensão superficial das gotas, levando ao chamado limite de Rayleigh. Com um maior número de cargas nas gotas, o limite de Rayleigh pode ser alcançado mais rapidamente, aumentando a eficiência global da ionização.

Porém, em estudos de quantificação utilizando padrão interno, tal efeito de supressão por coeluição de analitos pode ser bastante prejudicial. Se a influência dos analitos coeluídos sobre as áreas de seus próprios sinais for variável conforme seus níveis de concentração na amostra, alterações na razão entre as áreas de analito/padrão interno serão percebidas, podendo resultar em falsos positivos ou falsos negativos na quantificação.

5.6 DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA PREPARO DE AMOSTRAS POR EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

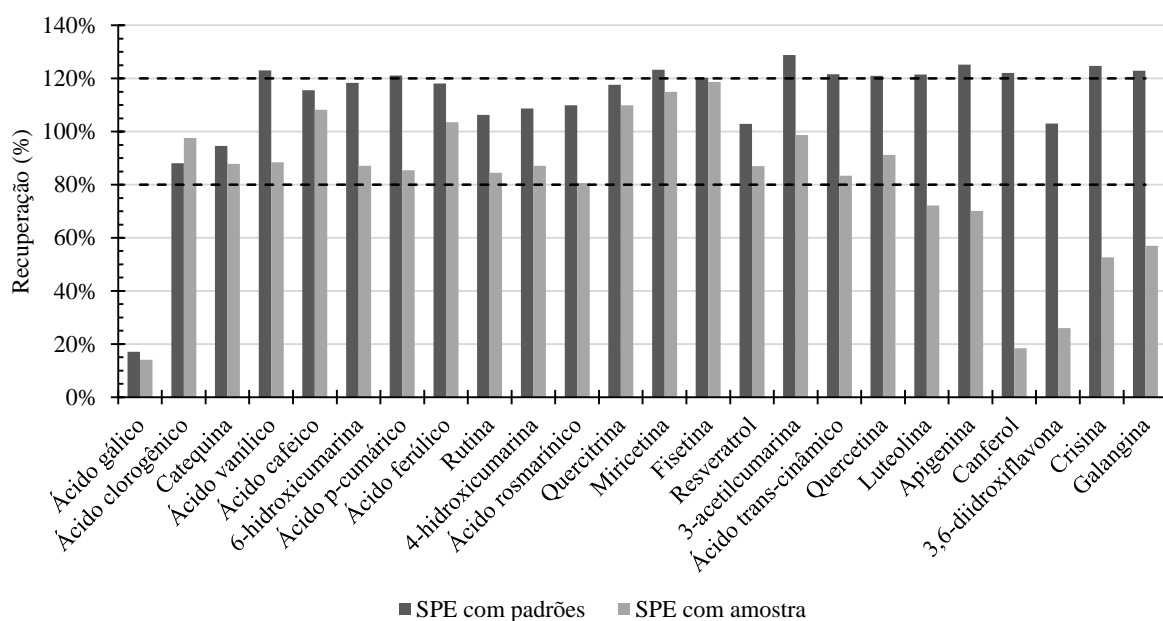
Todas as amostras de plantas utilizadas neste trabalho foram pré-tratadas por extração em fase sólida, com a finalidade única de redução da influência de espécies interferentes na ionização de analitos e de proteção da coluna cromatográfica contra interações irreversíveis. O método utilizado descrito na seção 4.2 foi adaptado do método previamente desenvolvido por LIMA (2013).

Do método original, o ácido clorídrico utilizado para acidificar os solventes utilizados foi substituído por ácido acético a uma concentração final igual a 0,1% (v/v), visando a compatibilidade com o sistema de espectrometria de massas. A etapa de lavagem com água acidificada foi mantida, a fim de evitar com que os analitos fossem eluídos devido à maior força eluotrópica de misturas com solventes orgânicos. Também foi mantido o metanol como solvente de eluição na SPE, uma vez que o método cromatográfico adotado para análise das amostras de plantas utiliza acetonitrila como fase móvel final do gradiente de eluição. Sendo o metanol de força eluotrópica menor que a acetonitrila, evita-se que sejam eluídos compostos retidos no cartucho de SPE que poderiam ficar posteriormente retidos de maneira irreversível na coluna cromatográfica.

O procedimento de extração em fase sólida então modificado foi avaliado quanto à recuperação dos analitos através de duas diferentes abordagens. Em um primeiro momento foi analisada uma solução analítica dos 24 analitos que compreendem este trabalho sem pré-tratamento com SPE, sendo que as áreas dos picos cromatográficos resultantes foram comparadas com as áreas obtidas na análise da mesma solução analítica após a aplicação do método de extração em fase sólida desenvolvido. Em uma segunda etapa, a recuperação do método de SPE foi avaliada por meio da análise de um extrato de *Cecropia obtusa*, o qual sofreu pré-tratamento com SPE e posteriormente foi fortificado com uma solução analítica dos 24 analitos. As áreas dos picos cromatográficos obtidos com a análise cromatográfica de tal

amostra foram comparadas com as áreas obtidas da análise do mesmo extrato fortificado com os analitos previamente ao pré-tratamento com SPE. Os resultados destes experimentos são mostrados na Figura 34.

Figura 34 – Avaliação das recuperações de analitos obtidas pelo procedimento de extração em fase sólida.



Fonte: Do autor.

Da análise da Figura 34 é possível observar que para a maioria dos analitos foram obtidas recuperações satisfatórias, variando entre 80 e 120%. Para o analito ácido gálico uma recuperação extremamente baixa foi obtida tanto para soluções analíticas como para a análise da amostra real. Tal fato é explicado devido à alta polaridade deste analito e à sua consequente baixa retenção no sorvente da SPE composto por C18. Também foram obtidas baixas recuperações para os últimos analitos relatados no gráfico, quando feita a determinação em amostra real. Estes analitos são também os últimos a serem eluídos da coluna cromatográfica utilizando o método de separação desenvolvido. Entende-se, portanto, que outros componentes endógenos à matriz avaliada retardaram a eluição destes últimos analitos do cartucho de SPE quando comparado à determinação utilizando apenas soluções analíticas. Entretanto, por se tratar de um método de análise de compostos de múltiplas classes, assumiu-se uma situação de compromisso entre um volume de eluição adequado que evitasse com que interferentes indesejados de menor polaridade fossem também eluídos.

5.7 SUPRESSÃO IÔNICA PELO EFEITO DE MATRIZ

A causa mais frequentemente avaliada de supressão iônica em análises por LC-MS é a oriunda de efeitos causados por componentes endógenos das matrizes, sendo esta chamada de supressão iônica pelo efeito de matriz. Sua causa está centrada principalmente no fato de que alguns componentes da matriz possuem maior ou menor afinidade por cargas durante a ionização, podendo interferir no mecanismo de ionização dos analitos pela fonte ESI.

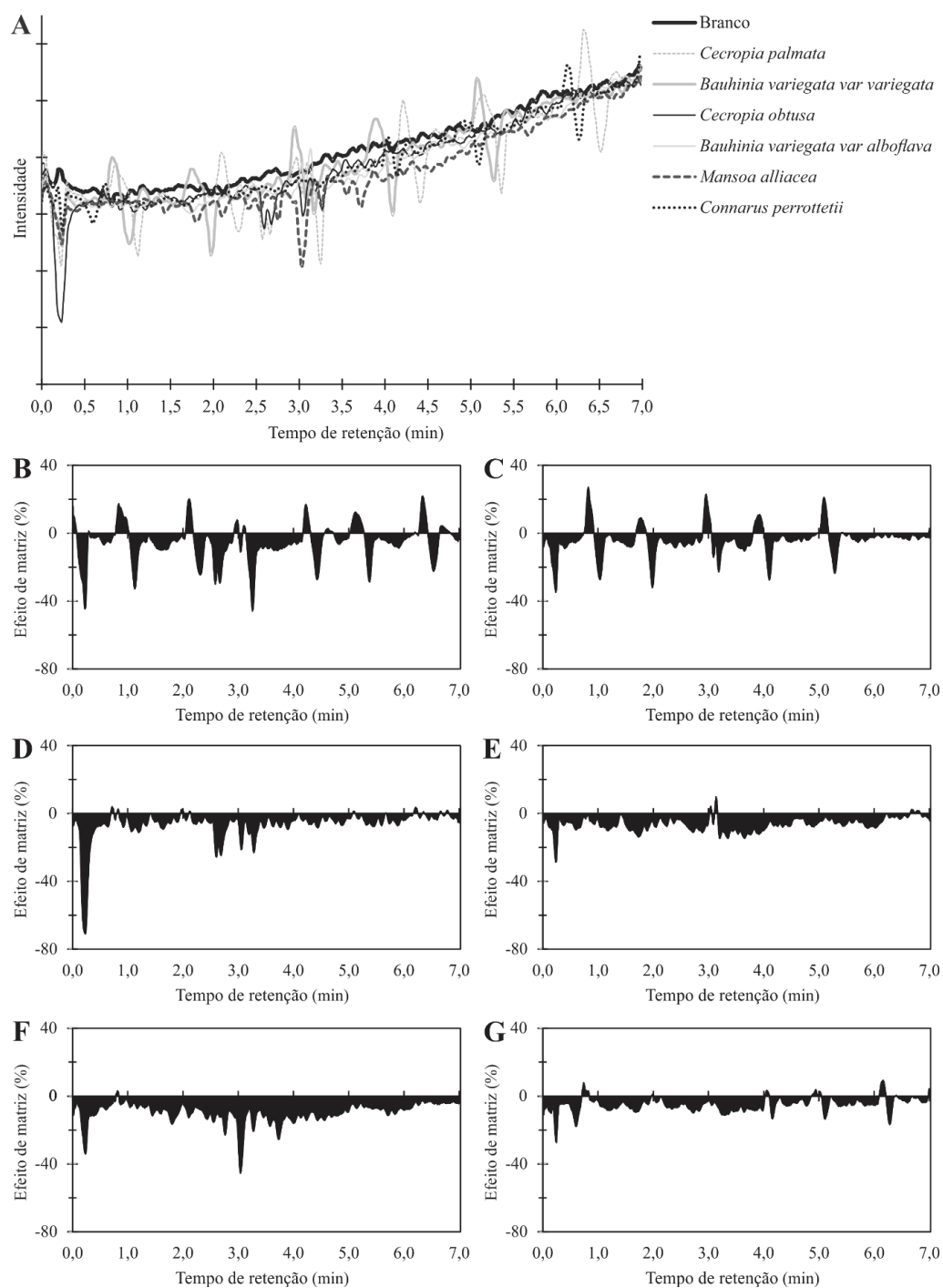
Perfis da supressão iônica nos extratos tratados com SPE das seis plantas em estudo foram registrados a partir dos cromatogramas de íon totais obtidos conforme descrito no item 4.4.6. A análise do comportamento de tais perfis em cada uma das matrizes, e sua comparação com a referência de fase móvel, permite fazer uma ótima avaliação qualitativa dos efeitos de supressão iônica ao longo da análise cromatográfica. Por exemplo, é possível observar pela Figura 35 que não há nenhuma grande zona de supressão iônica identificada nos cromatogramas, para todas as matrizes avaliadas, de forma que comprometa o método como um todo. Os casos existentes observados são de supressões pontuais, muito provavelmente causadas por compostos específicos eluídos no decorrer da análise cromatográfica dos extratos de plantas.

É importante salientar que na análise qualitativa, a presença prévia de analitos nas matrizes pode originar um falso efeito de enriquecimento iônico, como observado principalmente na Figura 35 B e na Figura 35 C. Quando detectados, tais comportamentos devem ser desconsiderados desta análise, uma vez que são inconclusivos visto a impossibilidade de se encontrar amostras brancas das espécies estudadas para a determinação de compostos fenólicos.

Entretanto, na análise quantitativa (Figura 36) o conteúdo prévio de analitos nas matrizes é incluído no cálculo da supressão por efeito de matriz. Desta forma, é possível notar a influência deste fenômeno para cada analito em todas as plantas medicinais avaliadas. São observadas supressões iônicas tão intensas quanto 60% bem como efeitos de enriquecimento iônico maiores que 70%. De forma generalizada, observou-se que a maior parte dos analitos apresenta comportamento semelhante entre as diferentes matrizes quanto à supressão iônica. Exceções a tal afirmação podem ser observadas para ácido gálico, ácido clorogênico, quercitrina, miricetina e quercetina, os quais demonstraram comportamentos totalmente diferentes quando comparados entre as matrizes determinadas. Ademais, para duas plantas de mesma espécie, porém de diferentes variedades, observou-se uma sintonia entre o

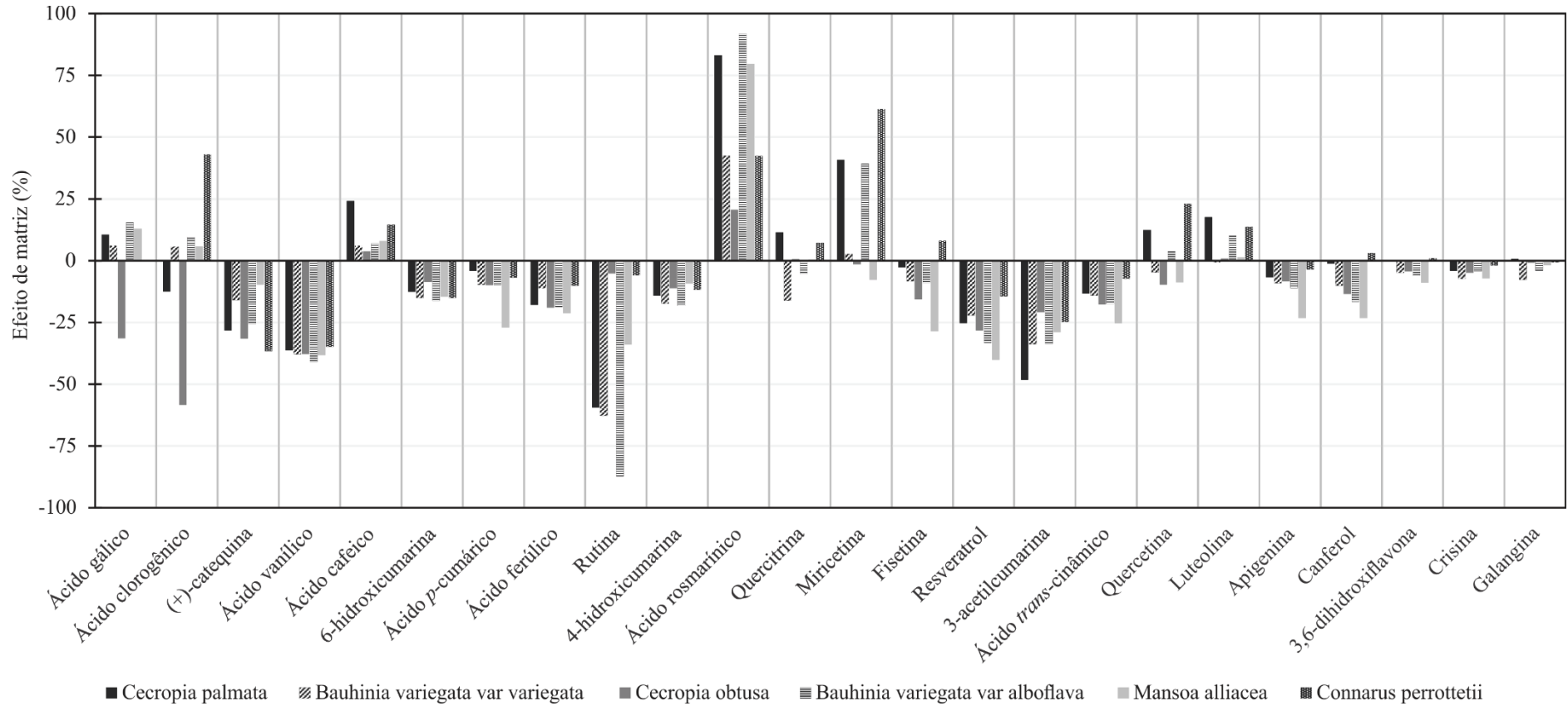
comportamento dos analitos nas duas matrizes quanto à supressão iônica. O mesmo não se pode afirmar com tamanha precisão para as duas plantas de mesmo gênero abrangidas pelo estudo.

Figura 35 – (A) Perfis de supressão iônica qualitativa obtidos por infusão dos compostos fenólicos depois da injeção de fase móvel (branco) e depois da injeção de extratos de plantas pré-tratados e não-fortificados. (B-G) Perfis do efeito de matriz calculado a partir dos perfis de infusão de cada matriz com relação ao branco. (B) *Cecropia palmata*, (C) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (D) *Cecropia obtusa*, (E) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (F) *Mansoa alliacea* e (G) *Connarus perrottetii*.



Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Figura 36 – Resultados quantitativos para supressão ou enriquecimento iônicos para todos os analitos em todas as matrizes avaliadas.



Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

É importante ressaltar que os efeitos de supressão e enriquecimento iônicos demonstrados pela Figura 36 foram observados após o tratamento das amostras com SPE, a qual é um dos métodos de *clean-up* mais recomendados para eliminação de interferentes presentes em matrizes para posterior análise por métodos de separação (GOSETTI et al., 2010; FUREY et al., 2013).

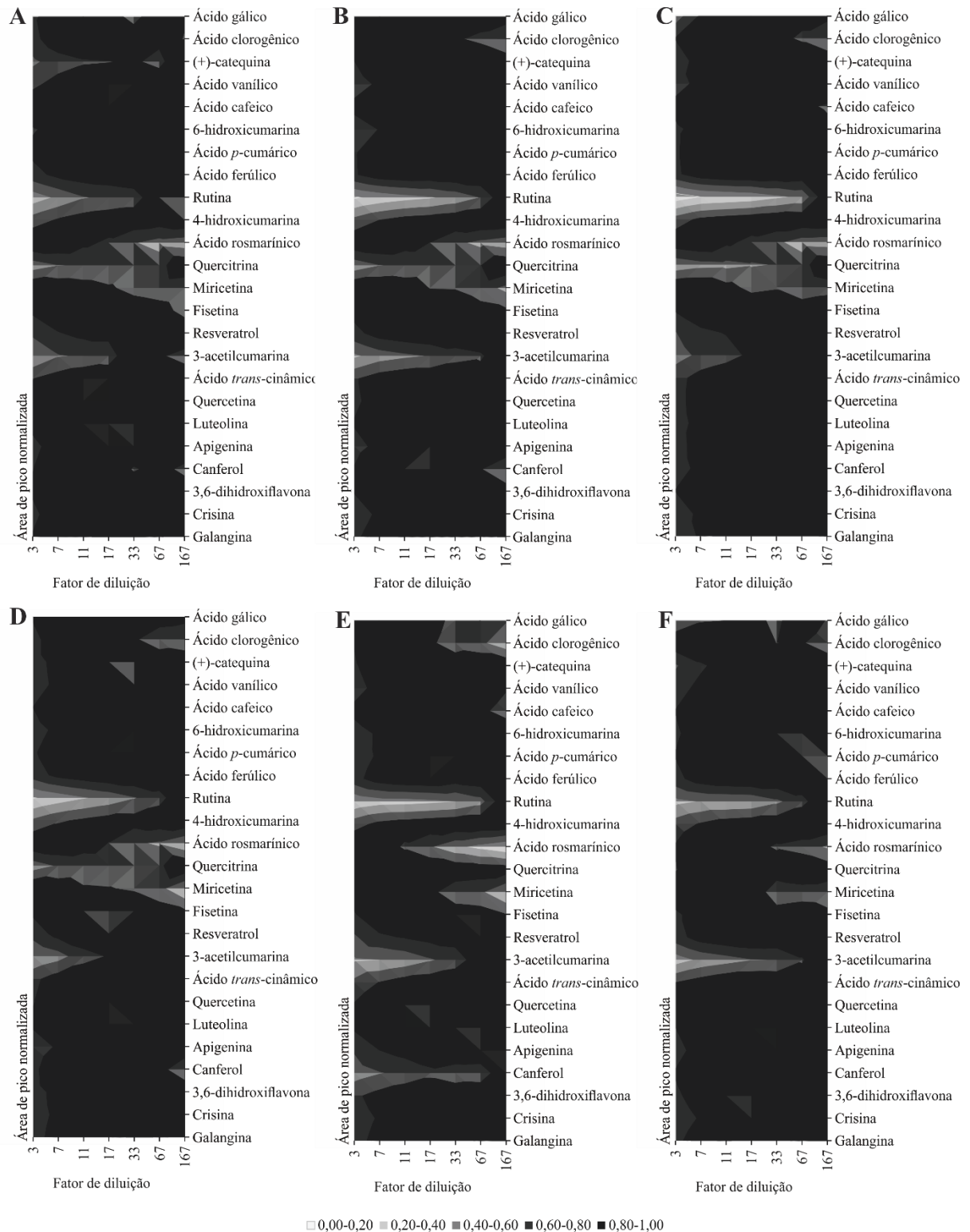
5.8 SUPRESSÃO IÔNICA POR COMPETIÇÃO DURANTE A IONIZAÇÃO

A competição é outro fenômeno muito bem conhecido que ocorre durante o mecanismo de ionização por ESI. Estudos indicam que uma concentração de íons próxima a 10^{-5} M constitua um limite superior para que uma ionização por eletrospray seja efetiva (KEBARLE e TANG, 1993). Para que ocorra supressão iônica advinda deste fenômeno, basta que as matrizes possuam compostos endógenos presentes em altas concentrações e que sejam facilmente ionizados por ESI. Desta maneira, uma vez que grande número de tais compostos coelua na análise cromatográfica por LC-MS, rapidamente ocorrerá um evento de supressão iônica (FUREY et al., 2013).

A fim de avaliar a ocorrência de supressão iônica por competição nas matrizes analisadas pelo método de separação desenvolvido, realizou-se um estudo utilizando os extratos tratados por SPE adicionados de padrões dos compostos fenólicos. Vários fatores de diluição destes extratos foram analisados por LC-MS. Uma vez que não haja ocorrência de supressão iônica por competição, as áreas dos picos cromatográficos multiplicadas pelos respectivos fatores de diluição fornecem um valor constante, considerando os erros experimentais (MIRNAGHI et al., 2013). Adicionalmente, considerando que o número de íons produzidos por unidade de tempo é aproximadamente constante, a diluição dos extratos proporciona uma diminuição da competição por cargas elétricas durante a ionização, e uma conseqüente redução dos efeitos de supressão iônica causados por tal mecanismo.

A Figura 37 mostra os resultados observados para este estudo, onde as diferentes regiões do gráfico mostram as áreas dos picos cromatográficos normalizadas e multiplicadas pelo fator de diluição. Nenhum efeito de supressão por competição é observado nas regiões pretas dos gráficos. Por sua vez, as regiões mais claras podem indicar tais efeitos.

