

Vítor Fernandes Freire

Estudo dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos dos frutos de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis* utilizando SBSE, LC/Flu e LC/MS

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências no Programa de Pós-Graduação em Química

Área de concentração: Química Orgânica e Biológica

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Janete Harumi Yariwake

São Carlos

2017

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço imensamente a todos que contribuíram para minha formação ao longo desses dois anos de mestrado.

Começo agradecendo muito ao meu pai, Petronilio, minha mãe, Tania, e minha irmã, Dayane, por todo o apoio demonstrado ao longo de meu caminho até aqui.

Não posso deixar de agradecer minha orientadora, Janete, que tanto auxiliou em minha formação, sendo uma orientadora muito presente, sempre disposta a discutir e me questionando sobre cada aspecto do trabalho. Ao técnico do laboratório, Benedito, um amigo que fiz durante o mestrado, e que me ajudou muito no desenvolvimento do trabalho. À Renata Colombo, que sempre esteve disposta a ajudar como fosse possível ao decorrer do trabalho. Ao Leandro Arriveti pelo auxílio nas análises por LC/MS.

Agradeço também a todos meus amigos, aos antigos, que continuaram muito presentes ao longo desses dois anos e aos que fiz durante esse período do mestrado. Em especial, gostaria de agradecer a parceria de uma pessoa com quem já tinha amizade desde a época de graduação, mas que durante o mestrado se tornou uma pessoa importantíssima nesse tempo em São Carlos, a grande amiga Mirelle Takaki.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida (Processo: 131094/2015-7) e à FAPESP pelo auxílio financeiro ao projeto (Processo: 21886-7/2013) e à CAQI pela disponibilização do equipamento multiusuário UHPLC/MS (FAPESP Proc. 2009/54040-8).

## RESUMO

FREIRE, V. F. **Estudo dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos dos frutos de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis* utilizando SBSE, LC/Flu e LC/MS.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2016.

O maracujá azedo, *Passiflora edulis*, e o maracujá doce, *Passiflora alata*, são as duas espécies pertencentes à família Passifloraceae de maior importância econômica para o Brasil, sendo seus frutos amplamente comercializados como alimentos. Um grupo de substâncias conhecido como alcaloides  $\beta$ -carbolínicos são componentes minoritários desses frutos, no entanto, a literatura indica que substâncias pertencentes a esse grupo podem ter atividade tóxica. Este trabalho apresentou três objetivos específicos, com o intuito de ampliar o conhecimento sobre a fitoquímica dos frutos de *P. edulis* e de *P. alata* e da aplicação da SBSE como método de preparo de amostra: quantificação de harmana e de harmina na polpa e nas sementes de *P. alata* utilizando SBSE-PDMS e análise por HPLC/Flu; identificação de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis* através de análises por HPLC/Flu e por UHPLC/MS; estudo do processo de extração de norharmana por SBSE com duas fases extratores diferentes (PDMS e EG-Silicone) por HPLC/Flu. A quantificação de harmana e harmina na polpa e nas sementes de *P. alata* foi realizada após preparo de amostra por SBSE-PDMS e análises por HPLC/Flu. A concentração de harmana encontrada foi  $1,0328 \cdot 10^{-1} \pm 3,1217 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$  na polpa, enquanto que nas sementes foi encontrada a concentração de  $7,4391 \cdot 10^{-5} \pm 2,5501 \cdot 10^{-6} \mu\text{g g}^{-1}$ . As concentrações de harmina ficaram abaixo do LOD e do LOQ na polpa e nas sementes de *P. alata*, respectivamente. Na identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis*, os extratos para análises por HPLC/Flu e por UHPLC/MS foram preparados pelo método clássico, sendo identificados os alcaloides norharmana, harmana, harmina, harmol e harmalol. Nas análises por HPLC/Flu de extrato das cascas de *P. edulis* preparado utilizando SBSE-PDMS, o alcaloide norharmana foi identificado como majoritário e por esse motivo, foi realizado o estudo do processo de extração de norharmana por SBSE com duas fases extratoras diferentes, PDMS e EG-Silicone, utilizando planejamento fatorial fracionário, tendo como objetivo obter a melhor recuperação

