



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**

Mariana Baptista

**Caracterização elementar e de compostos orgânicos em
sementes de urucum: um estudo multi plataforma**

CAMPINAS, 2020

Mariana Baptistão

**Caracterização elementar e de compostos orgânicos em
sementes de urucum: um estudo multi plataforma**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Química na área de Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin

Coorientadora: Profa. Dra. Ana Valéria Colnaghi Simionato

O arquivo digital corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Mariana Baptistão e orientada pelo Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin.

CAMPINAS, 2020

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Química
Simone Luiz Alves - CRB 8/9094

B229c Baptistão, Mariana, 1989-
Caracterização elementar e de compostos orgânicos em sementes de urucum : um estudo multi plataforma / Mariana Baptistão. – Campinas, SP : [s.n.], 2020.

Orientador: Marcos Nogueira Eberlin.

Coorientador: Ana Valéria Colnaghi Simionato.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Urucum. 2. Espectrometria de massas. 3. Caracterização. I. Eberlin, Marcos Nogueira, 1959-. II. Simionato, Ana Valéria Colnaghi, 1974-. III. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. IV. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Characterization of elements and organic compounds in urucum seeds : a multi-platform study

Palavras-chave em inglês:

Annatto

Mass spectrometry

Characterization

Área de concentração: Química Analítica

Titulação: Mestra em Química na área de Química Analítica

Banca examinadora:

Marcos Nogueira Eberlin [Orientador]

Carla Beatriz Grespan Bottoli

Marina Franco Maggi Tavares

Data de defesa: 09-03-2020

Programa de Pós-Graduação: Química

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-3282-7825>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/7002560330730574>

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Marcos Nogueira Eberlin (Orientador)

Profa. Dra. Marina Franco Maggi Tavares (Universidade de São Paulo)

Profa. Dra. Carla Beatriz Grespan Bottoli (UNICAMP)

A Ata de defesa assinada pelos membros da comissão examinadora, consta no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria do Programa da Unidade.

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida pela aluna Mariana Baptistão, aprovada pela Comissão Julgadora em 9 de Março 2020.

“Na vida, não existe nada a se temer, apenas a ser compreendido”

Marie Curie

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais, Lidia e Arcineo, por todo esforço dedicado à minha educação e o carinho e amor que me deram e me dão.

À Cíntia Matuyama por me incentivar desde o início desta jornada, proporcionando o meu desenvolvimento científico e profissional.

Ao Prof. Marcos Eberlin, por me receber em seu grupo e enriquecer essa experiência como um todo.

À Profa. Ana Valéria, pela coorientação e valiosos ensinamentos.

Ao Guilherme, pelo incentivo e paciência em todos os momentos.

Aos colegas dos laboratórios Thomson e Tiselius.

À Agilent Technologies por reconhecer a necessidade da formação contínua de profissionais e me permitir essa jornada. Gostaria de incluir especialmente os colegas de trabalho Rodolfo Lorençatto e Gabriel Martins que compartilharam conhecimentos e me ajudaram diretamente.

Ao Instituto de Química e à UNICAMP.

À todos meus amigos que de alguma forma me apoiaram nesse período.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo auxílio financeiro concedido para o projeto realizado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

RESUMO

A árvore (urucuzeiro), que fornece o fruto urucum (*Bixa Orellana L.*) é natural da América do Sul e rica em corantes naturais, apresentando-se como uma solução promissora e sustentável para a indústria alimentícia, uma vez que pode ser utilizado como corante natural em alimentos, bebidas e cosméticos.

Através de um estudo multi plataforma envolvendo técnicas cromatográficas e da espectrometria de massas, o foco deste trabalho foi caracterizar e também quantificar alguns compostos e elementos importantes presentes nas sementes de Urucum.

Primeiramente, desenvolveu-se métodos em cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos (LC-DAD) e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) para quantificação e identificação, respectivamente, da bixina - o carotenóide majoritário da semente. Na cromatografia líquida, o método desenvolvido mostrou-se 3 vezes mais rápido que os métodos previamente publicados e obteve-se concentração média de bixina de 17,03 mg/g com desvio padrão relativo (RSD) de 20,6% para os 23 produtores diferentes do estado de São Paulo. Agregaram-se informações com LC-MS, avaliando a massa exata e fragmentação da bixina através do analisador híbrido quadrupolo com tempo de voo (Q-TOF), que apresentou erro de massa ≤ 7 ppm em todas as amostras.

Além disso, foi aplicado um método em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para *fingerprinting* visando avaliar os ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis presentes no óleo da semente das 23 amostras. Dessa forma, foi possível verificar a similaridade entre as amostras, identificando compostos como os ácidos oleico e linoleico, esqualeno, estigmasterol e geranylgeraniol. Durante a etapa de preparo de amostra para a obtenção do óleo da semente foram comparados os métodos de extração de Bligh & Dyer e extração por fluido supercrítico (SFE).

Por fim, foi desenvolvido e validado um método de plasma indutivamente acoplado com espectrometria de massas (ICP-MS) para quantificação elementar de metais tóxicos e não-tóxicos nas amostras. Este método aplicou a diluição por aerossol para avaliar simultaneamente elementos presentes em alta e baixa concentração. O preparo das amostras para esta técnica utilizou um sistema de digestão assistida por microondas. Duas amostras de referência certificada (MRC)

foram analisadas pelo método e apresentaram recuperações entre 80 – 120%. Os valores de alguns elementos quantificados nas amostras foram comparadas com RDC nº42 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e se encaixam nos parâmetros adotados.

ABSTRACT

The tree (Urucuzeiro), which provides urucum fruit (*Bixa Orellana L.*) is native from South America and rich in natural dye, so it is a sustainable and promising solution for food industry, once it can be used as natural dye for food, beverage and cosmetics.

A multi-platform study involving chromatographic techniques and mass spectrometry was performed in order to characterize and quantify important elements and compounds presents in urucum seeds.

Firstly, liquid chromatography-diode array detector (LC-DAD) and liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) methods were developed to quantify and identify, respectively, bixin - the major urucum seed carotenoid. The LC-DAD developed method is three times faster than others recently published and the average bixin concentration found was 17.030 mg/g with relative standard deviation (RSD) of 20.6% to 23 producers from São Paulo state. Additional information was obtained by LC-MS, evaluating the exact mass and bixin fragmentation using the hybrid quadrupole-time of flight (Q-TOF) analyzer, which presented mass error \leq 7ppm for all samples.

Besides, a gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) method was applied for seeds fingerprinting regarding free fatty acids, tocopherols and phytosterols from the 23 samples. It was possible to confirm similarity between the samples by identifying compounds as oleic and linoleic acids, squalene, stigmasterol and geranylgeraniol. Regarding the sample preparation step to obtain the seed oil, it was made a comparison between Bligh & Dyer and supercritical fluid extraction methods.

Lastly, it was developed and validated a plasma inductively coupled-mass spectrometry (ICP-MS) method to quantify toxic and non-toxic elements in the samples. This method applied aerosol dilution to evaluate simultaneously elements in high and low concentration. The sample preparation for this technique used a microwave-assisted acid digestion. Two certified reference material (CRM) were analyzed by this method and presented recoveries between 80 – 120%. The values obtained for some elements were compared to RDC n°42 from Brazilian health vigilance agency (ANVISA) and were within their adopted limits.

Lista de Figuras

Figura 1. Urucum, a) árvore e b) fruto com suas sementes.	21
Figura 2. Estrutura química de A) bixina e B) norbixina	24
Figura 3. Estrutura química da Vitamina E.	27
Figura 4. Estruturas moleculares de fitoesteróis e fitostanóis.	28
Figura 5. Espectro de UV-Visível obtido para bixina por LC-DAD.	38
Figura 6. Cromatogramas obtidos com diferentes fases móveis orgânicas para análise de padrão de bixina 50 mg/L. A) Metanol; B) Acetonitrila	39
Figura 7. Cromatogramas obtidos por LC-DAD do padrão de bixina 50 mg/L avaliando a taxa de aquisição de dados do detector em A) 20Hz e B)120 Hz	40
Figura 8. Curva analítica para bixina obtida por LC-DAD em triplicata nas concentrações: 0,01; 0,025; 0,05; 0,10 e 0,250 mg/mL de acordo com o método da Tabela 2.	41
Figura 9. Cromatograma da amostra 11 para a quantificação da bixina por LC-DAD em 459 nm, com $t_r = 4,59$ minutos.	42
Figura 10. Histograma de concentração de bixina em mg/g em 21 amostras de urucum.	44
Figura 11. Cromatograma gerado na varredura de íons em amostra, comparando número de compostos eluídos A) no modo positivo: 177 e B) no modo negativo: 72	46

- Figura 12.** Espectro de massas de amostras de semente de urucum analisadas por LC-MS em modo de ionização positivo e varredura na faixa de massas 100-1400. 47
- Figura 13.** Identificação da bixina em amostra de semente de urucum com erro de massa de -0,28 pm 48
- Figura 14.** Espectro de massas para o padrão analítico de bixina a 15 mg/L em modo de ionização negativo 49
- Figura 15.** Identificação da bixina A) busca de espectros na base de dados do software com erro de 1,4 ppm e B) espectro MS/MS com os íons gerados na fragmentação do padrão de bixina 49
- Figura 16.** Estruturas dos fragmentos da bixina de maior intensidade encontrados em espectro MS/MS (modo de ionização negativo) 50
- Figura 17.** Espectro MS/MS da amostra 14 com os três principais fragmentos da bixina e seu íon desprotonado. 51
- Figura 18.** Sobreposição dos cromatogramas EIC do íon m/z 393,2 nas concentrações indicadas utilizadas para a construção da curva analítica 52
- Figura 19.** Curva analítica obtida com respectiva equação da reta e coeficiente de determinação no LC-MS 52
- Figura 20.** Exemplo de quantificação para a amostra 18, sendo apresentados (a) cromatograma do íon extraído (para a bixina, m/z 393,2) em modo de ionização negativo, (b) espectro de massas no tempo de retenção da bixina e (c) quantificação de acordo com a equação da reta 53

- Figura 21.** Amostras submetidas a extração de Bligh & Dyer. O sobrenadante foi descartado enquanto o líquido mais escuro (camada inferior) foi evaporado sob N₂ para obter o óleo da semente de urucum 59
- Figura 22.** Amostras de óleo de urucum em vial após a derivatização com BSTFA. 60
- Figura 23.** Mecanismo da reação ocorrida no processo de derivatização por siliilação de esteróis. 62
- Figura 24.** Representação das regiões dos ácidos graxos (1), tocoferóis e tocotrienóis (2) e fitoesteróis (3) obtidos nos cromatogramas da amostra 2. 63
- Figura 25.** Comparação dos espectros de massas experimental e teórico, respectivamente, para (a) ácido oleico e (b) ácido linoleico 64
- Figura 26.** Identificação do geranilgeraniol pela biblioteca NIST através da comparação de espectro de massas (superior) da amostra e (inferior) do banco de dados. 65
- Figura 27.** Sobreposição dos cromatogramas TIC (do inglês, *total ion chromatogram*) para amostra 23 comparando metodologia de preparo de amostra SFE (preto) com método tradicional (azul) 69
- Figura 28.** Sobreposição dos cromatogramas TIC de duas amostras (preto e azul) sem preparo de amostra comparado com método de lavagem, masceração e Bligh & Dyer (vermelho) 69
- Figura 29.** Sobreposição dos cromatogramas TIC comparando preparo de amostra completo (azul) e preparo de amostra com ausência das etapas de lavagem (vermelho) e maceração (preto) 70

Figura 30. Sementes de urucum em vaso fechado a) antes da digestão; b) após a digestão.	75
Figura 31. Espectro de massas em ICP-MS da amostra 15 em A) método He HMI e B) método He.	78
Figura 32. Curva analítica para quantificação de Magnésio por ICP-MS.	79
Figura 33. Curva analítica para quantificação de Cádmió por ICP-MS.	79
Figura 34. Curva analítica para quantificação de Cromo por ICP-MS.	80

Lista de Tabelas

Tabela 1. Gradiente aplicado para separação cromatográfica no LC-DAD	36
Tabela 2. Resultados da quantificação de bixina em amostras de semente de urucum por LC-DAD (n=3)	43
Tabela 3. Rampa de aquecimento do método para ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis	58
Tabela 4. Porcentagem do pó vermelho nas sementes de urucum (%)	61
Tabela 5. Principais compostos encontrados nas sementes de urucum por GC-MS e identificados pela biblioteca NIST	67
Tabela 6. Parâmetros de operação do ICP-MS para aquisição de dados	77
Tabela 7. Figuras de mérito para método desenvolvido por ICP-MS	81
Tabela 8. Teste de exatidão dos elementos nas amostras de referência certificada	83
Tabela 9. Recuperações para amostra de urucum fortificada	84
Tabela 10. Concentração de Mg, K e Ca em % nas amostras	85
Tabela 11. Concentração de Cr, Se, Cd e Pb em µg/kg nas amostras.	86
Tabela 12. Concentração de Al, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo e Ba em mg/kg.	88

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCI Ionização química à pressão atmosférica

BSTFA N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida

CPE Extração pressurizada à frio

Da Dalton

DAD Detector de arranjo de diodos

EI Ionização por elétrons

EIC Cromatograma de íon extraído

ESI Ionização por eletrospray

FAO Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

FDA Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos

GC Cromatografia gasosa

GC-EI-MS Cromatografia gasosa por ionização por elétrons acoplada a espectrometria de massas

GC-MS Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

HOMO Orbital molecular ocupado de maior energia

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

HPLC-ICP-MS Cromatografia líquida de alta eficiência – Plasma acoplado indutivamente acoplado a espectrometria de massas

ICP-MS Plasma acoplado indutivamente acoplado a espectrometria de massas

IUPAC União internacional de química pura e aplicada

JECFA Comitê de Especialistas em Aditivos Alimentares

LC-DAD Cromatografia líquida com detector de arranjo de diodos

LC-ESI-MS Cromatografia líquida por ionização por eletrospray acoplada a espectrometria de massas

LC-MS Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

LD limite de detecção

m/z razão massa carga

MALDI-TOF Ionização e dessorção a laser assistida por matriz com analisador por tempo de voo

MS Espectrometria de massas

MS/MS Espectrometria de massas em tandem

ODS Octadecilsilano

PES Polietersulfona

PVC Policloreto de vinila

Q-TOF híbrido quadrupolo-tempo de voo

RDC Resolução da Diretoria Colegiada

RMN Ressonância magnética nuclear

RPLC Cromatografia líquida de fase reversa

RSD Desvio padrão relativo

SIM Monitoramento de íon selecionado

SFE Extração por fluido supercrítico

TIC Cromatograma total de íons

TCMS Trimetilclorosilano

TMS Trimetilsilil

t_R tempo de retenção

WHO Organização Mundial da Saúde

SUMÁRIO

Capítulo I - Introdução Geral	19
1 Introdução	20
1.1 Urucum – Bixa Orellana	21
1.2 Bixina	24
1.3 Tocoferóis e fitoesteróis	26
1.4 Elementos Químicos	29
Capítulo II - Otimização de método para análise de bixina por cromatografia líquida	32
2.1 Cromatografia líquida para análise de plantas	33
2.2 Objetivos para LC-MS e LC-DAD	34
2.3 Parte Experimental	34
2.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos	34
2.3.2 Amostragem	35
2.3.3 Preparo de Amostra	35
2.3.4 Padrão de Bixina	35
2.3.5 Método LC-DAD	36
2.3.6 Método LC-MS	37
2.4 Resultados e Discussões	37
2.4.1 Bixina por LC-DAD	37
2.4.2 Bixina por LC-MS	45
2.5 Conclusão	54
Capítulo III – <i>Fingerprinting</i> da semente de urucum por cromatografia gasosa	55
3.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para análise de plantas	56
3.2 Objetivos para GC-MS	57
3.3 Parte Experimental	57

3.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos	57
3.3.2 Método GC-MS	57
3.3.3 Preparo de amostra	58
3.3.4 Determinação de pó vermelho da semente de urucum	59
3.3.5 Extração por Fluido Supercritico	60
3.4 Resultados e Discussões	60
3.5 Conclusão	71
Capítulo IV – Plasma acoplado indutivamente a espectrometria de massas para análise elementar de sementes de urucum	72
4.1 Plasma acoplado indutivamente e espectrometria de massas (ICP-MS) para amostras complexas	73
4.2 Objetivos	73
4.3 Parte Experimental	73
4.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos	74
4.3.2 Preparo dos padrões elementares	74
4.3.3 Preparo de Amostra	75
4.3.4 Método ICP-MS	76
4.4 Resultados e Discussões	77
4.5 Conclusão	89
Capítulo V – Conclusão e Referências	90
5.1 Conclusões Gerais	91
5.2 Referências Bibliográficas	93

Capítulo I
Introdução Geral

1. Introdução

O mercado de corantes naturais é de aproximadamente 700 milhões de euros com taxas de crescimento anuais de mais de 10%. Um importante impulsionador deste mercado é o efeito adverso de corantes sintéticos em crianças. Atualmente, 30% dos alimentos e bebidas usam corantes naturais. O maior desafio em converter o restante do mercado para os corantes naturais é o custo adicional, a baixa estabilidade e ocorrência dos pigmentos naturais.

Em termos de legislação, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) limitou, desde 1999, o uso de corantes artificiais para alimentos e bebidas a uma lista contendo 11 compostos. O FDA (do inglês, *Food and Drug Administration*), por sua vez, limita este número a 8.¹

Os carotenóides são o principal grupo de pigmentos usados para tons de amarelo e laranja, representando 60% do volume total neste mercado. A árvore de Annatto (*Bixa orellana* L.) proveniente da América do Sul pode conter acima de 5% de carotenóides nas sementes, o que é de 100-1000 vezes maior que a concentração comumente encontrada em cenouras, fazendo da *Bixa orellana* uma solução promissora e sustentável de um sistema para tais pigmentos. O nível dos principais carotenóides (bixina e norbixina) pode variar significativamente, tipicamente de 1% a 5%, em diferentes cultivos e variações da planta. Ambos os pigmentos são sensíveis a luz e temperatura, e insolúveis em água.^{16,19}

Desta maneira, este trabalho teve como objetivo o estudo da bixina e outros compostos de interesse, como metais e anti-oxidantes, através do uso das técnicas de ICP-MS, GC-MS e LC-MS em amostras de urucum de forma a caracterizar e quantificar os compostos de interesse.

1.1 – Urucum – *Bixa orellana* L.

Bixa orellana, comumente conhecida Urucum, Urucueiro ou Urucuzeiro ou ainda Annatto, pertence à família *Bixaceae* e é uma planta nativa da América Central e do Sul há muito tempo já conhecida por produzir pigmentos naturais. Constitui-se por uma árvore de 3 a 6 metros contendo um dos corantes naturais mais antigos e conhecidos. Foi nomeado em homenagem ao descobridor espanhol Francisco de Orellana e antigamente era aplicado para pintura corporal, tratamento de queimaduras e doenças relacionadas a estômago, protetor solar, repelente contra insetos e outros.¹



Figura 1. Urucum, a) árvore e b) fruto com suas sementes.

Os principais compostos que são encontrados em todas as partes da planta incluem carotenóides, apocarotenóides, terpenos, terpenóides, esteróis, óleos voláteis e compostos alifáticos. Estudos recentes extensos mostraram na última década o isolamento de diferentes classes de fitoconstituintes, como os citados acima, de todas as partes da planta. Estes fitoquímicos demonstram uma diversidade de atividades farmacológicas que incluem antibacteriana, antifúngica,

antioxidante, anticonvulsionante, anticancerígena, antiinflamatória, neurofarmacológica e analgésica.¹

O extrato obtido a partir das sementes de urucum é interessante do ponto de vista industrial uma vez que não é tóxico, apresenta intensa capacidade colorante devido sua ampla faixa de coloração (incluindo os tons vermelho, amarelo e alaranjado) além da estabilidade destes pigmentos frente às condições de processamento². É empregado como corante em alimentos, como queijos, manteiga, chocolates, cereais, temperos de saladas, salgadinhos, além de encontrar aplicação nas indústrias cosmética e farmacêutica, como corante em maquiagens, bronzeadores, entre outros. Extratos de annatto podem ser encontrados em muitas formas no mercado. Podem ser na forma de pó, pasta, óleo ou sólido. O uso das cores pode variar nos países devido as diferenças de alimentação que cada cultura possui.³

Novas aplicações para annatto têm sido descobertas, como potencial atividade repelente para o mosquito *Aedes aegypti*⁴ e efeitos benéficos para diabetes⁵, por exemplo.

Em relação à toxicidade dos extratos de urucum, o JECFA (do inglês, *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives*) da FAO/WHO (do inglês, *Food and Agriculture Organization/ World Health Organization*) em 2002, determinou um limite para ingestão de extrato de urucum, composto basicamente por bixina, de 0,065 mg kg⁻¹ de massa corpórea/dia⁶. A FAO, periodicamente, revisa os estudos publicados, visando manter constante atualização sobre a inocuidade das substâncias utilizadas em alimentos.

Paralelamente, outros autores estudaram a toxicidade dos extratos de urucum, e os resultados são contraditórios. Trabalhos prévios investigaram uma eventual toxicidade associada ao consumo do urucum em ratas prenhas. Nesse estudo, foram administrados por via oral até 500 mg/kg.dia de extrato (28% de bixina) a partir da segunda semana de gestação e nenhum efeito adverso foi observado nas ratas ou fetos, sugerindo que o urucum não apresenta toxicidade ou embriotoxicidade nas condições estudadas⁷. Eventuais efeitos tóxicos do extrato do urucum nas células sanguíneas e do cólon de ratos machos, que foram submetidos a uma alimentação formulada com 20, 200 e 1000 ppm de extrato (5% de bixina)

por 15 semanas foram avaliados em outro estudo e os resultados obtidos indicaram que não houve a ocorrência de danos celulares.⁸

A toxicidade crônica do urucum já foi avaliada em ratos alimentados por 13 semanas com dieta contendo 0,1, 0,3 e 0,9% de extrato (91,6% de norbixina) em relação ao peso corpóreo dos animais. Na concentração de 0,1%, não foram observadas alterações no consumo de água, ganho de peso e nos padrões hematológicos ou oftalmológicos. O aumento de tamanho e peso do fígado foi verificado após duas semanas de tratamento somente nos grupos que consumiram dietas com 0,3 e 0,9% do extrato, em ambos os sexos, constatando-se hipertrofia hepática nos animais submetidos às maiores concentrações de extrato na alimentação.⁹

Sendo assim, cabe reforçar que à medida que novos estudos são realizados, torna-se necessária contínua avaliação da toxicidade desses pigmentos. Uma série de estudos demonstrou que não pode ser negligenciada uma eventual toxicidade dos pigmentos em situações específicas. Sabe-se que, embora a bixina individualmente não promova danos ao material genético, quando associada ao íon cúprico, um metal pró-oxidante, os componentes do urucum desenvolvem um efeito oxidativo sinérgico e podem atuar de maneira deletéria sobre o DNA¹⁰. A resposta alérgica aos componentes do urucum em camundongos foi avaliada em outro estudo no qual o urucum desidratado e os extratos de bixina (84,10%) e norbixina (98,18%) foram individualmente aplicados em camundongos fêmeas. O urucum desidratado promoveu discreto efeito positivo em cobaias utilizadas para identificar potencial alergênico. Os mesmos testes foram realizados utilizando os concentrados de carotenóides, porém, mesmo aplicada em soluções de maiores concentrações (10%), a norbixina não provocou os mesmos efeitos. Por outro lado, a bixina induziu a sensibilização em concentrações significativamente inferiores (0,5%)¹¹. Cabe ressaltar que os experimentos que demonstraram uma eventual toxicidade dos derivados do urucum utilizaram concentrações amplamente superiores aos limites de ingestão determinados pela FAO, demonstrando que, à luz dos conhecimentos atuais, o uso dos derivados do urucum não compromete a segurança dos alimentos quando em acordo com as recomendações.

O Brasil é o principal produtor mundial de Urucum, apresentando uma produção anual de aproximadamente 12 mil toneladas, correspondendo a mais de

70% das 17 mil toneladas produzidas na América Latina¹². O fruto da planta consiste de 10 – 50 sementes cobertas por uma camada fina de pasta avermelhada, macia e ligeiramente pegajosa. Estão presentes em quantidade substancial os compostos carotenóides, principalmente os apocarotenóides bixina e norbixina e outros menos importantes como criptoxantina, luteína, zeaxantina e metilbixina^{13,14,15}.

1.2 Bixina

A bixina tem fórmula molecular $C_{25}H_{30}O_4$, e massa exata 394,214410 Da. Está primariamente presente como *cis*-bixina, contudo, *trans*-bixina, *trans*-norbixina e *cis*-norbixina também são encontrados nas sementes. As estruturas químicas de bixina e norbixina são apresentadas na Figura 2. A *cis*-bixina é solúvel em vários solventes orgânicos e fornece uma coloração laranja, entretanto é altamente insolúvel em óleos vegetais. Em função da sua instabilidade, a *cis*-bixina pode ser facilmente convertida no isômero *trans* – sua configuração mais estável, com propriedades similares a forma *cis*. O isômero *trans* apresenta uma coloração vermelha em solução e é solúvel em óleos vegetais¹⁶.