Figura 37 – Resultados de supressão iônica por competição. O eixo horizontal representa o fator de diluição do extrato e o eixo vertical representa os analitos. A superfície representa a área dos picos normalizada e multiplicada pelo fator de diluição, conforme legenda. As matrizes avaliadas foram (A) *Cecropia palmata*, (B) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (C) *Cecropia obtusa*, (D) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (E) *Mansoa alliacea* e (F) *Connarus perrottetii*.



Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Se a área clara do gráfico se origina de um fator de diluição menor em direção a um maior, observa-se a ocorrência do fenômeno de supressão iônica por competição. Em outras palavras, à medida em que se aplicam maiores diluições, as respostas dos analitos acabam sendo relativamente mais intensas do que quando aplicadas diluições menores. Isto é o evidenciado para rutina e 3-acetilcumarina em todas as matrizes analisadas. Tal efeito também pode ser observado para quercitrina, como evidenciado na Figura 37 A, B, C e D, e para (+)-catequina (Figura 37A) e canferol (Figura 37E). As diferenças de comportamento observadas principalmente na Figura 37 E e F, frente às outras figuras, indicam uma possível forte relação entre analitos e matrizes no que diz respeito à supressão iônica diferencial. Por outro lado, se uma região clara se origina de um fator de diluição maior em direção a um fator de diluição menor, isto não significa consequências de uma competição iônica, e sim de uma proximidade da concentração dos analitos aos respectivos limites de detecção. Este comportamento é observado em todas as matrizes para os analitos ácido clorogênico, ácido rosmarínico e miricetina.

Da análise dos gráficos também é possível inferir um fator de diluição para o qual pode-se minimizar os efeitos de supressão iônica por competição sem que se comprometa a detecção de compostos fenólicos. Neste estudo, então, como sendo o ideal para otimizar os efeitos de supressão observados, passou-se a assumir um fator de diluição para os extratos obtidos por SPE igual a 10 vezes.

5.9 SUPRESSÃO IÔNICA DIFERENCIAL

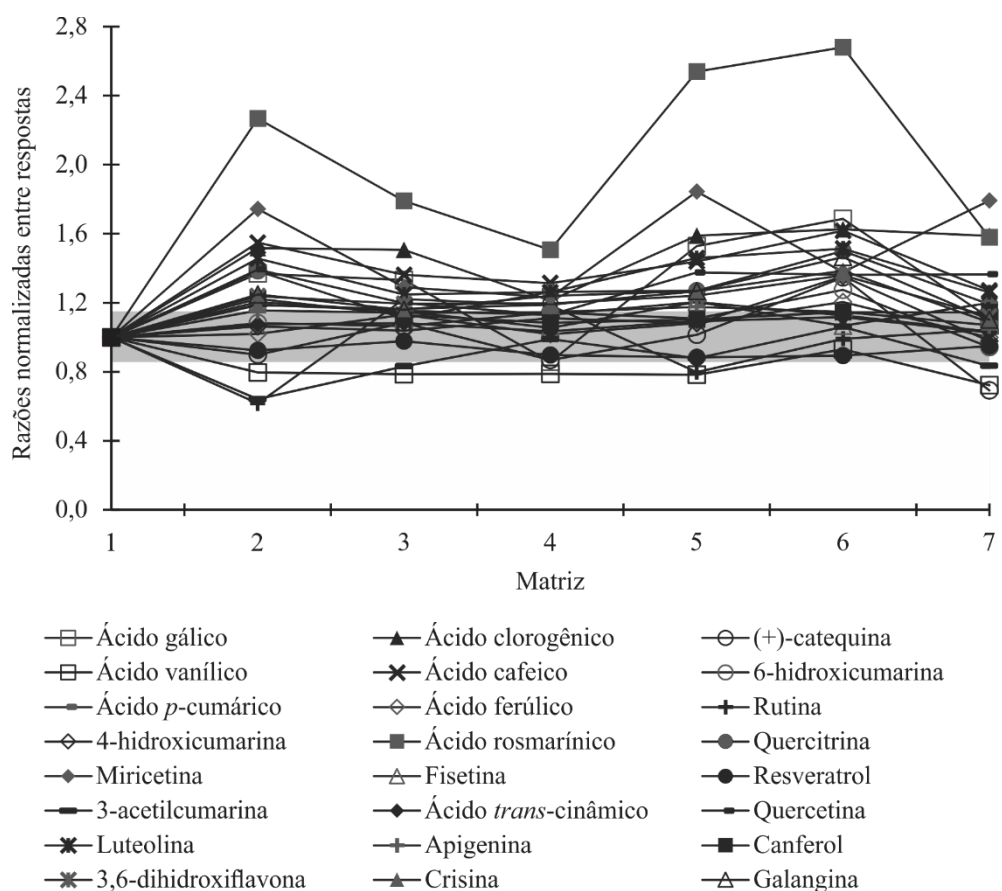
O uso de padrões internos nas análises por LC-MS é bastante difundido. Eles são tidos como uma das principais formas de compensação dos efeitos de supressão iônica, já que respondem à ionização de forma muito semelhante aos analitos. Entretanto, dependendo da região do cromatograma em que tais padrões internos são eluídos, estes podem coeluir com componentes da matriz diferentes daqueles que coeluem com os analitos. Esta situação gera diferentes condições para a ionização de padrões internos e de analitos em uma mesma análise cromatográfica, podendo causar o que se chama de supressão diferencial.

A fim de avaliar o efeito diferencial existente nas espécies de plantas estudadas por este trabalho, foi realizado um ensaio específico utilizando 2-naftol como padrão interno para a análise de compostos fenólicos em plantas, o qual já teve seu uso relatado na literatura (ESMAEILI et al., 2011). Uma vez não havendo supressão diferencial, a razão entre as áreas

dos picos de analitos e padrão interno deve ser aproximadamente a mesma quando comparadas análises em matrizes e em soluções controle.

Como pode ser observado na Figura 38, o padrão interno estudado apresentou comportamento variável em cada matriz analisada. Para ácido gálico, ácido cafeico, ácido rosmarínico, miricetina, ácido clorogênico, luteolina e quercetina a razão entre as áreas analito/padrão interno é no mínimo 30% maior quando medida nas matrizes, se comparada a medidas feitas em uma solução analítica em MeOH/CH₃COOH 0,2% (v/v). A situação inversa é observada para o ácido vanílico, onde na análise das matrizes a razão entre as áreas de analito e padrão interno chega a ser 28% menor do que em soluções analíticas.

Figura 38 – Resultados de supressão iônica diferencial para 2-naftol como um potencial padrão interno. As razões entre as áreas dos picos dos analitos e do padrão interno foram normalizadas com relação a uma solução analítica dos analitos em MeOH/CH₃COOH 0,2% (1:1, v/v), a qual é representada por (1). A zona cinza indica o intervalo de $\pm 15\%$ do valor obtido para a solução controle. As matrizes avaliadas foram (2) *Cecropia palmata*, (3) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (4) *Cecropia obtusa*, (5) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (6) *Mansoa alliacea* e (7) *Conarus perrottetii*.



Fonte: FACCIN et al. (2016). Reprodução autorizada pela editora Elsevier através da licença número 3905491320418.

Em estudos de quantificação sujeitos aos efeitos da supressão diferencial, a calibração com padrão interno pode trazer severos erros. Nos casos em que a razão entre os sinais de analitos e padrão interno aumenta em determinadas matrizes, resultados falsos positivos podem distorcer a realidade e levar a conclusões totalmente equivocadas (ANTIGNAC et al., 2005). A variabilidade de comportamento observada entre matrizes semelhantes (plantas de mesmo gênero ou até mesmo de mesma espécie) é outro ponto de atenção interessante, expandindo o argumento de ISMAIEL et al. (2008) também para a análise de extratos de plantas. Segundo ele, estudos de supressão iônica em uma única fonte biológica podem não ser suficientes para assegurar a validade do método em várias fontes de matrizes muito semelhantes.

A extensão da supressão diferencial pode ser reduzida diminuindo-se o tempo de análise cromatográfica, proporcionando com que o padrão interno coelua com os analitos, como defende MORTIER et al. (2004). Ainda segundo ISMAIEL et al. (2008), foi observada uma correção das variações causadas pela supressão diferencial através do uso de padrões internos deuterados com estruturas moleculares idênticas a de analitos. Porém, estudos posteriores realizados por BERG e STRAND (2011) mostram que o uso de padrões internos marcados com ^{13}C compensam a supressão diferencial de forma mais eficiente em análises de UHPLC frente àqueles marcados com ^2H . Entretanto, alguns estudos reportam que quando LC-ESI-MS é utilizada, os padrões marcados contribuem para a supressão iônica de analitos nativos presentes nas amostras (LIANG et al., 2003; SOJO, LUM e CHEE, 2003; GAY, NIEMANN e MUSSER, 2006).

A avaliação das diferentes causas de supressão iônica permite concluir que a adoção de uma única medida preventiva ou corretiva não é o suficiente para tornar um método utilizando LC-MS isento do fenômeno de supressão iônica. Neste estudo, não só as matrizes avaliadas contribuem para que a supressão iônica seja bastante intensa, como também a própria composição da fase móvel utilizada na separação e o fator de diluição utilizado para as amostras a serem determinadas por cromatografia líquida (medidas preventivas). Ademais, a utilização da extração em fase sólida como método de preparo de amostras tem um papel fundamental na redução de interferências causadas por determinadas classes de compostos, também se caracterizando por ser uma medida preventiva de supressão iônica. Como alternativa para contornar os efeitos indesejados de supressão iônica estaria o uso de padrões internos marcados para todos os 24 analitos estudados, uma vez que a utilização de um número reduzido de padrões internos associa um grande erro ao método devido à enorme variabilidade existente entre as amostras estudadas. Entretanto, o uso de marcados inviabilizaria economicamente a aplicação do método de análise, devido ao altíssimo custo de aquisição de tais substâncias. Por fim, como

medida corretiva à supressão iônica, cabe se utilizar do pequeno tempo de análise cromatográfica para empregar o método de adição de padrão como método de quantificação dos analitos avaliados nas amostras estudadas.

5.10 VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE ANÁLISE

A performance do método desenvolvido foi avaliada pela determinação de parâmetros instrumentais, tais como limites de detecção e quantificação, linearidade, faixa dinâmica, repetibilidade, precisão intermediária, robustez e recuperação. Tais parâmetros foram avaliados de acordo com o exposto no item 4.4.10, sendo que os resultados referentes à detectabilidade e linearidade estão sumarizados na Tabela 9 e os resultados referentes à precisão e exatidão do método desenvolvido estão descritos na Tabela 10.

Para o método desenvolvido, 19 dos 24 analitos contemplados por este trabalho apresentaram limites de detecção variando entre 0,5 e 8,4 $\mu\text{g L}^{-1}$, com exceção de 6-hidroxicumarina (14,0 $\mu\text{g L}^{-1}$), ácido vanílico (15,1 $\mu\text{g L}^{-1}$), 3-acetilcumarina (29,8 $\mu\text{g L}^{-1}$), canferol (33,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e miricetina (130,3 $\mu\text{g L}^{-1}$). Portanto, o método proposto apresenta uma adequada detectabilidade, tendo em vista que as substâncias antioxidantes estudadas devem estar presentes em concentrações maiores que a nível de traço para que desempenhem uma atividade biológica significativa nas matrizes avaliadas.

As curvas analíticas feitas para o estudo da faixa linear de aplicação do método mostraram uma linearidade satisfatória, com coeficientes de correlação (r) maiores que 0,99. A linearidade também foi avaliada e confirmada pelo gráfico traçado entre as áreas relativas (área do sinal/concentração analisada) e o logaritmo das concentrações correspondentes (Figura 39). Os valores das extremidades do gráfico que ultrapassaram a média dos resultados obtidos em $\pm 5\%$ foram considerados como sendo não-lineares.

Em termos de precisão, o método desenvolvido apresentou repetibilidade e precisão intermediária inferiores a 5% para os tempos de retenção de cada analito, conforme Decisão da Comissão das Comunidades Europeias que trata a respeito do desempenho de métodos analíticos (EC, 2002). O maior coeficiente de variação calculado para o tempo de retenção dos analitos estudados foi de 1,8% (para um tempo de retenção de 0,76 min). Já as áreas dos picos apresentaram uma repetibilidade que variou de 1,0 a 13,1% e uma precisão intermediária entre 4,2 e 13,8%, enquadrando-se nos limites propostos pela ANVISA (2003).

Tabela 9 – Parâmetros de validação referentes à detectabilidade e linearidade instrumentais do método de UHPLC-ESI-MS/MS desenvolvido.

Analito	ILOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	ILOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r (n=3)	Sensibilidade
Ácido gálico	7,7	25,6	76,7 - 230,2	0,9953	3,7
Ácido clorogênico	7,7	25,5	51,0 - 254,9	0,9968	3,0
(+)-Catequina	7,5	25,1	100,2 - 250,4	0,9972	2,1
Ácido vanílico	15,1	50,2	98,3 - 491,4	0,9976	2,1
Ácido cafeico	3,8	12,8	38,3 - 127,7	0,9946	8,4
6-Hidroxycumarina	14,0	46,5	42,0 - 420,0	0,9966	5,1
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,0	6,5	14,0 - 56,0	0,9977	17,8
Ácido ferúlico	8,3	27,6	59,3 - 296,4	0,9990	4,5
Rutina	3,7	12,5	12,5 - 112,2	0,9934	1,5
4-Hidroxycumarina	1,9	6,2	13,3 - 66,6	0,9964	32,2
Ácido rosmarínico	7,2	24,0	69,1 - 230,4	0,9937	1,3
Quercitrina	0,5	1,7	3,8 - 19,2	0,9913	25,0
Miricetina	130,3	434,3	1375,9 - 4586,3	0,9957	1,3
Fisetina	7,7	25,7	51,3 - 256,3	0,9966	5,1
Resveratrol	4,0	13,5	14,5 - 144,7	0,9981	3,9
3-Acetilcumarina	29,8	99,3	381,3 - 762,6	0,9982	12,5
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	8,4	28,0	93,7 - 312,2	0,9940	6,1
Quercetina	7,7	25,8	51,4 - 257,2	0,9963	8,2
Luteolina	1,8	5,9	16,4 - 54,5	0,9974	14,9
Apigenina	1,8	5,9	10,8 - 54,2	0,9974	15,2
Canferol	33,1	110,3	118,6 - 1185,5	0,9959	0,7
3,6-Diidroxi flavona	7,5	25,0	48,0 - 239,8	0,9957	4,0
Crisina	4,1	13,6	14,6 - 145,7	0,9954	6,9
Galangina	4,0	13,2	30,4 - 121,5	0,9949	2,2

Fonte: Do autor.

Tabela 10 – Precisão e exatidão instrumentais do método de UHPLC-ESI-MS/MS desenvolvido.

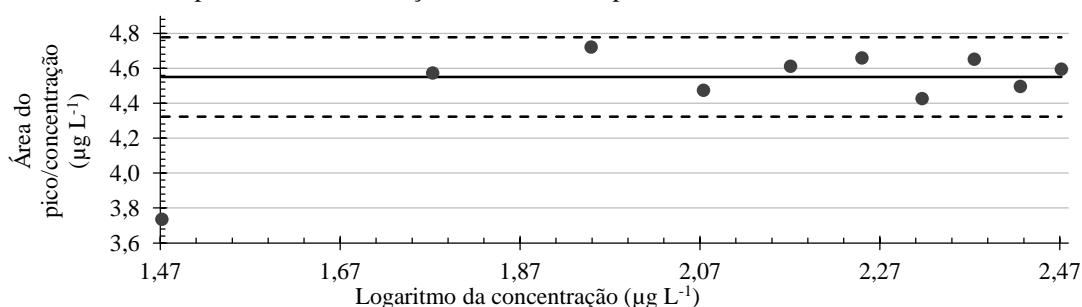
Análito	Repetibilidade (n=5, RSD %)						Precisão intermediária (n=20, RSD %)		Recuperação (%) (n=1, RSD %) [†]
	Área do pico cromatográfico			Tempo de retenção			Área do pico cromatográfico	Tempo de retenção	
	Nível de concentração [‡]			Nível de concentração [‡]			Nível de concentração [‡]	Nível de concentração [‡]	
	Baixo	Intermediário	Alto	Baixo	Intermediário	Alto	Intermediário	Intermediário	
Ácido gálico	1,1	3,3	1,0	0,0	0,0	0,0	10,7	1,7	94,8 – 109,8 (5,7)
Ácido clorogênico	6,6	3,5	3,7	0,6	0,0	0,6	8,3	1,6	94,1 – 123,1 (12,7)
(+)-Catequina	8,4	9,9	2,1	1,1	0,6	0,9	6,3	1,8	92,3 – 109,8 (6,5)
Ácido vanílico	7,3	6,2	3,7	0,0	0,6	0,6	11,2	1,0	96,7 – 106,7 (3,6)
Ácido cafeico	4,8	5,7	2,7	0,0	0,5	0,6	10,3	1,2	94,8 – 104,5 (3,6)
6-Hidroxycumarina	5,1	3,9	5,6	0,3	0,3	0,5	7,8	1,2	99,2 – 103,7 (1,8)
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,2	6,6	5,7	0,3	0,3	0,6	7,6	1,2	96,4 – 106,4 (3,5)
Ácido ferúlico	8,0	2,4	7,6	0,2	0,2	0,4	10,5	0,8	97,5 – 109,0 (4,0)
Rutina	6,3	7,0	4,9	0,0	0,1	0,3	13,1	0,5	95,1 – 123,7 (9,4)
4-Hidroxycumarina	2,5	4,2	6,1	0,2	0,2	0,2	8,5	0,5	97,0 – 103,6 (2,4)
Ácido rosmarínico	4,1	3,4	9,7	0,1	0,2	0,2	6,3	0,3	95,2 – 107,7 (4,8)
Quercitrina	3,2	2,1	5,8	0,1	0,1	0,2	4,2	0,5	92,3 – 123,8 (10)
Miricetina	13,1	4,7	9,7	0,2	0,1	0,1	13,8	0,4	96,6 – 111,9 (5,6)
Fisetina	10,8	7,2	5,4	0,1	0,1	0,1	8,2	0,4	93,7 – 103,6 (3,4)
Resveratrol	5,1	6,1	6,3	0,1	0,1	0,3	6,7	0,5	92,3 – 106,9 (4,8)
3-Acetilcumarina	3,6	3,2	4,4	0,1	0,1	0,2	6,4	0,5	100,5 – 108,9 (3,2)
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	4,0	4,9	2,9	0,1	0,1	0,2	9,7	0,5	96,6 – 101,2 (1,8)
Quercetina	2,2	2,8	8,7	0,1	0,1	0,2	5,7	0,4	95,4 – 103,3 (2,8)
Luteolina	2,1	5,7	8,4	0,1	0,1	0,2	6,9	0,5	93,5 – 105,3 (4,0)
Apigenina	5,4	5,2	5,4	0,1	0,1	0,1	5,7	0,5	98,3 – 104,5 (2,1)
Canferol	5,5	7,4	6,1	0,1	0,1	0,2	7,5	0,5	100,3 – 109,2 (2,8)
3,6-Diidroxi-flavona	3,3	3,4	9,0	0,0	0,1	0,2	8,2	0,4	97,7 – 101,5 (1,5)
Crisina	5,8	4,1	4,0	0,1	0,1	0,1	7,0	0,4	99,1 – 105,0 (1,9)
Galangina	2,5	4,5	4,6	0,1	0,1	0,2	7,2	0,3	91,7 – 109,9 (6,6)

[‡]Nível de concentração baixo igual a 2 vezes o ILOQ de cada analito; nível intermediário igual a 5 vezes o ILOQ; e nível alto igual a 8 vezes o ILOQ.

[†] O desvio padrão relativo é calculado entre as recuperações obtidas para uma replicata de cada uma das seis matrizes estudadas.

Fonte: Do autor.

Figura 39 – Gráfico representando a avaliação da linearidade para a curva analítica de ácido ferúlico.



Fonte: Do autor.

Ensaio de recuperação foram realizados em seis diferentes matrizes a partir da fortificação dos extratos obtidos das plantas com os analitos abordados neste estudo. De maneira geral, as recuperações determinadas experimentalmente variaram entre 92-112%. As exceções são para rotina em *Bauhinia variegata* var. *variegata* (124%) e ácido clorogênico e quercitrina em *Bauhinia variegata* var. *alboflava* (123% e 124%, respectivamente).

Por fim, a avaliação da robustez do método em LC-MS/MS foi avaliada pela abordagem de Youden, de acordo com o descrito no item 4.4.10.4. A análise dos resultados demonstrou que o método é robusto. Foi constatado que apenas dois analitos apresentaram uma alteração significativa (embora muito pequena) nos seus tempos de retenção quando foram submetidos a uma variação na vazão da fase móvel. Por sua vez, as áreas dos picos cromatográficos de dois analitos apresentaram leves variações com a mudança da vazão do gás de secagem da fonte de ionização. Para um total de quatro analitos, diferenças mais pronunciadas nas áreas de pico foram perceptíveis apenas com a mudança da composição da fase móvel.

5.11 APLICAÇÃO DO MÉTODO NA ANÁLISE DE EXTRATOS DE PLANTAS MEDICINAIS

O método desenvolvido foi aplicado em seis plantas medicinais (três diferentes coletas sazonais para cada planta) oriundas da região amazônica brasileira, tendo por objetivo a determinação e quantificação de alguns de seus constituintes fenólicos. Considerando que o uso tradicional das plantas estudadas se dá por meio do consumo de chás, foram feitas infusões dos materiais vegetais para elucidar alguns dos compostos potencialmente bioativos a serem extraídos desta maneira. Ademais, na hipótese de ser extraído maior número de compostos fenólicos, também foram feitos extratos etanólicos por maceração, conforme descrito na seção 4.2. Uma vez que os extratos das plantas estudadas não são isentos de compostos fenólicos (indisponibilidade de amostras brancas) e que apresentaram consideráveis efeitos de supressão

iônica por UHPLC-ESI-MS/MS, as quantificações dos extratos analisados foram levadas a cabo pelo método de adição de padrão.

Os resultados obtidos pelas determinações realizadas no modo de aquisição de dados por monitoramento de reações selecionadas (SRM) mostraram que todas as plantas medicinais, em pelo menos uma das coletas realizadas, apresentaram no mínimo 9 dos compostos fenólicos estudados, sendo rutina e os ácidos ferúlico, *p*-cumárico e vanílico os mais frequentemente encontrados. Importantes concentrações de rutina foram determinadas nas variedades de *B. variegata* (até 2,52 mg g⁻¹ de planta), bem como de ácido clorogênico nas espécies do gênero *Cecropia* (até 0,57 mg g⁻¹ de planta). Diferentemente das demais espécies estudadas, *Connarus perrottetii* var *angustifolius* apresentou uma grande concentração de catequina (chegando a 1,77 mg g⁻¹ de planta a partir da infusão). As informações detalhadas obtidas a partir das determinações e quantificações dos compostos fenólicos feitas nos 36 extratos vegetais estão sumarizadas desde a Tabela 11 até a Tabela 16.