percentual possível. Com as melhores condições para extração definidas, os ensaios utilizando PDMS e EG-Silicone apresentaram recuperação percentual de cerca de 50 % e 80 %, respectivamente. A quantificação de harmana na polpa e nas sementes do maracujá doce, *P. alata*, indicou quantidades muito pequenas desse alcaloide nessas partes dos frutos, levando à conclusão que um fruto de *P. alata*, apresenta cerca de 140 vezes menos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos do que o fruto de *P. edulis*, levando em consideração as quantidades de harmana e harmina no maracujá azedo relatadas na literatura. A identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis* é um importante passo para a compreensão sobre a fitoquímica dessa parte do fruto, que, nos últimos anos, deixou de ser apenas resíduo industrial e passou a ser produto alimentício com valor agregado, comercializadas como farinhas das cascas de maracujá. O estudo sobre a utilização da SBSE como técnica de extração de norharmana mostrou-se promissor, atingindo recuperação percentual aceitável para o futuro desenvolvimento de um método de quantificação de norharmana nas cascas de maracujá.

Palavras-chave: *Passiflora*; maracujá; SBSE; fitoquímica; alcaloides  $\beta$ -carbolínicos; cromatografia líquida; espectrometria de massas.

## ABSTRACT

FREIRE, V. F. **Study of  $\beta$ -carboline alkaloids in *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* fruits using SBSE, LC/Flu and LC/MS.** 2016. Dissertation (Master) - São Carlos Institute of Chemistry, São Paulo University, São Carlos, 2016.

Sour passion fruit, *Passiflora edulis*, and sweet passion fruit, *Passiflora alata*, are the two species of Passifloraceae of greater economic importance to Brazil, and their fruits are widely marketed as food. A class of compounds known as  $\beta$ -carboline alkaloids is a minor component of these fruits, however, the literature indicates that substances belonging to this group may have toxic activity. This work presents three specific objectives, in order to increase knowledge about the phytochemistry of *P. edulis* and *P. alata* and the application of SBSE as a sample preparation method: quantification of harmane and harmine in the pulp and in the seeds of *P. alata* using SBSE-PDMS and HPLC/Flu analysis; identification of  $\beta$ -carboline alkaloids in *P. edulis* peels using HPLC/Flu and UHPLC/MS analysis; study of the SBSE extraction process of norharmane using two different phases (PDMS and EG-Silicone), by HPLC/Flu analysis. Quantification of harmane and harmine in the pulp and the seeds of *P. alata* was performed after sample preparation by SBSE-PDMS and analysis by HPLC/Flu. The concentration of harmane was  $1,0328 \cdot 10^{-1} \pm 3,1217 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$  in the pulp while the in the seeds it was found  $7.4391 \cdot 10^{-5} \pm 2.5501 \cdot 10^{-6} \mu\text{g g}^{-1}$  harmane. The concentrations of harmine were below the LOD and LOQ in the pulp and in the seeds of *P. alata*, respectively. For the identification of the  $\beta$ -carboline alkaloids in the peels of *P. edulis*, the extracts were prepared by using the classic method and analyzed by HPLC/Flu and UHPLC/MS, and the alkaloids norharmane, harmane, harmine, harmol and harmalol were identified. In the HPLC/Flu analysis of the extract of *P. edulis* peels prepared using SBSE-PDMS, the alkaloid norharmane was identified as a major constituent and, for this reason, it was performed a study about the extraction process of norharmane by SBSE, evaluating two different phases, PDMS and EG-Silicone, by using fractional factorial design, aiming to get the best percentage recovery. Defined the best conditions for extraction, the experiments performed by using PDMS and EG-Silicone bars showed percentage recovery about 50% and 80%, respectively. Quantification of harmane in the pulp and seeds of sweet passionfruit, *P. alata*, indicated very small amounts of

this alkaloid in these parts of the fruits, leading to the conclusion that the fruits of *P. alata*, has around 140 times less  $\beta$ -carboline alkaloid than the fruits of *P. edulis*, taking into account the amounts of harmana and harmine on sour passionfruit reported in the literature. Identification of  $\beta$ -carboline alkaloids in *P. edulis* peels is an important step for understanding the phytochemistry of this part of the fruits, which, in recent years, is no longer just an industrial waste and became a food product with added value, marketed as passion fruit peels flour. The study about the utilization of SBSE as extraction technique of norharmane showed to be promising, reaching acceptable recovery percentage, for the future development of a method for quantification of norharmane in passion fruit peels.