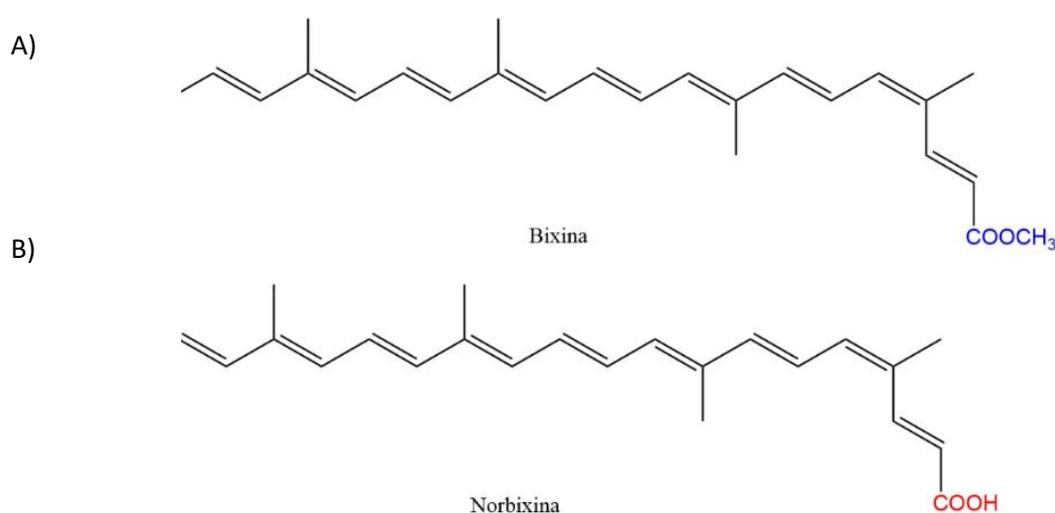


Figura 2. Estrutura química de A) bixina e B) norbixina.

Muitos outros carotenóides (C₁₉, C₂₂, C₂₄, C₂₅, C₃₀ e C₃₂) ocorrem nas sementes de urucum, mas constituem uma porcentagem menor de pigmento.¹⁷ A bixina e a norbixina podem ser identificadas e quantificadas empregando distintas técnicas analíticas, como a Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC, do inglês, *high performance liquid chromatography*)^{18,19,20}, espectrometria UV-VIS (UV-VIS, do inglês, *Ultraviolet-visible*)¹³, Ressonância Magnética Nuclear (NMR, do inglês, *nuclear magnetic resonance*)²¹ e Espectrometria de massas (MS, do inglês, *mass spectrometry*)^{22,23,24}.

Na área da cromatografia, os primeiros trabalhos usavam cromatografia planar e depois evoluíram para HPLC. Inicialmente eram aplicadas separações isocráticas em fase reversa com colunas com fases estacionária do tipo ODS (do inglês, *octadecylsilane*) e metanol/ água com ácido acético como fase móvel obtendo separações de 10 minutos, mas que não eram bem resolvidas e com formato de pico não satisfatório. Por isso outras abordagens foram testadas, incluindo troca de fase móvel, dimensões de colunas, natureza da fase estacionária e o uso do gradiente de fase móvel. Muitos dos métodos desenvolvidos utilizam detecção por um comprimento de onda fixo na faixa do UV-Visível (detectores de UV-Vis) para a bixina ou norbixina, mas a tecnologia do arranjo de diodos (DAD, do inglês *diode-array detector*) combina sensibilidade e especificidade para análises qualitativas e quantitativas e ainda permite monitoramento simultâneo na análise de isômeros com intensidade máxima em diferentes comprimentos de onda.¹⁶

Na Ressonância Magnética Nuclear (NMR) estudos em carotenóides iniciaram na década de 1960 com instrumentação de baixa resolução (40 MHz) para atribuir frequências de ¹H e entender melhor a estereoquímica da molécula. Mais tarde a transformada de Fourier junto com NMR conseguiu atribuir espectros de ¹³C da metil-bixina (*cis* e *trans*) usando compostos deuterados. O NMR de próton em 250 MHz foi usado para confirmar a estrutura de *cis*-bixina e *trans*-bixina e também para identificar seu principal produto de degradação térmica (ácido *trans*-4,8-dimetiltetrahexaenedióico). Além disso, a estrutura do menor apocarotenóide isolado da bixina foi confirmado como metil-90Z-apo-60-licopenato usando NMR de próton em 500 MHz.¹⁶

Muitas revisões já foram feitas sobre a espectrometria de massas, sendo as primeiras na década de 1990 abordando em detalhes as técnicas de ionização,

tandem MS, acoplamento com técnicas cromatográficas e reações de eliminação¹⁶. O primeiro método de ionização por eletrospray (LC-ESI-MS, do inglês *liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry*) para carotenóides empregando gradiente e fase reversa com DAD e MS em série foi em 1995. Em comum com outros carotenóides, os espectros de massas de bixina e norbixina são caracterizados por fragmentações que acarretam na perda de tolueno e xileno pela cadeia principal. A confirmação de outros 12 carotenóides usados como corantes alimentícios foi obtida utilizando APCI (do inglês, *atmospheric-pressure chemical ionization*) com LC-MS (do inglês, *liquid chromatography-mass spectrometry*) em 2004¹⁶. Nessa mesma época a bixina estava entre alguns dos polienos estudados usando alta resolução no MALDI-TOF (do inglês, *matrix-assisted laser desorption ionization – time of flight*) com intuito de explorar a habilidade de moléculas orgânicas neutras em perder um elétron durante a oxidação, processo governado pela energia de ocupação do orbital molecular mais alto (HOMO, do inglês, *highest occupied molecular orbital*) e que pode ser estimado por medidas de potencial.¹⁶

Mais recentemente, foi mostrado que HPLC-DAD em combinação com armadilha de íons⁸¹ e eletrospray pode ser aplicado para análise confirmatória de bixina e norbixina em produtos cárneos usando os íons precursores de m/z (do inglês, *mass-to-charge ratio*) 379 e 395, respectivamente e íons produto de m/z 253, 291, 310 e 355 (norbixina) e m/z 317, 335, 345 e 377 (bixina)¹⁸.

1.3 **Tocoferóis e Fitoesteróis**

O termo genérico “vitamina E” é utilizado para designar oito diferentes compostos, nomeados α -, β -, γ - e δ - (alfa, beta, gama e delta) tocoferóis e também tocotrienóis. Ambos ocorrem em uma variedade de isômeros que diferem na estrutura de acordo com o número e a localização de grupos substituintes no anel cromanol, representando na Figura 3.

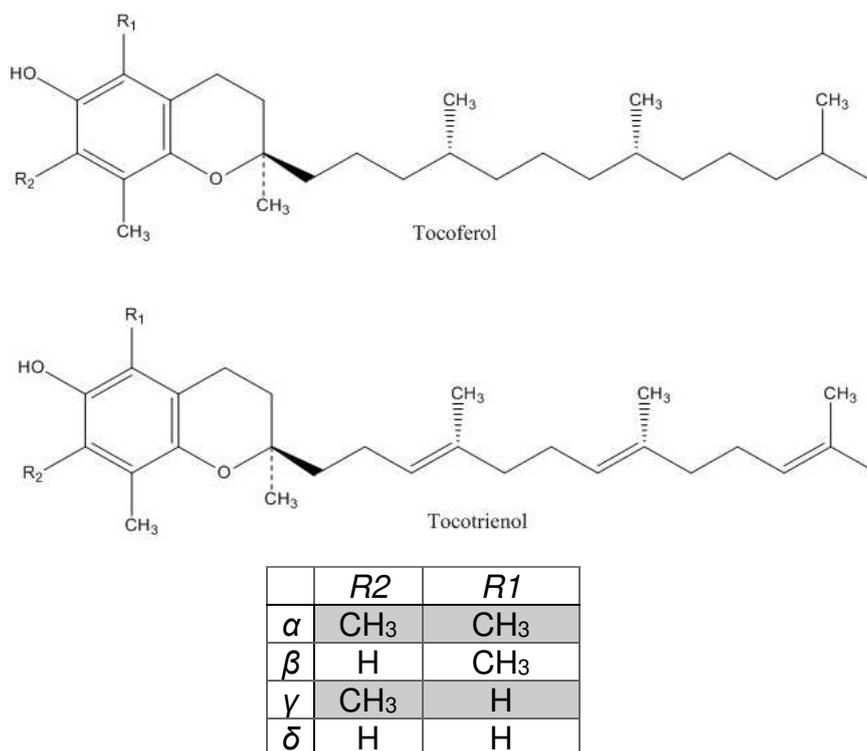


Figura 3. Estrutura química da Vitamina E.

A molécula de tocoferol exibe isomerismo óptico atribuído aos três átomos de carbono assimétricos nas posições 2, 4' e 8', totalizando oito formas estereoisoméricas possíveis. O sistema RS de configuração assimétrica é usado para especificar a quiralidade dos compostos da vitamina E, de acordo com as normas da IUPAC (do inglês, *international union of pure and applied chemistry*).

Tocoferóis e tocotrienóis são encontrados em proporções variáveis em plantas, sendo que as fontes principais são óleos vegetais, sementes oleaginosas, vegetais folhosos verde-escuros e alimentos de origem animal, principalmente gema de ovo e fígado. Os isômeros mais abundantes nesses alimentos são o γ - e o α -tocoferol. Atualmente, não se pode desconsiderar a utilização de alimentos enriquecidos e fortificados como fontes ricas em vitamina E.

A vitamina E tem sido extensivamente estudada em diversas áreas do conhecimento, uma vez que desempenha papéis especialmente importantes no metabolismo de tecidos animais e vegetais. Embora a deficiência não represente um problema de significância nutricional, a ingestão de vitamina E tem despertado interesse e preocupação principalmente nesta última década, uma vez que compõe juntamente com a vitamina C, β -caroteno, selênio e flavonóides, o grupo

denominado antioxidantes alimentares. Este grupo tem sido frequentemente associado à prevenção de doenças neurodegenerativas, aterosclerose, inflamação crônica, câncer e envelhecimento precoce.²⁵

Os óleos vegetais comestíveis, além de possuírem altas concentrações de tocoferóis e alguns tocotrienóis, apresentam grande consumo em nível mundial, constituindo, portanto, os alimentos de maior contribuição para a ingestão de vitamina E. Dentre eles, pode-se citar o óleo de soja como o principal contribuinte para a ingestão de vitamina E pela população.²⁵

Fitoesteróis, fitoestanóis e seus ésteres são esteróides naturais que são componentes importantes na estrutura de membranas de plantas e contribuem para regular a permeabilidade das membranas celulares – são estruturalmente e funcionalmente análogos ao colesterol em animais vertebrados. A maioria dos fitoesteróis contém 28 ou 29 carbonos e uma ou duas ligações duplas Carbono-Carbono. Os fitoestanóis são um subgrupo totalmente saturado dos fitoesteróis (não contém duplas ligações), conforme apresentados na Figura 4.^{26,27}

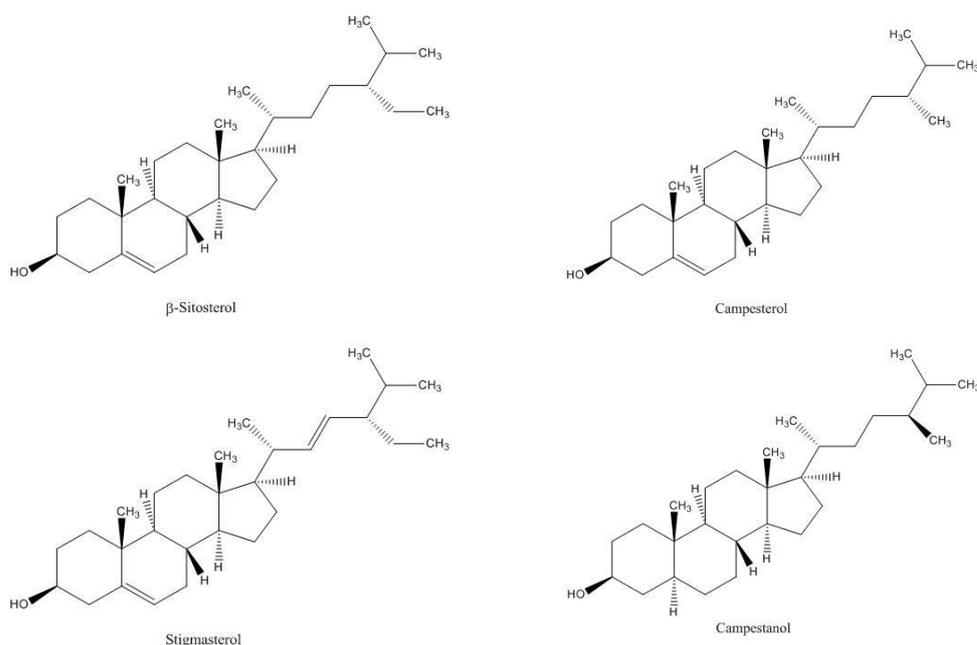


Figura 4. Estruturas moleculares de fitoesteróis e fitoestanóis.

Fontes de alimento de origem vegetal naturalmente ricas nessa classe de compostos incluem uma grande variedade de cereais, frutas, castanhas, legumes e

óleos vegetais. Ainda, alguns alimentos processados são fortificados com fitoesteróis, tais como: chocolates, molhos para saladas e outros. Os fitoesteróis encontrados em alimentos processados e fortificados incluem β -sitosterol, campesterol, estigmasterol, brassicasterol e estigmastanol.^{28,26}

1.4 Elementos Químicos

Elementos químicos ocorrem naturalmente na crosta terrestre e sua concentração no meio ambiente pode variar em diferentes regiões do globo. Sua distribuição é governada por propriedades do próprio metal e influências ambientais. Dos 92 elementos naturais, aproximadamente 30 metais e metalóides são potencialmente tóxicos aos humanos, sendo alguns deles Be, B, Li, Al, Ti, Cr, V, Mn, Co, Ni, As, Se, Sr, Mo, Pd, Ag, Cd, Sn, Sb, Te, Cs, Ba, W, Pt, Au, Hg, Pb e Bi.

O termo metais pesados é genérico para elementos que tem massa molar maior que 40,04 (massa atômica do Cálcio). Eles entram no ambiente por causas naturais e antropogênicas, o que inclui: erosão do solo, mineração, conteúdo industrial, intemperismo natural da crosta terrestre, escoamentos urbanos, agrotóxicos, poluição do ar, entre tantos outros. Embora alguns indivíduos sejam primariamente expostos a esses contaminantes em ambientes de trabalho, a grande maioria da população tem como principal rota de exposição a dieta (alimentos e bebidas). A cadeia de contaminação de metais pesados quase sempre segue uma ordem cíclica: indústria, atmosfera, solo, água, alimentos e humanos. Embora a toxicidade - e a resultante ameaça a saúde humana - seja função da concentração de metais, é conhecido que exposições crônicas a metais pesados e metalóides a níveis relativamente baixos podem causar efeitos adversos. Por isso, existe uma preocupação crescente sobre exposição, ingestões e absorção de metais pesados por humanos.²⁹

A maioria dos metais em óleos de semente provém da própria semente ou são introduzidos durante seu processamento e armazenagem, enquanto a composição mineral da semente depende da presença e disponibilidade dos metais no solo onde a planta cresceu. Outras fontes como fertilizantes e pesticidas usados na colheita podem ser incluídos nessa variação.³⁰

Uma vez que sementes são utilizadas para compor especiarias que podem ser adicionadas aos alimentos de diversas formas (temperos integrais, temperos moídos, óleos essenciais e infusões, entre outros), sabe-se que os condimentos podem conter traços de metais essenciais e tóxicos em uma ampla faixa de concentração, originados de matéria-prima, fontes de contaminação ou adulteração.³¹

Cádmio e Chumbo são elementos altamente tóxicos que se acumulam no sistema biológico e tem longo tempo de meia vida. Eles não são essenciais na nutrição de plantas e facilmente transferidos do solo para planta. A contaminação destes elementos pode se estender ainda através dos fertilizantes a base de fosfato.³² Os níveis de elementos tóxicos em plantas, que ainda incluem Mercúrio e Arsênio, costumam se apresentar em faixas de $\mu\text{g/L}$, necessitando então de instrumentos sensíveis para sua quantificação.³³

O Selênio é um elemento-traço chave, necessário em pequenas quantidades para manutenção da saúde animal. Ele existe em diferentes formas químicas e cada uma delas pode determinar a biodisponibilidade e toxicidade de Se no organismo. As formas inorgânicas mais comuns são selenito e selenato, enquanto na forma orgânica são selenoproteínas, Se-lipídios, Se-aminoácidos e Se-peptídeos. A toxicidade associada ao Se orgânico é menor que aquela associada ao Se inorgânico uma vez que essa última versão não é facilmente absorvida pelo organismo.³⁴ Níveis baixos de Se resultam em condições sub-ótimas de uma ou mais Se-proteínas que são associadas a diminuição do risco de diversas condições como câncer, doenças cardiovasculares, infertilidade, doenças inflamatórias e infecções virais.³⁵

Além disso, alguns elementos comuns como Potássio e Sódio são essenciais para a saúde e sua quantificação usualmente é importante para propósitos nutricionais. Uma vez que as concentrações desses elementos geralmente são altas, instrumentos mais simples podem ser usados para realizar análises de amostras contendo tais elementos, ou uma diluição é necessária quando uma determinação simultânea com elementos tóxicos precisa ser feita.³³

A maioria das técnicas de espectrometria atômica necessita de pré-tratamento das amostras. Vários métodos incluindo extração, solubilização, pré-concentração e diluição são usados para minimizar o efeito de matrizes orgânicas em sementes e óleos vegetais. Na maioria dos casos esses métodos de pré-tratamento são tediosos e consomem tempo ainda com risco de contaminação e perda de analito por uma mineralização incompleta da matriz orgânica. Para isso, o sistema de digestão por microondas em vaso fechado tem oferecido inúmeras vantagens.³²

Para garantir o controle de segurança e qualidade desses aditivos alimentares, o desenvolvimento de métodos analíticos sensíveis para determinação de elementos é de primordial importância.³¹

Capítulo II

Otimização de método para análise de bixina por cromatografia líquida

2.1 Cromatografia líquida para análise de plantas

Produtos naturais podem ser muito diversos^{36,37} e por isso apresentam polaridades distintas³⁸. Dessa forma, um número grande de protocolos pode ser usado nas análises por cromatografia líquida. Para melhorar a resolução e a seletividade da separação pode-se realizar uma otimização através da modificação da coluna (dimensões ou composição da fase estacionária) e das condições de análise por HPLC, tais como natureza e gradiente de fase móvel, temperatura de análise e quantidade de solvente orgânico na fase móvel. No caso de perfil de metabólitos de extratos naturais a grande maioria das aplicações utiliza a fase reversa sendo a fase estacionária de escolha um grupo octadecil ligado a sílica gel (fase C18).³⁹ Essa fase é amplamente utilizada com eluições em gradiente com água e metanol/acetonitrila. Os gradientes constituídos de água/acetonitrila e água/metanol são preferidos porque são totalmente compatíveis com a detecção por espectrometria de massas usando fontes de ionização como ESI ou APCI.

Em alguns casos, nenhuma das tradicionais fases estacionárias como C18 ou ainda C8 auxilia a separação de uma mistura mais complexa ou que contenha analitos polares e por isso fases estacionárias alternativas foram desenvolvidas, tais como alquil C30, alquil polar, a base de compostos aromáticos, entre outras.⁴⁰ Ainda, é relatado o uso de colunas mais recentes e inovadoras como as colunas monolíticas para a aplicação em análises de perfis de metabólitos^{41,42}. A vantagem é que essas colunas, por serem constituídas de um polímero com poros como fase estacionária, apresentam rapidez na separação.^{43,44} Sua desvantagem é a menor variedade de fases estacionárias disponíveis comercialmente.

Uma alternativa também inovadora frente às colunas monolíticas são as colunas de partícula superficialmente porosa. Essas partículas são feitas de um centro sólido não poroso e recoberto por um material poroso e fino e, dessa forma, apresentam alta performance e trabalham em pressão razoável^{41,42}. Essas colunas são largamente utilizadas em diversos tamanhos de partícula e não requerem uma bomba de alta pressão para eluição da fase móvel⁴⁵. Ainda, essas colunas apresentam menor capacidade de carregamento quando comparadas com colunas convencionais de HPLC⁴⁶, sendo que para aplicações usando técnicas mais

sensíveis, como LC-MS, o volume de injeção costuma ficar abaixo da capacidade da coluna.

2.2 Objetivos para LC-DAD e LC-MS

Desenvolver um método rápido por LC-DAD para quantificação de bixina nas sementes de urucum.

Utilizar a técnica de LC-MS com analisador híbrido Q-TOF (do inglês, *quadrupole-time of flight*) para identificar a bixina pela sua massa exata e avaliar sua fragmentação.

Comparar resultados de quantificação entre LC-DAD e LC-MS.

2.3 Parte Experimental

2.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

Utilizou-se um HPLC da linha Infinity modelo 1260 do tipo modular com módulo de bomba quaternária de pressão máxima de 600 bar, amostrador automático, forno de colunas e detector de arranjo de diodos (Agilent Technologies, Waldbrom, Alemanha). O LC-MS também dispõe de um HPLC da linha Infinity modelo 1290 do tipo modular com módulo de bomba binária de pressão máxima de 1200 bar, amostrador automático e forno de colunas; o espectrômetro de massas com fonte de íons eletrospray e analisador híbrido Q-TOF modelo 6550. Para o preparo de amostra foram necessários o banho ultrassônico (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil).

Durante o preparo de amostra foram utilizados os solventes acetona e metanol (Mallinckrodt, St. Louis, USA), água ultrapura Tipo I (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA), padrão analítico de bixina com pureza $\geq 95.0\%$ (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) e tubos de vidro com tampa (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil).

Após o preparo de amostra, utilizou-se de filtros de seringa de membrana PES (do inglês, *polyethersulfone*) com porosidade de 0,2 μm (Agilent Technologies,

Folsom, Califórnia, USA) e vials de vidro de borossilicato de 2 mL, cor âmbar (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA).

2.3.2 Amostragem

As amostras de semente de urucum foram coletadas no mês de agosto de 2015 em 23 propriedades diferentes da região de Monte Castelo/SP (Latitude: 21° 17' 58" S e Longitude: 51° 34' 07" W). Dentre as amostras obtidas de cada propriedade foi retirada uma alíquota representativa de aproximadamente 400 g, que foi dividida em duas partes e embalada à vácuo em sacos plásticos metalizados, de poliéster na parte interna e revestido na parte externa por polietileno, para posteriores análises. As amostras dos 23 diferentes produtores foram codificadas com números de 1 a 23

2.3.3 Preparo de Amostra

A extração de bixina foi feita com solução 50:40:10 (v/v) Acetona:Metanol:Água em réplicas de 15 vezes durante 30 minutos cada (com auxílio do banho ultrassônico), utilizando 9 mL da solução para cada 1 g de semente¹⁹. A quantidade e solventes adequados, bem como o tempo e número de extrações foi previamente estudado e definido usando a metodologia de superfície de resposta e o software Statistica¹⁹.

O volume total final foi evaporado, resuspendido em 1,5 mL de solução 70:30 (v/v) água:acetonitrila (fase móvel) e transferido para o vial, após filtração com filtro de seringa. Tal método de extração foi aplicado tanto às análises por LC-DAD quanto aquelas por LC-MS.

2.3.4 Padrão de Bixina

Para o desenvolvimento do método cromatográfico por LC-DAD e LC-MS utilizou-se o padrão analítico de bixina. Este padrão foi obtido comercialmente em ampola contendo 1 mg e com pureza $\geq 95\%$. Estudos anteriores mostram sua solubilidade em solventes orgânicos como clorofórmio, acetona, acetato de etila, metanol, éter etílico e etanol (ordem decrescente)⁴⁷. Dessa forma, foi preparada

uma solução estoque de 1 mg/mL em acetona e então diluições sucessivas para obtenção das concentrações 0,01; 0,025; 0,05; 0,10 e 0,250 mg/mL para a curva analítica por LC-DAD e das concentrações 5; 6; 10; 12,5; 15 e 20 µg/mL para a curva analítica por LC-MS. Pela dificuldade de se obter uma amostra branco (livre de bixina), não foi possível construir uma curva analítica na matriz da amostra.

2.3.5 Método LC-DAD

O sistema de HPLC realizou a aquisição de dados no arranjo de diodos a 20 Hz, no comprimento de onda 459 nm, com referência em 600 nm e largura de banda 10 nm, usando o software Agilent OpenLab 2.0.

A separação foi realizada em uma coluna Poroshell SB-Aq de 100 mm × 3,0 mm × 2,7 µm em vazão de 1,0 mL/min, 20 µL de volume de injeção, temperatura de 55 °C resultando numa corrida de 12 min, utilizando como fase móvel acetonitrila (B) e água (A), conforme gradiente apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Gradiente de fase móvel aplicado para separação cromatográfica por LC-DAD.

Tempo (min)	% A (Água)	%B (Acetonitrila)
0	70	30
1,5	50	50
3	40	60
6	20	80
9	5	95
12	5	95

Ainda foi aplicado um condicionamento pós-análise de 3 min para equilíbrio da coluna e retorno a condição inicial do gradiente para a próxima injeção.

O método apresentado foi adaptado da literatura, baseado em uma publicação ¹⁹ de 2011. O método base já havia sido validado apresentando limites de detecção, limites de quantificação, linearidade, recuperação e precisão.

2.3.6 Método LC-MS

A separação também foi realizada com a coluna Poroshell SB-Aq de 100mm × 3,0 mm × 2,7 μm, desta vez com vazão de fase móvel de 0,4 mL/min, 2 μL de volume de injeção, temperatura de 55 °C resultando numa corrida de 12 min, utilizando como fase móvel acetronitrila e água. O gradiente utilizado foi o mesmo descrito para LC-DAD (Tabela 2). Um condicionamento pós-análise de 3 minutos também foi aplicado.