Tabela 11 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Cecropia palmata* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em µg g⁻¹ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em µg g⁻¹).

Análito	<i>Cecropia palmata</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	-	-	-	-	-	-
Ácido clorogênico	475,0 ± 16,6	359,1 ± 19,9	60,1 ± 1,2	240,2 ± 7,7	1,1 ± 0,03	49,7 ± 1,9
(+)-catequina	24,0 ± 1,7	22,3 ± 0,9	3,7 ± 0,6	33,5 ± 2,5	0,3 ± 0,01	1,1 ± 0,2
Ácido vanílico	11,2 ± 2,3	18,5 ± 0,3	10,2 ± 0,9	5,2 ± 2,0	0,3 ± 0,02	2,3 ± 0,4
Ácido cafeico	23,0 ± 0,7	14,5 ± 0,7	19,8 ± 0,7	34,4 ± 3,1	1,9 ± 0,1	5,8 ± 0,3
6-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	4,2 ± 0,4	3,6 ± 0,1	4,9 ± 0,2	17,5 ± 1,0	0,8 ± 0,02	0,9 ± 0,02
Ácido ferúlico	3,4 ± 0,7	4,1 ± 0,6	2,2 ± 0,8	5,0 ± 1,0	0,3 ± 0,02	0,8 ± 0,1
Rutina	< ILOQ	< ILOQ	1,0 ± 0,2	153,2 ± 7,3	< ILOQ	< ILOQ
4-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	0,2 ± 0,1	-	0,1 ± 0,02	23,1 ± 1,1	-	< ILOQ
Miricetina	-	-	-	-	-	-
Fisetina	-	-	-	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	5,0 ± 0,8	2,5 ± 0,3	2,9 ± 0,4	1,3 ± 0,9	0,03 ± 0,01	0,5 ± 0,2
Quercetina	< ILOQ	< ILOQ	< ILOQ	42,8 ± 2,7	< ILOQ	0,4 ± 0,2
Luteolina	-	-	-	5,6 ± 0,4	0,02 ± 0,004	0,3 ± 0,04
Apigenina	-	-	-	24,4 ± 1,6	-	-
Canferol	-	-	-	< ILOQ	-	-
3,6-diidroxiflavona	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	< ILOQ	-	-
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

Tabela 12 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Cecropia obtusa* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).

Analito	<i>Cecropia obtusa</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	-	-	-	-	< ILOQ	-
Ácido clorogênico	568,2 ± 26,6	287,5 ± 9,2	312,1 ± 8,6	455,8 ± 4,3	8,3 ± 0,3	21,6 ± 0,4
(+)-catequina	66,9 ± 2,7	94,9 ± 4,7	16,1 ± 0,9	24,4 ± 1,7	4,2 ± 0,2	2,8 ± 0,1
Ácido vanílico	10,3 ± 1,6	12,8 ± 1,8	4,2 ± 0,8	10,1 ± 2,1	1,3 ± 0,1	0,3 ± 0,1
Ácido cafeico	31,9 ± 1,3	21,0 ± 1,3	6,2 ± 0,2	13,8 ± 1,9	4,9 ± 0,2	0,4 ± 0,03
6-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	2,9 ± 0,2	2,3 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,3 ± 0,4	0,7 ± 0,01	0,1 ± 0,01
Ácido ferúlico	3,2 ± 0,7	2,8 ± 0,6	2,3 ± 0,3	1,6 ± 0,5	0,3 ± 0,04	0,1 ± 0,03
Rutina	38,0 ± 1,0	45,9 ± 2,0	75,7 ± 1,0	21,9 ± 2,6	1,6 ± 0,05	6,9 ± 0,1
4-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	3,6 ± 0,2	3,5 ± 0,2	-	4,4 ± 0,4	0,2 ± 0,01	< ILOQ
Miricetina	< ILOQ	-	-	38,2 ± 9,5	-	-
Fisetina	-	-	-	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	1,8 ± 0,6	4,1 ± 0,6	4,5 ± 0,5	0,5 ± 0,3	0,1 ± 0,02	0,3 ± 0,1
Quercetina	2,5 ± 0,5	< ILOQ	< ILOQ	32,5 ± 2,4	9,9 ± 0,3	< ILOQ
Luteolina	< ILOQ	< ILOQ	-	4,4 ± 0,7	0,7 ± 0,01	< ILOQ
Apigenina	-	-	-	15,3 ± 1,3	-	-
Canferol	-	-	-	-	0,4 ± 0,1	-
3,6-diidroxiflavona	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	-	-	-
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

Tabela 13 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Bauhinia variegata* var. *variegata* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).

(continua)

Analito	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	-	< ILOQ	< ILOQ	-	-	-
Ácido clorogênico	79,6 ± 6,1	288,0 ± 8,3	384,9 ± 12,2	35,8 ± 2,3	29,4 ± 1,3	100,1 ± 2,2
(+)-catequina	12,8 ± 0,9	56,3 ± 1,4	78,8 ± 2,8	6,8 ± 0,4	4,9 ± 0,3	14,6 ± 0,4
Ácido vanílico	5,2 ± 0,7	9,5 ± 0,7	16,9 ± 0,8	1,6 ± 0,4	5,7 ± 0,1	3,8 ± 0,3
Ácido cafeico	13,1 ± 1,0	34,3 ± 1,7	27,4 ± 1,7	7,7 ± 0,6	121,1 ± 2,8	22,9 ± 0,6
6-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,3 ± 0,3	14,7 ± 0,4	19,8 ± 0,5	3,8 ± 0,1	18,4 ± 0,6	8,6 ± 0,2
Ácido ferúlico	7,8 ± 0,9	13,0 ± 0,9	10,9 ± 0,6	2,5 ± 0,3	28,7 ± 0,5	6,9 ± 0,2
Rutina	608,1 ± 32,3	351,1 ± 7,2	2517,3 ± 48,0	176,8 ± 4,3	129,9 ± 4,1	832,9 ± 1,4
4-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	24,5 ± 1,4	17,2 ± 0,9	158 ± 2,9	9,7 ± 0,5	3,9 ± 0,2	22 ± 0,1

(continuação)

Análito	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>variegata</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Miricetina	-	-	-	30,2 ± 5,6	-	-
Fisetina	-	-	-	-	0,3 ± 0,1	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	1,4 ± 0,3	1,8 ± 0,3	3,1 ± 0,6	0,4 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,8 ± 0,3
Quercetina	-	< ILOQ	< ILOQ	10,5 ± 0,6	99,8 ± 1,5	17,8 ± 0,5
Luteolina	-	< ILOQ	< ILOQ	0,8 ± 0,1	0,8 ± 0,1	4,6 ± 0,2
Apigenina	-	-	-	5,0 ± 0,4	< ILOQ	< ILOQ
Canferol	-	-	-	0,3 ± 0,6	9,3 ± 1,6	-
3,6-diidroxiflavona	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	< ILOQ	< ILOQ	-
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

Tabela 14 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Bauhinia variegata* var. *alboflava* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).

Análito	<i>Bauhinia variegata</i> var. <i>alboflava</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	-	-	< ILOQ	-	-	-
Ácido clorogênico	226,7 ± 6,2	349,7 ± 13	371,5 ± 15,8	27,5 ± 2,5	31,4 ± 1,1	81,3 ± 1,2
(+)-catequina	81,5 ± 4,6	123,1 ± 5,7	88,8 ± 3,6	8,6 ± 1,3	8,0 ± 0,1	23,0 ± 0,4
Ácido vanílico	8,3 ± 1,6	7,0 ± 1,4	16,0 ± 0,5	< ILOQ	3,0 ± 0,3	5,6 ± 0,5
Ácido cafeico	33,5 ± 2,4	48,7 ± 2,3	31,8 ± 1,1	8,3 ± 1,1	39,3 ± 0,8	21,9 ± 0,5
6-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	19,2 ± 0,6	27,3 ± 1,2	19,3 ± 0,3	4,8 ± 0,4	10,5 ± 0,2	13,4 ± 0,2
Ácido ferúlico	12,2 ± 1,0	10,1 ± 0,9	13,5 ± 0,4	2,1 ± 0,9	9,3 ± 0,2	6,2 ± 0,3
Rutina	746,2 ± 31,3	2182,2 ± 29,2	1720,8 ± 40,3	67,0 ± 3,3	274,1 ± 2,0	259,3 ± 1,5
4-hidroxycumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	12,3 ± 0,6	14,5 ± 0,5	16,6 ± 0,7	3,7 ± 0,1	2,3 ± 0,1	9,1 ± 0,2
Miricetina	< ILOQ	-	-	-	-	-
Fisetina	-	-	-	-	< ILOQ	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	2,9 ± 0,8	3,3 ± 0,8	4,3 ± 0,6	0,5 ± 0,3	0,6 ± 0,1	1,6 ± 0,3
Quercetina	< ILOQ	< ILOQ	1,2 ± 0,4	18,7 ± 2,3	37,1 ± 1,4	44,2 ± 1,2
Luteolina	< ILOQ	< ILOQ	< ILOQ	1,6 ± 0,2	1,1 ± 0,04	2,9 ± 0,2
Apigenina	-	-	-	6,7 ± 0,6	< ILOQ	< ILOQ
Canferol	-	-	-	< ILOQ	4,5 ± 0,6	5,0 ± 1,1
3,6-diidroxiflavona	-	< ILOQ	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	< ILOQ	0,1 ± 0,02	< ILOQ
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

Tabela 15 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Mansoa alliacea* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).

Analito	<i>Mansoa alliacea</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	-	< ILOQ	< ILOQ	-	-	-
Ácido clorogênico	99,1 ± 3,5	128,8 ± 2,7	63,0 ± 2,4	9,6 ± 0,4	3,3 ± 0,05	18,1 ± 0,6
(+)-catequina	-	-	-	-	-	-
Ácido vanílico	16,4 ± 1,4	10,1 ± 0,7	10,1 ± 0,8	2,7 ± 0,4	1,1 ± 0,1	5,4 ± 0,5
Ácido cafeico	5,6 ± 0,5	9,4 ± 0,4	4,8 ± 0,2	1,4 ± 0,2	0,9 ± 0,03	2,2 ± 0,1
6-hidroxicumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	34,2 ± 1,9	51,4 ± 1,2	22,4 ± 0,5	16,9 ± 1,1	5,9 ± 0,1	4,8 ± 0,1
Ácido ferúlico	25,8 ± 0,7	27,7 ± 0,8	32,5 ± 0,9	11,0 ± 0,4	4,2 ± 0,1	12,5 ± 0,2
Rutina	3,6 ± 0,4	1,6 ± 0,2	8,2 ± 0,5	0,4 ± 0,1	0,2 ± 0,02	4,2 ± 0,1
4-hidroxicumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	-	-	0,1 ± 0,04	-	-	0,1 ± 0,02
Miricetina	-	-	-	-	-	-
Fisetina	-	-	< ILOQ	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	3,7 ± 0,7	10,7 ± 0,8	6,9 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,6 ± 0,1	2,5 ± 0,3
Quercetina	-	-	-	-	-	< ILOQ
Luteolina	0,6 ± 0,2	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,1	10,2 ± 0,7	5,6 ± 0,2	1,8 ± 0,1
Apigenina	5,2 ± 0,2	4,0 ± 0,2	5,2 ± 0,3	8,6 ± 0,4	1,8 ± 0,03	3,8 ± 0,1
Canferol	-	-	-	-	-	-
3,6-diidroxiflavona	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	-	-	-
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

Tabela 16 – Concentrações dos compostos fenólicos em *Connarus perrottetii* var. *angustifolius* determinadas por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando infusões e extratos etanólicos de três diferentes coletas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de planta, seguidos do desvio padrão para concentração (em $\mu\text{g g}^{-1}$).

(continua)

Analito	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Ácido gálico	11,6 ± 0,8	109,8 ± 5,0	65,6 ± 1,3	6,6 ± 1,5	49,2 ± 1,9	44,3 ± 0,9
Ácido clorogênico	-	2,0 ± 0,7	-	-	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1
(+)-catequina	1007,8 ± 10,3	1773,7 ± 26,9	1236,4 ± 30,1	442,1 ± 31,7	374,1 ± 6,3	258,4 ± 3,5
Ácido vanílico	9,2 ± 0,9	15,2 ± 0,6	18,9 ± 1,2	6,2 ± 1,5	15,9 ± 0,9	14,6 ± 0,4
Ácido cafeico	-	-	0,8 ± 0,2	< ILOQ	-	0,3 ± 0,1
6-hidroxicumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>p</i> -cumárico	1,7 ± 0,1	2,4 ± 0,1	8,2 ± 0,2	2,9 ± 0,2	1,7 ± 0,04	6,1 ± 0,2
Ácido ferúlico	7,3 ± 0,6	0,9 ± 0,3	2,4 ± 0,5	10,7 ± 1,0	1,0 ± 0,2	1,5 ± 0,2
Rutina	0,5 ± 0,2	< ILOQ	< ILOQ	0,4 ± 0,1	-	< ILOQ
4-hidroxicumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido rosmarínico	-	-	-	-	-	-
Quercitrina	-	-	-	-	-	< ILOQ

(continuação)

Analito	<i>Connarus perrottetii</i> var. <i>angustifolius</i>					
	Infusão			Extrato etanólico		
	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta	1ª coleta	2ª coleta	3ª coleta
Miricetina	-	-	-	-	17,8 ± 8,3	5,6 ± 2,7
Fisetina	-	-	-	-	-	-
Resveratrol	-	-	-	-	-	-
3-acetilcumarina	-	-	-	-	-	-
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	-	0,7 ± 0,2	< ILOQ	-	< ILOQ	0,4 ± 0,1
Quercetina	-	< ILOQ	< ILOQ	< ILOQ	11,8 ± 0,2	7,3 ± 0,3
Luteolina	-	< ILOQ	-	< ILOQ	-	-
Apigenina	-	-	-	9,5 ± 0,1	-	-
Canferol	-	-	-	-	15,3 ± 1,8	7,6 ± 1,2
3,6-diidroxiflavona	-	-	-	-	-	-
Crisina	-	-	-	-	-	-
Galangina	-	-	-	-	-	-

Fonte: Do autor.

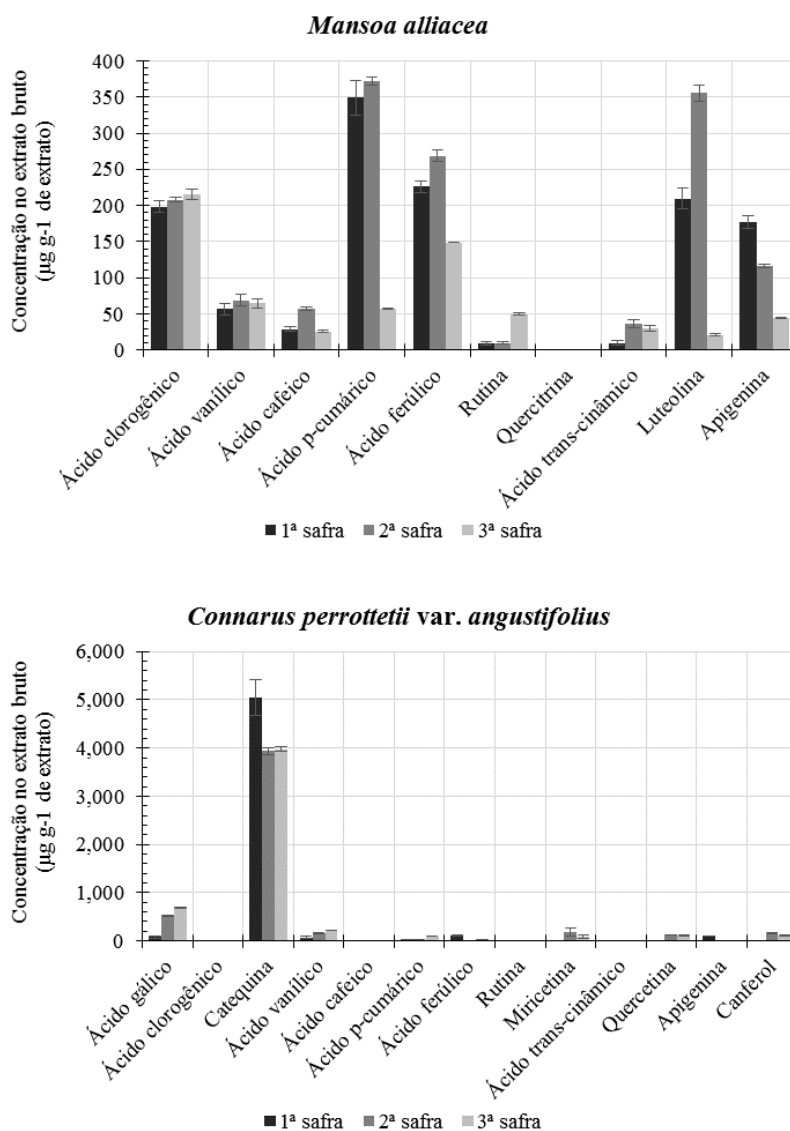
Para cada espécie estudada, a semelhança entre os compostos detectados tanto na infusão como no extrato etanólico por maceração permite inferir com maior segurança possíveis marcadores analíticos para tais espécies medicinais dentre os analitos estudados. Em linhas gerais, os extratos etanólicos foram capazes de concentrar de 2 a 30 vezes os compostos fenólicos analisados, com relação às infusões. Em alguns casos, o fator de concentração superou 100 vezes, considerando a concentração de analitos no extrato etanólico seco. Além disso, foi possível identificar alguns compostos fenólicos nos extratos etanólicos que não foram possíveis de serem determinados nas infusões.

Considerando os compostos fenólicos determinados em maior concentração para cada espécie vegetal, são potenciais marcadores analíticos para controle de qualidade de drogas vegetais a serem desenvolvidas: ácido clorogênico, ácido cafeico, quercetina e rutina para *Bauhinia variegata* var. *variegata* e *Bauhinia variegata* var. *alboflava*; ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico, catequina e ácido cafeico para *Cecropia palmata*; rutina, catequina, ácido clorogênico e ácido cafeico para *Cecropia obtusa*; luteolina, apigenina e ácidos ferúlico, *p*-cumárico e clorogênico para *Mansoa alliacea*; e catequina e ácidos gálico e vanílico para *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*.

A Figura 40 e a Figura 41 a seguir mostram de maneira mais clara os potenciais marcadores analíticos designados para cada uma das espécies vegetais analisadas. Os gráficos que constituem estas figuras indicam as concentrações dos compostos fenólicos determinadas em termos das massas de extratos etanólicos secos obtidos de cada uma das espécies vegetais, de acordo com o procedimento descrito na seção 4.2 Preparo de amostras. É possível observar que alguns dos analitos se destacam frente aos demais, em termos da concentração determinada.

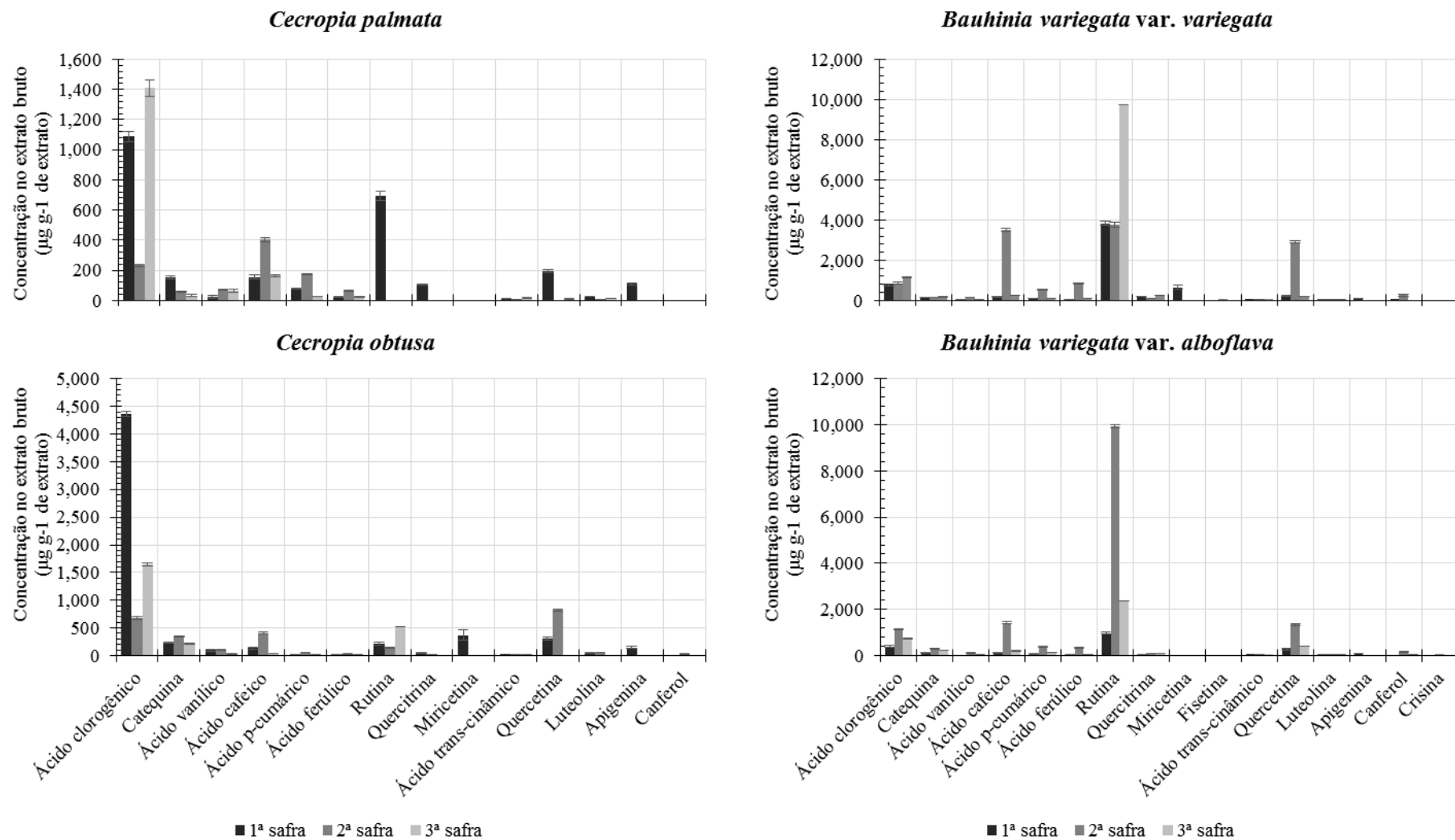
Adicionalmente, é possível perceber que os analitos designados como possíveis marcadores analíticos por este estudo foram determinados nas três diferentes coletas dos materiais vegetais, para cada uma das espécies analisadas. Por fim, através da análise da Figura 41, cabe salientiar a elevada semelhança da constituição química entre as espécies do gênero *Cecropia* e entre as variedades de *Bauhinia variegata* frente aos analitos determinados.