Keywords: *Passiflora*; passion fruit; SBSE; phytochemistry;  $\beta$ -carboline alkaloids; liquid chromatography; mass spectrometry.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Maracujá azedo ( <i>Passiflora edulis f. flavicarpa</i> ).....	14
Figura 2 - Flor de <i>Passiflora edulis</i> .....	15
Figura 3 - Estruturas dos alcaloides $\beta$ -carbolínicos descritos no gênero <i>Passiflora</i> e seus respectivos valores de $pK_a$ . ....	19
Figura 4 - Biogênese de alcaloides $\beta$ -carbolínicos.....	21
Figura 5 - Ilustração de uma barra de SBSE.....	25
Figura 6 - Recuperação teórica de analitos com diferentes $\log K_{OW}$ em SBSE e SPME.....	26
Figura 7 - Esquema geral de um HPLC .....	28
Figura 8 - Cromatogramas por HPLC/Flu e espectros de fluorescência dos padrões de harmana (A) e harmina (B).....	43
Figura 9 - Cromatogramas por HPLC/Flu e espectros de fluorescência do pico cromatográfico identificado como harmana nos extratos da polpa (A) e das sementes (B) de <i>P. alata</i> . ....	44
Figura 10 - Curvas de adição de padrão de harmana e de harmina na polpa de <i>P. alata</i> . ....	45
Figura 11 - Curva de adição de padrão de harmana e harmina nas sementes de <i>P. alata</i> . ....	47
Figura 12 - Cromatograma por HPLC/Flu da mistura de padrões de alcaloides em $\lambda_{emissão}$ de 470 nm e espectros de fluorescência dos picos analisados. ....	49
Figura 13 - Cromatograma por HPLC/Flu do extrato das cascas de <i>P. edulis</i> preparado pelo método clássico em $\lambda_{emissão}$ de 440 nm e espectros de fluorescência dos picos selecionados. ....	50
Figura 14 - Cromatograma por HPLC/Flu do extrato das cascas de <i>P. edulis</i> preparado utilizando SBSE-PDMS em $\lambda_{emissão}$ de 440 nm e espectros de fluorescência dos picos selecionados. ....	51
Figura 15 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmana.....	52
Figura 16 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmina.....	53
Figura 17 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmol.....	54
Figura 18 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmalina.....	55
Figura 19 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmalol.....	56
Figura 20 - TIC obtido por UHPLC/MS do extrato das cascas de <i>P. edulis</i> . ....	57

Figura 21 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon $C_{12}H_{11}N_2^+$ , no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> .....	58
Figura 22 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon $C_{13}H_{13}ON_2^+$ , no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> . ....	59
Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon $C_{12}H_{11}ON_2^+$ , no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> .....	60
Figura 24 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon $C_{12}H_{13}ON_2^+$ , no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> . ....	61
Figura 25 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon $C_{11}H_9N_2^+$ , no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> .....	63
Figura 26 - Gráficos de Pareto para as barras com fase extratora de PDMS e de EG-Silicone.....	65
Figura 27 - Gráfico dos Efeitos Principais para as fases extratoras PDMS e EG-Silicone.....	67
Figura 28 - Gráfico das Interações entre os fatores para as barras com fase extratora de PDMS e de EG-Silicone. ....	69



## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Produção de maracujá no Brasil entre 2010 e 2014. ....	16
Tabela 2 - Produção de maracujá nas cinco regiões do Brasil em 2014.....	17
Tabela 3 - Nomenclatura usual e IUPAC das $\beta$ -carbolinas. ....	20
Tabela 4 - $\log K_{o/w}$ para os alcaloides da Figura 3. ....	27
Tabela 5 - Condições do método de extração para quantificação de harmana e harmina utilizando SBSE-PDMS. ....	35
Tabela 6 - Condições cromatográficas e de detecção por HPLC/Flu.....	37
Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados pelo planejamento fatorial.....	39
Tabela 8 - Matriz dos experimentos do planejamento fatorial fracionário. ....	40
Tabela 9 - Concentração de harmana e harmina em polpa e sementes dos frutos de <i>P. alata</i> . ....	48
Tabela 10 - Alcaloides $\beta$ -carbolínicos identificados no extrato das cascas de <i>P. edulis</i> .....	64

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 - Recuperação Percentual.....	39
Equação 2 - Relação entre coeficiente angular e coeficiente linear .....	46
Equação 3 - Concentração de alcaloide na polpa .....	46
Equação 4 - Concentração de alcaloide nas sementes .....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