Para aquisição dos espectros de massa utilizou-se o analisador híbrido tipo Q-TOF com fonte ESI, utilizando os modos *scan* na faixa de m/z 100 – 1400 e SIM (do inglês, *selected ion monitoring*) em MS/MS (do inglês, *tandem mass spectrometry*) monitorando a bixina pela m/z 393,2, no modo de ionização negativo. O modo positivo foi avaliado pela m/z 395,2 mas não foi aplicado para análise de todas as amostras. Por fim, utilizou-se o software Agilent Masshunter Workstation Data Acquisition versão B.06.01 para aquisição e tratamento de dados.

2.4 Resultados e Discussões

2.4.1 Análise de bixina por LC-DAD

O método em LC-DAD foi desenvolvido com características muito similares ao método LC-MS, alterando principalmente a vazão e o volume de injeção. O gradiente e condicionamento pós-análise aplicados foram os mesmos, porém como a vazão é maior por LC-DAD espera-se que a bixina tenha eluição mais rápida neste método do que no método por LC-MS.

A bixina é um composto que pode ser detectado por arranjo de diodos graças a nove ligações do tipo π - π conjugadas que conferem uma coloração intensa vermelho-alaranjada¹⁶, caracterizando a molécula como um cromóforo. Através do espectro obtido em toda região UV-Visível (200-650 nm) (Figura 4) é possível verificar as regiões de absorção mais intensas entre 450-500 nm, além de nenhuma absorção na região de 600 nm⁴⁸.

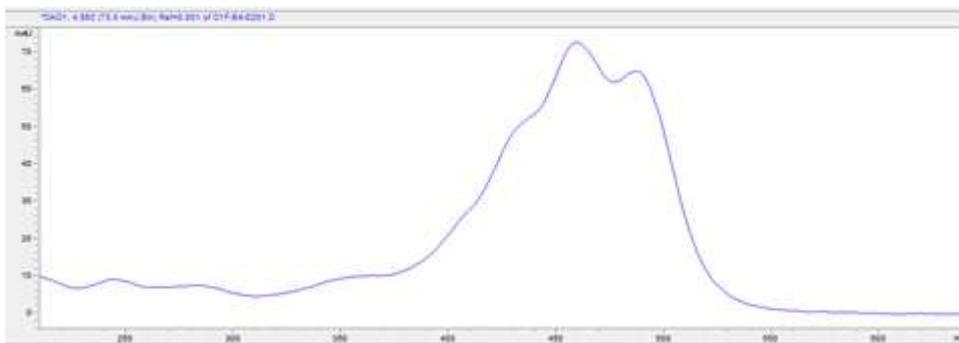


Figura 5. Espectro de UV-Visível obtido para bixina por LC-DAD.

De acordo com informações de estudos prévios e também a interpretação da Figura 4 obtida durante o desenvolvimento deste método, os melhores comprimentos de onda que poderiam ser selecionados para monitoramento são 459 e 487 nm, com a referência em 600 nm. Para este trabalho foi escolhido aleatoriamente o valor de 459 nm.

O solvente da fase orgânica (acetonitrila) foi adotado por gerar menor pressão no sistema e ter bons resultados em relação a formato de pico e linha de base, porém ainda são relatados na literatura o uso de metanol e acetona^{19,20,21}. Quando comparados diretamente como fase orgânica para este método, metanol ou acetonitrila, nota-se uma eluição mais rápida da bixina quando em acetonitrila em relação ao metanol ($t_R = 7,6$ minutos com metanol enquanto $t_R = 4,6$ minutos com acetonitrila) e ainda um pico mais eficiente com a acetonitrila em relação ao metanol (Figura 5). A eluição de compostos costuma ser mais adiantada em acetonitrila de forma geral (não apenas para bixina), uma vez que este solvente tem maior força cromatográfica e por isso os analitos interagem menos com a fase estacionária e então são detectados mais rapidamente.

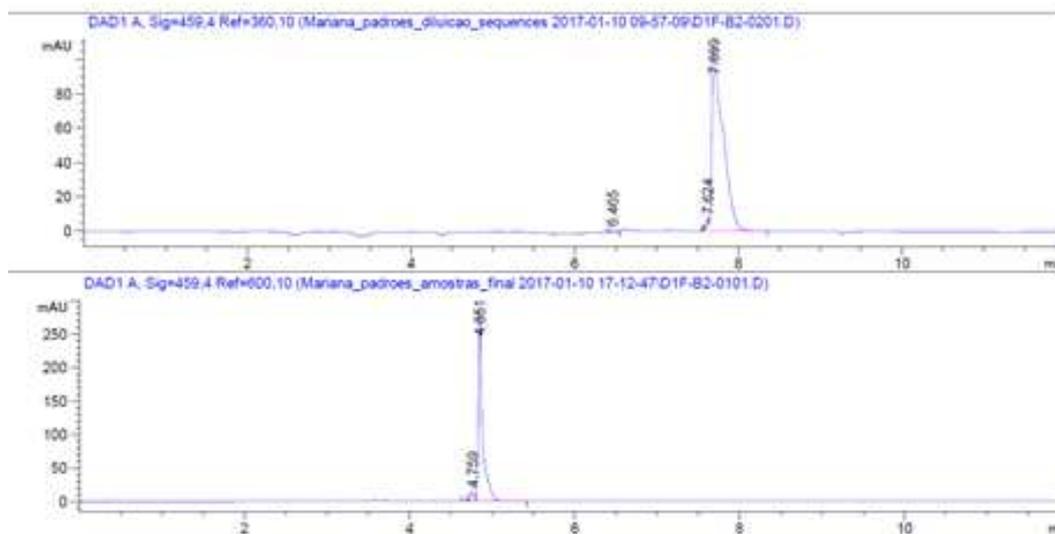


Figura 6. Cromatogramas obtidos com diferentes fases móveis orgânicas para análise de padrão de bixina 50 mg/L. A) Metanol; B) Acetonitrila

Também testou-se a adição de 2% de ácido fórmico na fase móvel aquosa, entretanto isso não gerou mudanças significativas nas análises dos padrões e, por isso, não foi aplicado nas análises posteriores.

Uma etapa muito importante durante o desenvolvimento desse método foi a escolha da coluna cromatográfica. Com intuito de obter uma separação rápida e eficiente, mas ainda em baixa pressão escolheu-se uma coluna com partículas superficialmente porosas de tamanho 2,7 μm , que consegue fornecer eficiência muito similar a colunas sub-2 μm ao mesmo tempo em que a pressão resultante no sistema não ultrapasse 600 bar, sendo assim adequada para o cromatógrafo líquido utilizado neste projeto. A fase estacionária octadecilsilano (C18) que foi utilizada já foi citada em diversos trabalhos anteriores, com pequenas diferenças apenas na marca e dimensões da coluna.⁴⁹ O método usado como base para desenvolvimento desse método aplicava uma coluna C18 nas dimensões 250 mm \times 4.6 mm \times 5.0 μm .

Na cromatografia líquida, a eficiência da coluna cromatográfica está diretamente ligada ao tamanho de partícula (de forma inversamente proporcional), ou seja, quanto menor for o tamanho de partícula, maior será a eficiência obtida e com isso mais estreitos os picos cromatográficos serão e conseqüentemente é maior a capacidade de pico da coluna. Por utilizar essa coluna mais eficiente e em

comprimento ligeiramente menor que trabalhos prévios (100 mm), a eluição da bixina foi rápida e, portanto, a corrida pôde ser mais curta. Alguns trabalhos recentes com esse tipo de sistema relataram tempos de retenção entre 18 e 38 minutos.^{19,50} Tempos de retenção menores já foram obtidos, porém com sistemas de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e com possível co-eluição de picos.²⁰

Por fim, foi avaliada a taxa de aquisição de dados do detector de arranjo de diodos a 20, 40, 80 e 120 Hz. Na Figura 7 são apresentados os resultados na menor e maior taxa de aquisição de dados avaliadas, respectivamente

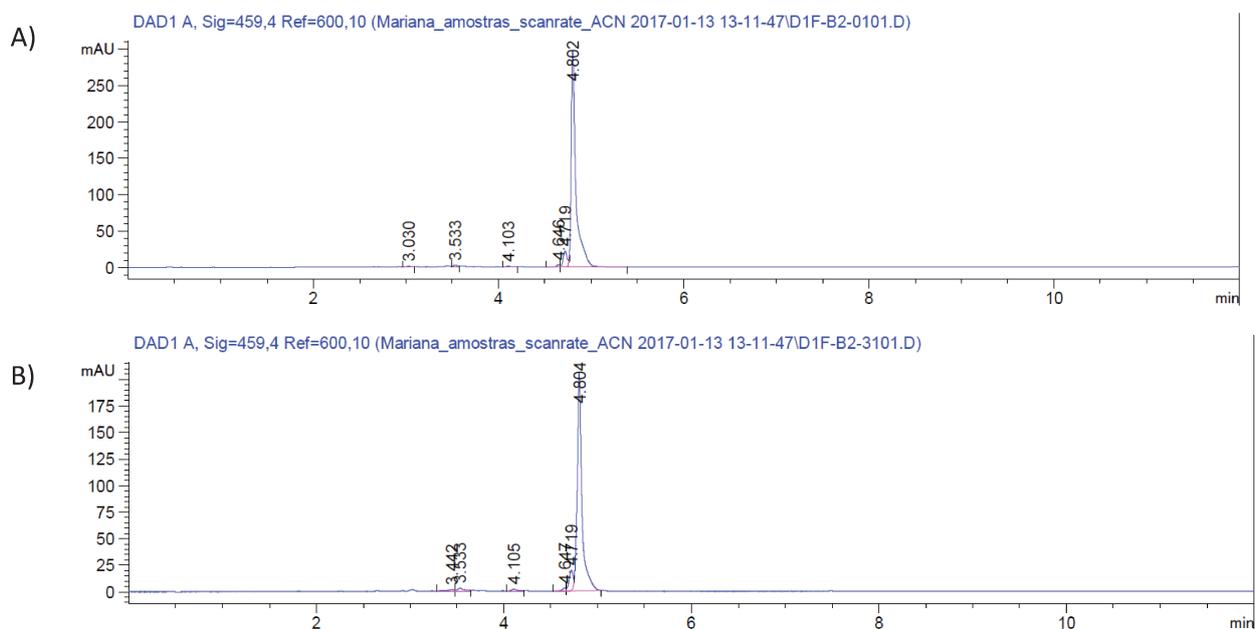


Figura 7. Cromatogramas obtidos por LC-DAD do padrão de bixina 50 mg/L avaliando a taxa de aquisição de dados do detector em A) 20Hz e B)120 Hz.

Por tratar-se de um método a baixa pressão e que não utiliza colunas com tamanho de partículas inferior a 2 μm , a mudança na taxa de aquisição de dados não fornece mudanças significativas nos cromatogramas, conforme apresentado.

Após todos os testes para desenvolvimento e otimização do método por LC-DAD, as diluições da solução estoque do padrão analítico de bixina nas concentrações 0,01; 0,025; 0,05; 0,10 e 0,250 mg/mL foram utilizadas para

construção da curva de analítica (Figura 8), visando a quantificação do analito nas amostras provenientes dos 23 produtores.

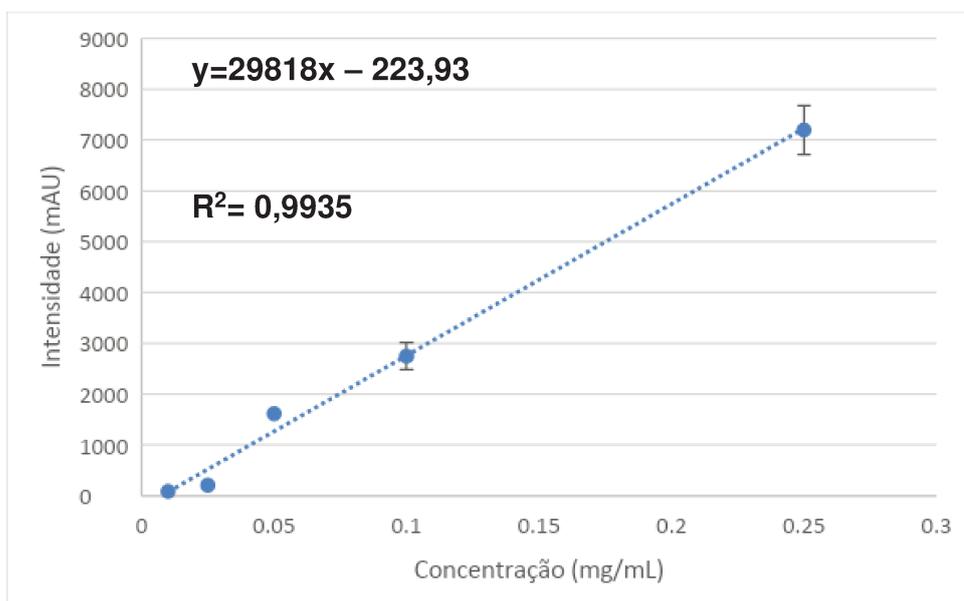


Figura 8. Curva analítica para bixina obtida por LC-DAD em triplicata nas concentrações: 0,01; 0,025; 0,05; 0,10 e 0,250 mg/mL de acordo com o método da Tabela 2.

É importante citar que foi estudado o uso de acetona ou fase móvel (70% água e 30% acetonitrila) para as diluições dos padrões. Notou-se que ambas poderiam ser utilizadas, porém optou-se por utilizar a diluição com fase móvel uma vez que tratam-se de baixas concentrações de bixina (não há risco portanto de precipitação) e porque dessa forma assemelha-se mais as condições de solubilização das amostras.

Com a curva analítica construída as amostras foram analisadas e em seguida quantificadas para a bixina de acordo com a equação da reta obtida. É importante mencionar que para quantificação de acordo com a curva analítica previamente obtida a maioria das amostras necessitou de diluição para atender as expectativas de concentração pré-estabelecidas. Os valores finais de concentração (C_{extrato}) foram calculados considerando o volume final de solução no vial (V_{vial}), o volume de extrato tomado como alíquota inicial (V_{extrato}) e a concentração calculada no vial (C_{vial}), conforme equação abaixo.

$$C_{extrato} = \frac{C_{vial} \times V_{vial}}{V_{extrato}}$$

Para cada amostra (que se refere a um produtor) foram realizadas análises em triplicata. A Figura 9 ilustra um cromatograma representativo da análise de uma amostra com detecção em 459 nm.

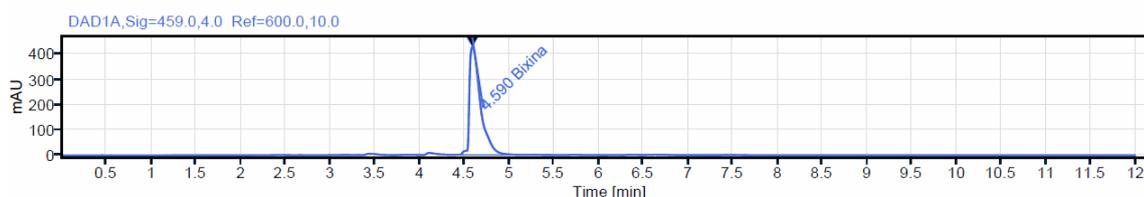


Figura 9. Cromatograma da amostra 11 para a quantificação da bixina por LC-DAD em 459 nm, com $t_r = 4,59$ minutos.

A Tabela 2 mostra a média da quantificação para cada amostra com seu desvio padrão obtido na determinação da concentração de bixina a partir da curva analítica. Os valores são apresentados em mg/g, levando em consideração a massa de semente utilizada, o fator de concentração do processo de extração e o fator de diluição para a injeção.

Os fatores mais importantes a serem considerados na dificuldade em quantificar bixina nas sementes são a heterogeneidade das amostras e o alto efeito matriz que deve existir. A curva analítica foi preparada em solvente enquanto as amostras sofrem do efeito matriz pela presença de lipídios, proteínas, açúcares, entre outros interferentes.

O efeito de matriz pode influenciar a performance da análise tanto na identificação quanto quantificação de um analito. Na parte quantitativa ele pode limitar a reprodutibilidade, linearidade e exatidão dos métodos, sendo imprevisível uma vez que sua ocorrência é estritamente relacionada a natureza da amostra. Embora o efeito matriz não possa ser completamente evitado durante algumas análises, ele pode ser minimizado ou compensado otimizando o preparo de amostra, as

condições da cromatografia líquida e até mesmo uma seleção cuidadosa da técnica usada. Um exemplo de facilmente diminuir o efeito matriz é diluir a amostra.^{51,52}

Tabela 2. Resultados da quantificação de bixina em amostras de semente de urucum por LC-DAD (n=3).

Amostra	Média ± Desvio (mg/g)
1	16,1 ± 3,2
2	1593 ± 339
3	23,1 ± 8,0
4	112,5 ± 96,4
5	27,2 ± 11,5
6	18,3 ± 0,8
7	14,8 ± 2,3
8	16,4 ± 0,7
9	15,4 ± 0,2
10	21,8 ± 1,5
11	13,6 ± 1,2
12	14,8 ± 3,0
13	14,4 ± 0,1
14	14,9 ± 2,0
15	14,8 ± 0,3
16	15,9 ± 2,5
17	22,2 ± 7,3
18	13,7 ± 1,9
19	16,0 ± 1,7
20	14,3 ± 0,6
21	18,1 ± 3,7
22	15,5 ± 0,3
23	16,5 ± 4,4

Para estes dados, em uma quantidade significativa de amostras foi necessário remover uma das três medidas por ter sido observado um valor muito diferente em relação a todos as demais. Na maioria das vezes, atribuiu-se essa diferença a medida 3. Logo, conclui-se que durante o terceiro procedimento de extração para estas amostras podem ter ocorrido falhas que acarretaram em quantificações inadequadas. Ainda, analisando as médias apresentadas na Tabela 3 constata-se que para as amostras 2 e 4 houve uma grande diferença de valor em relação as outras amostras. Avaliando as três medidas de cada uma dessas amostras, especificamente, foi possível compreender que os valores foram muito

altos porque haviam medidas com valores extremamente discrepantes, e por isso são consideradas anômalas e, portanto, foram descartadas.

Excluindo a situação da medida 3 em grande parte das amostras e a situação específica das amostras 2 e 4, ambas explicadas acima, os resultados obtidos são considerados satisfatórios tendo em vista a complexidade das amostras trabalhadas. Desconsiderando as amostras anômalas, o valor médio das 21 amostras é de $17,03 \pm 3,51$ mg/g com RSD (do inglês, *relative standard deviation*) de 20,6%. Ainda sem as amostras anômalas, estes valores foram colocados em um histograma (Figura 10), demonstrando a frequência de concentração de bixina na população de amostras trabalhada.

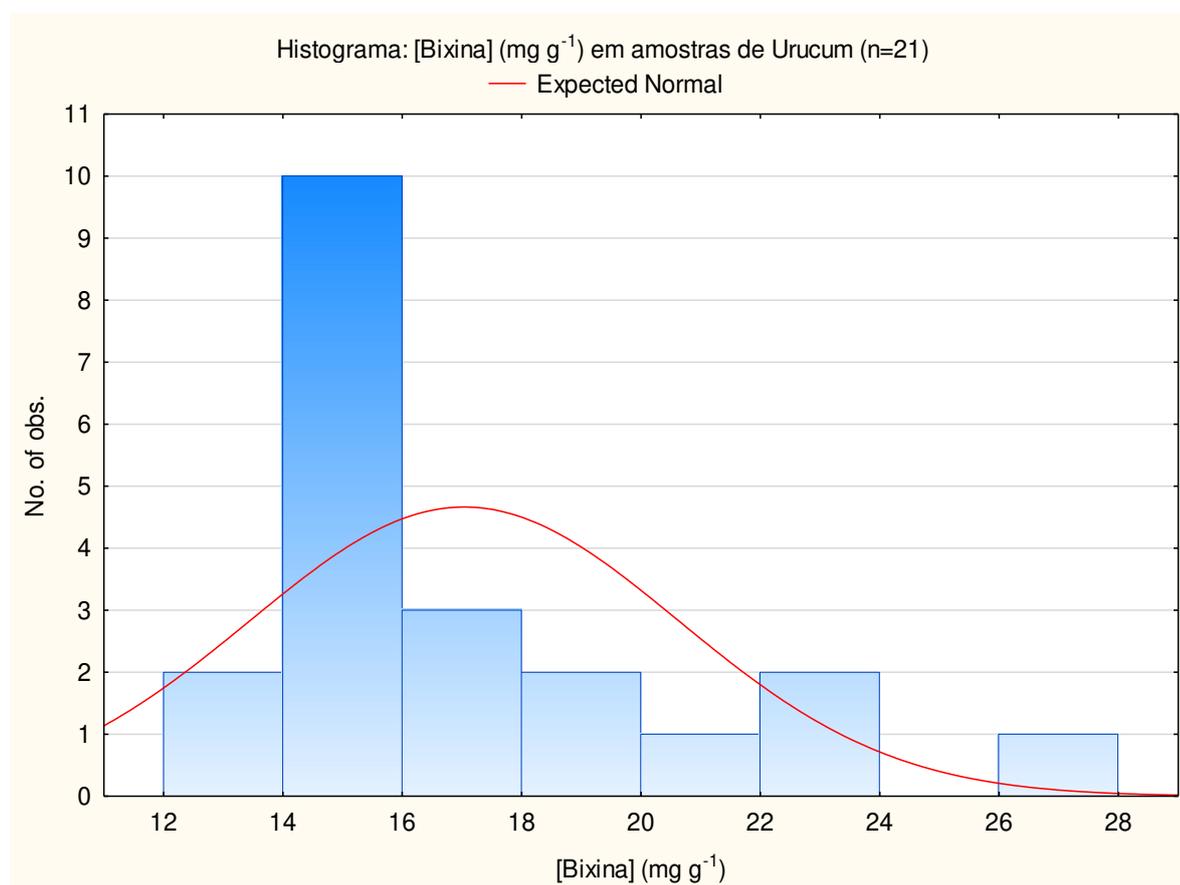


Figura 10. Histograma de concentração de bixina em mg/g em 21 amostras de urucum.

Observa-se pelo histograma que existem muitas amostras com concentração entre 14 e 16 mg/g e quase todas as amostras estão dentro do intervalo de 12 – 24 mg/g, sendo essa última informação importante para comparação com um

estudo recente¹⁹ que indica a faixa de 12 – 23 mg/g para amostras de urucum obtidas de um mercado local em Campinas/SP em agosto de 2008.

2.4.2 Análise de bixina por LC-MS

O método por LC-MS foi otimizado através de testes de diferentes fases móveis, solubilidade de amostras, vazão de fase móvel e volume de injeção, visando obter principalmente estabilidade da linha de base e intensidade dos íons satisfatória nos espectros de massas. Alguns parâmetros designados para o LC-DAD puderam ser mantidos e aplicados neste método por LC-MS. No que tange as dimensões da coluna cromatográfica, é interessante mencionar que o diâmetro interno de 3,0 mm da coluna utilizada neste trabalho forneceu versatilidade para aplicá-la tanto no método por LC-DAD, na vazão de 1,0 mL/min, quanto no método por LC-MS, aplicando vazão de 0,4 mL/min. O uso dessa coluna em LC-DAD resulta em menor consumo de fase móvel frente àquelas de 4,6 mm de diâmetro interno (mais conhecidas e rotineiramente aplicadas nesse tipo de sistema) enquanto para o método de LC-MS permite trabalhar nas mesmas vazões que as aplicadas em colunas de 2,1 mm (também mais conhecidas e rotineiramente aplicadas para a espectrometria de massas).

As primeiras análises foram feitas com solução de padrão de bixina na concentração de 0,015 mg/mL. O ácido fórmico foi relatado como modificador orgânico da fase móvel que favorece a ionização em modo positivo¹⁹, entretanto, no modo de ionização negativo os testes com ácido fórmico favoreceram a formação de diversos adutos, deixando a linha de base mais ruidosa, picos com baixa intensidade e ainda o surgimento de outros íons de m/z similar ao da bixina. Para LC-MS, sabe-se que é necessário favorecer a ionização para melhores resultados e considerando que a bixina é uma molécula com caráter ácido ($pka \approx 4.8$ ⁵³), sua ionização será desfavorecida em meios ácidos. Independente do solvente orgânico, é preferível manter a molécula em meio neutro ou então alcalino para favorecer sua forma desprotonada. Por conta dessas informações e testes adicionais em meio alcalino e neutro, ficou definido o uso de fase móvel acetonitrila e água, sem adição de ácidos ou bases. Por esses motivos, não foi aplicado por LC-MS, assim como por LC-DAD, o uso de modificadores de fase móvel.

Apesar de ter selecionado o modo de ionização negativo para o trabalho, uma vantagem notável do uso do modo positivo de ionização é o maior número de compostos eluídos usando o modo *scan*, o que pode ser útil para investigação de compostos desconhecidos, realizando uma varredura de todos os íons e assim obtendo um *screening* da amostra. A Figura 11 mostra uma comparação do número de picos cromatográficos identificados como compostos na amostra realizando o *scan* na faixa de massas de m/z 100-1400, no modo positivo e no modo negativo de ionização, respectivamente.