Figura 40 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando extratos etanólicos de três diferentes coletas das plantas descritas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato etanólico seco.



Fonte: Do autor.

Figura 41 – Perfil da concentração dos compostos fenólicos determinados por UHPLC-ESI-MS/MS utilizando extratos etanólicos de três diferentes coletas das plantas descritas. Os valores são dados em $\mu\text{g g}^{-1}$ de extrato etanólico seco.

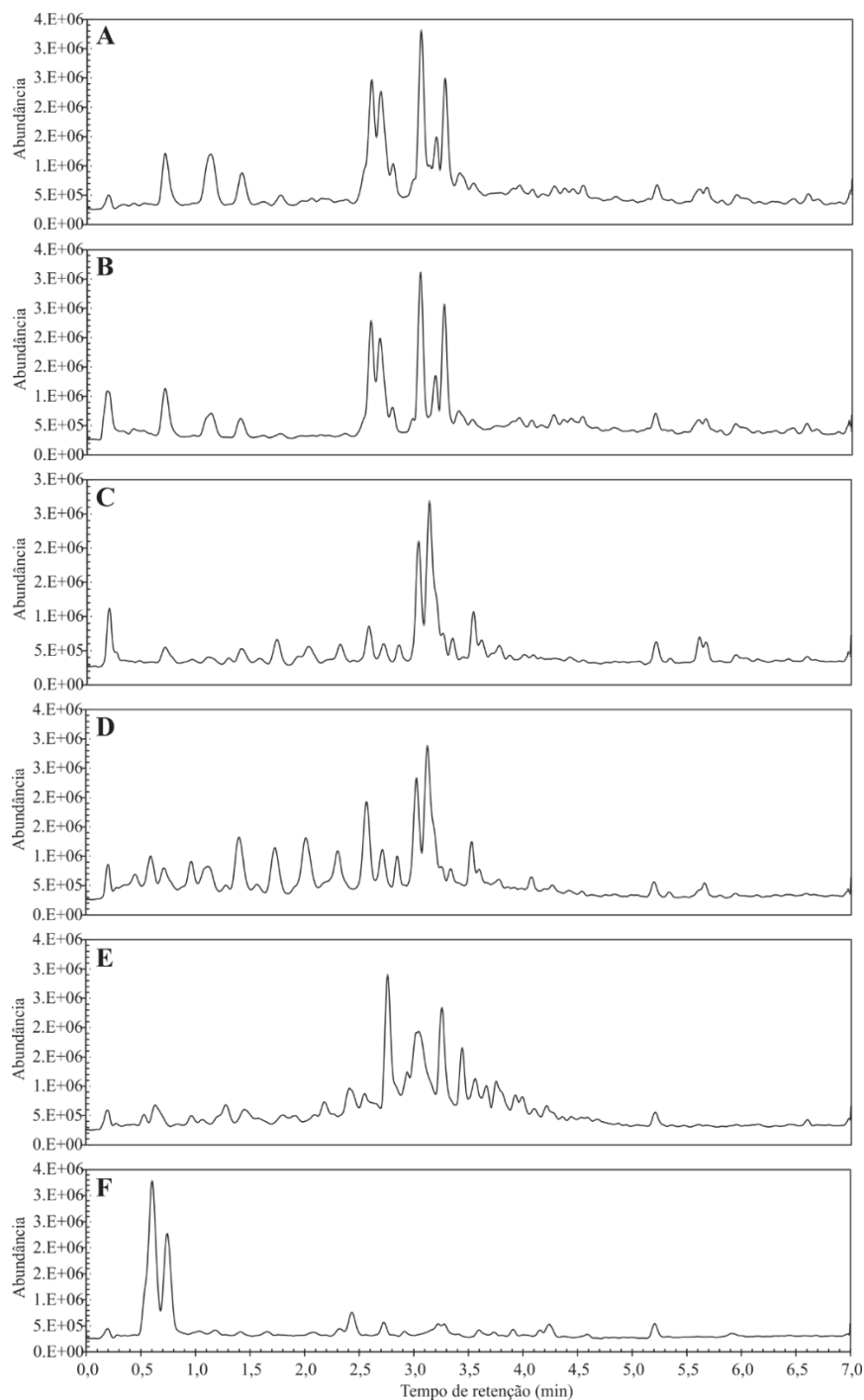


Fonte: Do autor.

A Figura 42 mostra os cromatogramas do tipo “*fingerprint*” para as infusões da 1ª coleta das espécies analisadas obtidos por UHPLC-ESI-MS no modo de aquisição por varredura (m/z 135-620, com um tempo de varredura igual a 300 ms) com ionização em polaridade negativa. Nesta figura, semelhanças significativas podem ser vistas entre os cromatogramas obtidos para as duas variedades de *B. variegata* estudadas. Da mesma forma, o perfil cromatográfico é facilmente comparável entre *Cecropia palmata* e *Cecropia obtusa*. Esta observação permite inferir que os cromatogramas obtidos no modo de varredura são capazes de confirmar a identidade química de plantas dentro de um mesmo gênero botânico. Destaca-se, inclusive, a significativa diferença do perfil cromatográfico obtido para *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, mostrando que a casca da referida espécie apresenta uma identidade química bastante diferente das folhas das demais plantas medicinais analisadas. De fato, a análise quantitativa confirma uma concentração de catequina e ácido gálico muito superior nesta espécie, em comparação com as demais espécies vegetais abordadas por este trabalho.

A determinação de marcadores analíticos para espécies vegetais e a avaliação do perfil cromatográfico destas espécies constituem etapas primordiais no desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), para o registro de um novo fitoterápico é exigida a elaboração de um relatório técnico do produto a ser comercializado. Tal relatório deve conter um procedimento para o controle de qualidade do material vegetal utilizado e, também, do derivado vegetal produzido e do medicamento acabado. Por sua vez, dentre os itens que devem compor esse procedimento de controle de qualidade estão a análise quantitativa de marcadores e a obtenção do perfil cromatográfico ou prospecção fitoquímica, tanto da droga vegetal, como do derivado vegetal utilizado e do produto acabado. A legislação brasileira atual que regulamenta o registro de medicamentos fitoterápicos apenas recomenda que os marcadores controlados tenham correlação com o efeito terapêutico da droga vegetal (marcadores ativos), entretanto, não exige estudos que comprovem tal correlação específica (ANVISA, 2014). Dessa forma, a atribuição de marcadores analíticos inerentes às espécies vegetais também atende aos requisitos e exigências da legislação federal. Ainda de acordo com a legislação, como complementação ao registro dos medicamentos fitoterápicos, a eficiência dos produtos acabados deve ser constatada por meio da tradicionalidade do uso das espécies vegetais para determinada finalidade, critério esse a ser comprovado por meio de estudos etnofarmacológicos ou etno-orientados.

Figura 42 – Cromatogramas do tipo “*fingerprint*” para infusões da primeira coleta das espécies analisadas obtidos por UHPLC(-)ESI-MS, em modo de varredura (m/z 135-620). (A) *Cecropia palmata*, (B) *Cecropia obtusa*, (C) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (D) *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, (E) *Mansoa alliacea* e (F) *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*.



Fonte: Do autor.

6 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi desenvolvido e validado um método para análise de 24 compostos fenólicos em plantas medicinais da Amazônia por UHPLC-ESI-MS/MS. Atingiu-se uma boa separação cromatográfica dos analitos, não se evidenciando interferências isobáricas entre as coeluições existentes. Vários compostos fenólicos foram quantificados em extratos obtidos das plantas *Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var *variegata*, *Bauhinia variegata* var *alboflava*, *Connarus perrottetii* var *angustifolius*, *Cecropia obtusa* e *Cecropia palmata*. Em todas estas plantas medicinais foram encontrados rutina, apigenina e os ácidos vanílico, cafeico, *p*-cumárico, ferúlico e *trans*-cinâmico, em pelo menos um de seus extratos. Considerando os compostos fenólicos de maior concentração em cada espécie analisada tanto em infusão como em extrato etanólico por maceração, num rol de três diferentes coletas de material vegetal, puderam ser definidos marcadores analíticos para fins de controle de qualidade em produtos fitoterápicos que venham a ser originados de tais plantas medicinais.

Também foi realizado estudo abrangendo diversas origens da supressão iônica na determinação de polifenóis por UHPLC-ESI-MS/MS. O método de separação desenvolvido e seis extratos de diferentes plantas medicinais utilizados neste estudo foram avaliados por seis experimentos desenhados de forma a identificar diferentes mecanismos de supressão iônica. O estudo comprovou a influência de diversas variáveis sobre a eficiência de ionização dos 24 analitos avaliados, como a composição da fase móvel, a coeluição de analitos, os efeitos de matriz, a competição por cargas na fonte de ionização e a ionização diferencial do padrão interno.

Os diferentes efeitos observados, inclusive entre matrizes muito semelhantes, como plantas de mesmo gênero e inclusive de mesma espécie, mostram que testes de supressão iônica são essenciais durante o desenvolvimento e validação de métodos em UHPLC-ESI-MS/MS para analitos bioativos. Também foi evidenciado o quão longe da realidade podem estar os resultados de estudos de quantificação de (poli)fenóis em amostras à base de plantas. Além disso, alguns pontos críticos foram identificados na tentativa de redução de limites de detecção no desenvolvimento de métodos de separação em fase líquida acopladas à espectrometria de massas, como a escolha ideal da fase móvel e da fase estacionária, para evitar supressões iônicas por aditivos e por coeluição, respectivamente.

A influência de componentes da matriz, por sua vez, pode ser minimizada através da escolha de um adequado pré-tratamento de amostras, sendo neste estudo utilizada a SPE. Ademais, o cuidado com resultados falso positivos ou falso negativos merece atenção

principalmente na escolha de uma diluição adequada da matriz, bem como no uso de um padrão interno adequado. Sendo assim, o pequeno tempo de análise cromatográfica do método desenvolvido permitiu a quantificação mais laboriosa dos analitos pelo método de adição de padrão, assim reduzindo consideravelmente os efeitos de supressão iônica existentes na análise destas matrizes.

Muitos outros analitos não abordados por este estudo foram encontrados nos extratos de plantas medicinais a partir da interpretação dos *fingerprints* obtidos cromatograficamente em modo *full scan*. Alguns destes compostos apresentaram inclusive uma maior intensidade quando comparado aos analitos estudados, o que pode estar associado a uma maior concentração e conseqüente maior relevância farmacológica. Dessa forma, fica evidenciada a necessidade da existência de um método de *screening* sem analitos-alvo associado a estudos de atividades farmacológicas para proporcionar uma incontestável determinação de marcadores ativos para as plantas medicinais estudadas neste trabalho.

BIBLIOGRAFIA

ALARCÓN-FLORES, M. I. et al. Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 134, n. 4, p. 2465-2472, 2012.

ALARCÓN-FLORES, M. I. et al. Evaluation of the Presence of Phenolic Compounds in Different Varieties of Apple by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry. **Food Anal. Methods**, v. 8, n. 3, p. 696-709, 2014.

AMOAH, S. K. S. et al. Phytochemical analysis of the hot tea infusion of *Hedyosmum brasiliense*. **Phytochem. Lett.**, v. 13, p. 267-274, 2015.

ANNESLEY, T. M. Ion Suppression in Mass Spectrometry. **Clin. Chem.**, v. 49, n. 7, p. 1041-1044, 2003.

ANTIGNAC, J.-P. et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis. **Anal. Chim. Acta**, v. 529, n. 1-2, p. 129-136, 2005.

ANVISA. Resolução RE nº 899, de 29 de Maio de 2003. **D. Of. União**, v. RE 899/2003, 2003.

_____. Resolução RDC nº 26, de 13 de Maio de 2014. **D. Of. União**, v. RE 26/2014, 2014.

ARAGÃO, N. M. D.; VELOSO, M. C. D. C.; ANDRADE, J. B. D. Validação de métodos cromatográficos de análise: um experimento de fácil aplicação utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e os princípios da "Química Verde" na determinação de metilxantinas em bebidas. **Quím. Nova**, v. 32, n. 9, p. 2476-2481, 2009.

AVERY, M. J. Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, n. 3, p. 197-201, 2003.

BATAGLION, G. A. et al. Determination of the phenolic composition from Brazilian tropical fruits by UHPLC-MS/MS. **Food Chem.**, v. 180, p. 280-287, 2015.

BATISTA, A. G. et al. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chem.**, v. 197 Pt B, p. 1153-1159, 2016.

BECERRA-HERRERA, M. et al. Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid-liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography-triple-quadrupole mass spectrometry. **LWT Food Sci. Technol.**, v. 57, n. 1, p. 49-57, 2014.

BERG, T.; STRAND, D. H. ¹³C labelled internal standards--a solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 52, p. 9366-9374, 2011.

BJORK, M. K. et al. Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 396, n. 7, p. 2393-2401, 2010.

BRAVO, L.; GOYA, L.; LECUMBERRI, E. LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages. **Food Res. Int.**, v. 40, n. 3, p. 393-405, 2007.

BURSAL, E. et al. Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS. **Food Res. Int.**, v. 51, n. 1, p. 66-74, 2013.

CÁMARA, C. et al. **Toma y tratamiento de muestras**. Madrid: Síntesis, 2002. 334 p.

CELA, R.; LORENZO, R. A.; CASAIS, M. D. C. **Técnicas de separación en Química analítica**. Madrid: Síntesis, 2002. 638 p.

CÉLINE, V. et al. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

CÉSAR, I. D. C.; PIANETTI, G. A. Robustness evaluation of the chromatographic method for the quantitation of lumefantrine using Youden's test. **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 45, n. 2, p. 235-240, 2009.

CEYMANN, M. et al. Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile. **J. Food Compos. Anal.**, v. 26, n. 1-2, p. 128-135, 2012.

CHICO, J.; VAN HOLTHOON, F.; ZUIDEMA, T. Ion Suppression Study for Tetracyclines in Feed. **Chromatogr. Res. Int.**, v. 2012, p. 1-9, 2012.

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Maruda, Para State (Brazil). **J. Ethnopharmacol.**, v. 126, n. 1, p. 159-175, 2009.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. In: (Ed.). **Fundamentos de cromatografia**: Unicamp, 2006. Number of

DA SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Quím. Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454, 2002.

DA SILVEIRA, G. D. et al. Determination of Phenolic Antioxidants in Amazonian Medicinal Plants by HPLC with Pulsed Amperometric Detection. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 38, n. 13, p. 1259-1266, 2015.

DAAYF, F.; LATTANZIO, V. **Recent advances in polyphenol research**. John Wiley & Sons, 2009. 416 p.

DE FREITAS, J. C.; FERNANDES, M. E. B. Uso de plantas medicinais pela comunidade de Enfarrusca, Bragança, Pará. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ciênc. Nat.**, v. 1, n. 3, p. 11-26, 2006.

DE PAEPE, D. et al. An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. **Food Chem.**, v. 136, n. 2, p. 368-375, 2013.

EC. Commission Decision EC 2002/657 of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC concerning the performance of analytical methods and the interpretation of results. **Off. J. Eur. Communities L.**, v. 2002/657/EC, 2002.

EL-ANEED, A.; COHEN, A.; BANOUB, J. Mass Spectrometry, Review of the Basics: Electrospray, MALDI, and Commonly Used Mass Analyzers. **Appl. Spectrosc. Rev.**, v. 44, n. 3, p. 210-230, 2009.

ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Res. Int.**, v. 46, n. 2, p. 557-562, 2012.

ESMAEILI, N. et al. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. **Pharmacogn. Mag.**, v. 7, n. 25, p. 74-80, 2011.

ESTEBAN, L. **La espectrometría de masas en imágenes**. ACK Editores, 1993. 261 p.

FACCIN, H. et al. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1427, p. 111-124, 2016.

FRAGA, C. G. **Plant phenolics and human health: biochemistry, nutrition and pharmacology**. John Wiley & Sons, 2009. 593 p.

FRANCESCA, N. et al. Optimised method for the analysis of phenolic compounds from caper (*Capparis spinosa* L.) berries and monitoring of their changes during fermentation. **Food Chem.**, v. 196, p. 1172-1179, 2016.

FUREY, A. et al. Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications. **Talanta**, v. 115, p. 104-122, 2013.

GALLART-AYALA, H.; MOYANO, E.; GALCERAN, M. T. Recent advances in mass spectrometry analysis of phenolic endocrine disruptors and related compounds. **Mass Spectrom. Rev.**, v. 29, n. 5, p. 776-805, 2010.

GALLART-AYALA, H. et al. Analysis of UV ink photoinitiators in packaged food by fast liquid chromatography at sub-ambient temperature coupled to tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1218, n. 3, p. 459-466, 2011.

GAY, M. L.; NIEMANN, R. A.; MUSSER, S. M. An isotopically labeled internal standard liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 2, p. 285-291, 2006.

GIORGETTI, M.; NEGRI, G.; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system: a study of historical sources from the 16th to 19th century. **J. Ethnopharmacol.**, v. 109, n. 2, p. 338-347, 2007.

GOBO, L. A. et al. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of triterpenoids in medicinal plant extracts. **J. Mass Spectrom.**, v. 51, n. 8, p. 558-565, 2016.

GOSETTI, F. et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1217, n. 25, p. 3929-3937, 2010.

GRANICA, S. Quantitative and Qualitative Investigations of Pharmacopoeial Plant Material *Polygoni Avicularis Herba* by UHPLC-CAD and UHPLC-ESI-MS Methods. **Phytochem. Anal.**, v. 26, n. 5, p. 374-382, 2015.

GROSS, J. H. **Mass spectrometry: a textbook**. 2nd Ed. Springer Science & Business Media, 2011. 753 p.

GÜLTEKIN-ÖZGÜVEN, M. et al. Determination of phenolic compounds by ultra high liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Applications in nuts. **LWT Food Sci. Technol.**, v. 64, n. 1, p. 42-49, 2015.

GUO, W. et al. Identification and quantitation of major phenolic compounds from *Penthorum chinense* pursh. by HPLC with tandem mass spectrometry and HPLC with diode array detection. **J Sep Sci**, v. 38, n. 16, p. 2789-2796, 2015.

HE, L. et al. Rapid identification and quantitative analysis of the chemical constituents in *Scutellaria indica* L. by UHPLC-QTOF-MS and UHPLC-MS/MS. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 117, p. 125-139, 2016.

HO, C.-T. Phenolic Compounds in Food: an Overview. In: (Ed.). **Phenolic Compounds in Food and Their Effects on Health I**. Washington, DC: ACS, v.506, 1992. cap. 1, Number of 2-7 p.

HOFFMANN, E. D.; STROOBANT, V. **Mass spectrometry: principles and applications**. 3rd Ed. Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, 2007. 489 p.

HOLCAPEK, M. et al. Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates. **J. Mass. Spectrom.**, v. 39, n. 1, p. 43-50, 2004.

INMETRO. Orientação sobre Validação de Métodos Analíticos. **Journal**. INMETRO, 2010.

ISMAIEL, O. A. et al. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations. **J. Chromatogr. B**, v. 875, n. 2, p. 333-343, 2008.

KEBARLE, P.; TANG, L. From Ions in Solution to Ions in the Gas Phase. **Anal. Chem.**, v. 65, n. 22, p. 972A-986A, 1993.

KECKES, S. et al. The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry. **Food Chem.**, v. 138, n. 1, p. 32-40, 2013.

KHLIFI, D. et al. LC-MS analysis, anticancer, antioxidant and antimalarial activities of *Cynodon dactylon* L. extracts. **Ind. Crop. Prod.**, v. 45, p. 240-247, 2013.

KUMARI, S. et al. Rapid screening and identification of phenolic antioxidants in *Hydrocotyle sibthorpioides* Lam. by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Chem.**, v. 203, p. 521-529, 2016.

LAW, B.; TEMESI, D. Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric methods to support drug discovery. **J. Chromatogr. B**, v. 748, n. 1, p. 21-30, 2000.

LAW, W. S. et al. Metabonomics investigation of human urine after ingestion of green tea with gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/mass spectrometry and (1)H NMR spectroscopy. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 22, n. 16, p. 2436-2446, 2008.

LIANG, H. R. et al. Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 17, n. 24, p. 2815-2821, 2003.

LIM, C.-K.; LORD, G. Current Developments in LC-MS for Pharmaceutical Analysis. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 25, n. 5, p. 547-557, 2002.

LIMA, F. O. **Estudo comparativo da bioatividade de compostos fenólicos em plantas medicinais**. 2013. 145 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria (RS), 2013.

LIN, L. Z. et al. UHPLC-PDA-ESI/HRMS/MS(n) analysis of anthocyanins, flavonol glycosides, and hydroxycinnamic acid derivatives in red mustard greens (*Brassica juncea* Coss variety). **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 22, p. 12059-12072, 2011.

LUCINI, L. et al. Rapid determination of lycopene and beta-carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. **J. Sci. Food Agric.**, v. 92, n. 6, p. 1297-1303, 2012.

LUO, H. et al. Quality evaluation of *Salvia miltiorrhiza* Bge. by ultra high performance liquid chromatography with photodiode array detection and chemical fingerprinting coupled with chemometric analysis. **J. Sep. Sci.**, v. 38, n. 9, p. 1544-1551, 2015.

MAGIERA, S.; ZARĘBA, M. Chromatographic Determination of Phenolic Acids and Flavonoids in *Lycium barbarum* L. and Evaluation of Antioxidant Activity. **Food Anal. Methods**, v. 8, n. 10, p. 2665-2674, 2015.

MALLET, C. R.; LU, Z.; MAZZEO, J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 18, n. 1, p. 49-58, 2004.

MATUSZEWSKI, B. K.; CONSTANZER, M. L.; CHAVEZ-ENG, C. M. Strategies for the Assessment of Matrix Effect in Quantitative Bioanalytical Methods Based on HPLC–MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 75, n. 13, p. 3019-3030, 2003.

MCMMASTER, M. C. **LC/MS: a practical user's guide**. John Wiley & Sons, 2005. 165 p.

MELLIU, E.; ZWEIGENBAUM, J. A.; MITCHELL, A. E. Ultrahigh-pressure liquid chromatography triple-quadrupole tandem mass spectrometry quantitation of polyphenols and secoiridoids in california-style black ripe olives and dry salt-cured olives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 63, n. 9, p. 2400-2405, 2015.

MIRNAGHI, F. S. et al. Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1276, p. 12-19, 2013.