DNA = do inglês "Deoxyribonucleic Acid", traduzido como Ácido Desoxirribonucleico

DPR = Desvio Padrão Relativo

EG-Silicone = Etilenoglicol-silicone

Flu = Fluorescência

HPLC = do inglês "High Performance Liquid Chromatography", traduzido como Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

HPR = do inglês "Horseradish Peroxidase"

IUPAC = do inglês "International Union of Pure and Applied Chemistry", traduzido como União Internacional de Química Pura e Aplicada

$K_{PDMS/W}$  = coeficiente de partição PDMS/água

LC = do inglês "Liquid Chromatography", traduzido como Cromatografia Líquida

LOD = do inglês "Limit of Detection", traduzido como Limite de Detecção

LOQ = do inglês "Limit of Quantification", traduzido como Limite de Quantificação

$\log K_{OW}$  = logaritmo do coeficiente de partição octanol/água

MAO = Monoamina Oxidase

MEPS = do inglês "Microextraction by packed sorbent", traduzido como Microextração em Sorvente Empacotado

MPO = do inglês "Myeloperoxidase", traduzido como mieloperoxidase

MS = do inglês "Mass Spectrometry", traduzido como Espectrometria de Massas

MTCA = do inglês "1-methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid", traduzido como ácido 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico

$m/z$  = relação massa/carga

PDMS = Polidimetilsiloxano

$p/r$  = do inglês "phase ratio", traduzido como razão entre volume da solução e volume da fase extratora.

SBSE = do inglês "Stir Bar Sorptive Extraction", traduzido como Extração Sortiva em Barra de Agitação

SIM = do inglês "Selected Ion Monitoring", traduzido como Monitoramento do íon Selecionado

SPE = do inglês "Solid Phase Extraction", traduzido como Extração em Fase Sólida

SPME = do inglês "Solid Phase Microextraction", traduzido como Microextração em Fase Sólida

TIC = do inglês "Total Ion Chromatogram", traduzido como Cromatograma dos Íons Totais

THCA = do inglês "1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline-3-carboxylic acid", traduzido como ácido 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico

$T_R$  = Tempo de Retenção

UHPLC = do inglês "Ultra High Performance Liquid Chromatography", traduzido como Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência

UV = Ultravioleta

(-1) = nível mínimo

(+1) = nível máximo

$[M+H]^+$  = molécula protonada

$\lambda_{\text{emissão}}$  = Comprimento de onda de emissão

$\lambda_{\text{excitação}}$  = Comprimento de onda de excitação

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>1.1 Passifloraceae</b> .....	14
1.1.1 Importância ecológica das espécies de <i>Passiflora</i> .....	15
1.1.2 Produção de maracujá no Brasil .....	16
1.1.3 Etnofarmacologia do maracujá e sua utilização como alimento funcional.....	17
<b>1.2 Alcaloides <math>\beta</math>-carbolínicos</b> .....	19
1.2.1 Distribuição de alcaloides $\beta$ -carbolínicos em diferentes matrizes biológicas ...	22
1.2.2 Atividades bioquímicas e farmacológicas.....	23
<b>1.3 Análise de alcaloides</b> .....	25
1.3.1 SBSE.....	25
1.3.2 Cromatografia líquida .....	27
1.3.2.1 Detectores em cromatografia líquida.....	29
1.3.3 Planejamento experimental.....	31
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	33
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	34
<b>3.1 Materiais</b> .....	34
<b>3.2 Material Vegetal</b> .....	34
<b>3.3 Quantificação de alcaloides presentes na polpa e nas sementes de <i>P. alata</i></b> .....	35
<b>3.4 Identificação de alcaloides <math>\beta</math>-carbolínicos nas cascas de <i>P. edulis</i></b> .....	37
<b>3.5 Estudo do processo de extração de norharmana por SBSE</b> .....	38
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	42
<b>4.1 Quantificação de harmana e harmina na polpa e nas sementes de <i>P. alata</i></b>	42
<b>4.2 Identificação de alcaloides <math>\beta</math>-carbolínicos nas cascas de <i>P. edulis</i></b> .....	49
<b>4.3 Estudo do processo de extração de norharmana por SBSE</b> .....	64
<b>5 CONCLUSÕES</b> .....	71
<b>6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS</b> .....	72
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	73

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 Passifloraceae

A família Passifloraceae possui 36 gêneros com 932 espécies (THE PLANT LIST, 2013). Encontrada na América, África e Ásia, está distribuída entre os trópicos e em regiões temperadas quentes (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005). Grande parte das espécies dessa família pertencem ao gênero *Passiflora*, com 513 espécies (THE PLANT LIST, 2013), que se distribui na América (apenas 20 espécies pertencentes ao gênero foram encontradas fora do continente americano), sendo que 141 espécies ocorrem no Brasil, possuindo 82 espécies endêmicas ao nosso território (REFLORA, 2014; MELETTI, 2011).