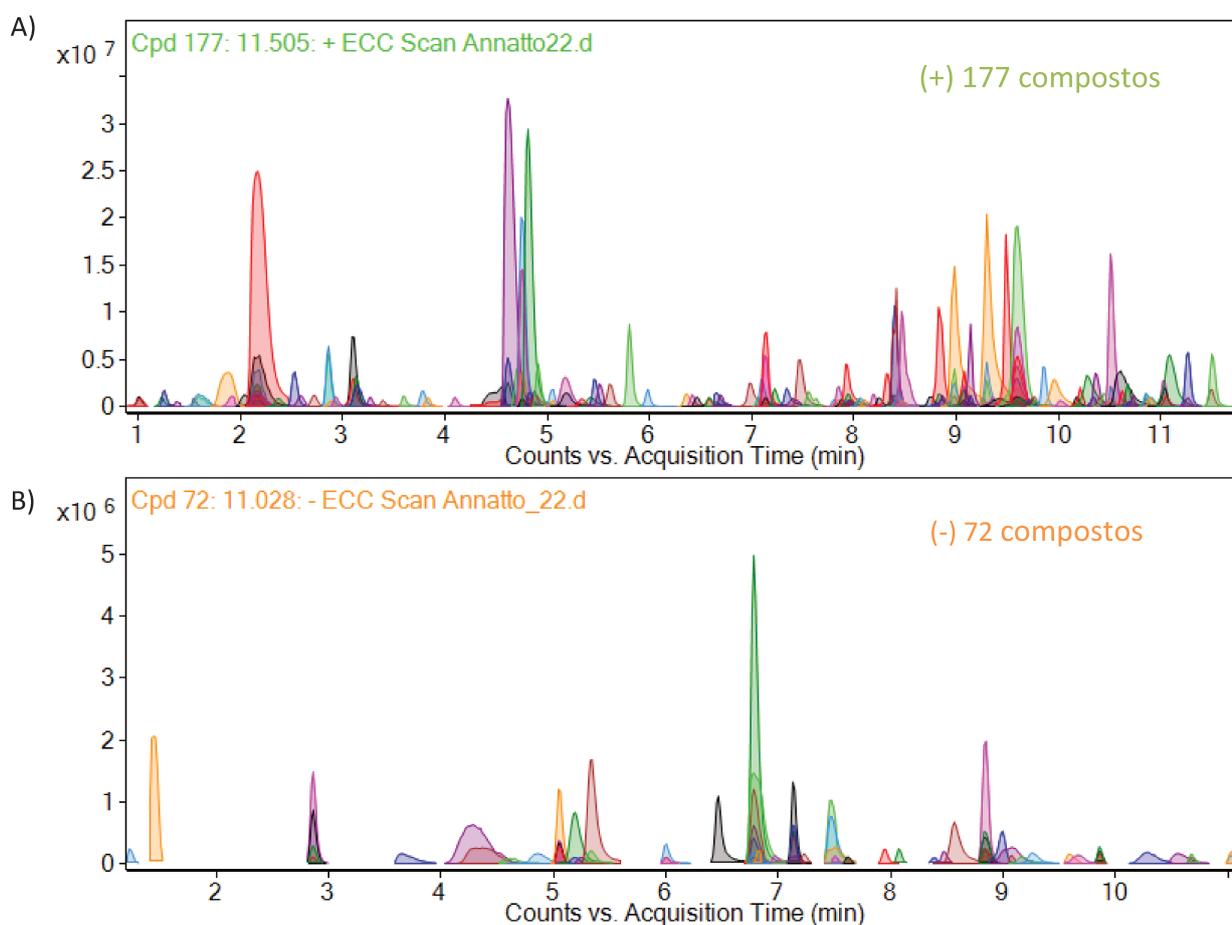


Figura 11. Cromatogramas de íons totais da varredura de íons em uma amostra representativa de semente de urucum, comparando o número de compostos identificados A) no modo positivo de ionização: 177 e B) no modo negativo de ionização: 72.

Avaliando o modo positivo de ionização com amostras de semente de urucum, foi possível identificar a bixina protonada ($[M+H]^+ = 395,21$) (Figura 12), na qual três amostras diferentes foram analisadas em modo *scan*.

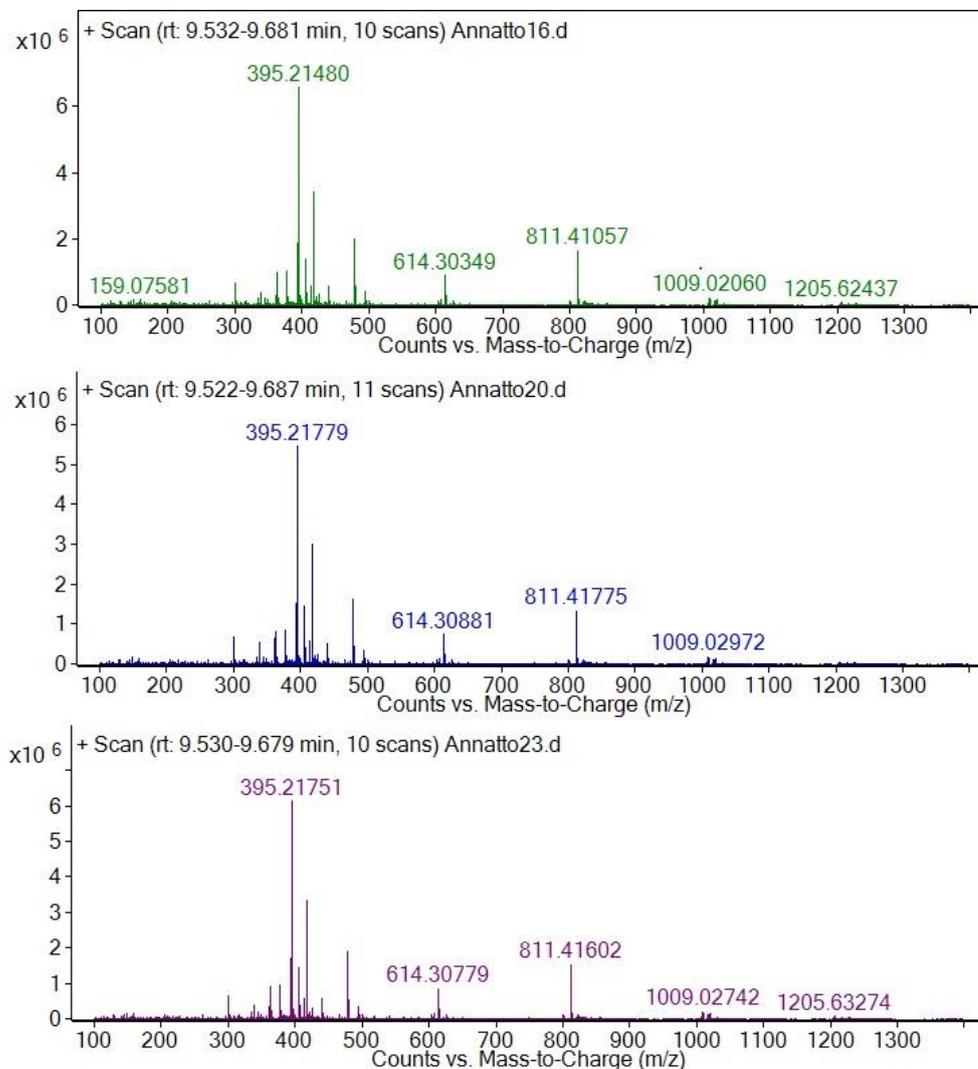


Figura 12. Espectro de massas de amostras de semente de urucum analisadas por LC-MS em modo de ionização positivo e varredura na faixa de massas 100-1400.

Para avaliar essa identificação, os valores de massa exata atribuídos a bixina protonada nessas análises (MM_{medida}) podem ser comparados com o valor de massa exata da bixina protonada calculada ($MM_{calculada}$), baseada na informação de massa exata da fórmula molecular $C_{25}H_{31}O_4$ (395,222235 Da), conforme a seguinte equação.

$$\Delta MM \text{ (ppm)} = \frac{MM \text{ medida} - MM \text{ calculada}}{MM \text{ calculada}} \times 10^6$$

Este erro de massa pode ser positivo ou negativo, e é importante sempre usá-lo em comparações com medidas únicas, e não um valor médio gerado através de diversas medidas.⁷⁷

Aplicando a equação mencionada acima encontra-se que a amostra Annatto 20 (Figura 12) tem um erro atribuído de -11 ppm. Ademais, analisando os dados de erro de massa, de forma geral, foi possível constatar que as análises em modo de ionização positivo demonstraram erro de massa maior que aquelas em modo de ionização negativo. Esse foi um dos fatos que motivou, durante o desenvolvimento de método, a escolha do modo negativo de ionização para este trabalho. A Figura 13 demonstra um exemplo de identificação da bixina com baixo erro de massa atrelado.

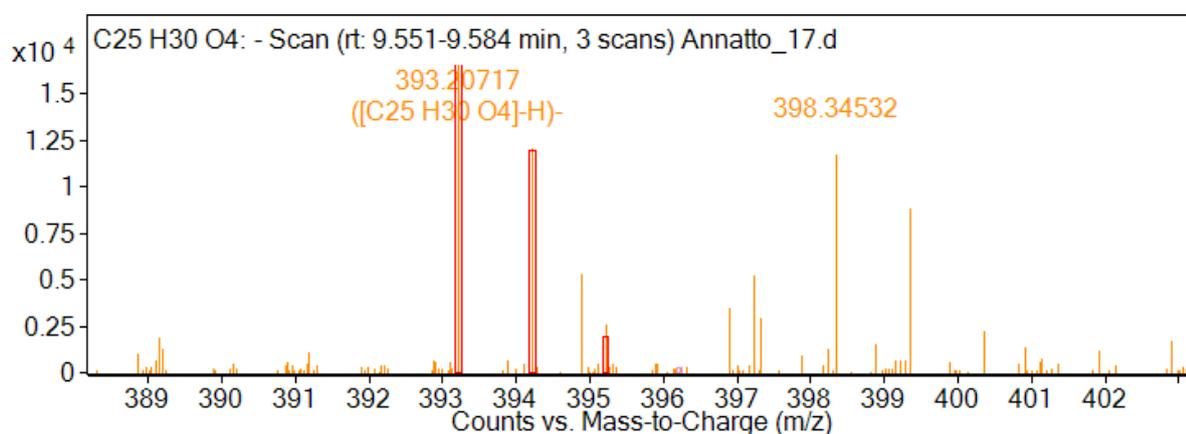


Figura 13. Identificação da bixina em amostra de semente de urucum com erro de massa de -0,28 ppm.

Nas condições do método por LC-MS a bixina eluiu em aproximadamente 6,7 minutos e pode-se observar uma linha de base pouco ruidosa e a intensidade de íons satisfatória. O espectro de massas em modo de ionização negativo para o padrão de bixina mostra o íon m/z 393,20566 como íon mais intenso (Figura 14).

Adicionalmente foi realizada uma análise no modo MS/MS com fragmentação da bixina, usando a informação do tempo de retenção identificado. Essa análise foi realizada então num modo chamado de *Product Ion* (íon produto), fazendo referência a íons produzidos pela fragmentação de um composto que está

no tempo de retenção selecionado. Do resultado gerado, foi feita uma busca de espectros na base de dados para indicação de uma possível estrutura molecular. A sugestão do software é apresentada na Figura 15 (A), nomeada como $[C_{25}H_{30}O_4 - H]^-$ (bixina desprotonada) e que também pode ser confirmada pela sua estrutura molecular. Os principais fragmentos gerados pelo composto que foi confirmado como bixina estão contidos na Figura 15(B).

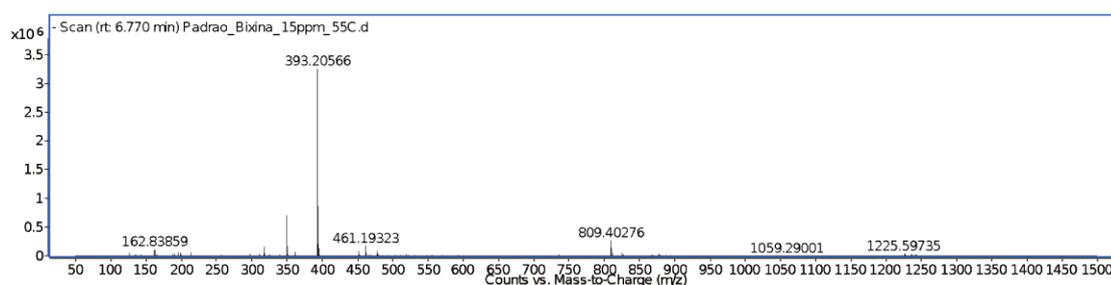


Figura 14. Espectro de massas para o padrão analítico de bixina a 15 mg/L em modo de ionização negativo.

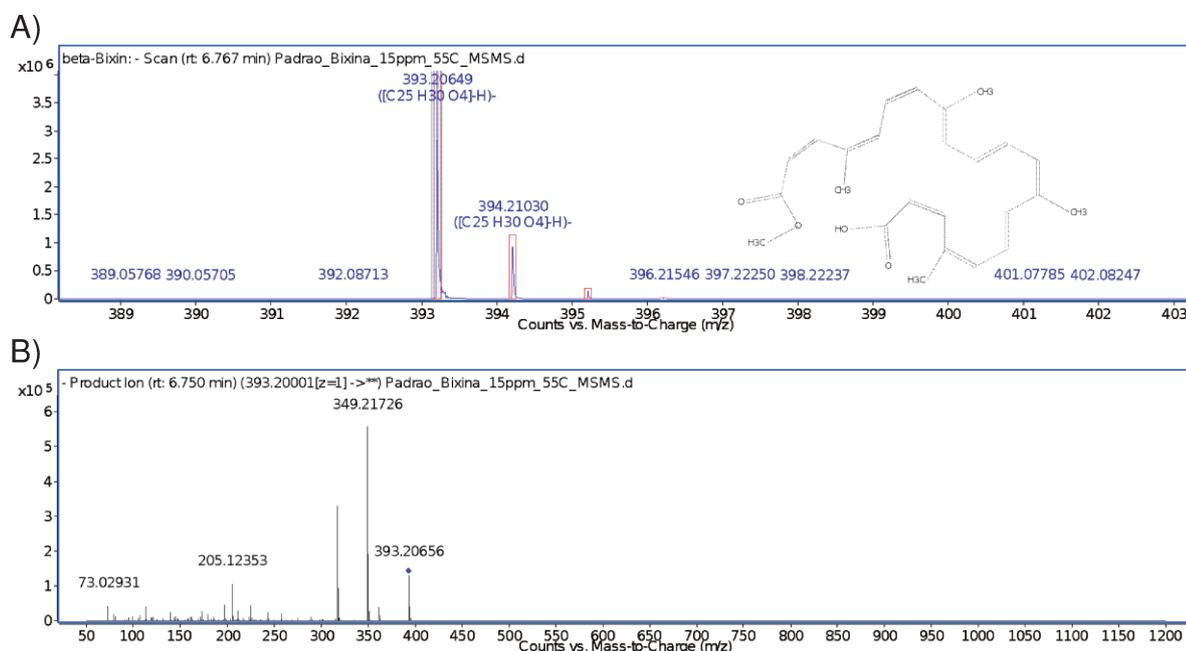


Figura 15. Identificação da bixina A) busca de espectros de massas na base de dados do software com erro de 1,4 ppm e B) espectro de fragmentação do padrão de bixina.

Neste modo MS/MS, os principais fragmentos da Figura 14(B) que permitem a caracterização da bixina em modo negativo são os íons m/z 349, referente a perda de $-COO$ radicalar, bem como m/z 317 e m/z 361 que caracterizam perda de $CH_3OH+COO$ radicalar e perda de CH_3OH respectivamente¹⁹. Suas estruturas são apresentadas na Figura 16.

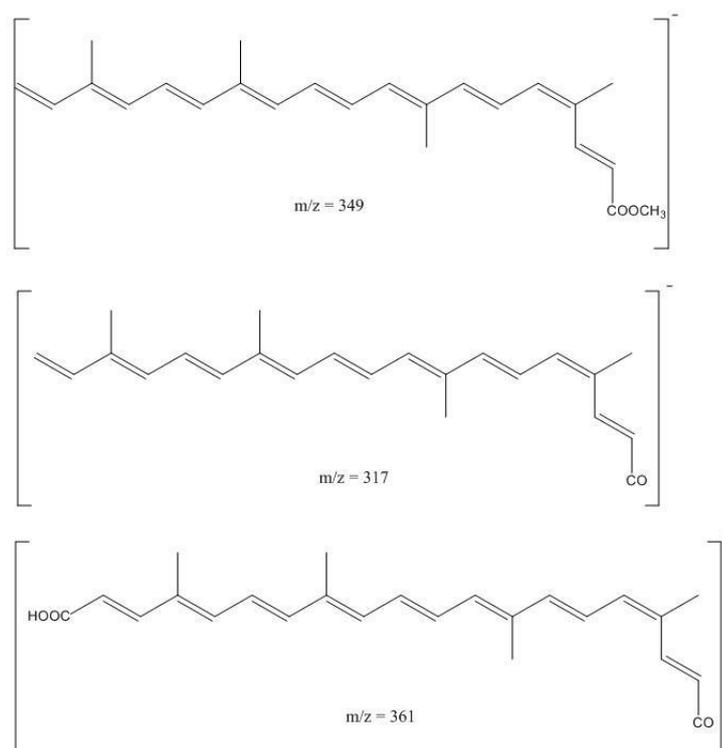


Figura 16. Estruturas dos fragmentos da bixina de maior intensidade encontrados em espectro MS/MS (modo de ionização negativo).

Estes fragmentos também são visualizados nos espectros de massas das amostras. A Figura 16 apresenta um espectro de massas MS/MS da amostra 14, no qual são indicados os íons dos fragmentos apresentados e novamente suas estruturas.

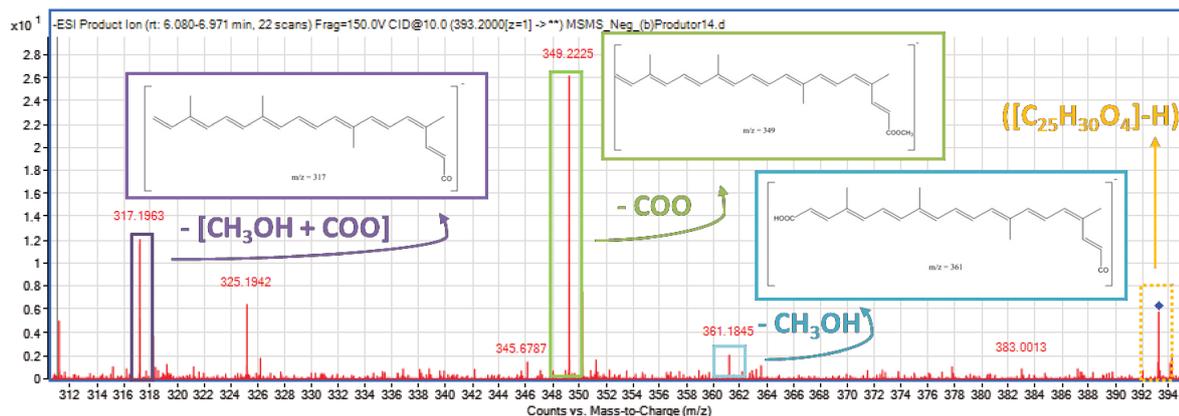


Figura 17. Espectro MS/MS da amostra 14 com os três principais fragmentos da bixina e seu íon desprotonado.

Nota-se na Figura 17 a baixa intensidade do íon desprotonado, devido a sua fragmentação, e a maior intensidade dos fragmentos. O íon m/z 349 é o mais intenso, seguido do íon m/z 317 e por fim o íon m/z 361.

Uma vez que a bixina e seus fragmentos foram confirmados em todas as amostras de urucum, avaliou-se a construção de uma curva analítica para bixina. A maioria das quantificações em LC-MS é feita usando analisadores triplo quadrupolo devido a sua alta sensibilidade, principalmente em aplicações de analitos em baixa concentração. No entanto, trabalhos prévios mostram que é possível fazer quantificações com Q-TOF²³ respeitado a faixa linear de concentração deste analisador, que tende a ser menor que as dos triplos quadrupolo.

A curva analítica foi construída na faixa de concentração de 5 a 20 $\mu\text{g/mL}$ com 6 pontos e nas seguintes concentrações: 5 $\mu\text{g/mL}$; 6 $\mu\text{g/mL}$; 10 $\mu\text{g/mL}$; 12,5 $\mu\text{g/mL}$; 15 $\mu\text{g/mL}$ e 20 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 17).

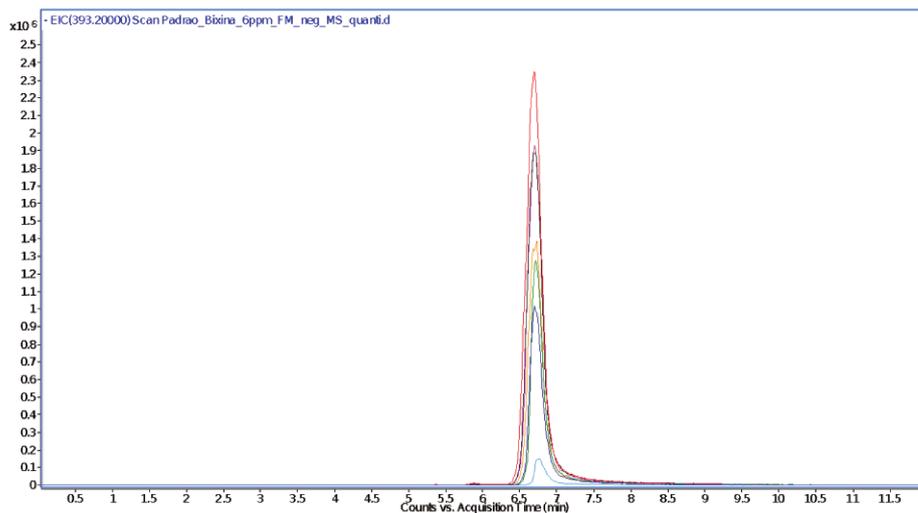


Figura 18. Sobreposição dos cromatogramas dos íons extraídos (m/z 393,2) nas concentrações 5; 6; 10; 12,5; 15 e 20 $\mu\text{g/mL}$ utilizadas para a construção da curva analítica.

A curva analítica que foi gerada através destes cromatogramas (Figura 18) é mostrada na Figura 19 com sua equação da reta e coeficiente de determinação (R^2).

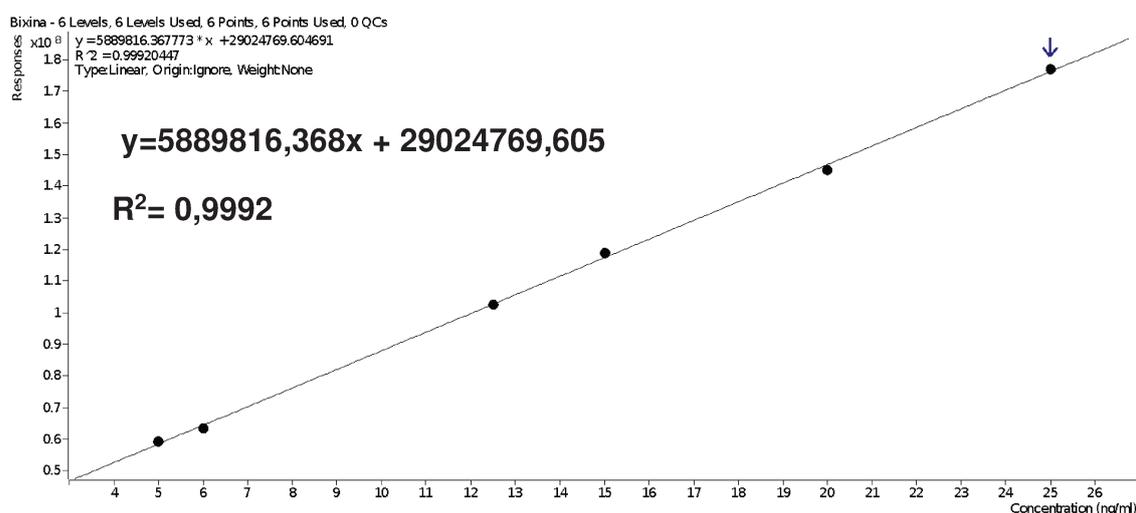


Figura 19. Curva analítica obtida com respectiva equação da reta e coeficiente de determinação para quantificação de bixina por LC-MS.

Foram realizados alguns testes de diluição para obter a melhor proporção solvente:extrato, considerando a intensidade do íon m/z 393,2.

Através do software Masshunter Quantitative algumas amostras foram quantificadas de acordo com a equação da curva analítica (Figura 19 e Figura 20c). Usando as ferramentas de software quantificou-se a bixina na amostra 18, apresentando concentração de 15,1990 $\mu\text{g/mL}$. Nas quantificações por LC-MS são fornecidas as informações de separação cromatográfica (Figura 20 a), espectro de massas (Figura 20 b) e quantificação (Figura 20 c).