MOKRANI, A. et al. Phenolic contents and bioactive potential of peach fruit extracts. **Food Chem.**, v. 202, p. 212-220, 2016.

MOLDOVEANU, S. C.; DAVID, V. **Sample preparation in chromatography**. Elsevier, 2002. 930 p.

MORTIER, K. A. et al. Enhanced method performance due to a shorter chromatographic run-time in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for paclitaxel. **J. Chromatogr. A**, v. 1041, n. 1-2, p. 235-238, 2004.

MÜLLER, C. et al. Ion suppression effects in liquid chromatography–electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries. **J. Chromatogr. B**, v. 773, n. 1, p. 47-52, 2002.

MÜLLER, L. S. et al. Investigation of phenolic antioxidants as chemical markers in extracts of *Conarus perrotteti* var. *angustifolius* Radlk by capillary zone electrophoresis. **J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.**, v. 39, n. 1, p. 13-20, 2015.

NOVAKOVA, L. et al. Rapid qualitative and quantitative ultra high performance liquid chromatography method for simultaneous analysis of twenty nine common phenolic compounds of various structures. **Talanta**, v. 80, n. 5, p. 1970-1979, 2010.

NUENGCHAMNONG, N.; KRITTASILP, K.; INGKANINAN, K. Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC–ESI–MS coupled with DPPH assay. **Food Chem.**, v. 117, n. 4, p. 750-756, 2009.

NUENGCHAMNONG, N.; KRITTASILP, K.; INGKANINAN, K. Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay. **Food Chem.**, v. 127, n. 3, p. 1287-1293, 2011.

PANDEY, R. et al. A rapid and highly sensitive method for simultaneous determination of bioactive constituents in leaf extracts of six *Ocimum* species using ultra high performance

liquid chromatography-hybrid linear ion trap triple quadrupole mass spectrometry. **Anal. Methods**, v. 8, n. 2, p. 333-341, 2016.

PANDEY, R.; RAMESHKUMAR, K. B.; KUMAR, B. Ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the simultaneous determination of multiple bioactive constituents in fruit extracts of *Myristica fragrans* and its marketed polyherbal formulations using a polarity switching technique. **J. Sep. Sci.**, v. 38, n. 8, p. 1277-1285, 2015.

PERIAT, A. et al. Systematic comparison of sensitivity between hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry. **J. Chromatogr. A**, v. 1312, p. 49-57, 2013.

RAMIREZ-AMBROSI, M. et al. A new ultrahigh performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray ionization and quadrupole time-of-flight mass spectrometry analytical strategy for fast analysis and improved characterization of phenolic compounds in apple products. **J. Chromatogr. A**, v. 1316, p. 78-91, 2013.

REMANE, D. et al. Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization. **Rapid Commun. Mass Spectrom.**, v. 24, n. 21, p. 3103-3108, 2010.

RIEHLE, P.; VOLLMER, M.; ROHN, S. Phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal infusions — Antioxidant capacity and thermal stability during the brewing process. **Food Res. Int.**, v. 53, n. 2, p. 891-899, 2013.

RUIZ, L. et al. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. **J. Ethnopharmacol.**, v. 133, n. 2, p. 917-921, 2011.

SANZ-BISET, J.; CAÑIGUERAL, S. Plant use in the medicinal practices known as "strict diets" in Chazuta valley (Peruvian Amazon). **J. Ethnopharmacol.**, v. 137, n. 1, p. 271-288, 2011.

SCOLES, R. Sabiduria popular y plantas medicinales: el ejemplo de la comunidad negra de Itacoã, Acará, Pará. **Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi Ciênc. Nat.**, v. 1, n. 2, p. 79-102, 2006.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. CRC press, 2003. 566 p.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chem.**, v. 101, n. 3, p. 1012-1018, 2007.

SIMIRGIOTIS, M. J. et al. Fast Detection of Phenolic Compounds in Extracts of Easter Pears (*Pyrus communis*) from the Atacama Desert by Ultrahigh-Performance Liquid Chromatography and Mass Spectrometry (UHPLC-Q/Orbitrap/MS/MS). **Molecules**, v. 21, n. 1, 2016.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; DOLAN, J. W. **Introduction to modern liquid chromatography**. 3rd Ed. John Wiley & Sons, 2009. 960 p.

SOJO, L. E.; LUM, G.; CHEE, P. Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC-ESI-MS. **Analyst**, v. 128, n. 1, p. 51-54, 2003.

SONG, J. Z. et al. A novel approach to rapidly explore analytical markers for quality control of Radix Salviae Miltiorrhizae extract granules by robust principal component analysis with ultra-high performance liquid chromatography-ultraviolet-quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 53, n. 3, p. 279-286, 2010.

SONG, Y. et al. Polyphenolic profile and antioxidant effects of various parts of Artemisia annua L. **Biomed. Chromatogr.**, v. 30, n. 4, p. 588-595, 2016.

SONGSONG, W. et al. Characterization and rapid identification of chemical constituents of NaoXinTong capsules by UHPLC-linear ion trap/Orbitrap mass spectrometry. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 111, p. 104-118, 2015.

SPIGNO, G.; TRAMELLI, L.; DE FAVERI, D. M. Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. **J. Food Eng.**, v. 81, n. 1, p. 200-208, 2007.

STAHNKE, H.; REEMTSMA, T.; ALDER, L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS. **Anal. Chem.**, v. 81, n. 6, p. 2185-2192, 2009.

SUAREZ, M. et al. Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil. **J. Chromatogr. A**, v. 1214, n. 1-2, p. 90-99, 2008.

SUFFREDINI, I. B. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian plant extracts against human lung, colon and CNS solid cancers and leukemia. **Fitoter.**, v. 78, n. 3, p. 223-226, 2007.

SUPELCO. **Guide to solid phase extraction**. 1998.

SVOBODA, P.; VLCKOVA, H.; NOVAKOVA, L. Development and validation of UHPLC-MS/MS method for determination of eight naturally occurring catechin derivatives in various tea samples and the role of matrix effects. **J. Pharm. Biomed. Anal.**, v. 114, p. 62-70, 2015.

WAB Aidur, S. M. et al. Ultra high performance liquid chromatography with mass spectrometry method for the simultaneous determination of phenolic constituents in honey from various floral sources using multiwalled carbon nanotubes as extraction sorbents. **J. Sep. Sci.**, v. 38, n. 15, p. 2597-2606, 2015.

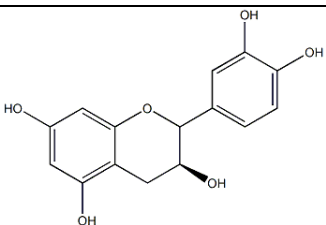
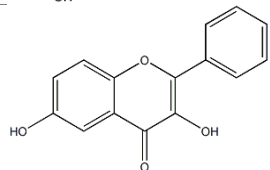
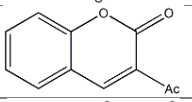
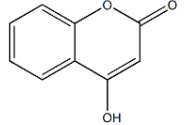
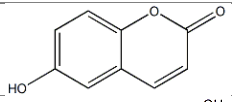
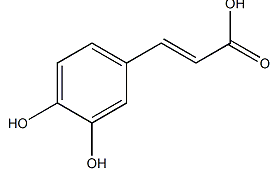
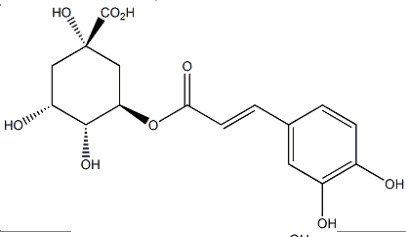
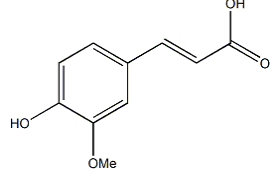
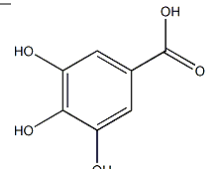
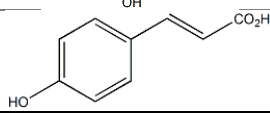
YAMAGUCHI, J.-I. et al. Utility of Postcolumn Addition of 2-(2-Methoxyethoxy)ethanol, a Signal-Enhancing Modifier, for Metabolite Screening with Liquid Chromatography and Negative Ion Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Anal. Chem.**, v. 71, n. 23, p. 5386-5390, 1999.

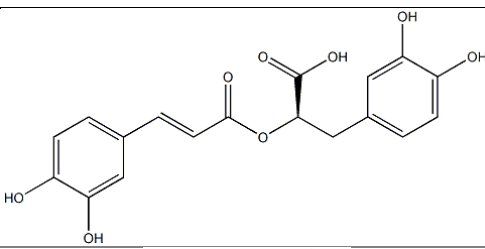
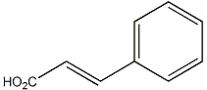
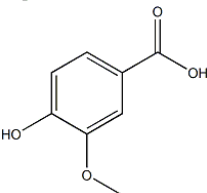
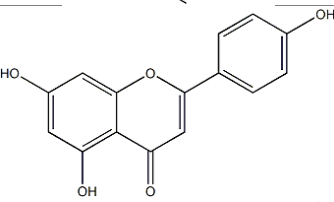
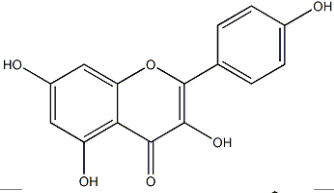
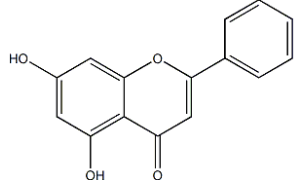
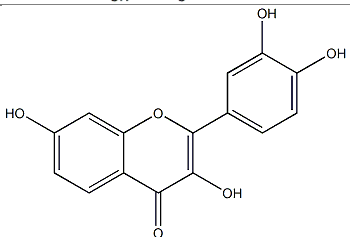
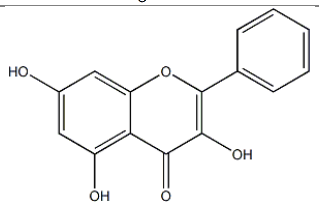
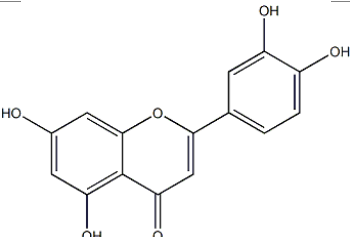
YAO, L. et al. Phenolic acids in Australian Melaleuca, Guioa, Lophostemon, Banksia and Helianthus honeys and their potential for floral authentication. **Food Res. Int.**, v. 38, n. 6, p. 651-658, 2005.

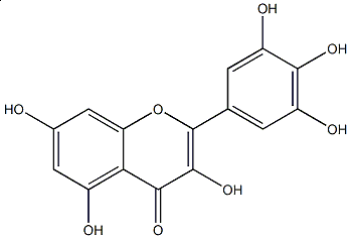
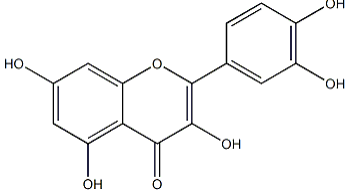
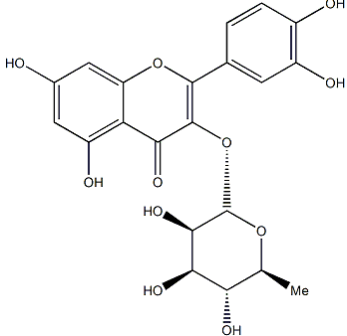
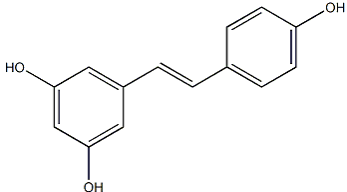
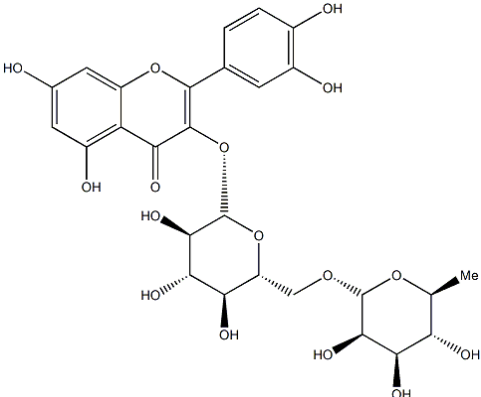
ZHANG, J. et al. Isolation and identification of antioxidant compounds in *Vaccinium bracteatum* Thunb. by UHPLC-Q-TOF LC/MS and their kidney damage protection. **J. Funct. Foods**, v. 11, p. 62-70, 2014.

ZIMMERMANN, B. F. et al. Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea). **J. Chromatogr. B**, v. 879, n. 24, p. 2459-2464, 2011.

APÊNDICE A – ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ANALITOS ESTUDADOS

Analito	CAS	Fórmula estrutural	Massa exata (uma)
(+)-catequina	225937-10-0		290,07904
3,6-dihydroxiflavona	108238-41		254,05791
3-acetilcumarina	3949-36-8		188,04734
4-hidroxicumarina	1076-38-6		162,03169
6-hidroxicumarina	6093-68-1		162,03169
Ácido cafeico	331-39-5		180,04226
Ácido clorogênico	327-97-9		354,09508
Ácido ferúlico	1135-24-6		194,05791
Ácido gálico	149-91-7		170,02152
Ácido <i>p</i> -cumárico	501-98-4		164,04734

Analito	CAS	Fórmula estrutural	Massa exata (uma)
Ácido rosmarínico	20283-92-5		360,08397
Ácido <i>trans</i> -cinâmico	140-10-3		148,05243
Ácido vanílico	121-34-6		168,04171
Apigenina	520-36-5		270,05227
Canferol	520-18-3		286,04774
Crisina	480-40-0		254,05791
Fisetina	345909-34-4		286,04774
Galangina	548-83-4		270,05227
Luteolina	491-70-3		286,04719

Analito	CAS	Fórmula estrutural	Massa exata (uma)
Miricetina	529-44-2		318,03757
Quercetina	6151-25-3		302,04265
Quercitrina	522-12-3		448,10056
Resveratrol	501-36-0		228,07864
Rutina	207671-50-9		610,15338

ANEXO A – ARTIGO PUBLICADO¹

Journal of Chromatography A, 1427 (2016) 111–124



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Chromatography A

journal homepage: www.elsevier.com/locate/chroma

Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid chromatography–electrospray tandem mass spectrometry

H. Faccin^a, C. Viana^b, P.C. do Nascimento^a, D. Bohrer^a, L.M. de Carvalho^{a,b,*}^a Graduate Program in Chemistry, Center of Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil^b Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 September 2015

Received in revised form 1 December 2015

Accepted 6 December 2015

Available online 9 December 2015

Keywords:

Ion suppression

Ion enhancement

UHPLC-ESI-MS/MS

Phenolic antioxidants

Plant extracts

ABSTRACT

A systematic study on the various sources of ion suppression in UHPLC-MS-MS analysis was carried out for 24 phenolic antioxidants in 6 different extracts of medicinal plants from Amazonia. The contributions of matrix effects, mobile-phase additives, analyte co-elution and electric charge competition during ionization to the global ion suppression were evaluated. Herein, the influence of mobile-phase additives on the ionization efficiency was found to be very pronounced, where ion suppression of approximately 90% and ion enhancement effects greater than 400% could be observed. The negative effect caused by the wrong choice of internal standard (IS) on quantitative studies was also evaluated and discussed from the perspective of ion suppression. This work also shows the importance of performing studies with this approach even for very similar matrices, such as varieties of medicinal plants from the same species, because different effects were observed for the same analyte.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Medicinal plants and foodstuffs that possess high antioxidant capacities have been an important focus of studies in analytical chemistry in recent years. Among the studied issues is the development of methodologies for chemically characterizing such plants and foods [1–3], the identification of compounds responsible for the antioxidant properties [4–6], and the proper measurement of the antioxidant power of specific components in the matrix [7–9]. For the characterization of antioxidant compounds, liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) has excelled as an analytical tool [1–3,5–7,10–12] because it is able to provide the high selectivity required for analyzing complex matrices, such as vegetable matrices. Moreover, the use of ultra-high performance LC (UHPLC) allows an increase in the separation efficiency, while the analysis times can be considerably reduced. Additionally, tandem mass spectrometry using triple quadrupole analyzers is a powerful quantification tool [13]. In recent years, studies on the contents of antioxidant compounds have been reported for oils [10–15], wine [11], fruits [2,7], honey [1] and medicinal herbs [3–6,12], wherein

most of the methodologies developed with LC-MS used electrospray (ESI) as the ion source. However, few works investigated the effects of ion suppression on the analysis of antioxidant compounds in complex matrices [14–16]. It is well known, however, that various matrix effects act on the ionization mechanism of ESI sources [17–22], which subjects the methodologies to the occurrence of ion suppression.

The effect of ion suppression is characterized by a decrease in the signal of the analyte in the matrix compared to the same analyte concentration in a medium merely composed of pure solvents. In addition to ion suppression, ion enhancement can also be observed. Beyond the detectability, ion suppression can also be responsible for deviations in the repeatability and accuracy of analytical methods [23]. Signal suppression, when very pronounced, can lead to a false negative result, or in the case of using an internal standard (IS), the unequal suppression of the analyte and IS can lead to false positive results.

There are different mechanisms proposed for explaining ion suppression in LC-MS. The most widespread theory suggests a competition between the matrix components and analytes during the evaporation of droplets formed in the electrospray so that only some compounds reach the droplet surface and pass to a gas phase [24]. Moreover, interferences can modify the viscosity or surface tension of droplets produced by the electrospray, which affects the ionization efficiency. Competition for available electric

* Corresponding author at: Graduate Program in Chemistry, Center of Natural Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS 97105-900, Brazil.
E-mail address: leandrocarvalho@pq.cnpq.br (L.M. de Carvalho).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.12.017>

0021-9673/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

charges can also occur in complex matrices, which can justify the eventual differences in signals observed for samples and standard solutions. However, ion suppression should not be considered as only a matrix effect. It can even be caused by co-eluting analytes such that their peak areas may not correspond to the sum of their individual responses. This phenomenon also indicates that there is a practical concentration limit of compounds that can be ionized simultaneously [25]. Lastly, other causes independent from the matrix, such as the mobile phase composition [19,26–28] or presence of contaminants from the analysis system [23], can also contribute to ion suppression or enhancement.

Different forms of evaluation for ion suppression have been singly described in the literature. Mallet et al. [29] described the evaluation of the influence of mobile phase additives on the signal intensity for acidic and basic drugs. In this study, it was observed that an increase in the additive concentration in the mobile phase caused a decrease in the analyte signals in most cases. Remane et al. [30] reported a study on the influence of co-eluted drugs on the effects of ion suppression and ion enhancement. The influence of the matrix composition was studied by Chico et al. [31], who evaluated the effect of different sample preparation approaches on the analysis of tetracyclines in feed samples. Herein, qualitative and quantitative assays were performed and showed suppression effects near 70% and enhancement effects of approximately 20% compared to the analysis of standard solutions. Recently, Mirnaghi et al. [11] performed a study to evaluate the analyte responses when subjected to different sample dilutions. This study aimed to measure the ion suppression caused by the competition of electric charges during the ionization process. Lastly, Avery [32] studied the differential ion suppression that can occur due to the wrong choice of an IS. This study compared the variation in the ratio of the analyte/IS areas in a series of samples of the same analytical matrix. In addition, the author compared the results with a commercial control of the sample, where the deviations were evaluated and the best IS was defined for the analytical method.

In addition to the quantification performed through the internal calibration, other methods of quantification are not free from ion suppression. The external calibration probably is the most susceptible method to ion suppression, due to the large difference in composition between standards and samples. A widespread calibration method is the matrix-matched calibration. This method requires a blank sample on which the external calibration curve must be built. Although this is a method much closer to reality than external calibration, it does not guarantee that all the samples to be analyzed present a similar response to electrospray ionization. Stüber and Reemtsma published a study which showed that none of the three aforementioned calibration methodologies are able to reduce the effects of ion suppression for samples with highly variable matrix [33]. In this study, they assumed that the calibration by standard addition provides the true analyte concentrations. Other authors have also reported the method of standard addition as the ideal calibration method to correct the effects of ion suppression [34], since the calibration curve is built on each of the samples to be analyzed. Unfortunately, this requirement makes it an extremely laborious method.

An alternative that is becoming more popular is the use of stable-isotope-labeled internal standards (SIL-IS) in quantitative methods. In this approach, stable substances with the same molecular structure of the analytes, but with deuterated sites or ^{13}C -labeled, are used as IS. Thus, co-elution of these internal standards with the analytes is guaranteed. Ideally, for each analyte should be used as IS its labeled analog, avoiding that SIL-IS demonstrate differential ion suppression. Each analyte is therefore ionized under the same elution conditions of the respective SIL-IS, correcting the effects of ion suppression. However, it is well known that such labeled

standards are not easily found commercially and, when available, are extremely costly.

The aim of this work was to perform a complete evaluation of the different possible causes of ion suppression in the analysis of medicinal plant extracts by UHPLC-MS/MS using electrospray ionization, which is the main ion source used to analyze phenolic compounds. The comprehensive study of ion suppression in the determination of 24 phenolic compounds was carried out regarding the effects of mobile phase additives, the co-elution of compounds, the composition of the matrix, and the use of an IS (2-naphthol). The ion suppression effects were studied in 6 different extracts of medicinal plants from the Brazilian Amazonian region: *Mansoa alliacea*, *Bauhinia variegata* var. *variegata*, *Bauhinia variegata* var. *alboflava*, *Connarus perrottetii* var. *angustifolius*, *Cecropia obtusa* and *Cecropia palmata*. The studied compounds belong to the most frequently found phenolic classes in medicinal plants (flavonoids, flavones, hydroxycinnamic acids, coumarins, catechins and stilbenes), which have been analyzed as chemical and bioactive markers in extracts.

2. Experimental

2.1. Chemicals and reagents

The standards (+)-catechin, 2-naphthol, 3-acetyl coumarin, 3,6-dihydroxyflavone, 4-hydroxycoumarin, 6-hydroxycoumarin, apigenin, chlorogenic acid, chrysin, fisetin, galangin, gallic acid, kaempferol, luteolin, myricetin, *p*-coumaric acid, quercetin, quercitrin, resveratrol, rosmarinic acid, rutin, *trans*-cinnamic acid, and vanillic acid were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Caffeic and ferulic acids were obtained from Fluka Analytical (Buchs, Switzerland). All the standards were of analytical grade with a minimum of 95% purity and were used as received.