Apenas com a descoberta da América, a ciência passou a ter contato com as primeiras espécies de *Passiflora*. O primeiro registro se deve a Cieza de León (*apud* FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005) em 1553 com o nome de *granadilla*, por achá-la similar à romã. No entanto, já existiam outros nomes atribuídos ao fruto pelos índios, como múrucuya (tupi) e mburucuya (guarani), assim, foi agregado ao português a palavra maracujá (Figura 1), que significa "alimento na cuia" ou "fruto de sorver" (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

Figura 1 - Maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*).



Fonte: MOON, 2016.

Na Europa, pouco tempo após os primeiros relatos, a flor do maracujá (Figura 2) foi relacionada com a crucificação de Cristo, ficando conhecida como *passion*

*flower* (flor da paixão), e o fruto do maracujazeiro como *passion fruit* (fruto da paixão) (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005).

Figura 2 - Flor de *Passiflora edulis*.



Fonte: Autoria própria.

Na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira, lançada em 2010 pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária, são descritas as características dos fitomedicamentos referentes à *Passiflora edulis* e a *Passiflora alata*, sendo caracterizados pelo uso das folhas secas, contendo, no mínimo, 1% de flavonoides totais expressos em apigenina (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010).

#### 1.1.1 Importância ecológica das espécies de *Passiflora*

Tanto o gênero *Passiflora* como a tribo de borboletas Heliconiini, tribo pertencente à família Nymphalidae subfamília Heliconiinae, possuem distribuição geográfica muito similar, sendo encontrados principalmente entre os trópicos na América (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; GILBERT, 1971; MILLÁN C, CHACÓN C, 2010). A hipótese mais aceita para a geração dos altos níveis de correlação taxonômica entre os insetos e seus hospedeiros é atribuído à sua evolução concomitante (BENSON; BROWN; GILBERT, 1975). As larvas de algumas espécies de Heliconiini, apresentam sua dieta restrita às plantas da família

Passifloraceae. Por ser o único grande taxon de borboletas a manter essa relação exclusiva, passaram a ser conhecidos, em inglês, como *Passion Flower Butterflies*, e em português como "Borboletas-do-Maracujá" (BENSON; BROWN; GILBERT, 1975; AYMONE, 2009).

Tendo em vista a relação ecológica descrita e o número de espécies citadas no item 1.1, é possível ter uma ideia da dimensão da biodiversidade, e da quimiodiversidade, que representam a família Passifloraceae e suas relações com outros organismos. A Portaria nº 443 de 17 de dezembro de 2014, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente, reconhece seis espécies pertencentes à família Passifloraceae como espécies ameaçadas de extinção, sendo as espécies *Passiflora hatschbachii* Cervi, *Passiflora imbeana* Sacco, *Passiflora margaritae* Sacco, *Passiflora setulosa* Killip e *Passiflora urubiciensis* Cervi descritas como "Em Perigo" e a espécie *Passiflora ischnoclada* Harms descrita como "Criticamente em Perigo", sendo esse o nível mais próximo da extinção da espécie (BRASIL, 2014).

#### 1.1.2 Produção de maracujá no Brasil

As espécies do gênero *Passiflora* de maior interesse comercial são o maracujá azedo (também conhecido como maracujá amarelo), *Passiflora edulis fo. flavicarpa* O. Deg, o maracujá doce, *Passiflora alata* Curtis, e o maracujá roxo, *Passiflora edulis fo. edulis*. O Brasil é o maior produtor mundial de maracujá há mais de duas décadas, sendo que cerca de 95% de toda a produção de maracujá é referente ao maracujá azedo (MELETTI, 2011). A Tabela 1 apresenta informações sobre a dimensão do cultivo do maracujá no Brasil.

Tabela 1 - Produção de maracujá no Brasil entre 2010 e 2014.