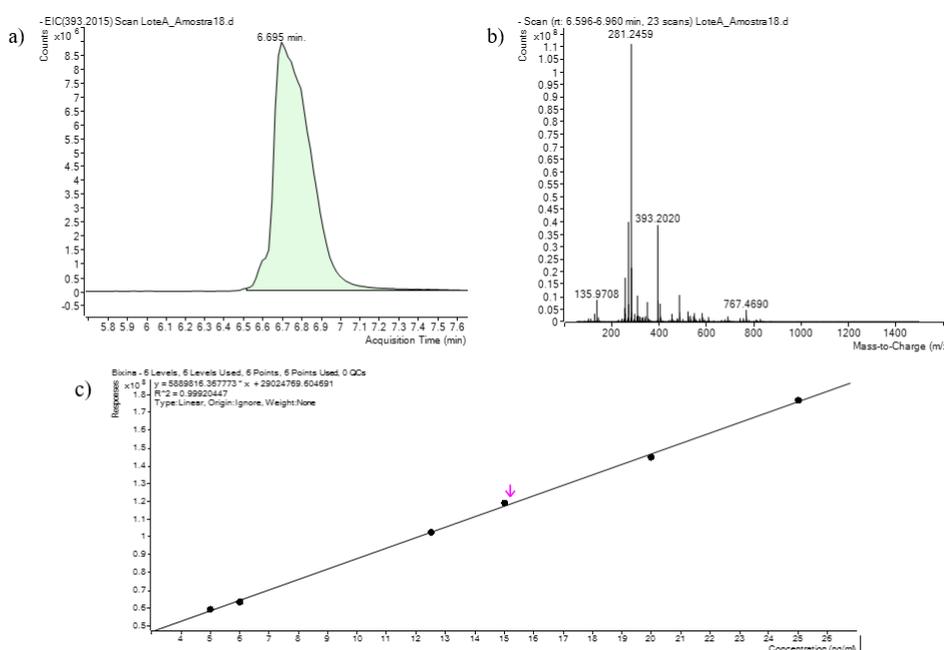


Figura 20. Exemplo de quantificação para a amostra 18, sendo apresentados (a) cromatograma do íon extraído para a bixina (m/z 393,2) em modo de ionização negativo, (b) espectro de massas no tempo de retenção da bixina e (c) quantificação de acordo com a equação da reta.

A concentração de bixina encontrada na amostra 18 foi de 15,2 $\mu\text{g/mL}$ em solução. Levando em consideração a massa de semente e as diluições realizadas durante o preparo de amostra, obtém-se a concentração de 12,9 mg/g de semente. Comparando os conjuntos de resultados das quantificações por LC-MS e LC-DAD e realizando os testes estatísticos, teste-t e teste-F, conclui-se que os conjuntos de dados são equivalentes.

O número de trabalhos que fazem uso das técnicas de LC-DAD e LC-MS, da mesma forma como abordado neste capítulo, para quantificar e identificar compostos em plantas e alimentos tem crescido constantemente^{79,80,81} e por isso infere-se que esta abordagem apresentada é adequada e atual para o tema.

2.5 Conclusão

Um método rápido por LC-DAD foi desenvolvido e utilizado para quantificação de bixina em todas as amostras. Os principais parâmetros avaliados no desenvolvimento do método foram composição da fase móvel e gradiente, comprimento de onda monitorado e referência e a taxa de aquisição de dados. As amostras 3, 5, 10 e 17 destacaram-se pela maior concentração de bixina, todas superiores a 20 mg/g. As amostras 2 e 4 foram consideradas anômalas por apresentarem concentrações muito discrepantes das demais e portanto tiveram seus valores descartados. O valor médio de bixina encontrado nas sementes foi de 17,03 mg/g e está de acordo com a estimativa previamente publicada¹⁹ que menciona o intervalo de 12 a 23 mg/g baseado em amostras de semente de urucum de outra localidade do estado de São Paulo em 2008.

Com a mesma coluna cromatográfica (fase reversa, C18 de partículas superficialmente porosas), um método LC-MS com fonte ESI foi desenvolvido para identificação da bixina através da sua massa exata (analisador híbrido Q-TOF). Por apresentar menor erro de massa nas amostras, o modo de ionização negativo foi aplicado no método. Todas as amostras tiveram erro de massa ≤ 7 ppm. Ainda, usando o modo MS/MS foi possível identificar os principais fragmentos da bixina, sendo eles $C_{24}H_{30}O_2^-$ (m/z 349), $C_{23}H_{26}O^-$ (m/z 317) e $C_{24}H_{26}O_3^-$ (m/z 361), apresentando suas estruturas e o espectro de massa MS/MS das amostras.

Capítulo III

***Fingerprinting* da semente de urucum por cromatografia gasosa**

3.1 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) para análise de plantas

A técnica de GC-MS (do inglês, *gas chromatography-mass spectrometry*) também têm possibilitado separações e identificações de compostos de misturas complexas na pesquisa de produtos naturais. O GC-MS utilizado com coluna tipo capilar demonstra alta capacidade de pico e usando EI (do inglês, *electronic ionization*) as massas, ainda que com resolução nominal, geram espectros padrão que podem ser facilmente pesquisados em bancos de dados, uma vez que a energia de ionização é fixada em 70 eV.

Entretanto, a restrição primária do método é que os analitos devem ser voláteis e termicamente estáveis e por isso a técnica é restrita a análise de compostos voláteis de origem vegetal (óleos essenciais, fragrâncias, aromas, etc)⁴⁶. O GC-MS pode ser útil também para análise de constituintes não-voláteis uma vez que etapas de derivatização e enriquecimento das amostras sejam aplicados previamente.^{54,55} Portanto, embora análises por LC-MS não necessitem de uma etapa de derivatização, GC-MS continua sendo uma das técnicas analíticas mais empregadas com alta aplicabilidade em metabolômica de produtos naturais, especialmente para análise de metabólitos primários.^{56,57}

Para aumentar a volatilidade e estabilidade térmica dessas moléculas, diversos derivatizantes podem ser usados para proteger os grupos funcionais tais como OH, COOH, NH e SH. Como exemplo, reações de alquilação, siliilação e acilação tem sido utilizadas.^{55,54} Contudo, as etapas de derivatização podem aumentar a complexidade da análise pela possibilidade de reação incompleta, introdução de erros e aumento do tempo de análise total.⁵⁸

Devido a alta reprodutibilidade da fragmentação de massas observada em EI, uma das grandes forças em GC-EI-MS (do inglês, *gas chromatography-electronic ionization-mass spectrometry*) é a possibilidade da comparação fiel entre instrumentos baseado na identificação de compostos pela pesquisa e comparação com uma biblioteca.⁵⁹

3.2 Objetivos

Obter o perfil de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis nas 23 amostras de sementes de urucum. Verificar as similaridades e diferenças das amostras, utilizando bases de dados disponíveis com informações complementares sobre os principais compostos encontrados.

Avaliar o método de preparo de amostra para obtenção do óleo da semente, verificando a necessidade de cada etapa do processo para, se possível, otimizar a extração.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

As análises por GC-MS foram realizadas em um equipamento modelo 7890A/5975 com fonte EI inerte (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, USA) e coluna cromatográfica de fase HP-5ms, de composição 5% fenil e 95% poli-dimetil-siloxano (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, USA). Para o preparo das amostras utilizaram-se os solventes clorofórmio, iso-octano, metanol (Mallinckrodt, St. Louis, USA) e água ultrapura Tipo I (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA), além de almofariz e pistilo de porcelana, pipetas de vidro tipo pasteur e nitrogênio líquido. O derivatizante escolhido foi o N,O-bis-trimetilsilil-trifluoroacetamida (BSTFA) 1% trimetilclorosilano (TCMS) (Cerilliant, Texas, USA). Ao final, as amostras foram transferidas para vials de vidro de borossilicato de 2 mL, cor âmbar (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, USA).

3.3.2 Método GC-MS

A injeção da amostra foi feita no modo *split* na razão 1:10, volume de injeção de 2 µL e temperaturas do injetor e MS ambos a 280 °C. O gás Hélio foi empregado como gás de arraste com vazão de 1 mL/min. A separação foi feita utilizando uma coluna HP-5ms de 30 metros de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura do filme e um gradiente de temperatura durante a análise (Tabela 3. A temperatura da linha de transferência entre o CG e o MS foi de 250 °C e o

sistema de aquisição de dados foi efetuado através do software ChemStation versão E.02.01 que acompanha base de dados de espectros contidos na biblioteca espectral NIST MS versão 8.0.

Tabela 3. Gradiente de temperatura do método GC-MS para análise de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis em sementes de urucum.

Taxa (°C/min)	Temperatura (°C)	Tempo de Equilíbrio (min)
	40	0
8	270	0
15	280	5

3.3.3 Preparo de amostra

Para a análise simultânea de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis⁶⁰ utilizou-se o óleo extraído do urucum, sem pigmento. Para obter as sementes de urucum preparadas de forma adequada para a análise de GC-MS, quatro principais etapas foram necessárias, sendo elas: 1) lavagem da semente; 2) trituração das sementes; 3) extração de Bligh & Dyer⁶¹ e 4) derivatização. Inicia-se este processo com 0,6 g de amostra. A etapa 1 foi realizada em água corrente de forma manual e deixado secar (da mesma forma que será abordado em seguida, com detalhes, na seção 3.3.4 deste Capítulo). Na etapa 2 utilizou-se um kit de almofariz e pistilo e nitrogênio líquido para auxílio na trituração das amostras. A etapa 3 foi feita em tubos de vidro com tampa e usando clorofórmio, água e metanol como solventes extratores com auxílio de vórtex e centrífuga. Primeiramente adicionou-se 1,4 mL de água ultrapura, 4 mL de metanol, 2 mL de clorofórmio e agitou-se por 5 minutos em vórtex. Nesta mistura foi adicionado mais 2 mL de clorofórmio e agitou-se novamente em vórtex, por 2 minutos. Por fim, adicionou-se 2 mL de água ultrapura e agitou-se por 5 minutos no vórtex. A mistura foi centrifugada por 5 minutos. O resultado foi um líquido bifásico com a parte sólida das sementes intermediando os líquidos imiscíveis. O sobrenadante (parte aquosa) foi descartado e a parte orgânica foi transferida usando pipetas pasteur de vidro para um vial para secagem usando gás Nitrogênio (Figura 21).



Figura 21. Amostras submetidas a extração de Bligh & Dyer. O sobrenadante foi descartado enquanto o líquido mais escuro (camada inferior) foi evaporado sob N_2 para obter o óleo da semente de urucum.

Em seguida, o extrato foi submetido ao processo de derivatização⁶² (etapa 4), na qual utilizou-se a proporção 1:2 óleo: BSFTA 1% TCMS. De forma geral com a quantidade inicial de amostra utilizada obteve-se pequenas quantidades de óleo da semente (variando entre 0,003 e 0,005 g), e por isso a quantidade de BSFTA 1% TCMS sempre foi adicionada de acordo com a proporção mencionada acima mas sendo calculada individualmente para a quantidade de óleo obtida em cada amostra. Por fim, uma diluição em iso-octano⁶³ foi feita, visando obter um volume total no vial de cerca de 400 a 500 μL (Figura 21). Aguardou-se 3 horas para início das análises.

3.3.4 Determinação de pó vermelho da semente de urucum

Para avaliar a porcentagem do pó vermelho que recobre a semente do urucum foram pesadas em balança analítica cinco sementes de cada uma das 23 amostras. Em seguida, as sementes foram lavadas manualmente em água corrente, de maneira a retirar todo o pó vermelho, e deixadas em local seco e ventilado por 24h. Então foram novamente pesadas. Esse procedimento foi realizado em triplicata e a proporção de pó vermelho e semente sem o pó foram expressas em porcentagem de massa (% m/m). Na Tabela 4 encontram-se os resultados de média e desvio para a quantidade de pó vermelho nas 23 amostras de urucum.



Figura 22. Amostras de óleo de urucum em vial após a derivatização com BSTFA.

3.3.5 Extração por Fluido Supercrítico

Esta opção de preparo de amostra foi avaliada durante o trabalho na tentativa de obter um método simples e rápido para remover os interferentes da semente e possibilitar a análise de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis por GC-MS. A extração foi feita em sistema comercial SFE modelo 7071 da Applied Biosystem (Speed SFE Laboratory System, 7071, Applied Separations, Allentown, USA) equipado com bomba pneumática e forno elétrico, com recipientes de extração de 6,57 e 290 mL (Thar Designs, CL 1373, Pittsburg, USA). O solvente utilizado foi dióxido de carbono (99,2% CO₂, Gama Gases Especiais Ltd., São Bernardo do Campo, Brasil), que foi resfriado a 263 K em banho termostaticado (Marconi, MA-184, Piracicaba, Brasil) antes de atingir a bomba. O recipiente foi montado no forno, mantido na temperatura selecionada. O extrato foi coletado em vials de vidro âmbar de 100 mL, submersos em banho de gelo a pressão ambiente. O valor total de CO₂ foi medido com um totalizador de fluxo (LAO, modelo G0,6, Osasco, Brasil); o CO₂ não foi re-circulado. Após a extração, o vial de vidro ficou em um dessecador por 10 minutos para total eliminação do CO₂. Todas essas condições reproduzem um estudo publicado recentemente já otimizado para sementes de urucum.⁶⁴

3.4 Resultados e Discussões

Na Tabela 4 são apresentados os resultados da determinação de pó vermelho nas sementes de urucum, em relação ao seu peso total.

Tabela 4. Porcentagem do pó vermelho nas sementes de urucum (% m/m).

Amostra	Média ± Desvio (% m/m)
1	11,00 ± 0,07
2	12,59 ± 0,06
3	13,08 ± 0,78
4	10,39 ± 0,63
5	14,26 ± 1,12
6	14,27 ± 0,52
7	9,73 ± 1,04
8	12,84 ± 1,72
9	11,99 ± 1,62
10	13,93 ± 0,56
11	11,13 ± 0,54
12	14,21 ± 1,92
13	11,81 ± 0,35
14	13,46 ± 0,23
15	10,96 ± 0,94
16	13,61 ± 0,69
17	13,72 ± 0,80
18	14,54 ± 0,70
19	8,81 ± 1,22
20	11,97 ± 0,91
21	10,85 ± 0,47
22	10,51 ± 1,52
23	11,94 ± 2,23

Devido a alta massa molar e baixa volatilidade dos tocoferóis e fitoesteróis a análise por GC-MS requer uma etapa de preparo de amostras envolvendo derivatização. O mecanismo da reação de derivatização é mostrado na Figura 23, onde ROH são os esteróis e o trimetilsilano é o grupo reativo do BSTFA.

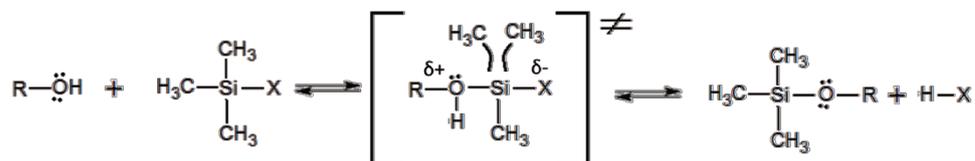


Figura 23. Mecanismo da reação ocorrida no processo de derivatização por sililação de esteróis.

Esta reação caracteriza-se por uma substituição nucleofílica bimolecular, onde os hidrogênios ativos de ROH são substituídos pelo grupo silano, o que diminui a polaridade e aumenta a volatilidade dos compostos.

Após o preparo de amostra das sementes de urucum as análises por GC-MS foram feitas com corridas de 37 minutos. Todas as amostras apresentaram um perfil cromatográfico muito similar, observando-se primeiramente a eluição de ácidos graxos, seguidos pelos tocoferóis e por fim os fitoesteróis – moléculas conhecidas como ácido hexadecanóico (ou ácido palmítico), ácido octadecaenodióico (ou ácido esteárico), esqualeno, gama-tocoferol, estigmasterol e beta-sitosterol foram detectadas em todas as amostras.

A Figura 24 ilustra com mais detalhes as regiões características de cada uma das classes de compostos presentes. A região designada como 1 refere-se a localização dos ácidos graxos, seguido pela região 2 referente aos tocoferóis e tocotreinóis e, por fim, a região 3 onde encontram-se os fitoesteróis. Os valores de m/z escolhidos para os cromatogramas de íon extraído observados na Figura 22 referem-se a picos intensos observados para todos os compostos relevantes de cada uma das regiões, sendo m/z 117 para os ácidos graxos, m/z 129 para fitoesteróis e m/z 209 e 223 para tocoferóis.

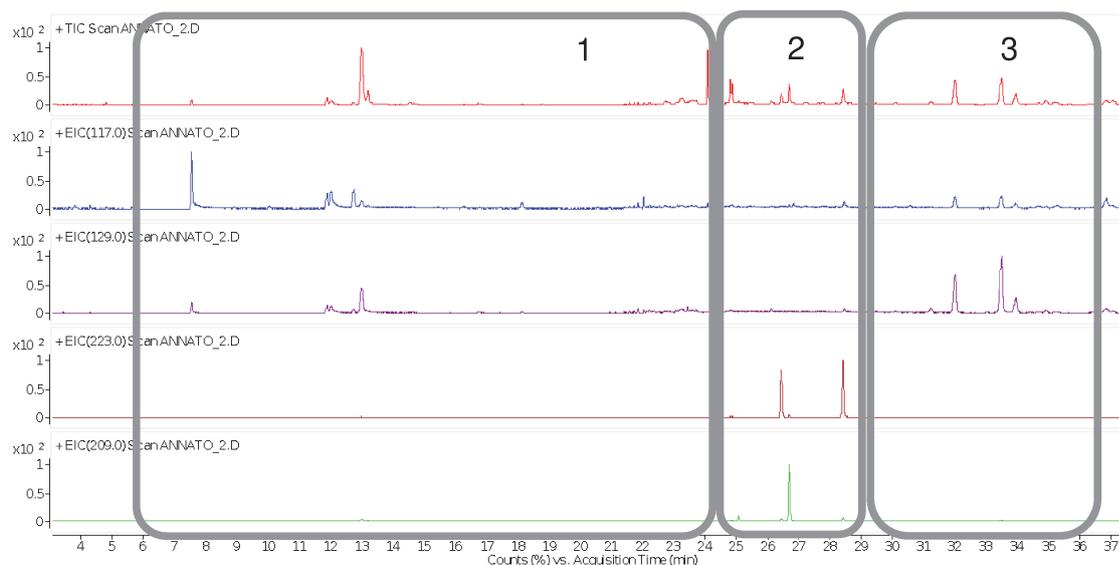


Figura 24. Representação das regiões dos ácidos graxos (1), tocoferóis e tocotrienóis (2) e fitoesteróis (3) obtidos na análise da amostra 2 por GC-MS.

Para obter informações mais detalhadas dessas regiões fez-se então uma integração de todos os picos cromatográficos utilizando *threshold* de 17,0, visando ao mesmo tempo a eliminação de ruído sem perda de possíveis compostos de interesse.

Analisando a primeira região dos cromatogramas encontrou-se uma grande quantidade de derivados de ácidos carboxílicos de cadeia alifática longa (conhecidos como ácidos graxos), na forma derivatizada. Dois dos mais importantes, que são mencionados e apresentados os espectros de massas, são os ácidos oleico ($C_{18}H_{34}O_2$) e linoleico ($C_{18}H_{32}O_2$), que puderam ser detectados através de pesquisa na base de dados da biblioteca NIST 8.0 (Figura 25). Ambos ácidos contêm 18 carbonos e 2 átomos de oxigênio na sua fórmula molecular, divergindo apenas no número de átomos de hidrogênio presentes (pela diferença no número de insaturações na estrutura molecular). Apesar de muitas semelhanças estruturais eles possuem uma grande diferença de ponto de ebulição, que é uma das características que a cromatografia gasosa pode usar para diferenciar os analitos.

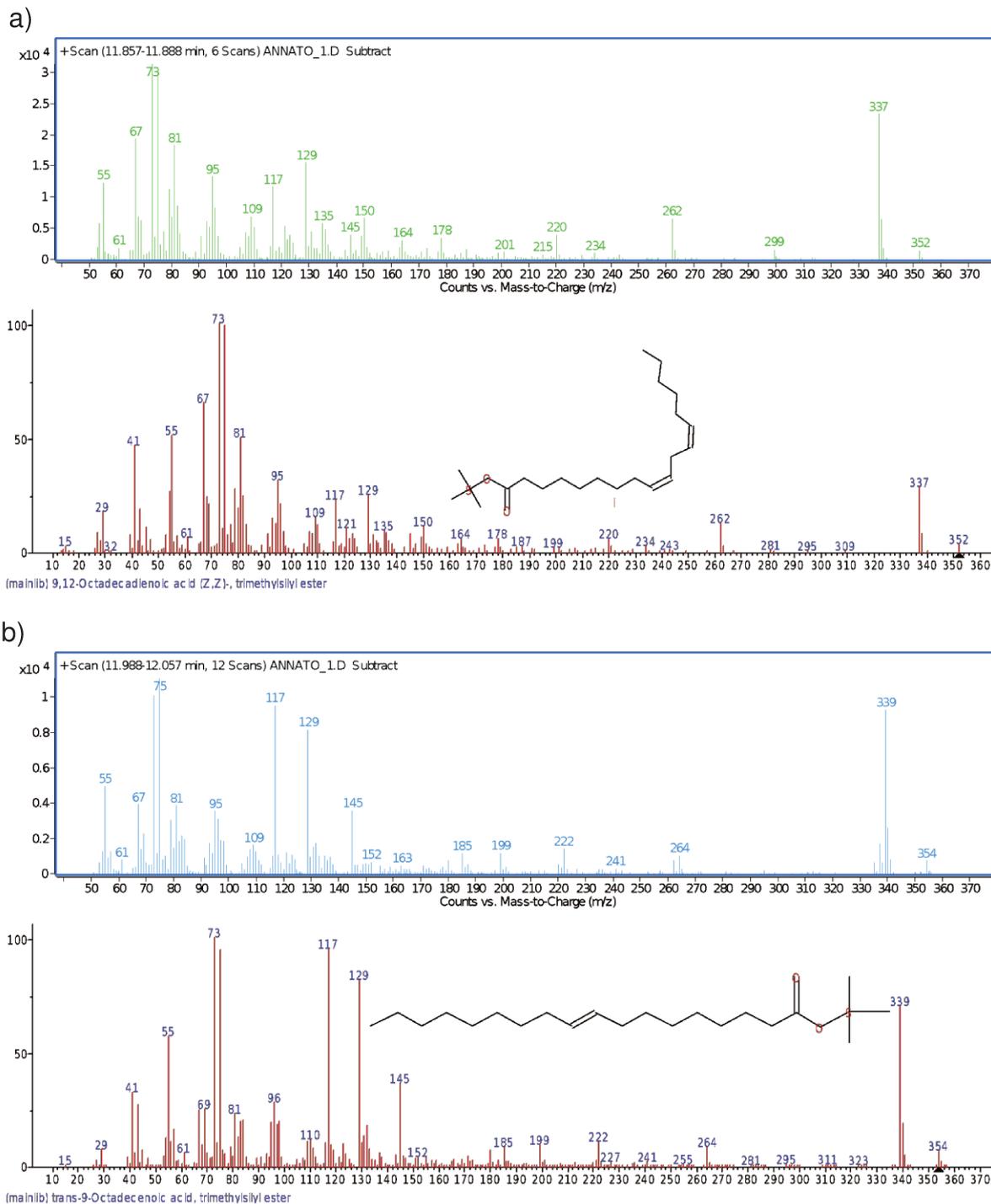


Figura 25. Comparação dos espectros de massas experimental e teórico, respectivamente, para (a) ácido oleico e (b) ácido linoleico.

Ainda estudando a primeira região do cromatograma, de forma geral atribuída aos ácidos graxos, foi identificado o composto geranylgeraniol, um diterpeno de álcool que desempenha papel em vários processos biológicos e sempre é citado por trabalhos da área como um dos principais constituintes da parte

oleosa da semente de urucum (Figura 26). Sabe-se que sua concentração pode chegar a 1% da semente seca.^{64,17}

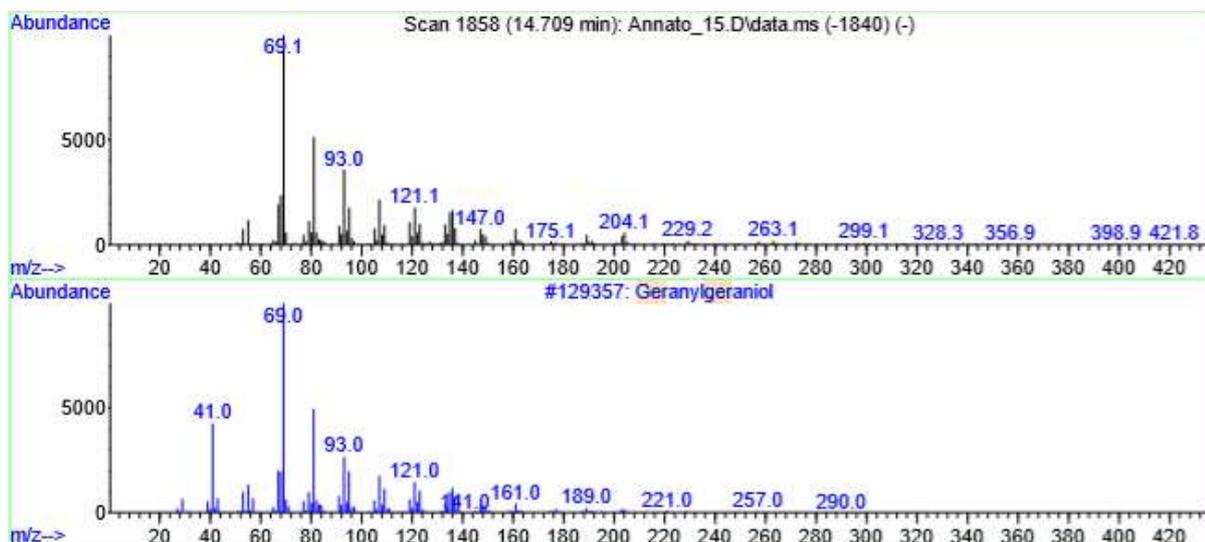


Figura 26. Identificação do geranylgeraniol pela biblioteca NIST através da comparação de espectro de massas (superior) da amostra e (inferior) do banco de dados.

Além da busca em biblioteca de todos os picos cromatográficos mais intensos, é possível analisar estes dados extraindo íons específicos. Para tocoferóis e tocotrienóis, por exemplo, os íons de maior interesse seriam m/z 209, 223 (já apresentados) e também m/z 237 que indicam a presença de sigma-tocoferol, gama-tocoferol e alfa-tocoferol, respectivamente. Para os fitoesteróis pode-se utilizar o íon m/z 129 para esta avaliação, por ser um fragmento muito comum observado em campesterol e beta-sitosterol.