Ultrapure water was obtained from a Milli-Q Synergy UV (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) system. Methanol and acetonitrile (LC–MS grade) were obtained from Panreac (Castellar del Vallès, Spain). Acetic acid, formic acid, ammonium acetate, ammonium formate and ammonium hydroxide were obtained from Sigma–Aldrich (St. Louis, USA). Standard stock solutions (1000 mg L^{-1}) were prepared by dissolving appropriate amounts of substances in LC–MS grade methanol. All the solutions were stored in amber glass recipients at $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ until their use. Working solutions of the studied phenolic compounds were prepared by dilution of the stock solutions in the respective solvents according to the optimization experiment performed.

2.2. UHPLC-ESI-MS/MS conditions

Separations were carried out on a UHPLC 1260 Infinity Binary system (Agilent, Santa Clara, USA), which was able to operate at pressures up to 600 bar using a reverse-phase Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column ($2.1 \times 50\text{ mm}$, $1.8\text{ }\mu\text{m}$, Agilent) maintained at $40\text{ }^{\circ}\text{C}$. The injection volume was $5\text{ }\mu\text{L}$, and the injected aliquots were acidified to a final concentration of 0.1% (v/v) acetic acid. The mixture of phenolic compounds was separated by using a gradient elution composed of 0.1% acetic acid (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate ($800\text{ }\mu\text{L min}^{-1}$) according to the following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). In all the chromatographic separations, 2-naphthol was used as the IS.

The chromatographic effluent generated until 7.0 min into the run was ionized in an electrospray ionization source (ESI), which was optimized to give the best response for the analytes, especially for intensity to give signal stability. The optimized parameters for

Table 1
Retention time windows (RTWs) and MS/MS parameters of the selected phenolic compounds.

Phenolic compound	RTW (min)	Fragmentor (V)	ESI polarity	Quantification transition ^a	Confirmation transition ^a
Gallic acid	0.24–0.43	106	–	169.0 > 125.1 (10)	–
Chlorogenic acid	0.61–0.94	104	–	353.1 > 191.1 (5)	–
(+)-Catechin	0.66–0.88	134	–	289.1 > 245.1 (10)	289.1 > 203.2 (15)
Vanillic acid	0.87–1.13	92	–	167.0 > 152.2 (10)	167.0 > 123.1 (8)
Caffeic acid	0.89–1.10	106	–	179.0 > 135.1 (10)	–
6-Hydroxycoumarin	1.48–1.77	124	–	161.0 > 133.2 (17)	161.0 > 105.2 (17)
<i>p</i> -Coumaric acid	1.70–2.01	96	–	163.0 > 119.1 (9)	–
Ferulic acid	2.40–2.66	88	–	193.1 > 134.1 (9)	193.1 > 178.1 (7)
Rutin	2.87–3.43	210	–	609.1 > 300.1 (31)	–
4-Hydroxycoumarin	3.26–3.54	130	–	161.0 > 117.2 (15)	–
Rosmarinic acid	3.50–3.77	138	–	359.1 > 161.0 (7)	359.1 > 197.1 (7)
Quercitrin	3.48–3.82	164	–	447.1 > 301.1 (17)	–
Myricetin	3.63–3.91	128	–	317.0 > 150.9 (21)	317.0 > 178.8 (21)
Fisetin	3.71–4.07	120	–	285.0 > 135.0 (15)	285.0 > 163.0 (15)
Resveratrol	3.82–4.10	124	–	227.1 > 185.2 (13)	227.1 > 143.0 (13)
3-Acetylcoumarin	4.02–4.31	80	+	211.0 > 211.0 (0)	–
<i>trans</i> -Cinnamic acid	4.26–4.54	90	–	147.0 > 103.2 (5)	147.0 > 77.1 (15)
Quercetin	4.37–4.96	126	–	301.0 > 151.1 (17)	301.0 > 179.0 (15)
Luteolin	4.37–4.97	162	–	285.0 > 133.2 (27)	285.0 > 151.1 (27)
Apigenin	5.19–5.53	136	–	269.0 > 117.1 (29)	269.0 > 149.0 (20)
Kaempferol	5.25–5.49	164	–	285.0 > 239.0 (29)	285.0 > 117.2 (31)
3,6-Dihydroxyflavone	6.16–6.51	126	–	253.1 > 197.0 (20)	253.1 > 208.0 (21)
Chrysin	6.26–6.84	130	–	253.1 > 143.1 (25)	253.1 > 106.9 (25)
Galangin	6.60–6.87	156	–	269.0 > 169.1 (30)	269.0 > 211.2 (29)
2-Naphthol (IS)	5.15–5.40	134	–	143.0 > 115.1 (24)	–

^a Collision energy (V) is given in brackets.

ESI were a gas flow of 11 L min⁻¹, a nebulizer of 30 psi, a capillary voltage of ± 2.4 kV and a gas temperature of 250 °C, with nitrogen used as the drying gas. The compounds were subsequently analyzed in an Agilent 6430 Triple Quadrupole mass spectrometer operating in the multiple reaction monitoring (MRM) mode with a resolution of 0.7 *m/z* (FWHM). High purity nitrogen (99.999%) obtained from Linde (Munich, Germany) was used as the gas for inducing collision. The collision energies were optimized for each analyte as shown in Table 1, which describes the transitions monitored by the mass spectrometer as well.

The chromatographic effluent generated between 7.0 and 9.0 min was discharged so that it was not introduced into the MS/MS system, which can be characterized as a cleaning step for the chromatographic column. After finishing the gradient program, a time of 4.0 min was adopted for re-equilibrating the system, which was based on the initial pressure being established. The acquired data were analyzed by using the MassHunter Workstation Software Qualitative Analysis (version B.04.00, Build 4.0.479.0, Agilent Technologies, Inc., 2011).

2.3. Sample treatment

The medicinal plant species *M. alliacea* (Lam.) A. H. Gentry (deposit no. IAN 1843394), *B. variegata* var. *variegata* (deposit no. IAN 185932), *C. perrottetii* var. *angustifolius* (Radlk) (deposit no. IAN 184393), *B. variegata* var. *alboflava* (deposit no. IAN 185831), *C. obtusa* Trécul (deposit no. IAN 185555) and *C. palmata* Willd (deposit no. IAN 185556) were obtained from the herbal collection of the Brazilian Agricultural Research Corporation, *Embrapa Amazônia Oriental*, Belém, PA, Brazil. The geographical location of the collection site is 1°27'21"S latitude and 48°30'14"W longitude. All the plants were collected during September 2012 (the wet season in northern Brazil). The fresh plant specimens were cleaned, dried at 40 °C for 12 h, ground into a fine powder in a laboratory mill and used as a dry powdered material. *C. perrottetii* was received as a fine, powdered, dried material from bark. All the other plant specimens were received as a fine powdered dried leaf material.

Dried samples were stored in desiccators under vacuum at room temperature until sample treatment.

Extracts of the aforementioned plants were obtained from an infusion of 2 g of vegetal material in 50 mL of ultrapure water at 90 °C for 10 min. The extracts were filtered through a 0.45 μ m membrane and diluted in methanol to a 1:4 proportion (MeOH/H₂O), followed by subsequent acidification with acetic acid to a 0.1% (v/v) concentration. After this step, the extracts were submitted to a cleanup step using Strata C18-E solid phase cartridges (500 mg, 3 mL, Phenomenex, Torrance, USA). The cartridges were conditioned with 6 mL of MeOH:0.2% CH₃COOH (1:1, v/v) and equilibrated with 6 mL of 0.1% CH₃COOH. A fixed volume of 2 mL of the obtained extracts with a final MeOH:H₂O:CH₃COOH composition of 20:80:0.1 (v/v) was percolated with a 2 mL min⁻¹ flow rate, followed by washing with 2 mL of 0.1% CH₃COOH. Lastly, the retained analytes were eluted with 2 mL of MeOH.

2.4. Analytical procedures

2.4.1. Evaluation of the ion suppression caused by mobile phase additives

Quantitative analysis of the ion suppression caused by mobile phase additives was carried out by flow injection analysis (FIA) using the chromatographic system described above. The chromatographic column was replaced by a dead volume connection. The influence of acetic acid, formic acid, ammonium hydroxide, ammonium formate and ammonium acetate was evaluated.

The experiment was performed at a mobile phase flow rate of 200 μ L min⁻¹ by injecting a volume of 10 μ L of the standards, which were diluted and enriched with 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0% formic acid. This procedure was identical for the vials fortified with acetic acid and ammonium hydroxide. For ammonium formate and ammonium acetate, the concentrations added were 5.0, 10.0, 20.0 and 50.0 mmol L⁻¹.

The procedures were repeated even for the eluent composed of MeOH:H₂O (1:1, v/v) or the eluent composed of ACN:H₂O (1:1, v/v). Electrospray ionization with positive and negative charges was also compared. Data acquisition was done in triplicate using the full

scan mode (m/z 100–650) with a 250 ms scan time. Each analyte was measured as the average of the signal areas obtained from extracted ion chromatograms (EIC). The injections performed in the absence of additives were used as zero reference values. Thus, the observed suppression effects were reported as relative negative percentages, and ion enhancement effects were reported as relative positive percentages.

2.4.2. Evaluation of the ion suppression caused by the co-elution of analytes

The ion suppression or enhancement caused by the co-elution of analytes was quantitatively evaluated by dividing the phenolic compounds into four different groups, all containing the same concentration for each analyte (0.5 mg L^{-1}), which were analyzed by the chromatographic method described in Section 2.2. Group I consisted of all 24 phenolic compounds covered in this work. The pairs of co-eluting analytes were divided into groups II, III and IV so that within each group, no co-elution occurs.

The intensity of the effects of ion suppression or enhancement was calculated relative to both analytes of co-eluting pairs by using the following equation [30]:

$$\text{Ion suppression (\%)} = \left[\frac{Y}{X} - 1 \right] \times 100 \quad (1)$$

where X is the area of analyte A or B when the other analyte of the co-eluting pair is not present (groups II, III or IV) and Y is the area of the analyte A or B when the other analyte of the co-eluting pair is present (group I). As described in Section 2.4.1, the observed suppression effects were reported as negative percentages, and ion enhancement effects were reported as positive values. Data acquisition was done in triplicate using the MRM mode.

2.4.3. Qualitative evaluation of the ion suppression caused by matrix effects

The ion suppression caused by the influence of the matrix was evaluated qualitatively through a post-column infusion system, which was coupled with a T connection to the chromatographic system described in Section 2.2. Herein, plant extracts (after the SPE cleanup step) were injected concomitantly with a 5 mg L^{-1} solution of analyte, which was continuously infused at a $10 \mu\text{L min}^{-1}$ flow rate. A reference baseline was obtained by injecting the mobile phase into the chromatographic system. The transitions for each analyte were monitored in the MS/MS system in the MRM mode so that a decrease in the signal intensity compared to the baseline indicated some matrix components that cause ion suppression.

2.4.4. Quantitative evaluation of the ion suppression caused by matrix effects

Ion suppression caused by matrix effects was quantitatively evaluated in triplicate by the chromatographic analysis of standard solutions of the analytes at 0.5 mg L^{-1} , which were compared with the analysis of plant extracts fortified with the same concentrations of the analyte standards [35]. Due to the absence of "blank" matrices for the medicinal plants, the basal signals of the analytes in the matrices had to be disregarded. Therefore, the subtraction of areas obtained in triplicate was done in the analysis of matrices without the addition of standards. The ion suppression was calculated relatively for the 24 analytes in the 6 medicinal plants studied using the following equation:

$$\text{Ion suppression (\%)} = \left[\frac{A_{(\text{matrix}+\text{std})} - A_{\text{matrix}}}{A_{\text{std}}} - 1 \right] \times 100 \quad (2)$$

where A is the area of the chromatographic peak and the denominations $A_{(\text{matrix}+\text{std})}$, $A_{(\text{matrix})}$ and $A_{(\text{std})}$ referred to signals for the matrix with the addition of standards, the matrix only, and the standards only, respectively.

2.4.5. Evaluation of the ion suppression caused by competition

The ion suppression caused by competition between ions during the ionization process was measured by the chromatographic analysis of the extracts fortified with standards at different dilution factors. Herein, the proportions 1:2, 1:6, 1:10, 1:16, 1:32, 1:66 and 1:166 (extract/mobile phase, v/v) were evaluated in triplicate.

For each studied matrix, a contour graph was plotted, where the horizontal axis represents the dilution factor of the extract and the vertical axis represents the different analytes studied. The graphic surface represents the normalized peak areas multiplied by the dilution factor. If there is no effect of ion suppression over the analytes, the color of the graphic should remain constant for each analyte when increasing the dilution factor.

2.4.6. Evaluation of differential ion suppression

Differential ion suppression was evaluated for the internal standard following the chromatographic analysis of standard solutions of analytes at a concentration of 0.5 mg L^{-1} , which was compared with the analysis of plant extracts spiked with the same concentration of standards. All aliquots used in the study were spiked with 0.5 mg L^{-1} of internal standard. The data were acquired in triplicate in the MRM mode, and differential ion suppression was calculated according to the following ratio:

$$\text{Differential ion suppression} = \frac{A_{(\text{matrix}+\text{std})}/A_{\text{IS}} - A_{\text{matrix}}/A_{\text{IS}}}{A_{\text{std}}/A_{\text{IS}}} \quad (3)$$

where A is the area of the chromatographic peak, with the denominations $A_{(\text{matrix}+\text{std})}$, $A_{(\text{matrix})}$, $A_{(\text{std})}$ and A_{IS} referring to signals for the matrix with the addition of standards, the matrix only, the standards only and the internal standard only, respectively. The occurrence of differential ion suppression was indicated when it was found that the results exceeded $\pm 15\%$ of the value assumed as a reference.

3. Results and discussion

3.1. Ion suppression caused by mobile phase additives

The effects of ion suppression caused by sources exogenous to the matrix were first evaluated. One of the adopted strategies was based on the study of the influence of the mobile phase and possible additives on the responses of analytes during ionization by ESI. This study was carried out before the development of the UHPLC separation method. Thus, it was possible to evaluate solvents and additives that would negatively affect the ionization of analytes. It allows the use of chemicals during the development of the UHPLC method that lead to the lowest ion suppression effect.

The ionization efficiency of the ESI source is directly related to the mobile phase composition. The pH is an important factor to be considered because the molecules can reach the source already ionized in the liquid phase. Another factor is the viscosity, which strongly influences the formation of the electrospray, facilitating both the nebulization and the evaporation of the mobile phase. Furthermore, it is already known that certain additives, such as trifluoroacetic acid (TFA), can fully suppress the ionization process and inhibit analyte detection in the negative mode as well as influence the detection in the positive mode [24,25,27,28].

In this study, the influence of methanol and acetonitrile in the mobile phase composition was evaluated, both containing additives that change the pH (Tables 2–4). Although different behaviors were observed for each analyte when using a mobile phase consisting of ACN:H₂O (1:1, v/v) compared to MeOH:H₂O (1:1, v/v), we were unable to find a generic reason for these differences. However, it was observed that the ion suppression (%) has a strong logarithmic correlation with the molar concentration of the tested

Table 2
Suppression and enhancement effects (%) for the pH additives in a mobile phase composed by methanol. Relative standard deviation (RSD, %) is given in brackets.

	Formic acid					Acetic acid					Ammonium hydroxide				
	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	1.0%	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	1.0%	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	
<i>Positive polarity</i>															
3-Acetylcoumarin	27 (1.1)	10 (1.9)	-11 (0.6)	-19 (0.7)	-62 (10.8)	45 (2.2)	42 (1.0)	16 (1.4)	5 (1.1)	-8 (17.2)	-93 (2.5)	-93 (1.5)	-94 (2.6)	-96 (11.7)	
<i>Negative polarity</i>															
trans-Cinnamic acid	-54 (17.6)	-58 (11.4)	-63 (23.6)	-70 (3.7)	-62 (10.8)	9 (2.6)	14 (2.8)	8 (4.9)	-8 (17.2)	231 (6.0)	231 (6.0)	232 (1.9)	172 (0.6)	202 (1.8)	
4-Hydroxycoumarin	-36 (1.8)	-45 (1.3)	-64 (3.2)	-70 (3.7)	-70 (3.7)	-19 (2.0)	-26 (0.9)	-40 (2.2)	-46 (4.4)	72 (2.1)	72 (2.1)	65 (0.3)	33 (1.6)	27 (0.7)	
6-Hydroxycoumarin	-31 (5.9)	-43 (10.6)	-61 (5.8)	-66 (10.8)	-66 (10.8)	-40 (5.3)	-40 (5.3)	-41 (4.6)	-46 (4.4)	71 (2.8)	71 (2.8)	70 (4.1)	35 (1.6)	27 (0.7)	
p-Coumaric acid	-45 (3.1)	-59 (5.3)	-80 (6.9)	-86 (21.0)	-86 (21.0)	-1 (5.2)	-6 (4.8)	-5 (7.5)	-22 (6.8)	472 (3.7)	472 (3.7)	449 (6.9)	336 (3.4)	299 (3.5)	
Vanillic acid	-50 (7.3)	-54 (8.8)	-63 (9.9)	-73 (7.6)	-73 (7.6)	-43 (9.6)	-45 (5.9)	-45 (5.9)	-68 (11.2)	-77 (6.1)	-77 (6.1)	-73 (7.0)	-69 (7.5)	-68 (1.7)	
Galic acid	-29 (2.1)	-35 (7.9)	-43 (5.5)	-45 (5.3)	-45 (5.3)	-48 (6.7)	-50 (8.2)	-45 (6.9)	-45 (3.6)	-19 (5.6)	-19 (5.6)	-48 (4.2)	-80 (5.9)	-84 (5.9)	
Gallic acid	-21 (2.6)	-28 (8.3)	-57 (2.9)	-62 (17.7)	-62 (17.7)	-19 (5.6)	-17 (7.1)	-13 (7.2)	-15 (8.1)	280 (4.3)	280 (4.3)	287 (4.7)	236 (4.2)	255 (2.2)	
Ferulic acid	-8 (3.6)	-20 (10.4)	-42 (5.4)	-50 (6.3)	-50 (6.3)	-14 (4.7)	-14 (4.7)	-25 (4.7)	-30 (6.6)	19 (3.8)	19 (3.8)	12 (1.8)	-14 (1.6)	-25 (1.6)	
Resveratrol	-24 (7.4)	-22 (6.6)	-41 (9.7)	-50 (8.6)	-50 (8.6)	-4 (2.1)	-7 (1.3)	-15 (4.2)	-16 (5.4)	98 (2.0)	98 (2.0)	103 (3.3)	84 (0.6)	85 (2.2)	
3,6-Dihydroxyflavone	-24 (7.4)	-22 (6.6)	-41 (9.7)	-50 (8.6)	-50 (8.6)	-4 (2.1)	-7 (1.3)	-15 (4.2)	-16 (5.4)	98 (2.0)	98 (2.0)	103 (3.3)	84 (0.6)	85 (2.2)	
Chrysin	-25 (3.3)	-29 (10.9)	-49 (5.2)	-57 (6.2)	-57 (6.2)	-21 (4.1)	-24 (7.8)	-32 (6.6)	-37 (12.9)	50 (2.4)	50 (2.4)	41 (1.9)	5 (2.4)	-2 (1.4)	
Apigenin	-25 (3.3)	-29 (10.9)	-49 (5.2)	-57 (6.2)	-57 (6.2)	-21 (4.1)	-24 (7.8)	-32 (6.6)	-37 (12.9)	50 (2.4)	50 (2.4)	41 (1.9)	5 (2.4)	-2 (1.4)	
Galangin	-26 (7.3)	-35 (3.7)	-49 (4.5)	-61 (5.6)	-61 (5.6)	-36 (4.1)	-38 (12.2)	-45 (7.4)	-55 (7.7)	-5 (3.1)	-5 (3.1)	-14 (1.8)	-36 (2.0)	-52 (6.7)	
Luteolin	-26 (7.3)	-35 (3.7)	-49 (4.5)	-61 (5.6)	-61 (5.6)	-36 (4.1)	-38 (12.2)	-45 (7.4)	-55 (7.7)	-5 (3.1)	-5 (3.1)	-14 (1.8)	-36 (2.0)	-52 (6.7)	
Kaempferol	-26 (7.3)	-35 (3.7)	-49 (4.5)	-61 (5.6)	-61 (5.6)	-36 (4.1)	-38 (12.2)	-45 (7.4)	-55 (7.7)	-5 (3.1)	-5 (3.1)	-14 (1.8)	-36 (2.0)	-52 (6.7)	
Fisetin	18 (2.3)	7 (2.5)	-3 (5.4)	-27 (10.0)	-27 (10.0)	5 (9.7)	7 (2.3)	13 (3.9)	-7 (4.1)	-80 (12.6)	-80 (12.6)	-85 (12.5)	-86 (16.7)	-87 (14.3)	
(+)-Catechin hydrate	-29 (8.9)	-34 (7.7)	-43 (6.1)	-54 (4.5)	-54 (4.5)	-38 (8.9)	-38 (5.6)	-47 (9.9)	-57 (5.3)	-69 (4.9)	-69 (4.9)	-61 (7.1)	-65 (5.3)	-73 (6.4)	
Quercetin	-83 (4.3)	-85 (11.0)	-87 (9.3)	-86 (26.4)	-86 (26.4)	-77 (4.6)	-79 (7.6)	-85 (8.8)	-93 (12.4)	165 (5.7)	165 (5.7)	120 (4.1)	34 (7.7)	-20 (6)	
Myricetin	8 (4.0)	-11 (11.5)	-41 (9.8)	-43 (2.4)	-43 (2.4)	41 (9.8)	14 (12.4)	-37 (2.7)	-32 (19.0)	-51 (8.0)	-51 (8.0)	-79 (7.1)	-60 (7.5)	-42 (9.3)	
Chlorogenic acid	58 (9.2)	38 (17)	17 (5.5)	-7 (37.6)	-7 (37.6)	-47 (6.0)	-42 (2.2)	-44 (2.8)	-50 (4.8)	80 (6.4)	80 (6.4)	66 (4.6)	46 (2.9)	19 (5.3)	
Rosmarinic acid	-13 (5.9)	-17 (5.3)	-41 (8.1)	-52 (4.6)	-52 (4.6)	-47 (6.0)	-42 (2.2)	-44 (2.8)	-50 (4.8)	80 (6.4)	80 (6.4)	66 (4.6)	46 (2.9)	19 (5.3)	
Quercitrin	63 (2.4)	50 (4.6)	24 (5.7)	-1 (2.6)	-1 (2.6)	-11 (1.9)	-4 (4.2)	14 (4.5)	-5 (6.0)	192 (4.6)	192 (4.6)	162 (5.0)	123 (3.5)	57 (4.0)	
Rutin	63 (2.4)	50 (4.6)	24 (5.7)	-1 (2.6)	-1 (2.6)	-11 (1.9)	-4 (4.2)	14 (4.5)	-5 (6.0)	192 (4.6)	192 (4.6)	162 (5.0)	123 (3.5)	57 (4.0)	

Table 3
 Suppression and enhancement effects (%) for the pH additives in a mobile phase composed by acetonitrile. Relative standard deviation (RSD, %) is given in brackets.