Com uma avaliação mais detalhada nos cromatogramas e espectros de massas de todas as amostras, com foco na região dos tocoferóis e fitoesteróis como gama-tocoferol, estigmasterol e beta-sitosterol, pode-se mencionar as amostras 10 (intensidade 540.000), 6 (intensidade 460.000), 17 e 8 (intensidade 400.000) como aquelas com maior presença de tocoferóis e fitoesteróis, destacando-se dentre todas as demais.

Estes analitos são escolhidos para estudo mais profundo em diversas áreas uma vez que tocoferóis são poderosos anti-oxidantes (previnem stress oxidativo *in vivo*) enquanto os fitoesteróis podem inibir absorção de colesterol e por isso ajudam

a prevenir doenças circulatórias e cardíacas em humanos. A adição de urucum em alimentos processados é vantajosa por enriquecer naturalmente os alimentos com tais compostos, ao invés da realização de processos químicos para fortificação.^{60,28}

A Tabela 5 lista alguns dos compostos encontrados, incluindo ácidos graxos, tocoferóis, fitoesteróis e outras classes de compostos.

Ainda foram investigadas as funções de compostos diferentes dos ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis, mas que foram encontrados em algumas amostras. Um exemplo é o Dotriacontano, presente na Tabela 5, um alcano de fórmula molecular $C_{32}H_{66}$, que tem sido apontado em estudos como um potencial agente antiTB (tuberculose) quando presente em plantas do cerrado brasileiro.⁶⁵

Todas as determinações de analitos apresentadas foram feitas através da biblioteca NIST 8.0 com índice de similaridade mínimo (*match factor*) de 800, considerado um bom fator a ser utilizado para afirmar que um espectro refere-se aquele compostos sugerido da biblioteca.⁶⁶

Os analitos ainda foram consultados em base de dados específicas de plantas como a *Golm Database* e *PMN Database* e todos estão mencionados como compostos típicos de plantas. Para geranilgenariol, por exemplo, constam as informações adicionais de que ele atua como substrato em reações bioquímicas para geração do plaunotol, um composto que desempenha papel importante como agente antibacteriano, antineoplásico, indutor de apoptose, anti-úlceras e metabólito vegetal. Sabe-se que essa reação bioquímica ocorre em todas as plantas do reino *Viridiplantae*.

O ácido linoleico é parte de diversas reações bioquímicas, podendo ser consumido como substrato durante a oxidação de alcanos, por exemplo, ou sendo formado durante a degradação de triacilgliceróis e a degradação da ceramida. O estigmasterol é um dos produtos principais na síntese de esteróis pelas plantas, mas a depender do substrato pode-se gerar brassicasterol ou crinosterol em seu lugar.

Tabela 5. Principais compostos encontrados nas sementes de urucum por GC-MS e identificados pela biblioteca NIST.

Nome	Tempo de retenção (min)	Número CAS
Alfa-D-Arabinofuranose, TMS	4,1	020585-61-9
Ácido cítrico, tetra-TMS	4,2	014330-97-3
Ácido Tetradecanóico, TMS	4,5	018603-17-3
Adenina, di-TMS	4,8	017995-04-9
Longifoleno	5,7	000475-20-7
Ácido 9-<i>cis</i>-Hexadecenóico, TMS	7,2	1000333-19-8
Ácido Hexadecanóico, TMS	7,5	055520-89-3
Palmidrol	10,1	000544-31-0
Ácido Heptadecanóico, TMS	10,3	055517-58-3
Ácido 9,12-Octadecadienóico (Z,Z), TMS	11,9	056259-07-5
Ácido 13-<i>cis</i>-octadecenóico, TMS	12,0	1000333-58-8
Ácido 11-<i>cis</i>-octadecenóico, TMS	12,1	1000333-60-2
Ácido 9-<i>trans</i>-octadecenóico, TMS	12,3	096851-47-7
Ácido Oleico, TMS	12,4	021556-26-3
Ácido Octadecanóico, TMS	12,8	018748-91-9
Trans-Geraniogeraniol	13,1	024034-73-9
Trans-Farnesol, TMS	13,3	1000079-12-1
Ácido Eicosanóico, TMS	18,3	055530-70-6
Ácido 5,8,11-Eicosatrienóico, TMS	18,4	1000333-53-6
Fosfato de 3-Inositol, hepta-TMS	18,9	055568-91-7
Ácido Heneicosanóico, TMS	20,7	1000333-86-8
Ácido Docosanóico, TMS	22,1	074367-36-5
Ácido Tetracosanóico, TMS	24,2	074367-37-6
Esqualeno	24,3	000111-02-4
Delta Tocoferol, TMS	25,2	052704-11-7
Gama Tocoferol, TMS	26,5	002733-27-9
Dotriacontano	29,2	000544-85-4
Campesterol, TMS	31,3	1000331-83-5
Estigmasterol, TMS	32,8	014030-29-6
Beta Sitosterol, TMS	33,5	002625-46-9

Quaisquer compostos podem ser consultados nesse tipo de base de dados para obter informações detalhadas das moléculas bem como sua atuação como metabólitos, analitos ou substâncias de referência.

No que diz respeito ao preparo de amostra para essas análises, que consistiu na extração do óleo da semente de urucum, sabe-se que óleos também podem ser extraídos de sementes aplicando pressão a frio (CPE, do inglês, *cold pressing extraction*) e com uso de fluido supercrítico de dióxido de carbono. Esta última se tornou muito buscada como opção no preparo de amostra uma vez que remove completamente o solvente do extrato enquanto o dióxido de carbono volatiliza quando exposto a atmosfera. O método de extração por fluido supercrítico (do inglês, *supercritical fluid extraction*) já foi aplicado previamente para outras amostras em GC-MS, como chá, tomate e chia.^{63,62,67}

Comparando os perfis cromatográficos de amostras preparadas com fluido supercrítico e preparadas com método tradicional de lavagem, trituração e extração de Bligh & Dyer (Figura 27) é possível notar que menos picos são detectados nas amostras preparadas com método por fluido supercrítico. Este não conseguiu extrair a mesma quantidade de compostos, apesar de apresentar-se como um método ser rápido e envolver pouco manuseio no laboratório, o que seria uma grande vantagem para aplicação do método na indústria ou em necessidade de analisar muitas amostras em espaço curto de tempo.

Em outra tentativa de facilitar o processo de preparo de amostra para as análises por GC-MS foram injetadas amostras de semente de urucum sem algumas etapas do processo de preparo de amostra (lavagem e trituração). Esse teste avaliou a necessidade do preparo de amostra bem como ratificou a suspeita de que estas etapas não podem ser retiradas do processo, pois todas contribuem para o sucesso do resultado da análise por GC-MS. Duas amostras diferentes, escolhidas aleatoriamente, foram preparadas mas sendo uma delas apenas com a extração de Bligh & Dyer enquanto uma delas foi preparada novamente pelo procedimento completo convencional (lavagem, trituração e extração de Bligh & Dyer). Os resultados dos cromatogramas TIC estão sobrepostos na Figura 28.

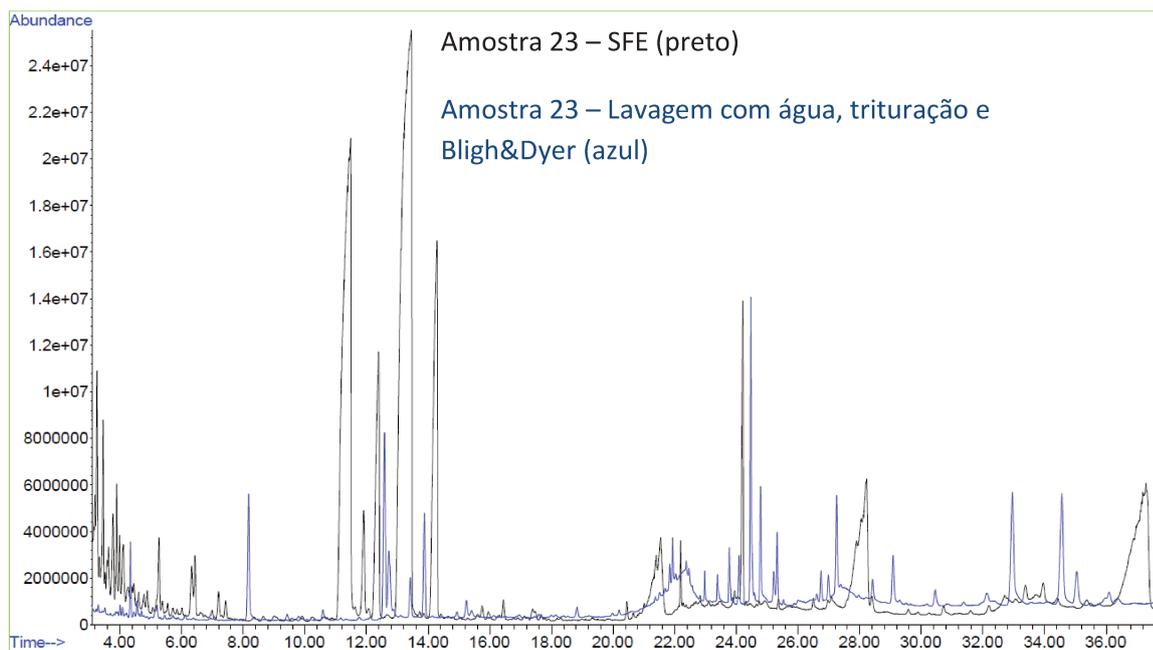


Figura 27. Sobreposição dos cromatogramas TIC (do inglês, *total ion chromatogram*) obtidos por GC-MS para amostra 23 comparando metodologia de preparo de amostra SFE (preto) com método tradicional (azul).

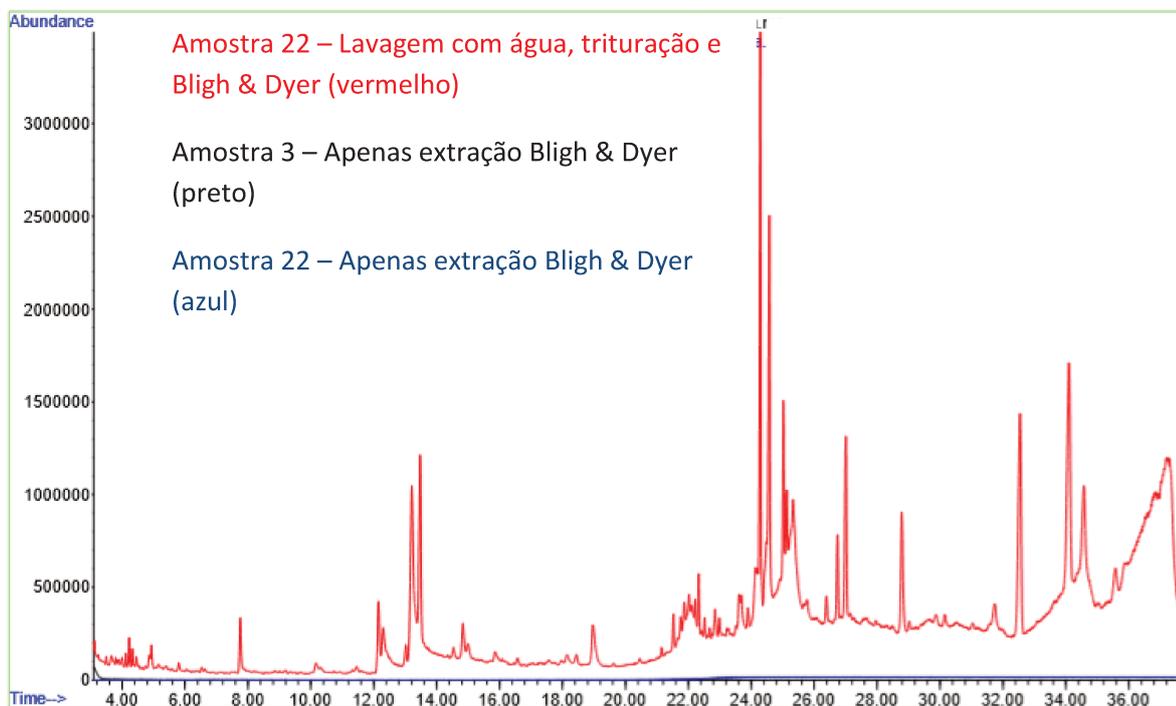


Figura 28. Sobreposição dos cromatogramas TIC de duas amostras (preto e azul) sem preparo de amostra comparado com método de lavagem, trituração e Bligh & Dyer (vermelho).

Por fim, as etapas de lavagem com água e trituração foram avaliadas separadamente, verificando se apenas uma delas seria suficiente para obter os resultados desejados. Na Figura 29 estão os cromatogramas de uma mesma

amostra na qual sementes foram submetidas ao preparo de amostra completo, preparo apenas com lavagem das sementes e preparo apenas com maceração das sementes.

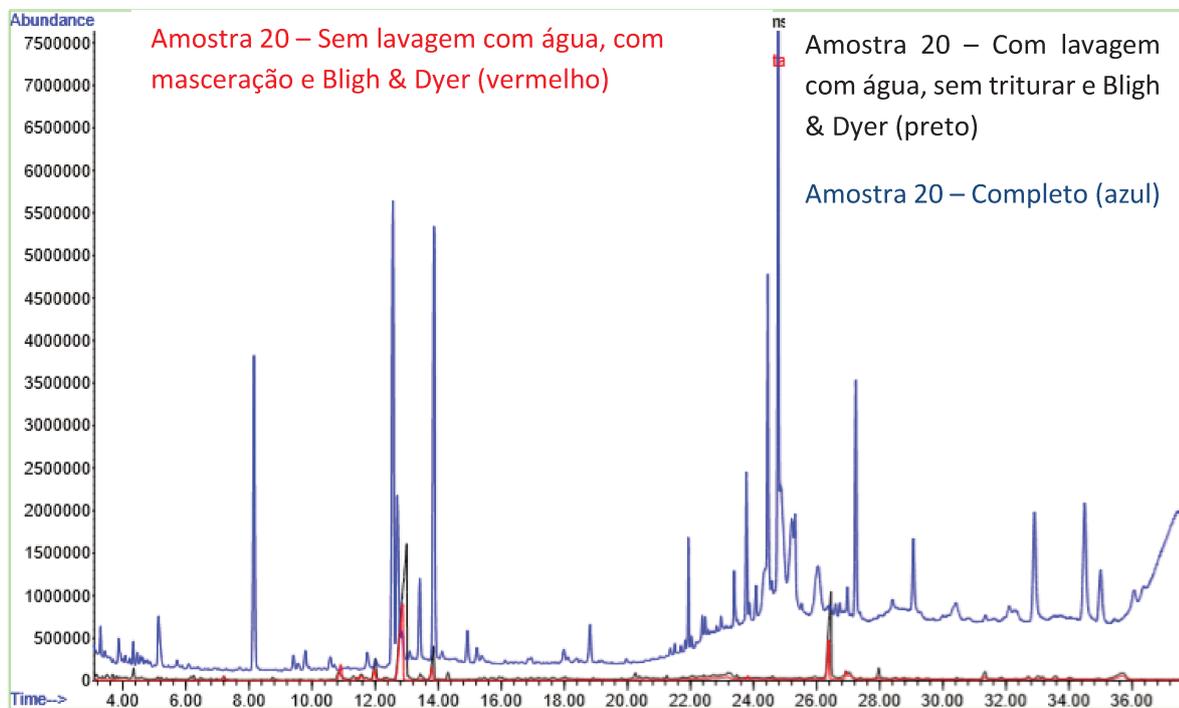


Figura 29. Sobreposição dos cromatogramas TIC comparando preparo de amostra completo (azul) e preparo de amostra com ausência das etapas de lavagem (vermelho) e trituração (preto).

Novamente é possível confirmar que todas as etapas do processo de preparo de amostra são estritamente necessárias. Sem a etapa de lavagem com água ou sem a etapa de trituração o número de compostos encontrados é reduzido drasticamente.

Ainda existe a possibilidade de otimização do método de extração por fluido supercrítico, que não foi avaliada neste trabalho, mas que poderia otimizar os resultados.

Ressalta-se que durante todos os testes de preparo de amostra, o processo de derivatização foi executado ao final, sem modificações ao seu protocolo. Esta etapa necessita ser realizada independentemente do preparo prévio da amostra conforme discorrido no início deste capítulo.

3.5 Conclusão

Um método por GC-MS para identificação de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis em sementes de urucum foi apresentado. Foi possível identificar valores de m/z que são característicos para cada classe de compostos e também apresentar compostos importantes em cada classe que foram encontrados nas amostras. As bases de dados PMN e Golm podem ser consultadas para colaborar com informações adicionais sobre os compostos no metabolismo das plantas.

Em uma abordagem rápida e sem uso de instrumentação dedicada, foi possível constatar que as sementes de urucum contêm, em média, 12,24% (m/m) de pó vermelho. Dentre todas, a amostra 7 foi a única que apresentou valor menor que 10%.

A etapa de derivatização foi fundamental para a identificação dos compostos pela técnica de cromatografia gasosa. Avaliando as etapas do preparo de amostra, uma a uma, concluiu-se que a lavagem e trituração são necessárias e contribuem para os bons resultados das análises. A extração por fluido supercrítico (SFE) não conseguiu reproduzir os resultados obtidos com a extração Bligh & Dyer.

Capítulo IV

Plasma acoplado indutivamente a espectrometria de massas para análise elementar de sementes de urucum

4.1 Plasma acoplado indutivamente a espectrometria de massas (ICP-MS) para análise de amostras complexas

Os instrumentos de ICP-MS (do inglês, *inductively coupled plasma - mass spectrometry*) evoluíram muito nas últimas décadas. Novas tecnologias para solucionar as análises de amostras complexas foram desenvolvidas, como celas de reação e colisão para minimizar o efeito das interferências por íons poliatômicos e íons de dupla carga, sistemas do tipo *tandem* MS/MS que permitem seletividade nas celas de reação e quadrupolos hiperbólicos com resolução unitária de massa menor que 1 e detecção de íons com abundância de 10^{-7} para melhor sensibilidade.⁶⁸

Quanto ao sistema de introdução de amostra, a diluição por aerossol tem sido proposta recentemente para a análise de amostras complexas como urina⁶⁹, água do mar⁷⁰, mel⁷¹ e materiais geológicos⁷². Por isso, podem se aplicar as sementes de urucum, também de alta complexidade (ainda não há na literatura estudos envolvendo esta técnica com este tipo de semente). A estratégia para lidar com essa amostra consiste em aplicar um fluxo perpendicular de argônio na saída da câmara de nebulização. Quando comparado com a diluição convencional (de bancada ou por injeção em fluxo), o impacto da diluição por aerossol na sensibilidade é substancialmente menor, uma vez que menos amostra é introduzida no plasma, menos energia é perdida com o processo de dessolvatação e uma energia maior no plasma é obtida. A diluição por aerossol pode também aumentar a vida útil dos consumíveis do instrumento, especialmente os cones de interface e lentes iônicas, que podem ser danificados por alto teor de sólidos. No instrumento utilizado durante o trabalho, o sistema HMI (do inglês, *high matrix introduction*) tem uma tecnologia que utiliza auto otimização da diluição do aerossol para aumentar a tolerância a matriz, reduzir a densidade do aerossol e a densidade de vapor de água no plasma. Trabalhos anteriores mostram uso eficiente do ICP-MS acoplado ao HMI para determinação de mais de 25 elementos em matrizes complexas, como solo e sedimentos de rio. Amostras aquosas também podem ser investigadas usando cromatografia líquida acoplada a ICP-MS com HMI.⁷³

4.2 Objetivos

Desenvolver e validar um método para quantificar elementos essenciais e tóxicos em amostras de urucum através da digestão assistida por microondas e ICP-MS, utilizando um acessório para realizar a diluição de aerossol para elementos em alta concentração.

4.3 Parte Experimental

4.3.1 Materiais, Reagentes e Equipamentos

Utilizou-se um sistema de plasma indutivamente acoplado com espectrômetro de massas quadrupolo simples, modelo 7900 (Agilent Technologies Inc., Tóquio, Japão) que necessita de gás Argônio e Hélio de alta pureza (99,999% White Martins, São Paulo, Brasil) e um sistema de digestão assistida por microondas Multiwave GO (Antoon Par, Graz, Austria). Foram utilizadas a solução de tune (10 µg/L Li, Y, Tl, Co e Mg em 5% HNO₃) para calibração do instrumento, solução de padrão interno para ICP-MS (100mg/L Li, Sc, Y, In, Tb e Bi em 5% HNO₃), solução padrão de Mercúrio (10µg/mL de Hg em 5% HNO₃) e solução padrão de calibração (1000µg/mL Ca, Fe, K, Mg, Na; 10 µg/mL Ag, Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se, Th, Tl, U, V e Zn) (Agilent Technologies Inc, Santa Clara, USA) para elaboração das curvas analíticas. Para o preparo das amostras foram empregados os reagentes de alta pureza ácido nítrico 65% (m/m) (Merck, Darmstadt, Alemanha), água oxigenada 30% (v/v) (Merck, Darmstadt, Alemanha). Durante a validação foram avaliadas amostras de referência da NIST (SRM NIST 1573A) e da Embrapa Pecuária Sudeste RM-Agro E1001a (FO-01/12). Todas as soluções foram preparadas em tubos de polipropileno de 50 mL (Corning, NY, USA) e com água ultrapura Tipo I (Milli-Q, Millipore, Bedford, MA, USA).

4.3.2 Preparo de soluções dos padrões elementares

Foram preparadas soluções aquosas com 0,1% de ácido clorídrico, 4% de ácido nítrico e 1% de peróxido de hidrogênio em tubos de polipropileno de 50mL, a partir dos respectivos padrões analíticos. As concentrações foram de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 µg/L para Hg. Para Al, As, Ba, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Mo, Ni, Pb, Sb, Se,

Tl, U, V e Zn as concentrações foram de 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 10; 20; 40; 100; 200 e 1000 µg/L. Para Ca, Fe, K, Mg e Na as concentrações foram de 0,04; 0,1; 0,2; 0,4; 1,0; 2,0; 4,0; 10; 20 e 100 mg/L.

4.3.3 Preparo de Amostra

Foram utilizadas 0,5 g de semente em vaso fechado de Teflon com 2,0 mL de ácido nítrico 65%, 0,5 mL de solução de peróxido de nitrogênio 30% e 5,0 mL de água ultrapura. O vaso foi fechado e colocado no Sistema Multiwave GO de digestão assistida por microondas.

A programação de digestão consistiu em um aquecimento gradativo por 30 minutos até 180°C e mantido constante por mais 20 minutos, totalizando 50 minutos no procedimento de preparo de amostra. O sistema permitiu preparar simultaneamente até 12 amostras. Após a digestão, o conteúdo foi transferido para tubos de polipropileno e diluídos com água ultrapura ao volume final de 50 mL.

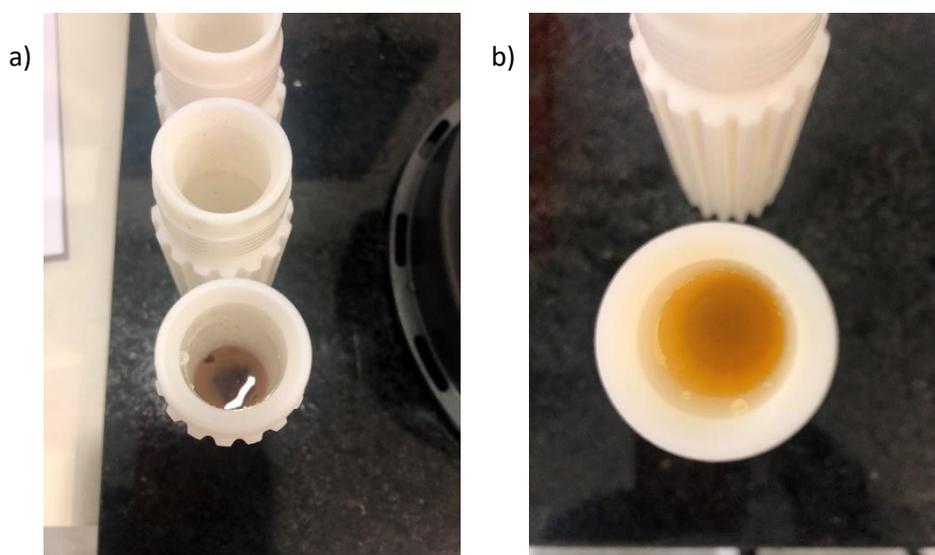


Figura 30. Sementes de urucum em vaso fechado a) antes da digestão; b) após a digestão.

Para apresentar um teste de adição e recuperação, a amostra 1, escolhida aleatoriamente, foi fortificada no início do preparo de amostra, participando de todo

processo de extração e análise. No total foram realizadas fortificações em 4 níveis de concentração diferentes, variando de 0,0006 a 10 mg/L; buscando assim se aproximar da melhor forma possível as concentrações que poderiam ser encontradas nas sementes

4.3.4 Método ICP-MS

O instrumento ICP-MS modelo 7900 contém um gerador de estado sólido de radiofrequência do plasma operando a 27 MHz e octapolo de quarta geração para remoção de interferências isobáricas através da discriminação de energia cinética usando gás Hélio de alta pureza. O sistema foi equipado com uma conexão adicional entre a câmara de nebulização e a tocha para que um fluxo perpendicular de gás argônio fosse introduzido, criando diluição de aerossol. A introdução de amostras foi feita através de tubulação de PVC (do inglês, *polyvinyl chloride*), câmara de nebulização do tipo passo duplo, nebulizador inerte e tocha de quartzo. Os parâmetros instrumentais adotados no método de diluição por aerossol (HMI He) e no método sem diluição por aerossol (He), bem como os isótopos monitorados em cada um deles, estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6. Parâmetros de operação do ICP-MS para aquisição de dados.