	Formic acid				Acetic acid				Ammonium hydroxide			
	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%	0.05%	0.1%	0.5%	1.0%
<i>Positive polarity</i>												
3-Acetylcoumarin	8 (0.4)	-4 (0.2)	-21 (1.3)	-27 (0.6)	18 (3.2)	18 (0.4)	3 (1.2)	-7 (2.5)	-95 (3.1)	-94 (2.0)	-95 (5.2)	-97 (19.2)
<i>Negative polarity</i>												
<i>trans</i> -Cinnamic acid	-66 (6.5)	-69 (2.0)	-78 (7.4)	-82 (5.9)	-8 (4.9)	-13 (5.3)	-23 (8.9)	-29 (4.2)	92 (4.1)	140 (3.8)	237 (1.9)	253 (3.3)
4-Hydroxycoumarin	-39 (2.2)	-47 (2.2)	-63 (1.8)	-70 (2.2)	-25 (1.5)	-29 (0.6)	-43 (1.7)	-48 (3.3)	37 (0.4)	38 (2.0)	45 (1.1)	38 (0.8)
6-Hydroxycoumarin	-39 (2.2)	-47 (2.2)	-63 (1.8)	-70 (2.2)	-25 (1.5)	-29 (0.6)	-43 (1.7)	-48 (3.3)	37 (0.4)	38 (2.0)	45 (1.1)	38 (0.8)
<i>p</i> -Coumaric acid	-39 (6.1)	-44 (5.2)	-59 (6.1)	-67 (10.0)	-48 (7.8)	-45 (4.6)	-47 (3.2)	-51 (4.5)	42 (3.0)	52 (2.7)	76 (5.9)	70 (2.4)
Vanillic acid	-65 (5.5)	-71 (11.4)	-84 (24.9)	-88 (5.1)	-33 (6.5)	-28 (6.6)	-30 (4.2)	-40 (10.7)	243 (4.9)	281 (5.5)	362 (4.6)	300 (3.2)
Galic acid	-37 (2.4)	-45 (3.8)	-65 (4.4)	-73 (6.3)	-33 (4.5)	-35 (4.3)	-42 (5.2)	-56 (8.6)	-72 (8.5)	-67 (9.9)	-55 (3.6)	-52 (7.9)
Caffeic acid	-27 (1.2)	-29 (0.8)	-37 (3.1)	-34 (6.3)	-46 (2.2)	-46 (6.0)	-42 (5.7)	-44 (1.9)	-12 (4.4)	-40 (2.3)	-72 (9.3)	-76 (7.3)
Ferulic acid	-33 (5.3)	-41 (5.6)	-61 (5.3)	-65 (7.5)	-38 (7.6)	-42 (5.5)	-38 (5.6)	-42 (4.3)	155 (1.5)	197 (1.2)	293 (0.6)	310 (2.9)
Resveratrol	-37 (0.9)	-43 (2.8)	-61 (2.1)	-67 (5.4)	-40 (4.5)	-44 (3.7)	-47 (9.8)	-53 (5.6)	-12 (2.9)	-14 (1.7)	-16 (6.3)	-22 (2.6)
3,6-Dihydroxyflavone	-28 (2.9)	-31 (0.6)	-40 (3.1)	-50 (5.7)	-3 (0.7)	-5 (1.7)	-13 (1.5)	-21 (2.9)	59 (0.7)	65 (1.3)	91 (3.1)	96 (0.5)
Chrysin	-28 (2.9)	-31 (0.6)	-40 (3.1)	-50 (5.7)	-3 (0.7)	-5 (1.7)	-13 (1.5)	-21 (2.9)	59 (0.7)	65 (1.3)	91 (3.1)	96 (0.5)
Apigenin	-32 (2.8)	-39 (1.2)	-52 (8.0)	-60 (1.2)	-17 (0.6)	-22 (4.4)	-32 (5.3)	-39 (5.2)	16 (1.9)	8 (2.2)	7 (1.9)	0 (0.9)
Galangin	-32 (2.8)	-39 (1.2)	-52 (8.0)	-60 (1.2)	-17 (0.6)	-22 (4.4)	-32 (5.3)	-39 (5.2)	16 (1.9)	8 (2.2)	7 (1.9)	0 (0.9)
Luteolin	-34 (0.7)	-37 (3.0)	-54 (5.1)	-62 (2.3)	-31 (2.2)	-33 (3.7)	-46 (7.0)	-53 (3.7)	-32 (1.0)	-32 (1.9)	-34 (1.5)	-48 (2.3)
Kaempferol	-34 (0.7)	-37 (3.0)	-54 (5.1)	-62 (2.3)	-31 (2.2)	-33 (3.7)	-46 (7.0)	-53 (3.7)	-32 (1.0)	-32 (1.9)	-34 (1.5)	-48 (2.3)
Fisetin	-31 (11.8)	-34 (5.4)	-46 (4.7)	-51 (9.2)	-43 (13.3)	-35 (3.0)	-38 (9.0)	-43 (5.5)	-91 (9.9)	-90 (15.1)	-89 (17.3)	-89 (14.7)
(+)-Gallocatechin hydrate	-37 (3.2)	-41 (4.4)	-50 (4.7)	-61 (10.8)	-35 (12.1)	-36 (4.3)	-44 (2.0)	-52 (10.5)	-73 (4.1)	-68 (1.1)	-57 (2.1)	-64 (3.4)
Quercetin	-88 (9.2)	-89 (11.6)	-93 (1.5)	-94 (20.8)	-62 (10.2)	-68 (10.0)	-81 (3.9)	-97 (15.5)	-58 (5.2)	-55 (5.4)	-41 (8.4)	-45 (0.8)
Myricetin	39 (17.4)	9 (11.4)	-34 (5.6)	-57 (9.6)	59 (4.7)	54 (2.3)	21 (6.5)	-26 (1.2)	133 (6.6)	131 (3.6)	88 (0.7)	10 (5.3)
Chlorogenic acid	-25 (5.3)	-17 (3.4)	-28 (2.6)	-36 (3.6)	-16 (4.4)	-19 (3.4)	-43 (6.0)	-56 (5.1)	-90 (4.5)	-87 (18.5)	-68 (7.6)	-53 (12.5)
Rosmarinic acid	-25 (2.7)	-32 (5.2)	-47 (1.4)	-55 (6.9)	-54 (4.6)	-52 (2.7)	-52 (3.4)	-59 (7.0)	57 (0.4)	64 (0.3)	76 (1.0)	50 (4.7)
Quercitrin	-13 (10.3)	-8 (6.9)	-28 (6.0)	-46 (10.4)	-47 (6.0)	-48 (6.8)	-38 (4.9)	-51 (5.3)	84 (2.1)	94 (4.6)	98 (1.4)	44 (3.4)

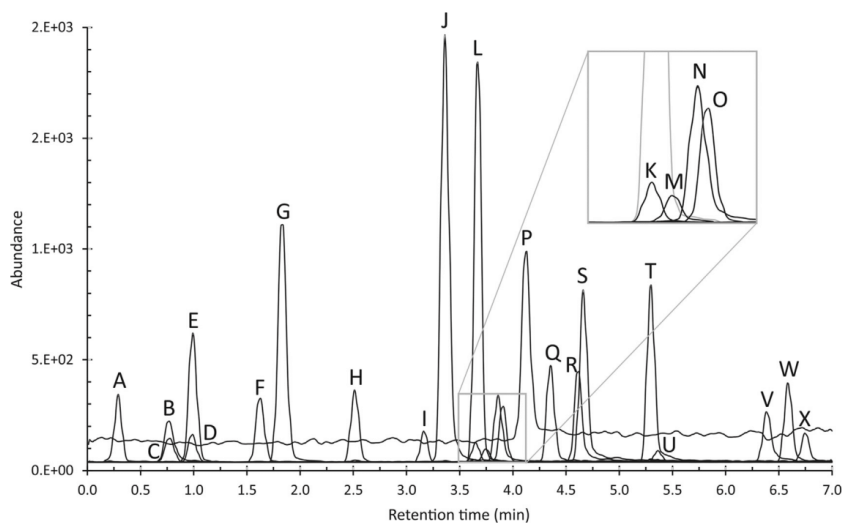


Fig. 1. Multiple reaction monitoring (MRM) chromatogram of a calibration standard in MeOH/CH₃COOH 0.2% (1:1, v/v) with a concentration of 0.5 µg/mL from the UHPLC-ESI-MS/MS analysis of phenolic compounds, (A) gallic acid, (B) chlorogenic acid, (C) (+)-catechin, (D) vanillic acid, (E) caffeic acid, (F) 6-hydroxycoumarin, (G) *p*-coumaric acid, (H) ferulic acid, (I) rutin, (J) 4-hydroxycoumarin, (K) rosmarinic acid, (L) quercitrin, (M) myricetin, (N) fisetin, (O) resveratrol, (P) 3-acetylcoumarin, (Q) *trans*-cinnamic acid, (R) quercetin, (S) luteolin, (T) apigenin, (U) kaempferol, (V) 3,6-dihydroxyflavone, (W) chrysin and (X) galangin.

Table 5

Ion suppression or enhancement effects measured in the co-eluting analyte pairs.

Co-eluting analyte pair		Analyte A influenced by B	Analyte B influenced by A
Analyte A	Analyte B	Average, % ^a	Average, % ^a
Chlorogenic acid	(+)-Catechin	97.5 (22)	-2.5 (26)
Vanillic acid	Caffeic acid	3.8 (50)	7 (37)
Rosmarinic acid	Quercitrin	40.4 (16)	18.3 (5)
Quercitrin	Myricetin	18.3 (5)	31.9 (36)
Fisetin	Resveratrol	59.2 (21)	6.1 (13)
Quercetin	Luteolin	56 (4)	20.9 (2)
Apigenin	Kaempferol	16.6 (1)	49.9 (2)
Chrysin	Galangin	92.4 (1)	45.7 (4)

^a Relative standard deviation (RSD) is given in brackets.

additives, which is valid for MeOH and ACN. Corroborating these results, Law and Temesi [25] also observed an augmentation of ion suppression when increasing the concentrations of additives.

The evaluation of buffering additives (Table 4) showed more evident ion suppression compared to the use of their conjugate acids at a similar concentration. Such suppression was very likely caused by a high concentration of anions acetate and formate completely dissociated, which suppress the ionization of analytes in negative ionization mode [36]. For most of the analytes, ammonium formate had a greater contribution to the ion suppression than ammonium acetate. The possible reason for this is the lower volatility of the ammonium formate (boiling point (bp), 180 °C), which results in the formation of droplets of mobile phase rich in formate anions. Additionally, ammonium hydroxide was also evaluated as an additive, where significant ion enhancement effects were observed in the negative ionization mode for various analytes. The possible cause for this effect was the considerable increase of the pH and the resulting deprotonation of acidic analytes even before they reached the ionization source [37].

For developing the UHPLC separation method, an acidic pH value in the mobile phase was adopted to facilitate the retention of the analytes. Thus, acetic acid was chosen as the mobile phase

additive because it caused lower ion suppression than the other additives tested. Formic acid was not used in the development of the UHPLC separation method because it has a lower *pK_a* value than acetic acid, which could promote the ionization of interfering species with some basic character in the analysis of medicinal plants. On the other hand, the appropriate pH of the mobile phase could be achieved using a concentration of formic acid lower than the concentration of acetic acid adopted (0.05% (v/v) for formic acid, instead of 0.1% (v/v) for acetic acid). However, at this concentration of formic acid the effects of ion suppression are very close to those caused by acetic acid at a concentration of 0.1% (v/v) for various analytes. Additionally, the ruggedness of the method could be affected due to the higher volatility of formic acid and the possible changes in mobile phase composition throughout the analysis. The chromatogram obtained in the separation of the studied compounds by the optimized UHPLC-ESI-MS/MS method can be seen in Fig. 1.

3.2. Ion suppression caused by the co-elution of analytes

In separation methodologies covering different classes of analytes in the same run, the resolution of possible co-eluting compounds is conditioned by the choice of optimal experimental

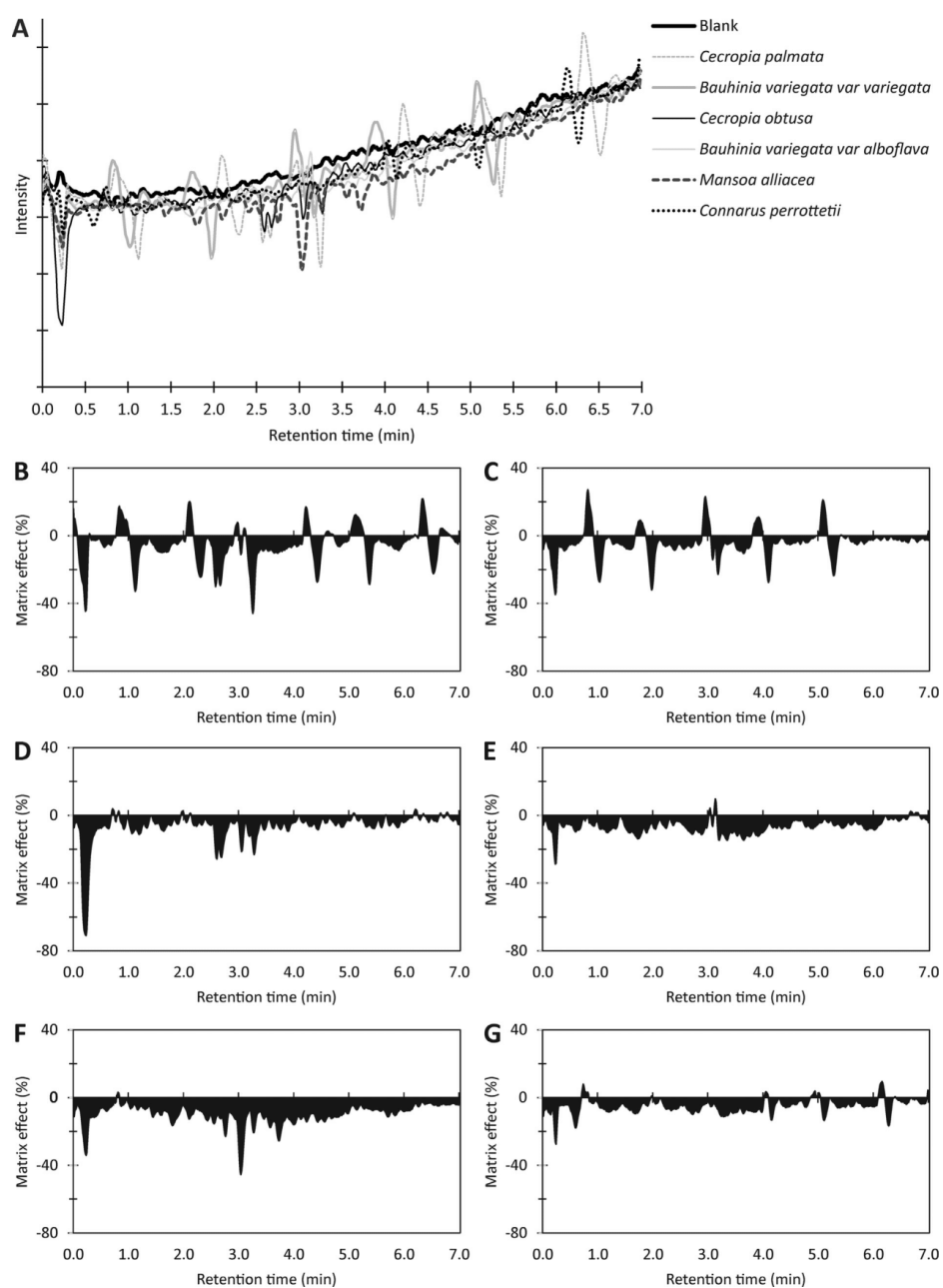


Fig. 2. (A) Qualitative ion suppression profiles obtained by infusion of phenolic compounds after injection of mobile phase (blank) and after injection of pretreated and unfortified plant extracts. (B–G) Matrix effect profiles calculated from the infusion profiles of each matrix relative to blank. (B) *Cecropia palmata*, (C) *Bauhinia variegata var. alboflava*, (D) *Cecropia obtusa*, (E) *Bauhinia variegata var. variegata*, (F) *Mansoa alliacea* and (G) *Connarus perrottetii*.

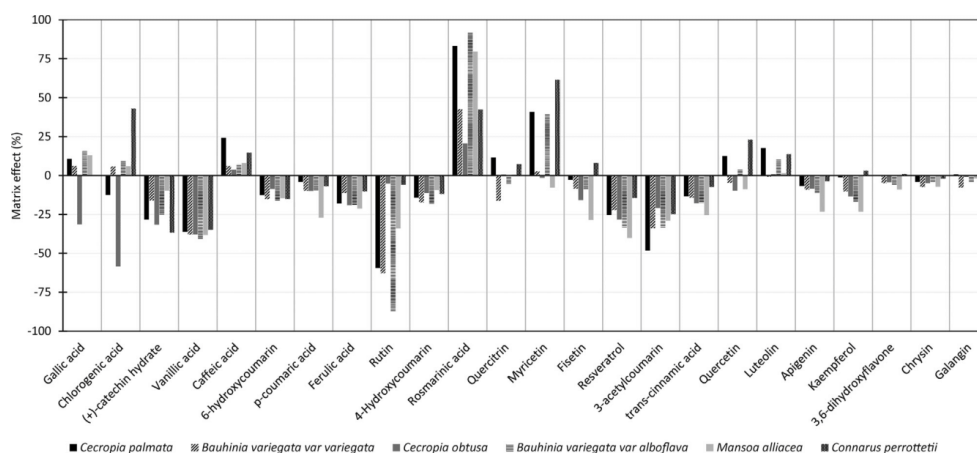


Fig. 3. Quantitative results for ion suppression or ion enhancement for all analytes in all matrices tested.

parameters that are often a compromise rather than maximizing one or the other analyte classes. It creates, therefore, a situation of loss and gain that must be administered carefully, as a partial or complete co-elution of certain analytes may consequently occur. However, in methods that use LC coupled to MS, this fact cannot be characterized as a serious problem because MS provides a high degree of selectivity to the analysis and can resolve co-eluting analytes in some cases.

Although MS confers a high selectivity to the analysis, co-elution can present a totally anomalous behavior in LC–MS compared to other detection methods. An example can be easily traced to an analysis carried out by HPLC/UV, in which the area of co-eluting peaks is very close to the sum of the areas of the same peaks analyzed separately for the same wavelength. In the case of analysis by LC–MS, the areas of the peaks obtained individually may not be equal to the areas of these peaks determined in a situation of co-elution. This phenomenon is known as the ion suppression effect of co-eluting analytes [30].

Table 5 shows the ion suppression or ion enhancement results obtained in this work for the analytes that totally or partially co-elute in the developed separation method. It can be seen that, except in one case, in all the cases where co-elution occurred, the signals were influenced by an ion enhancement effect. In other words, almost none of the studied cases lead to co-elution that adversely affects the detectability of the analytes. On the contrary, some signals have their height increased by ca. 90%.

It is already known that this phenomenon is the result of synergistic effects that act on the ionization mechanism, such as changes in the viscosity and surface tension of the droplets, in addition to eluate variations regarding its affinity for electrical charges [38]. Since the study of ion suppression caused by the co-elution of analytes was performed using standard solutions, it was eliminated the influence of any matrix on the obtained results. Thus, co-elution of two or more analytes with acid character may favor a higher accumulation of negative charges in the tip of the capillary, also known as “Taylor cone”. There is also an increase in the amount of charge in the droplets formed by acetonitrile, water, acetic acid and co-eluting analytes. As the solvent in the droplets dry, the repulsive forces between anions overcomes the surface tension of the droplets reaching the so-called Rayleigh limit. With greater number of charges on the droplets, the Rayleigh limit can be achieved more rapidly, increasing the overall efficiency of ionization.

However, in quantification studies using an IS, such an effect can be quite harmful. The influence of co-eluting analytes on the areas is variable according to their concentration levels in the sample, and changes in the ratio of the analyte/IS will be perceived and may result in false positive or false negative results in quantification.

3.3. Ion suppression caused by matrix effects

The most frequent evaluated cause of ion suppression upon analysis by LC–MS originates from effects caused by endogenous components of the matrix. This is mainly based on the fact that some matrix components have a greater or lesser affinity for charges during the ionization process and may therefore interfere with the ionization mechanism of the analytes by the ESI source.

In this study, dry powdered plant materials were stored in desiccators under vacuum at room temperature until sample treatment. Previous reported studies showed that the storage of products containing polyphenols at temperatures near 25 °C does not considerably affect the content of these compounds over time [39,40]. Additionally, a low water activity in storage also contributes to a small degradation of polyphenols. Fang and Bhandari monitor the concentration of some polyphenols during the storage of a dry extract at room temperature and low water activity. They concluded that during the storage the qualitative composition of polyphenols has not changed [39]. The presence of oxygen is another decisive factor for the degradation of polyphenols, since the proteins polyphenol oxidases (PPOs) catalyze the oxidation of phenolic compounds to quinones in an oxygen-rich environment. Despite that, the activity of the PPOs is easily eliminated by reducing the concentration of molecular oxygen in the storage location [41]. Thus, the integrity of the dried plants was guaranteed by storing them in desiccators under vacuum at room temperature until sample treatment.