Parâmetro	Método He HMI	Método He
Potência do plasma (W)	1.600	1.600
Vazão do gás do plasma (L/min)	15	15
Vazão gás auxiliar (L/min)	1,0	1,0
Temperatura câmara de nebulização (°C)	2	2
Velocidade da bomba peristáltica (rps)	0,10	0,10
Vazão do gás de nebulização (L/min)	0,3	1
Vazão do gás diluidor (L/min)	0,7	0,0
Voltagem das lentes iônicas (V)	Autotune	Autotune
Vazão de He na cela de colisão (mL/min)	4,5	4,5
Voltagem das lentes do octapolo (V)	Autotune	Autotune
Faixa de massa (m/z)	6 - 270	6 - 270
Isótopos monitorados (m/z)	$^{44}\text{Ca}^+$, $^{56}\text{Fe}^+$, $^{39}\text{K}^+$, $^{24}\text{Mg}^+$	$^{27}\text{Al}^+$, $^{75}\text{As}^+$, $^{137}\text{Ba}^+$, $^9\text{Be}^+$, $^{111}\text{Cd}^+$, $^{59}\text{Co}^+$, $^{52}\text{Cr}^+$, $^{63}\text{Cu}^+$, $^{201}\text{Hg}^+$, $^{55}\text{Mn}^+$, $^{95}\text{Mo}^+$, $^{23}\text{Na}^+$, $^{60}\text{Ni}^+$, $^{208}\text{Pb}^+$, $^{121}\text{Sb}^+$, $^{78}\text{Se}^+$, $^{205}\text{Tl}^+$, $^{238}\text{U}^+$, $^{51}\text{V}^+$, ^{66}Zn

4.4 Resultados e Discussões

No método proposto, as medidas foram feitas em triplicata com tempo de análise de 13,5 segundos por amostra. A Figura 31 apresenta o espectro de massas gerado por uma das amostras.

A faixa de massa avaliada (m/z 6 – 270) apesar de pequena é adequada para métodos em ICP-MS uma vez que contempla a massa dos principais elementos químicos da tabela periódica. O espectro de massas tem resolução unitária e a carga dos analitos ionizados é +1. No método sempre são obtidos dois espectros

de massa por amostra sabendo que alguns elementos estão sendo quantificados com diluição por aerossol (HMI He) e outros sem diluição (He).

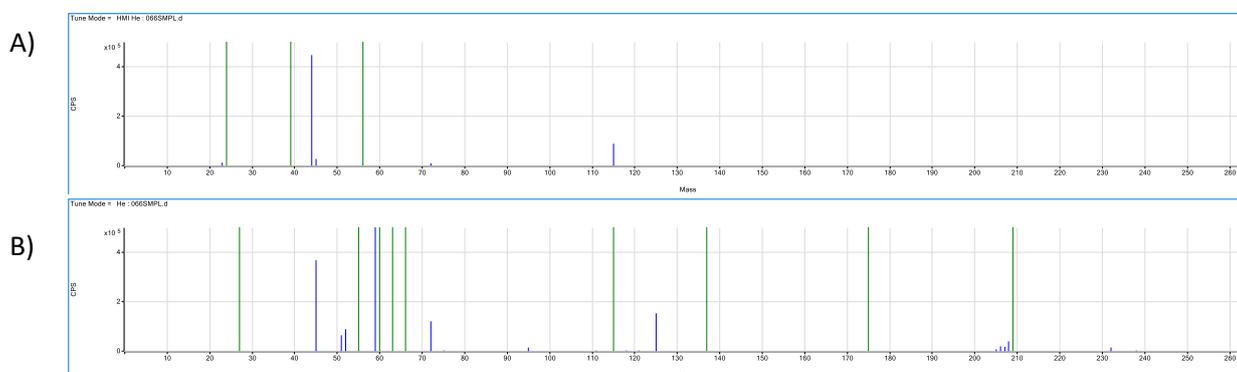


Figura 31. Espectro de massas obtidos por ICP-MS na análise da amostra 15 em A) método He HMI e B) método He.

Com auxílio dos padrões foram construídas as curvas analíticas para todos os elementos mencionados. Assim, foram obtidos a equação da reta, o coeficiente de determinação (R^2) e o limite de detecção (LD) para cada um deles. A faixa de concentração utilizada para as curvas analíticas foi determinada de acordo com a concentração esperada para elementos tóxicos e elementos essenciais. Ainda uma faixa maior de concentração foi aplicada para elementos em que não havia informação prévia nem expectativa de concentração média em sementes. Na Figura 32 é apresentada a curva analítica para Mg, na qual o padrão interno foi Sc e foi utilizado o método com diluição por aerossol.

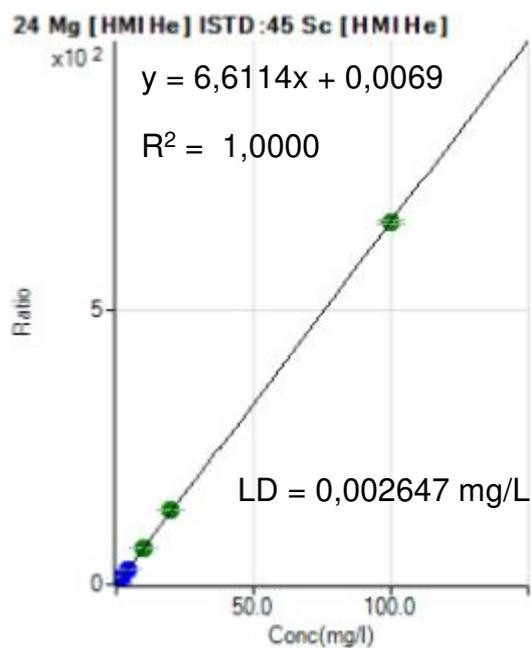


Figura 32. Curva analítica para quantificação de Magnésio por ICP-MS.

Além da curva para Mg, são apresentadas as curvas para Cd (Figura 33) e Cr (Figura 34), visando assim representar cada uma das diferentes faixas de concentração utilizadas para as curvas analíticas neste trabalho.

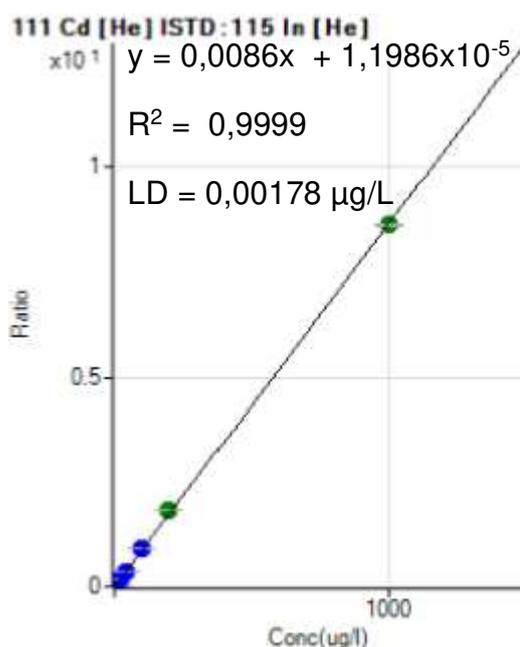


Figura 33. Curva analítica para quantificação de Cádmiio por ICP-MS.

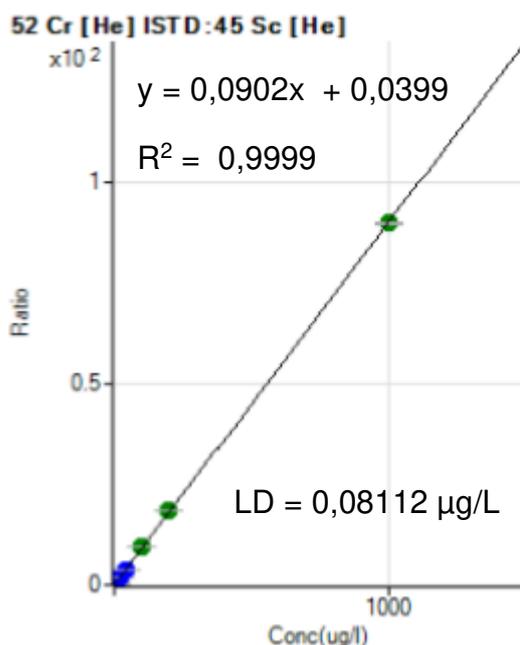


Figura 34. Curva analítica para quantificação de Cromo por ICP-MS.

Os cálculos de limite de detecção instrumental foram feitos pelo software, aplicando a equação abaixo, onde BEC equivale a razão entre concentração do branco e inclinação da reta e SD é a variação da concentração da medida do branco.

$$LD_{inst} = 3 \times BEC \times SD$$

As cores verde e azul nas linhas do espectro de massas e também nos pontos das curvas analíticas fazem distinção ao tipo de aquisição feito pelo detector, que pode ser na forma pulsada (azul) ou analógica (verde). Esse mecanismo é automático do instrumento, não tendo influência no método analítico em questão.

O método proposto foi validado, sendo fornecida a linearidade e MLOQ (do inglês, *method limit of quantification*) para cada elemento (Tabela 7). O MLOQ foi calculado através do SD também, conforme abaixo.

$$MLOQ = 10 \times SD$$

Tabela 7. Figuras de mérito para método desenvolvido por ICP-MS.

Analito	Padrão Interno	Modo de Aquisição	Linearidade (R²)	MLOQ (µg/kg)
Be	Sc	He	1,0000	4,3
Na	Sc	He (HMI)	1,0000	2.193
Mg	Sc	He (HMI)	1,0000	399
Al	Sc	He	1,0000	553
K	Sc	He (HMI)	1,0000	9,9
Ca	Sc	He (HMI)	1,0000	132
V	Sc	He	1,0000	25
Cr	Sc	He	1,0000	14
Mn	Sc	He	1,0000	5,3
Fe	Sc	He (HMI)	1,0000	103
Co	Sc	He	1,0000	0,71
Ni	Y	He	1,0000	4,0
Cu	Y	He	0,9999	74
Zn	Y	He	1,0000	40
As	Sc	He	1,0000	4,5
Se	Sc	He	1,0000	18
Mo	Y	He	1,0000	9,0
Cd	Y	He	1,0000	0,61
Sb	Y	He	1,0000	4,7
Ba	Lu	He	1,0000	5,2
Hg	Bi	He	0,9998	2,0
Tl	Bi	He	1,0000	6,4
Pb	Bi	He	1,0000	0,72
U	Bi	He	1,0000	0,16

Para várias aplicações em ICP-MS são utilizados os padrões internos para correção de interferências físicas, como por exemplo a diferença de viscosidade entre soluções, durante a determinação elementar. Os elementos usados como padrão interno para cada analito são mostrados pela primeira vez na Tabela 6 e sua seleção seguiu três principais critérios, sendo eles: (1) proximidade da massa do isótopo do padrão interno com a massa do isótopo do analito, (2) primeira energia de ionização similar entre o padrão interno e o analito e (3) tendência a reações de transferência de carga no plasma.⁷⁶

Pela Tabela 7, nota-se que sódio apresenta alto MLOQ. Isso ocorre primeiramente porque o método de aquisição para este elemento não usou a diluição por aerossol e por isso é menos sensível. O método foi desenvolvido dessa forma por esperar uma alta concentração mais alta de sódio nas amostras.

Durante a validação utilizou-se as duas amostras referência certificada (CRM, do inglês *certified reference material*) de folhas de tomate proveniente da NIST (SRM NIST 1573A) e de *Brachiaria Brizantha* cv Marandu (conhecido como capim marandu) proveniente da Embrapa Pecuária Sudeste RM-Agro E1001a (FO-01/12). Os resultados de concentração foram obtidos em quintuplicata e as exatidões são apresentadas na Tabela 8.

Ainda no processo de validação da metodologia, apresenta-se a Tabela 8 com valores do teste de adição e recuperação feito em uma amostra aleatória. Uma amostra aleatória de semente de urucum foi escolhida para um teste de adição e recuperação. Os valores apresentados contemplam a menor concentração que apresentou resultados de recuperação entre 80 – 120% para cada um dos elementos.

O elemento que teve recuperação satisfatória em menor concentração foi o Hg, enquanto entre as maiores concentrações destacam-se o K e o Ca.

Após os testes de validação, todas amostras foram analisadas e seus resultados finais de concentração elementar e respectivos desvios padrão são apresentados nas Tabelas 10, 11 e 12. Cada uma delas contempla elementos presentes em mesma faixa de concentração. Os elementos colocados no rodapé logo abaixo de cada tabela ficaram abaixo do MLOQ apresentado na Tabela 7.

Tabela 8. Teste de exatidão dos elementos com as amostras de referência certificada.

Analito	Padrão Interno	CRM	Concentração certificada (mg/kg)	Resultado (mg/kg) (n=5)	Exatidão (%)
Na	Sc	NIST 1573a	136,1 ± 3,7	124,3 ± 4,8	91
Mg	Sc	NIST 1573a	12,000	10,321 ± 308	86
Mg	Sc	Embrapa E1001a	2,950 ± 440	2,800 ± 61	95
Al	Sc	NIST 1573a	598,4 ± 7,1	486,8 ± 48	81
K	Sc	NIST 1573a	26,760 ± 480	27,151 ± 1,073	101
K	Sc	Embrapa E1001a	12,000 ± 2,400	12,600 ± 742	104
Ca	Sc	NIST 1573a	50,450 ± 550	46,386 ± 1,138	92
Ca	Sc	Embrapa E1001a	4,370 ± 580	4,746 ± 176	108
V	Sc	NIST 1573a	0,835 ± 0,034	0,694 ± 0,004	83
Cr	Sc	NIST 1573a	1,988 ± 0,034	1,622 ± 0,092	82
Mn	Sc	NIST 1573a	246,3 ± 7,1	235,1 ± 1,8	95
Mn	Sc	Embrapa E1001a	76,0 ± 18,5	74,8 ± 2,2	98
Fe	Sc	NIST 1573a	367,5 ± 4,3	296,3 ± 4,0	81
Fe	Sc	Embrapa E1001a	91 ± 13	77 ± 1,5	85
Co	Sc	NIST 1573a	0,5773 ± 0,0071	0,524 ± 0,0028	91
Ni	Y	NIST 1573a	1,582 ± 0,041	1,286 ± 0,006	81
Cu	Y	NIST 1573a	4,70 ± 0,14	3,95 ± 0,19	84
Cu	Y	Embrapa E1001a	4,0 ± 0,7	3,3 ± 0,1	83
Zn	Y	NIST 1573a	30,94 ± 0,55	28,00 ± 1,33	91
As	Sc	NIST 1573a	0,1126 ± 0,0024	0,111 ± 0,004	99
As	Sc	Embrapa E1001a	1,69 ± 0,70	1,77 ± 0,07	104
Se	Sc	NIST 1573a	0,0543 ± 0,0020	0,0602 ± 0,006	111
Cd	Y	Embrapa E1001a	19,9 ± 5,1	17,4 ± 1,1	87
Sb	Y	NIST 1573a	0,0619 ± 0,0032	0,0665 ± 0,0036	107
Ba	Lu	NIST 1573a	63	52 ± 3,4	83
Hg	Bi	NIST 1573a	0,0341 ± 0,0015	0,031 ± 0,0032	92
Pb	Bi	Embrapa E1001a	4,0 ± 1,8	4,2 ± 0,3	105

Tabela 9. Recuperações para amostra de urucum fortificada.

Analito	Padrão interno	Fortificação (mg/L)	Recuperação (%)
Be	Sc	0,50	93
Na	Sc	5,00	103
Mg	Sc	5,00	108
Al	Sc	1,00	99
K	Sc	10,0	116
Ca	Sc	10,0	118
V	Sc	0,50	94
Cr	Sc	0,50	96
Mn	Sc	0,50	107
Fe	Sc	5,00	91
Co	Sc	0,50	96
Ni	Y	0,50	97
Cu	Y	0,50	97
Zn	Y	0,50	99
As	Sc	0,50	109
Se	Sc	0,50	110
Mo	Y	0,50	93
Cd	Y	0,50	97
Sb	Y	0,50	96
Ba	Lu	0,50	99
Hg	Bi	0,0006	83
Tl	Bi	0,50	97
Pb	Bi	0,50	97
U	Bi	0,50	94

Tabela 10. Concentração de Mg, K e Ca em % nas amostras.

Amostra	Mg [HMI He]	K [HMI He]	Ca [HMI He]
	%		
1	0,52 ± 0,01	3,7 ± 0,2	0,48 ± 0,01
2	0,55 ± 0,03	3,6 ± 0,2	0,61 ± 0,03
3	0,58 ± 0,01	4,0 ± 0,1	0,54 ± 0,05
4	0,51 ± 0,01	3,6 ± 0,2	0,61 ± 0,03
5	0,49 ± 0,02	3,9 ± 0,1	0,53 ± 0,04
6	0,56 ± 0,01	3,8 ± 0,1	0,51 ± 0,01
7	0,52 ± 0,01	4,0 ± 0,1	0,50 ± 0,02
8	0,56 ± 0,01	4,3 ± 0,1	0,52 ± 0,02
9	0,55 ± 0,03	4,1 ± 0,2	0,47 ± 0,02
10	0,52 ± 0,03	3,8 ± 0,2	0,50 ± 0,01
11	0,54 ± 0,01	3,9 ± 0,2	0,48 ± 0,02
12	0,58 ± 0,05	3,9 ± 0,1	0,52 ± 0,03
13	0,56 ± 0,01	4,1 ± 0,1	0,56 ± 0,04
14	0,60 ± 0,03	3,7 ± 0,2	0,37 ± 0,03
15	0,54 ± 0,01	4,7 ± 0,1	0,54 ± 0,01
16	0,53 ± 0,02	3,7 ± 0,1	0,54 ± 0,03
17	0,58 ± 0,03	4,0 ± 0,2	0,52 ± 0,01
18	0,57 ± 0,01	3,4 ± 0,1	0,47 ± 0,01
19	0,53 ± 0,03	3,8 ± 0,1	0,49 ± 0,01
20	0,56 ± 0,02	4,3 ± 0,1	0,59 ± 0,09
21	0,46 ± 0,01	3,9 ± 0,1	0,67 ± 0,04
22	0,55 ± 0,03	3,9 ± 0,1	0,46 ± 0,03
23	0,57 ± 0,01	4,0 ± 0,1	0,51 ± 0,03

Os resultados da Tabela 10 demonstram a alta concentração de magnésio, potássio e cálcio na amostra, de acordo com o esperado e designado em suas curvas analíticas, uma vez que são mineiras essenciais. Também por esse motivo todos estes elementos foram quantificados através do método com diluição por aerossol. O baixo erro atrelado as medidas permite afirmar que existe uma homogeneidade da presença destes elementos nas sementes, independente do produtor. Nenhuma amostra se diferencia em alto teor de Mg, K ou Ca frente as demais amostras, podendo assim afirmar que todos os produtores possuem sementes de urucum com concentração similar destes elementos.

Pode-se ainda mencionar que estes elementos são alguns componentes minerais principais das plantas e suas concentrações podem depender da espécie em particular e do solo onde se desenvolveu. Outros estudos de sementes mostraram que, especificamente no Brasil, independente da região do cultivo, sempre há alto teor pelo menos para Mg e K.⁷⁴

Tabela 11. Concentração de Cr, Se, Cd e Pb em µg/kg nas amostras

Amostra	Cr [He]	Se [He]	Cd [He]	Pb [He]
	µg/kg			
1	83,2 ± 3,3	59,9 ± 2,3	23,7 ± 0,9	35,4 ± 3,0
2	143,6 ± 11,8	118,9 ± 4,4	59,4 ± 7,3	55,5 ± 3,8
3	91,0 ± 6,9	70,5 ± 2,3	16,4 ± 1,5	33,3 ± 3,6
4	148,2 ± 10,6	48,8 ± 0,3	35,7 ± 1,6	42,7 ± 2,7
5	107,5 ± 5,1	63,2 ± 1,2	13,0 ± 1,1	29,3 ± 2,6
6	107,5 ± 0,7	74,9 ± 6,0	37,8 ± 3,3	36,9 ± 0,8
7	78,6 ± 6,8	86,5 ± 6,1	51,0 ± 12,8	32,1 ± 2,3
8	65,3 ± 2,3	73,2 ± 10,1	24,6 ± 1,5	27,1 ± 2,9
9	78,8 ± 2,9	158,7 ± 25,5	18,1 ± 1,0	36,2 ± 3,1
10	111,2 ± 4,4	61,4 ± 5,4	34,1 ± 3,2	28,5 ± 0,6
11	169,9 ± 9,3	73,1 ± 3,8	20,5 ± 0,1	43,1 ± 10,6
12	143,9 ± 5,5	102,3 ± 8,2	17,6 ± 0,3	61,0 ± 1,6
13	69,4 ± 0,1	116,9 ± 6,6	11,8 ± 1,0	26,9 ± 0,8
14	160,4 ± 3,7	91,1 ± 13,1	28,1 ± 2,4	51,9 ± 1,4
15	207,3 ± 2,9	81,6 ± 4,4	11,1 ± 1,0	60,6 ± 1,5
16	115,5 ± 3,2	53,3 ± 6,5	18,6 ± 1,5	43,4 ± 1,8
17	78,3 ± 2,3	86,7 ± 6,0	22,9 ± 2,2	28,8 ± 3,1
18	62,0 ± 4,3	231,9 ± 14,8	71,0 ± 5,4	21,3 ± 0,2
19	116,1 ± 3,9	44,3 ± 6,8	31,6 ± 0,3	50,4 ± 11,3
20	55,4 ± 2,4	95,2 ± 14,4	20,8 ± 1,1	23,9 ± 1,6
21	174,2 ± 21,8	69,5 ± 3,0	20,8 ± 2,0	55,1 ± 9,4
22	79,2 ± 4,8	82,7 ± 4,1	44,9 ± 3,9	68,2 ± 3,9
23	85,7 ± 0,4	58,0 ± 5,8	35,5 ± 1,3	37,9 ± 1,6

Be < 4,3; V < 25; As < 4,5; Sb < 4,7; Hg < 2,0; Tl < 6,4; U < 0,16 µg/kg.

O selênio está nas sementes de urucum, assim como na castanha-do-pará (*Bertholletia excelsa*) - a semente com maior concentração de Se, na qual a concentração pode variar de 8 a 83 µg/g.⁷⁸ Como a concentração média de Se nas sementes de urucum analisadas é de 87,02 µg/kg ou 0,087 µg/g, pode-se dizer que

as sementes de urucum tem concentração de Se de 100 a 1000 vezes menor que nas castanhas-do-pará.

Dependendo da forma que se apresenta o cromo pode ser um elemento tóxico ou essencial. Estudos que fazem essa avaliação completa utilizam-se de um sistema HPLC-ICP-MS (do inglês, *high performance liquid chromatography-inductively plasma coupled-mass spectrometry*) para realizar a especiação química, um tipo de análise que avalia as espécies particulares ou a forma específica (ao invés de sua concentração total) na qual um determinado elemento se apresenta nas amostras. Para isso, é necessário o acoplamento dos sistemas de HPLC e ICP-MS.⁷⁵

A maioria das publicações na área de especiação usando HPLC-ICP-MS foca em 5 elementos principais: arsênio, cromo, estanho, mercúrio e selênio. Estima-se que todos os outros elementos juntos concentram apenas 20% dos estudos.⁷⁵

Os valores encontrados para Pb e Cd foram comparados com a RDC n°42, de 29 de Agosto de 2013 da ANVISA, que dispõe sobre para as quantidades máximas permitidas destes contaminantes inorgânicos nos alimentos, válido para o Brasil e todo Mercosul. As amostras de sementes de urucum se adequam a categoria das sementes secas, sendo nesse caso permitido até 200µg/kg de Pb e até 100µg/kg de Cd. Portanto, comparando com a Tabela 11, nota-se que todas as amostras estão de acordo com os parâmetros exigidos. A resolução ainda dispõe valores para Hg e As, que não puderam ser quantificados neste método.

Nota-se na Tabela 11 maior variação de concentração entre as 23 amostras para cada elemento, que pode ser causado primeiramente porque os valores são mais baixos e também pela heterogeneidade das amostras, que foi uma dificuldade enfrentada nas quantificações por outros métodos neste trabalho.

Os elementos indicados ao final da Tabela 10 não são comumente encontrados em sementes e/ou não apresentaram concentrações significativas, ficando abaixo do MLOQ.

Tabela 12. Concentração de Al, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo e Ba em mg/kg.

Amostra	Al [He]	Mn [He]	Fe [HMI He]	Co [He]	Ni [He]	Cu [He]	Zn [He]	Mo [He]	Ba [He]
	mg/kg								
1	61,5 ± 4,4	157,3 ± 0,2	90,7 ± 2,7	0,92 ± 0,05	14,7 ± 0,4	24,0 ± 0,4	44,3 ± 0,9	0,12 ± 0,03	39,6 ± 3,1
2	110,9 ± 7,1	194,3 ± 4,7	122,3 ± 5,4	1,20 ± 0,10	13,9 ± 0,1	22,8 ± 0,3	44,8 ± 1,1	0,16 ± 0,02	43,1 ± 0,4
3	61,2 ± 4,9	137,3 ± 2,8	90,0 ± 1,3	1,19 ± 0,06	12,3 ± 0,6	22,3 ± 0,6	41,2 ± 0,7	0,38 ± 0,03	49,0 ± 1,4
4	77,5 ± 1,9	176,3 ± 6,9	104,6 ± 10,2	1,13 ± 0,06	18,4 ± 1,7	22,4 ± 1,3	45,2 ± 3,8	0,18 ± 0,01	29,7 ± 1,2
5	48,3 ± 1,2	136,5 ± 7,1	74,6 ± 3,9	1,18 ± 0,08	13,3 ± 0,7	22,6 ± 0,8	41,1 ± 2,2	0,43 ± 0,03	31,4 ± 2,5
6	64,4 ± 1,7	142,9 ± 2,8	106,9 ± 4,4	1,26 ± 0,12	16,9 ± 0,1	26,2 ± 1,8	51,2 ± 4,8	0,15 ± 0,03	38,0 ± 3,1
7	53,9 ± 0,5	154,2 ± 11,8	86,3 ± 8,5	1,84 ± 0,01	18,6 ± 0,9	21,4 ± 1,0	48,3 ± 8,2	0,07 ± 0,01	36,1 ± 3,1
8	28,4 ± 0,3	136,9 ± 12,3	73,8 ± 2,4	2,52 ± 0,11	15,2 ± 0,5	24,2 ± 0,4	46,1 ± 1,2	0,40 ± 0,06	31,5 ± 1,1
9	43,2 ± 0,8	170,8 ± 10,5	78,3 ± 3,7	0,66 ± 0,03	13,9 ± 0,9	23,2 ± 1,5	41,4 ± 3,1	0,31 ± 0,01	24,9 ± 0,7
10	56,7 ± 0,9	224,8 ± 12,6	81,4 ± 1,0	2,26 ± 0,19	17,8 ± 0,6	22,8 ± 0,4	40,2 ± 1,7	0,19 ± 0,05	35,4 ± 2,9
11	66,9 ± 4,4	167,5 ± 8,5	97,1 ± 6,9	1,75 ± 0,11	13,8 ± 0,9	24,4 ± 1,0	41,1 ± 1,5	0,07 ± 0,01	37,2 ± 3,7
12	121,3 ± 5,1	163,7 ± 0,1	132,6 ± 1,4	0,84 ± 0,04	13,9 ± 0,6	22,2 ± 0,8	46,0 ± 1,9	0,13 ± 0,02	49,9 ± 4,7
13	30,4 ± 1,6	147,0 ± 7,3	71,5 ± 1,6	1,02 ± 0,05	18,3 ± 1,3	21,9 ± 0,5	43,0 ± 1,3	0,15 ± 0,01	39,9 ± 1,1
14	88,8 ± 5,9	220,8 ± 11,6	100,5 ± 7,1	2,46 ± 0,03	12,9 ± 0,7	21,5 ± 0,8	50,3 ± 22,2	0,13 ± 0,03	91,1 ± 13,1
15	131,2 ± 8,6	150,9 ± 8,3	130,2 ± 0,8	1,58 ± 0,09	15,1 ± 0,7	20,9 ± 0,7	45,4 ± 3,7	0,09 ± 0,01	41,9 ± 2,7
16	64,9 ± 0,7	128,3 ± 12,8	95,5 ± 7,2	0,93 ± 0,13	14,8 ± 2,0	23,9 ± 2,2	48,6 ± 4,6	0,52 ± 0,07	31,1 ± 0,6
17	46,0 ± 2,357	178,5 ± 10,8	77,5 ± 6,5	0,85 ± 0,02	16,6 ± 0,4	21,7 ± 0,6	40,1 ± 0,9	0,10 ± 0,01	41,9 ± 2,7
18	26,2 ± 0,379	266,5 ± 17,7	59,8 ± 2,6	1,16 ± 0,06	20,6 ± 1,1	24,1 ± 0,7	42,0 ± 2,0	0,09 ± 0,01	44,6 ± 2,9
19	39,9 ± 4,037	155,0 ± 12,5	80,6 ± 5,4	1,19 ± 0,05	18,6 ± 1,2	28,4 ± 2,0	47,8 ± 5,3	0,24 ± 0,04	25,4 ± 1,0
20	19,5 ± 0,909	123,0 ± 4,5	62,0 ± 3,5	1,48 ± 0,12	12,3 ± 0,3	24,9 ± 0,8	45,9 ± 1,4	0,43 ± 0,03	40,0 ± 3,4
21	98,5 ± 2,740	198,1 ± 13,3	116,1 ± 16,9	1,14 ± 0,05	12,3 ± 1,0	23,4 ± 1,2	37,6 ± 0,8	0,24 ± 0,04	37,7 ± 2,8
22	46,3 ± 4,151	217,7 ± 7,0	81,4 ± 7,4	0,56 ± 0,02	21,1 ± 0,3	24,8 ± 0,9	43,8 ± 2,3	0,07 ± 0,01	34,4 ± 2,7
23	54,3 ± 4,560	220,7 ± 24,1	93,8 ± 5,1	1,44 ± 0,09	20,4 ± 1,5	27,8 ± 1,5	50,5 ± 0,2	0,06 ± 0,01	38,5 ± 2,6

Na < 2,193 mg/kg

Avaliando a Tabela 12, constatamos a presença de elementos comumente encontrados em alimentos, como ferro, cobre, zinco e bário.

Não foi possível quantificar sódio nas amostras uma vez que o método foi desenvolvido esperando altas concentrações (usando a diluição por aerossol - HMI) e as amostras ficaram abaixo do MLOQ, provando que a concentração de Na deve ser baixa. Essa informação está de acordo com a busca feita depois em embalagens comerciais de sementes de urucum, que informam que não há sódio (0 mg) em seus pacotes de 100g de sementes de urucum.

4.5 Conclusão

Um método de preparo de amostra para sementes de urucum baseado em digestão ácida assistida por microondas foi apresentado. Foi possível quantificar Cr, Cd, Pb, Se, Al, Mn, Co, Ni, Cu, Zn, Mo e Ba pelo método ICP-MS sem diluição por aerossol enquanto Ca, Fe, Mg e K utilizaram o método ICP-MS com diluição por aerossol. As análises com e sem diluição por aerossol são feitas de forma simultânea pelo instrumento e por isso o método apresentou rapidez para identificar e quantificar um grande número de elementos químicos.

A concentração de Se em sementes de urucum é de 100 a 1000 vezes menor que em castanhas-do-pará e as concentrações de Cd e Pb estão de acordo com a legislação vigente no país.

Não foi possível quantificar as amostras para Be, Na, V, As, Sb, Hg, Tl e U, uma vez que suas concentrações ficaram abaixo dos MLOQs que foram apresentados durante a validação da metodologia.

Duas amostras de referência foram utilizadas durante a validação do método e apresentaram recuperações satisfatórias de 80 - 120% para todos os elementos.

A quantificação apresentada pode ser utilizada para encontrar a quantidade máxima permitida de ingestão de sementes de urucum, considerando elementos tóxicos e/ou orientar produtores sobre boas práticas no que diz respeito ao uso de fertilizantes, pesticidas e condições de transporte e armazenamento das sementes de urucum.

Capítulo V

Conclusões e Referências

5.1 Conclusões Gerais

Uma caracterização para sementes de urucum foi apresentada neste trabalho. Primeiramente através do estudo da composição da semente que apresentou, na média, 12,24% de pó vermelho na sua constituição.

Depois, um método rápido para detecção e quantificação de bixina por LC-DAD foi desenvolvido. O método permitiu quantificar amostras de 23 produtores diferentes da região de Monte Castelo/SP, apresentando concentração média de bixina de 17,03 mg/g, valor que está dentro da faixa de concentração já citada por outros autores. Ao mesmo tempo, sabe-se que esse valor pode variar para amostras cultivadas em outro solo ou locais de diferente temperatura e iluminação.

Com uso do LC-MS foi desenvolvido um método por ESI utilizando a mesma coluna cromatográfica que no método por LC-DAD. As análises por LC-MS permitiram realizar a identificação da bixina uma vez que obteve-se a massa exata através do Q-TOF, um analisador que fornece resultados de alta exatidão, e também a identificação dos principais fragmentos da bixina, utilizando o modo *tandem* MS/MS. Ainda, com uma curva analítica foi possível quantificar bixina em algumas amostras, para efeitos comparativos, e foi comprovado resultados muito similares (5% de diferença) entre as técnicas LC-DAD e LC-MS. Por isso, pode-se utilizar uma das técnicas para confirmação dos resultados gerados na outra.

Com o auxílio do GC-MS foi possível avaliar o perfil de ácidos graxos, tocoferóis e fitoesteróis em óleo das sementes de urucum. Essas classes de compostos são extremamente importantes devido a sua aplicação na indústria de alimentos e na saúde humana. Apesar da similaridade das amostras (mesma região, temperatura e data de coleta) algumas se destacaram com alto teor de tocoferóis e fitoesteróis em comparação as demais – fator que pode ser atribuído a uma prática especial de cada produtor como a árvore ou ao solo da sua produção. Também alguns testes para melhorar o preparo de amostra foram avaliados entretanto não conseguiram desempenho similar no número de compostos extraídos nem na intensidade dos íons em relação ao método convencional e por isso não foram aplicados para análise em todas as amostras.

Por fim, elementos presentes em alta e baixa concentração podem ser determinados simultaneamente nas sementes de urucum por ICP-MS utilizando um

único método, após uma digestão ácida assistida por microondas. Os elementos de maior concentração foram K, Ca e Mg (macroelementos); de menor concentração foram Al, Ba, Mo, Cu, Co, Fe, Mn, Ni e Zn (microelementos) e, por fim, Cr, Cd, Se e Pb em níveis traço. Neste método Na, U, Hg, V, Be, As, Sb e Tl não puderam ser quantificados uma vez que ficaram abaixo do limite de quantificação do método.

Dessa forma, as abordagens aqui descritas permitem uma caracterização abrangente das sementes de urucum em relação aos seus compostos de interesse, podendo ser posteriormente aplicada em um estudo mais abrangente através da coleta de amostras de diferentes regiões do Brasil ou ainda de diferentes países.

5.2 Referências Bibliográficas

1. Shahid-ul-Islam, Rather, L. J. & Mohammad, F. Phytochemistry, biological activities and potential of annatto in natural colorant production for industrial applications - A review. *J. Adv. Res.* **7**, 499–514 (2016).
2. Giuliano, G., Rosati, C. & Bramley, P. M. To dye or not to dye: biochemistry of annatto unveiled. *Trends Biotechnol.* **21**, 513–516 (2003).
3. Mala, K. S. & Rao, P. P. Studies on application of annatto (*Bixa orellena* L.) dye formulations in dairy products. *J Food Sci Technol* **52**, 912–919 (2013).
4. Giorgi, A., Marinis, P. De, Granelli, G., Chiesa, L. M. & Panseri, S. Secondary Metabolite Profile, Antioxidant Capacity and Mosquito Repellent Activity of *Bixa orellana* from Brazilian Amazon Region. *J. Chem.* **26**, 499–514, (2013).
5. Ezuruike, U. F. & Prieto, J. M. The use of plants in the traditional management of diabetes in Nigeria: Pharmacological and toxicological considerations. *J. Ethnopharmacol.* **155**, 857–924 (2014).
6. Alexander, J. *et al.* *Evaluation of certain food additives: fifth-ninth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. World Health Organization - Technical Report Series* (2002).
7. Paumgarten, F. J. R. *et al.* Evaluation of the developmental toxicity of annatto in the rat. *Food Chem. Toxicol.* **40**, 1595–1601 (2002).
8. Agner, A. R., Barbisan, L. F., Scolastici, C. & Salvadori, D. M. F. Absence of carcinogenic and anticarcinogenic effects of annatto in the rat liver medium-term assay. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 1687–1693 (2004).
9. Yoshino *et al.* Ninety-toxicity study of annatto extract, a natural food color, in rats. *J. Toxicol. Sci.* **28**, 294 (2003).
10. Ouyang, D., Zhang, R., Yi, L. & Xi, Z. A synergistic effect of Cu²⁺ and norbixin on DNA damage. *Food Chem. Toxicol.* **46**, 2802–2807 (2008).
11. Auttachoat, W., Germolec, D. R., Smith, M. J., White, K. L. & Guo, T. L. Contact sensitizing potential of annatto extract and its two primary color components, cis-bixin and norbixin, in female BALB/c mice. *Food Chem. Toxicol.* **49**, 2638–2644 (2011).
12. IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Produção da extração vegetal e silvicultura, v.24, 2009. 45p.
13. Mercadante, A. Z., Steck, A. & Pfander, H. Isolation and structure elucidation

- of minor carotenoids from annatto (*Bixa orellana* L.) seeds. *Phytochemistry* **46**, 1379–1383 (1997).
14. Tirimanna, A. S. L. Study of the carotenoid pigments of *Bixa orellana* L. Seeds by thin layer chromatography. *Mikrochim. Acta* **76**, 11–16 (1981).
 15. Prabhakara Rao, P. G., Jyothirmayi, T., Balaswamy, K., Satyanarayana, A. & Rao, D. G. Effect of processing conditions on the stability of annatto (*Bixa orellana* L.) dye incorporated into some foods. *LWT - Food Sci. Technol.* **38**, 779–784 (2005).
 16. Scotter, M. The chemistry and analysis of annatto food colouring: a review. *Food Addit. Contam.* **26**, 1123–1145 (2009).
 17. Vilar, D. D. A. *et al.* Traditional Uses, chemical constituents, and biological activities of *Bixa Orellana* L.: A review. *Sci. World J.* **2014**, 1-11 (2014).
 18. Noppe, H. *et al.* Determination of bixin and norbixin in meat using liquid chromatography and photodiode array detection. *Food Addit. Contam. Part A* **26**, 17–24 (2009).
 19. Chisté, R. C., Yamashita, F., Gozzo, F. C. & Mercadante, A. Z. Simultaneous extraction and analysis by high performance liquid chromatography coupled to diode array and mass spectrometric detectors of bixin and phenolic compounds from annatto seeds. *J. Chromatogr. A* **1218**, 57–63 (2011).
 20. Breithaupt, D. E. Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: Applicability of accelerated solvent extraction. *Food Chem.* **86**, 449–456 (2004).
 21. Rehbein, J. *et al.* Characterization of bixin by LC-MS and LC-NMR. *J. Sep. Sci.* **30**, 2382–2390 (2007).
 22. De Rosso, V. V. & Mercadante, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian fruits. *J. Agric. Food Chem.* **55**, 5062–5072 (2007).
 23. López-Cobo, A., Martín-García, B., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A. & Gómez-Caravaca, A. Comparison of Two Stationary Phases for the Determination of Phytosterols and Tocopherols in Mango and Its By-Products by GC-QTOF-MS. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, 1594 (2017).
 24. Azevedo-Meleiro, C. H. & Rodriguez-Amaya, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *J. Food*

- Compos. Anal.* **17**, 385–396 (2004).
25. Guinazi, M., Miranda Milagres, R. C. R., Pinheiro-SanT'Ana, H. M. & Chaves, J. B. P. Tocoferóis e tocotrienóis em óleos vegetais e ovos. *Quim. Nova* **32**, 2098–2103 (2009).
 26. Bacchetti, T., Masciangelo, S., Bicchiega, V., Bertoli, E. & Ferretti, G. Phytosterols, phytostanols and their esters: from natural to functional foods. *Med. J. Nutrition Metab.* **4**, 165–172 (2011).
 27. Moreau, R. A., Whitaker, B. D. & Hicks, K. B. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid Res.* **41**, 457–500 (2002).
 28. Duong, S. *et al.* Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection. *Food Chemistry*, **511**, 570–576 (2016).
 29. Morais, S., Garcia e Costa, F., Pereira, M. Livros. *Environmental Health, emerging issues and practical* 227–228 (2012).
 30. Chaves, E. S. *et al.* Metals and phosphorus determination in vegetable seeds used in the production of biodiesel by ICP OES and ICP-MS. *Microchem. J.* **96**, 71–76 (2010).
 31. Virgilio, A., Rêgo, J. F., Barros, A. I. & Neto, J. A. G. Determination of Cd, Ni and V in spices by solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Braz. Chem. Soc.* **26**, 1988–1993 (2015).
 32. Ansari, R. *et al.* Variation in accumulation of heavy metals in different varieties of sunflower seed oil with the aid of multivariate technique. *Food Chem.* **115**, 318–323 (2009).
 33. Jia, L. H., Liu, Y. & Li, Y. Z. Determination of wholesome elements and heavy metals in safflower (*Carthamus tinctorius* L.) from Xinjiang and Henan by ICP-MS/ICP-AES. *J. Pharm. Anal.* **1**, 100–103 (2011).
 34. Tie, M. *et al.* HPLC-ICP-MS speciation of selenium in Se-cultivated *Flammulina velutipes*. *Arab. J. Chem.* **13**, 416–422 (2017).
 35. Thomson, C. D., Chisholm, A., McLachlan, S. K. & Campbell, J. M. Brazil nuts: An effective way to improve selenium status. *Am. J. Clin. Nutr.* **87**, 379–384 (2008).

36. El-elimat, T. *et al.* Chemical Diversity of Metabolites from Fungi, Cyanobacteria, and Plants. *ACS Med Chem Lett.* **8**, 645-649 (2012).
37. Feher, M. & Schmidt, J. M. Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* **43**, 218–227 (2003).
38. Dobson, C. M. Chemical space and biology. *Nature* **432**, 824–828 (2004).
39. Eugster, P. J. & Wolfender, J. L. *UHPLC in natural products analysis*. *RSC Chromatography Monographs* vol. 2012–Janua (2012).
40. Przybyciel, M. Novel phases for HPLC separations. *LC C LC Column Technol. Suppl.* 49–52 (2006).
41. Chester, T. Recent Developments in HPLC Stationary Phases. *Anal. Chem.* **85**, 579-589 (2012).
42. Fekete, S., Grand-Guillaume Perrenoud, A. & Guillarme, D. Evolution and Current Trends in Liquid and Supercritical Fluid Chromatography. *Curr. Chromatogr.* **1**, 15–40 (2013).
43. Marston, A. Role of advances in chromatographic techniques in phytochemistry. *Phytochemistry* **68**, 2786–2798 (2007).
44. Cabrera, K. Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *J. Sep. Sci.* **27**, 843–852 (2004).
45. Fekete, S., Guillarme, D. & Dong, M. W. Superficially porous particles: perspectives, practices, and trends. *LC GC North Am.* **32**, 420 (2014).
46. Guillarme, D., Ruta, J., Rudaz, S. & Veuthey, J. L. New trends in fast and high-resolution liquid chromatography: A critical comparison of existing approaches. *Anal. Bioanal. Chem.* **397**, 1069–1082 (2010).
47. Juarez Souza de Oliveira, Antônio Augusto Ulson de Souza, S. M. A. G. U. de S. Caracterização, extração e purificação por cromatografia de compostos de urucum. (Universidade Federal de Santa Catarina, 2005).
48. Scotter, M. J. Characterisation of the coloured thermal degradation products of bixin from annatto and a revised mechanism for their formation. *Food Chem.* **53**, 177–185 (1995).
49. Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T. & Zhang, H. Core-shell particles: Preparation, fundamentals and applications in high performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* **1357**, 36–52 (2014).

50. Rios, A. D. O., Borsarelli, C. D. & Mercadante, A. Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. *J. Agric. Food Chem.* **53**, 2307–2311 (2005).
51. Zhou, W., Yang, S. & Wang, P. G. Matrix effects and application of matrix effect factor. *Bioanalysis* **9**, 1839–1844 (2017).
52. Cappiello, A., Famigliani, G., Palma, P. & Trufelli, H. Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **33**, 1067–1081 (2010).
53. Ruiz-Anchondo, T., Flores-Holguín, N. & Glossman-Mitnik, D. Natural carotenoids as nanomaterial precursors for molecular photovoltaics: A computational DFT study. *Molecules* **15**, 4490–4510 (2010).
54. Fiehn, O. Metabolomics - the link between genotypes and phenotypes. *Plant Mol Biology* **48**, 155-171 (2002).
55. Dettmer, K., Aronov, P. A. & Hammock, B. D. Mass Spectrometry – Bases metabolomics. *Mass Spec Reviews* **26**, 51–78 (2007).
56. Dunn, W. B. Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Phys. Biol.* **11001**, 1–24 (2008).
57. Kind, T. *et al.* FiehnLib: Mass Spectral and Retention Index Libraries for Metabolomics Based on Quadrupole and Time-of-Flight Gas Chromatography/ Mass Spectrometry. *Anal Chem* **81**, 10038–10048 (2009).
58. Sanz, M. L. A derivatization procedure for the simultaneous analysis of iminosugars and other low molecular weight carbohydrates by GC – MS in mulberry (*Morus sp.*). *Food Chemistry* **126**, 353–359 (2011).
59. Ausloos, P. *et al.* The critical evaluation of a comprehensive mass spectral library. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **10**, 287–299 (1999).
60. Du, M. & Ahn, D. U. Simultaneous Analysis of Tocopherols , Cholesterol , and Phytosterols Using. *J. Food Sci.* **67**, 1696–1700 (2002).
61. Bligh, E. G. & Dyer, W.J. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Canadian J. Biochem. Physiol.* **37**, 911-917 (1959).
62. Zanqui, A. B. *et al.* Subcritical Extraction of *Salvia hispanica* L. Oil with N-Propane: Composition, Purity and Oxidation Stability as Compared to the Oils Obtained by Conventional Solvent Extraction Methods. *Artic. J. Braz. Chem.*

- Soc* **26**, 282–289 (2015).
63. Beveridge, T. H., Li, T. S. & Drover, J. C. G. Phytosterol Content in American Ginseng Seed Oil. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 744–750 (2002).
 64. Albuquerque, C. L. C. & Meireles, M. A. a. Defatting of annatto seeds using supercritical carbon dioxide as a pretreatment for the production of bixin: Experimental, modeling and economic evaluation of the process. *J. Supercrit. Fluids* **66**, 86–94 (2012).
 65. Prince, K. De & Sato, D. N. Avaliação das moléculas com atividade antiTB das plantas do cerrado brasileiro Screening of molecules with anti-TB activity from the. **XVI**, 83–88 (2010).
 66. Standards, N. I. of. NIST Standard Reference Database 14. 1–49 (1992).
 67. Gómez-Pietro, M. S., Caja, M. M., Herraiz, M., Santa- María, G. Supercritical Fluid Extraction of all – trans - Lycopene from Tomato. *J Agric Food Chem.* **51**, 3–7 (2003).
 68. Thomas, R. *Practical Guide to ICP-MS: A Tutorial for Beginners.* (2013).
 69. Barros, A. I., Pinheiro, F. C., Amaral, C. D. B., Lorençatto, R. & Nóbrega, J. A. Aerosol dilution as a simple strategy for analysis of complex samples by ICP-MS. *Talanta* vol. 178 805–810 (2018).
 70. Pinheiro, F. C., Lorençatto, R., Barros, A. I., Amaral, C. D. B. & Nóbrega, J. A. Fit-for-purpose ICP-MS procedure supporting brazilian regulations on inorganic constituents in fresh and saline waters. *J. Braz. Chem. Soc.* **29**, 1570–1578 (2018).
 71. Döker, S. Exploiting aerosol dilution for the determination of ultra-trace elements in honey by collision/reaction cell inductively coupled plasma mass spectrometry (CRC-ICP-MS) without thermal digestion. *Anal. Methods* **9**, 1710–1717 (2017).
 72. Tao, D. *et al.* Rapid and accurate determination of gold in geological materials by an improved ICP-MS method. *Microchem. J.* **135**, 221–225 (2017).
 73. Wilbur, S. M. Combining Helium Collision Mode, Aerosol Dilution and Discrete Sampling to Maximize Matrix Tolerance and Productivity in ICP-MS Analysis of Environmental Samples. *Open Chem. Biomed. Methods J.* **3**, 135–142 (2011).
 74. da Silva, B. P. *et al.* Chemical composition of Brazilian chia seeds grown in

- different places. *Food Chem.* **221**, 1709–1716 (2017).
75. Wang, T. Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry (LC-ICP-MS). *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **30**, 807–831 (2007).
 76. Finley-Jones, H. J., Molloy, J. L. & Holcombe, J. A. Choosing internal standards based on a multivariate analysis approach with ICP(TOF)MS. *J. Anal. At. Spectrom.* **23**, 1214–1222 (2008).
 77. Brenton, A. G., Godfrey, A. R. & Brenton, A. G. CRITICAL INSIGHT Accurate Mass Measurement: Terminology and Treatment of Data. *J Am Soc Mass Spectrom* **21**, 1821–1835 (2010).
 78. Thomson, C.D., Chisholm, A., McLachlan, S.K. & Campbell, J.M. Brazil nuts: an effective way to improve selenium status. *Am J Clin Nutr.* **2**, 379-384 (2008).
 79. Braunberger, C. *et al.* LC-NMR, NMR and LC-MS identification and LC-DAD quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in *Drosera peltate*. *Journal of Chromatography B* **932**, 111-116 (2013).
 80. Weon, J. B. *et al.* Simultaneous quantification of eleven chemical components in traditional herbal medicinal formula socheongryongtang by HPLC-DAD and LC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **35**, 2243-2254 (2012).
 81. Lin, L. Z., Mulhopadhyay, S., Robbins, R. J. & Harnly, J. M. Identification and quantification of flavonoids of Mexican oregano (*Lippia graveolens*) by LC-DAD-ESI/MS analysis. *Journal of Food Composition and Analysis* **20**, 361-369 (2007).
 82. Vessechi, R. *et al.* Nomenclaturas de espectrometria de massas em língua portuguesa. *Quím. Nova* **34**,1875-1887 (2011).