The profiles of ion suppression in the studied plant extracts treated with SPE were recorded from the total ion chromatograms (as described in Section 2.4.3). The analysis of the behavior of each matrix and its comparison with the mobile phase reference allows a qualitative evaluation of the effects of ion suppression in the chromatographic analysis. For example, one can see in Fig. 2 that there is no large area of ion suppression identified in the chromatograms for all the evaluated matrices that could compromise the methodology as a whole. The existing effects are related to specific suppressions,

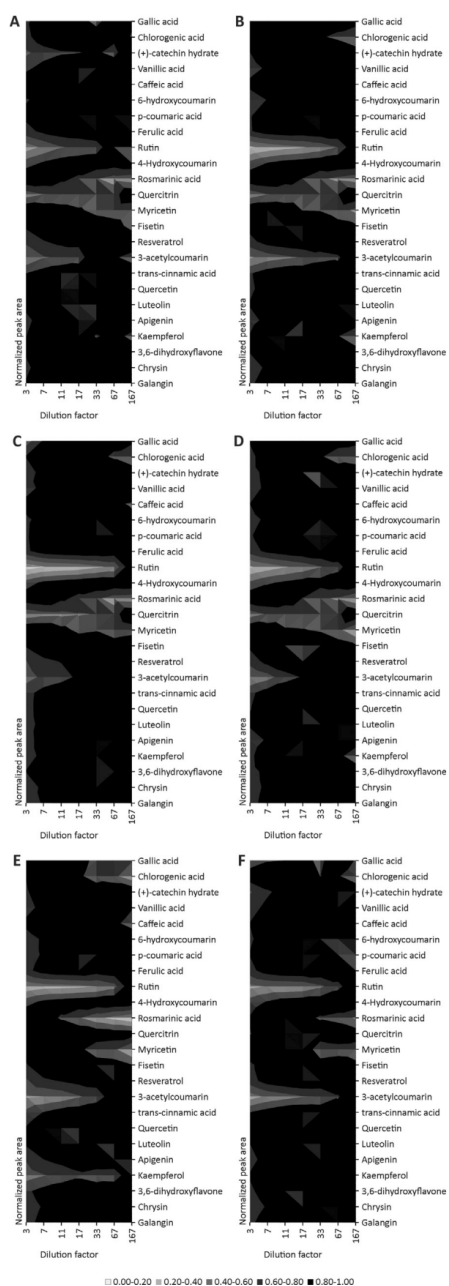


Fig. 4. Results of ion suppression by competition. The horizontal axis represents the dilution factor of the extract and the vertical axis represents the analytes. The surface represents the normalized peak areas multiplied by dilution factor, as subtitle. The matrices studied were (A) *Cecropia palmata*, (B) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (C) *Cecropia obtusa*, (D) *Bauhinia variegata* var. *albiflora*, (E) *Mansoa alliacea* and (F) *Conarus perrottetii*.

which are very likely caused by specific compounds eluted during the chromatographic analysis of plant extracts.

It is important to highlight that in the qualitative analysis, the inherent presence of the analytes in the matrix can result in a false enhancement effect caused by the matrix, as can be observed in Fig. 2B and C. Once detected, such behavior must be disregarded in that analysis because the analysis is inconclusive due to the inability to find blank matrices for the studied phenolic compounds.

However, the prior content of analytes in the matrices is included in the quantitative analysis (Fig. 3) for calculating the suppression by matrix effects. Thus, it is possible to observe the influence of this phenomenon for each analyte in all the studied medicinal plants. Herein, ion suppression as intense as 60% and ion enhancement higher than 70% can be observed. In general, it was observed that most analytes present similar behaviors among the different matrices regarding ion suppression. Exceptions to this conclusion can be observed for gallic acid, chlorogenic acid, quercitrin, myricetin and quercetin, which demonstrated fully different behaviors for the different matrices compared. Furthermore, two plants of the same species but of different varieties analyzed in this work showed a high similarity for the behavior of the analytes in the two matrices. The same behavior cannot be precisely observed for the two plants of the same genus covered by the study.

It is worth emphasizing that the ion suppression and ion enhancement evidenced were observed even after treatment of samples with solid phase extraction (SPE), which is one of the clean-up methods most recommended for eliminating interferents present in the matrices [24,38].

3.4. Ion suppression caused by competition during ionization

Competition is another well-known phenomenon that occurs during ionization by the ESI mechanism. Studies indicate that an ion concentration close to 10^{-5} M constitutes the upper limit for an effective electrospray ionization [42]. Therefore, ion suppression arising from this phenomenon occurs if the matrices possess endogenous compounds in high concentrations that can also be easily ionized by ESI. Thus, if a large number of compounds co-elute in the chromatographic analysis by LC-MS, an ion suppression event rapidly occurs [24].

To evaluate the occurrence of ion suppression caused by competition in the analyzed matrices, a study using extracts cleaned by SPE with phenolic compounds added was performed. Thus, different dilution factors of these extracts were analyzed by LC-MS. In the case where there is no occurrence of ion suppression by competition, the areas of the chromatographic peaks multiplied by their dilution factors provide a constant value, considering the experimental errors [11]. Furthermore, considering that the number of ions generated per time unit is almost constant, the dilution of the extracts leads to a decrease in competition for electrical charges during ionization and, consequently, a reduction of ion suppression effects caused by this mechanism.

Fig. 4 shows the results observed for this study, where the different regions of the graph show the areas of the chromatographic peaks normalized and multiplied by the dilution factor. Thus, no suppression effect for competition is observed in the black areas of the graphics. In turn, the clear regions can indicate such effects.

If the clear region of the graph originates from a lower dilution factor toward a larger one, the occurrence of ion suppression by competition can be observed. In other words, as higher dilutions are applied, the responses of the analytes end up being relatively more intense than those at lower dilution factors. This phenomenon can be shown for rutin and 3-acetylcoumarin in all the analyzed matrices. Such an effect can also be observed for quercitrin (Fig. 4A–D), (+)-catechin (Fig. 4A) and kaempferol (Fig. 4E). The differences in behavior observed mainly in Fig. 4E and F indicate a strong possible

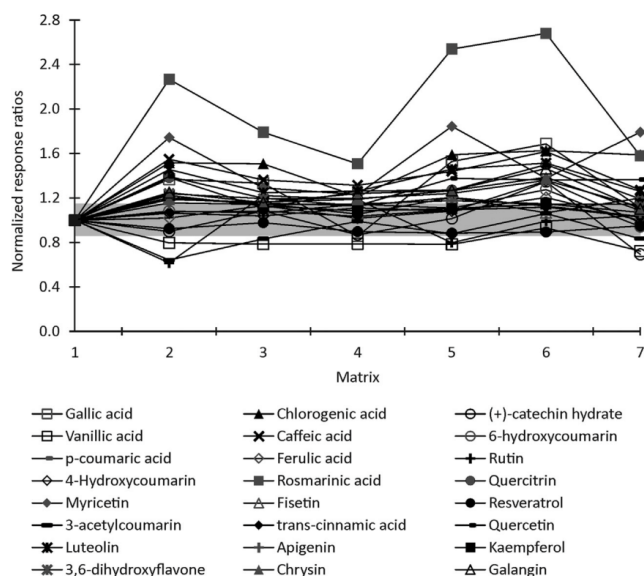


Fig. 5. Results of differential ion suppression for 2-naphthol as a potential internal standard. The ratios of peak areas of analytes and internal standard were normalized relative to a standard solution of the analytes in MeOH/CH₃COOH 0.2% (1:1, v/v), which is represented by (1). The gray zone indicates a range of $\pm 15\%$ of the value obtained for the reference solution. The matrices studied were (2) *Cecropia palmata*, (3) *Bauhinia variegata* var. *variegata*, (4) *Cecropia obtusa*, (5) *Bauhinia variegata* var. *albiflora*, (6) *Mansoa alliacea* and (7) *Connarus perrottetii*.

relationship between the analytes and matrices with respect to the ion suppression. On the other hand, if a clear region originates from a higher dilution factor toward a lower one, it does not mean that it is a consequence of ion competition but indicates the proximity of the analyte concentrations to the respective detection limits. This behavior is observed in all the matrices for the analytes chlorogenic acid, rosmarinic acid and myricetin.

From the analysis of the graphs, it is also possible to infer a dilution factor that can minimize the effects of ion suppression caused by competition without compromising the detection of the phenolic compounds. In this study, a 10-fold dilution factor for the extracts obtained after the SPE cleanup step was assumed as being optimal for minimizing the observed suppression effects.

3.5. Differential ion suppression

The use of internal standards (ISs) in analysis by LC-MS is widespread. They are considered the main forms of compensation for ion suppression effects because they respond to the ionization process similarly to the analytes. However, depending on the chromatogram region where the ISs are eluted, they can co-elute with matrix components different than those components that co-elute with analytes. This situation generates different conditions for the ionization of the IS and the analytes in the same chromatographic analysis, which can cause differential ion suppression.

To evaluate the differential effect existing in the studied plant species, a study was carried out using 2-naphthol as an IS for the analysis of some phenolic compounds, which have been reported in the literature [43]. In the case where there is no differential suppression, the ratio between the analyte and IS areas should be almost the same when analyses in the matrices and standard solutions are compared.

As observed in Fig. 5, the studied IS presents a variable behavior in each studied matrix. For gallic acid, caffeic acid, rosmarinic acid, myricetin, chlorogenic acid, luteolin and quercetin, the ratio for the analyte/IS areas is at least 30% higher in the matrices compared to the measurements performed in standard solutions in MeOH/0.1% CH₃COOH (v/v). The opposite situation is observed for vanillic acid, where in the matrix analysis, the analyte/IS ratio is up to 28% lower than that in standard solutions.

In quantification studies liable to effects of differential suppression, calibration with an IS can lead to severe errors. In cases where the analyte/IS ratio increases in specific matrices, false positive results can distort the reality and lead to conclusions that are completely wrong [21]. The variability in behavior observed among similar matrices (plants of the same genus or even the same species) is another point that should be carefully addressed, following and expanding the arguments stated by Ismaiel et al. [44] for the analysis of plant extracts. According to these authors, ion suppression studies in a unique biological source may not be sufficient for ensuring the validity of the method in different sources of matrices that are significantly different.

The extent of differential ion suppression can be reduced by decreasing the time of the chromatographic analysis, providing that the IS co-elutes with the analytes, as proposed by Mortier et al. [45]. Additionally, according to Ismaiel et al. [44], a correction of the variations caused by differential ion suppression through the use of a deuterated IS possessing a molecular structure identical to the analyte was observed. Subsequent studies performed by Berg and Strand [46] showed that the use of ¹³C-labeled ISs can compensate for the differential suppression more efficiently than those labeled with deuterium (²H) for analysis by UHPLC. However, some studies report that when LC-ESI-MS is used the labeled standards contribute to the ion suppression of native analytes present in the samples [47–49].

4. Conclusions

A systematic study covering the various sources of ion suppression in analysis by UHPLC-ESI-MS/MS was performed. The developed separation method and the different plant extracts were evaluated by six experimental approaches, which were designed to identify different mechanisms of ion suppression. The study showed the influence of diverse variables on the ionization efficiencies of 24 analytes, including the mobile phase composition, co-elution of analytes, matrix effects, competition for charges in the ionization source and differential ionization of an IS. To the best of our knowledge, it is the first time that an evaluative study of several causes of ion suppression in the analysis of phenolic compounds by UHPLC-ESI-MS/MS is performed by comparing different species of plants and using the same sample pre-treatment procedure.

The different effects observed, even between very similar matrices, showed that ion suppression studies are essential during the development and validation of methods using UHPLC-ESI-MS/MS. It was also evidenced how far from the reality may be the results of a quantification study of (poly) phenols in plant-based samples. Herein, some critical points were identified with the aim of reducing the LODs of the method, such as the choice of appropriate mobile and stationary phases so that ion suppression caused by additives and co-elution could be avoided. The influence of matrix components, in turn, can be minimized by choosing an appropriate sample pre-treatment, such as the SPE used in this study. Moreover, obtaining false positive or false negative results deserves attention and is mainly affected by the choice of an appropriate dilution of the matrix as well as the use of a suitable IS. Lastly, to reduce the effects of ion suppression caused by the matrix or errors in the choice of an IS, the use of calibration by the standard addition method is highly recommended, even though it is laborious.

Acknowledgments

This study was supported by *Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico—CNPq* (processes 487028/2012-0 and 440132/2014-2). The authors specifically thank the Research Program for the SUS (PPSUS) implemented by Decit/SCITIE/MS through the CNPq with the support of FAPERGS and SES/RS. The authors also thank *Embrapa Amazônia Oriental* (Belém/PA) for supplying the medicinal plants studied.

References

- [1] S. Keckes, U. Gasic, T.C. Velickovic, D. Milojkovic-Opšenica, M. Natic, Z. Tesic, The determination of phenolic profiles of Serbian unifloral honeys using ultra-high-performance liquid chromatography/high resolution accurate mass spectrometry, *Food Chem.* 138 (2013) 32–40.
- [2] M. Ceymann, E. Arrigoni, H. Schäfer, A. Bozzi Nising, R.F. Hurrell, Identification of apples rich in health-promoting flavan-3-ols and phenolic acids by measuring the polyphenol profile, *J. Food Compos. Anal.* 26 (2012) 128–135.
- [3] L. Bravo, L. Goya, E. Lecumberri, LC/MS characterization of phenolic constituents of mate (*Ilex paraguariensis*, St. Hil.) and its antioxidant activity compared to commonly consumed beverages, *Food Res. Int.* 40 (2007) 393–405.
- [4] J. Zhang, C.-J. Chu, X.-L. Li, S. Yao, B. Yan, H.-L. Ren, N.-Y. Xu, Z.-T. Liang, Z.-Z. Zhao, Isolation and identification of antioxidant compounds in *Vaccinium bracteatum* Thunb. by UHPLC-Q-TOF LC/MS and their kidney damage protection, *J. Funct. Foods* 11 (2014) 62–70.
- [5] N. Nuenghamhong, K. Krittasilp, K. Ingkaninan, Characterisation of phenolic antioxidants in aqueous extract of *Orthosiphon grandiflorus* tea by LC-ESI-MS/MS coupled to DPPH assay, *Food Chem.* 127 (2011) 1287–1293.
- [6] N. Nuenghamhong, K. Krittasilp, K. Ingkaninan, Rapid screening and identification of antioxidants in aqueous extracts of *Houttuynia cordata* using LC-ESI-MS coupled with DPPH assay, *Food Chem.* 117 (2009) 750–756.
- [7] E. Bursal, E. Köksal, I. Gülçin, G. Bilsel, A.C. Gören, Antioxidant activity and polyphenol content of cherry stem (*Cerasus avium* L.) determined by LC-MS/MS, *Food Res. Int.* 51 (2013) 66–74.
- [8] D. Khilifi, E.A. Hayouni, A. Valentin, S. Cazaux, B. Moukarzel, M. Hamdi, J. Bouajila, LC-MS analysis anticancer, antioxidant and antimalarial activities of *Cynodon dactylon* L. extracts, *Ind. Crop. Prod.* 45 (2013) 240–247.
- [9] G. Spigno, L. Tramelli, D.M. De Faveri, Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics, *J. Food Eng.* 81 (2007) 200–208.
- [10] C.A. Baltus, R. Quirantes-Pine, A. Bakhouch, L.F. da Silva, A.F. de Oliveira, E.F. Coutinho, D.M. da Croce, A. Segura-Carretero, H.T. Godoy, Profile of phenolic compounds of Brazilian virgin olive oils by rapid resolution liquid chromatography coupled to electrospray ionisation time-of-flight mass spectrometry (RRLC-ESI-TOF-MS), *Food Chem.* 170 (2015) 366–377.
- [11] F.S. Mirnaghi, F. Mousavi, S.M. Rocha, J. Pawliszyn, Automated determination of phenolic compounds in wine, berry, and grape samples using 96-blade solid phase microextraction system coupled with liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1276 (2013) 12–19.
- [12] B.F. Zimmermann, S.G. Walch, L.N. Tinzoh, W. Stuhlinger, D.W. Lachenmeier, Rapid UHPLC determination of polyphenols in aqueous infusions of *Salvia officinalis* L. (sage tea), *J. Chromatogr. B* 879 (2011) 2459–2464.
- [13] J.H. Gross, *Mass Spectrometry: A Textbook*, 1st ed., Springer Science & Business Media, 2004.
- [14] M.I. Alarcón Flores, R. Romero-Gonzalez, A. Garrido French, J.L. Martínez Vidal, Analysis of phenolic compounds in olive oil by solid-phase extraction and ultra high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 134 (2012) 2465–2472.
- [15] M. Suarez, A. Macía, M.P. Romero, M.J. Motilva, Improved liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the determination of phenolic compounds in virgin olive oil, *J. Chromatogr. A* 1214 (2008) 90–99.
- [16] M. Becerra-Herrera, M. Sánchez-Astudillo, R. Beltrán, A. Sayago, Determination of phenolic compounds in olive oil: New method based on liquid–liquid micro extraction and ultra high performance liquid chromatography–triple–quadrupole mass spectrometry, *LWT Food Sci. Technol.* 57 (2014) 49–57.
- [17] L. Lucini, M. Pellizzoni, C. Baffi, G.P. Molinari, Rapid determination of lycopene and beta-carotene in tomato by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry, *J. Sci. Food Agric.* 92 (2012) 1297–1303.
- [18] M.K. Bjørk, M.K. Nielsen, L.O. Markussen, H.B. Klinker, K. Linnet, Determination of 19 drugs of abuse and metabolites in whole blood by high-performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.* 396 (2010) 2393–2401.
- [19] H. Gallart-Ayala, E. Moyano, M.T. Galceran, Recent advances in mass spectrometry analysis of phenolic endocrine disruptors and related compounds, *Mass Spectrom. Rev.* 29 (2010) 776–805.
- [20] H. Stahnke, T. Reemtsma, L. Alder, Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS, *Anal. Chem.* 81 (2009) 2185–2192.
- [21] J.-P. Antignac, K. de Wasch, F. Monteau, H. De Brabander, F. Andre, B. Le Bizec, The ion suppression phenomenon in liquid chromatography–mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis, *Anal. Chim. Acta* 529 (2005) 129–136.
- [22] C. Müller, P. Schäfer, M. Störtzel, S. Vogt, W. Weinmann, Ion suppression effects in liquid chromatography–electrospray–ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries, *J. Chromatogr. B* 773 (2002) 47–52.
- [23] W.S. Law, P.Y. Huang, E.S. Ong, C.N. Ong, S.F. Li, K.K. Pasikanti, E.C. Chan, Metabonomics investigation of human urine after ingestion of green tea with gas chromatography/mass spectrometry, liquid chromatography/mass spectrometry and ¹H NMR spectroscopy, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 22 (2008) 2436–2446.
- [24] A. Furey, M. Moriarty, V. Bane, B. Kinsella, M. Lehane, Ion suppression; a critical review on causes, evaluation, prevention and applications, *Talanta* 115 (2013) 104–122.
- [25] B. Law, D. Temesi, Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic–mass spectrometry methods to support drug discovery, *J. Chromatogr. B* 748 (2000) 21–30.
- [26] M. Holcapek, K. Volna, P. Jandera, L. Kolarova, K. Lemr, M. Exner, A. Cirkva, Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulfonated dyes and intermediates, *J. Mass. Spectrom.* 39 (2004) 43–50.
- [27] T.M. Annesley, Ion suppression in mass spectrometry, *Clin. Chem.* 49 (2003) 1041–1044.
- [28] C.-K. Lim, G. Lord, Current developments in LC-MS for pharmaceutical analysis, *Biol. Pharm. Bull.* 25 (2002) 547–557.
- [29] C.R. Mallet, Z. Lu, J.R. Mazzeo, A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid-phase extracts, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 18 (2004) 49–58.
- [30] D. Remane, M.R. Meyer, D.K. Wissenbach, H.H. Maurer, Ion suppression and enhancement effects of co-eluting analytes in multi-analyte approaches: systematic investigation using ultra-high-performance liquid chromatography/mass spectrometry with atmospheric-pressure chemical ionization or electrospray ionization, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 24 (2010) 3103–3108.
- [31] J. Chico, F. van Holthoorn, T. Zuidema, Ion suppression study for tetracyclines in feed, *Chromatogr. Res. Int.* 2012 (2012) 1–9.
- [32] M.J. Avery, Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometry bioanalytical methods, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 17 (2003) 197–201.
- [33] M. Stüber, T. Reemtsma, Evaluation of three calibration methods to compensate matrix effects in environmental analysis with LC-ESI-MS, *Anal. Bioanal. Chem.* 378 (2004) 910–916.

- [34] S. Ito, K. Tsukada, Matrix effect and correction by standard addition in quantitative liquid chromatographic–mass spectrometric analysis of diarrhetic shellfish poisoning toxins, *J. Chromatogr. A* 943 (2002) 39–46.
- [35] B.K. Matuszewski, M.L. Constanzer, C.M. Chavez-Eng, Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC–MS/MS, *Anal. Chem.* 75 (2003) 3019–3030.
- [36] J.-i. Yamaguchi, M. Ohmichi, S. Jingu, N. Ogawa, S. Higuchi, Utility of postcolumn addition of 2-(2-methoxyethoxy) ethanol, a signal-enhancing modifier, for metabolite screening with liquid chromatography and negative ion electrospray ionization mass spectrometry, *Anal. Chem.* 71 (1999) 5386–5390.
- [37] A. Periat, J. Boccard, J.L. Veuthey, S. Rudaz, D. Guillarme, Systematic comparison of sensitivity between hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1312 (2013) 49–57.
- [38] F. Gosetti, E. Mazzucco, D. Zampieri, M.C. Gennaro, Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 3929–3937.
- [39] Z. Fang, B. Bhandari, Effect of spray drying and storage on the stability of bayberry polyphenols, *Food Chem.* 129 (2011) 1139–1147.
- [40] I. Klimczak, M. Malecka, M. Szlachta, A. Gliszczyńska-Swięto, Effect of storage on the content of polyphenols, vitamin C and the antioxidant activity of orange juices, *J. Food Compos. Anal.* 20 (2007) 313–322.
- [41] C. Queiroz, M.L. Mendes Lopes, E. Fialho, V.L. Valente-Mesquita, Polyphenol oxidase: characteristics and mechanisms of browning control, *Food Rev. Int.* 24 (2008) 361–375.
- [42] P. Kebarle, L. Tang, From ions in solution to ions in the gas phase, *Anal. Chem.* 65 (1993) 972A–986A.
- [43] N. Esmaeili, H. Ebrahimzadeh, K. Abdi, S. Safarian, Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study, *Pharmacogn. Mag.* 7 (2011) 74–80.
- [44] O.A. Ismaiel, M.S. Halquist, M.Y. Elmanly, A. Shalaby, H. Thomas Karnes, Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations, *J. Chromatogr. B* 875 (2008) 333–343.
- [45] K.A. Mortier, A.G. Verstraete, G.-F. Zhang, W.E. Lambert, Enhanced method performance due to a shorter chromatographic run-time in a liquid chromatography–tandem mass spectrometry assay for paclitaxel, *J. Chromatogr. A* 1041 (2004) 235–238.
- [46] T. Berg, D.H. Strand, ¹³C labelled internal standards—a solution to minimize ion suppression effects in liquid chromatography–tandem mass spectrometry analyses of drugs in biological samples? *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 9366–9374.
- [47] M.L. Gay, R.A. Niemann, S.M. Musser, An isotopically labeled internal standard liquid chromatography–tandem mass spectrometry method for determination of ephedrine alkaloids and synephrine in dietary supplements, *J. Agric. Food Chem.* 54 (2006) 285–291.
- [48] L.E. Sojo, G. Lum, P. Chee, Internal standard signal suppression by co-eluting analyte in isotope dilution LC–ESI–MS, *Analyst* 128 (2003) 51–54.
- [49] H.R. Liang, R.L. Foltz, M. Meng, P. Bennett, Ionization enhancement in atmospheric pressure chemical ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry, *Rapid Commun. Mass. Spectrom.* 17 (2003) 2815–2821.