Variável	2010	2011	2012	2013	2014
Área colhida (Hectares)	62.177	61.631	57.848	57.277	56.825
Quantidade produzida (Toneladas)	922.334	923.035	776.097	838.244	823.284
Valor da produção (Mil Reais)	797.088	851.390	857.595	932.024	984.866

Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016.



Embora a área dedicada ao cultivo e a quantidade produzida tenham diminuído no período compreendido entre 2010 e 2014, a produção passou a possuir maior valor agregado, tendo em 2014 atingido quase 1 bilhão de reais. Na Tabela 2 é possível observar a contribuição de cada região do país para a produção de maracujá em 2014.

Tabela 2 - Produção de maracujá nas cinco regiões do Brasil em 2014.

<b>Região</b>	<b>Área colhida (Hectares)</b>	<b>Quantidade produzida (Toneladas)</b>	<b>Valor da produção (Mil Reais)</b>
Nordeste	43.045	583.636	577.407
Sudeste	6.375	134.317	226.621
Norte	3.898	50.635	89.939
Sul	2.553	38.419	61.308
Centro-Oeste	954	16.277	29.591
Brasil	56.825	823.284	984.866

Fonte: INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016.

O Nordeste é o maior produtor do país, contribuindo com a maior parte de toda a produção nacional, destacando-se o estado da Bahia com área colhida de 30.657 hectares (INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA, 2016). O Brasil contribuiu com cerca de 70% de toda a produção mundial de maracujá em 2010. No entanto, a exportação é incipiente, representando cerca de 1,5% de toda a produção nacional, ocorrendo em pequena escala em forma de frutas frescas, mas principalmente de sucos concentrados, tendo como principal destino a Europa (FALEIRO; JUNQUEIRA; BRAGA, 2005; MELETTI, 2011).

### 1.1.3 Etnofarmacologia do maracujá e sua utilização como alimento funcional

O uso pré-histórico do maracujá foi comprovado em trabalho de Gremillion (1989), que indicou os arborígenas como parte ativa na dispersão de sementes de *Passiflora incarnata* no sudeste dos Estados Unidos, relatando uma relação mutualística entre os seres humanos e o maracujá.

Há relatos na América do Sul sobre uso de diferentes partes da *Passiflora edulis* como sedativo, diurético, anti-helmíntico, antidiarreico, estimulante, tônico e

também no tratamento da hipertensão, sintomas da menopausa e cólicas infantis. Em outras partes do mundo há relatos do uso do fruto como estimulante digestivo e uso como remédio para carcinoma gástrico. Na Índia as folhas frescas são fervidas em uma pequena quantidade de água e o extrato é usado para o tratamento de disenteria e hipertensão, enquanto seus frutos são consumidos para alívio da constipação (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004).

Alimentos funcionais, nutracêuticos, alimentos planejados, bioativos, protetores, entre outros são denominações para alimentos que oferecem benefícios para saúde, além de suas funções nutricionais básicas (BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2008).

Grande parte dos estudos químicos sobre *Passiflora* são referentes a duas espécies, *Passiflora incarnata* e *Passiflora edulis*. Sobre *Passiflora edulis*, diversos trabalhos trazem estudos sobre a química da polpa e da semente, por serem as partes comumente utilizadas na alimentação, mostrando benefícios à saúde por conta principalmente da ação antioxidante, proveniente principalmente dos flavonoides, caracterizando esse fruto como alimento funcional. Entretanto, pouco se conhece sobre os componentes bioativos presentes nas cascas, com exceção de alguns poucos estudos recentes sobre os flavonoides e compostos fenólicos (DA SILVA et al., 2014; ICHIMURA et al., 2006; ZIBADI et al., 2007). Nos últimos anos, alguns estudos trazem informações sobre os possíveis benefícios da farinha do maracujá, a qual é produzida com a casca do fruto, indicando esta como um alimento funcional (DA SILVA et al., 2014; JANEIRO et al., 2008; RAMOS et al., 2007). Porém, é nítida a necessidade de aprofundamento nos estudos sobre constituintes bioativos presentes nas cascas dos frutos. No caso de outra espécie consumida no Brasil, embora em menor escala, a *Passiflora alata*, há um nicho de pesquisa sobre sua fitoquímica, principalmente dos frutos, tanto de pesquisas que prospectem componentes bioativos, quanto sobre as moléculas responsáveis por conferir as suas propriedades organolépticas distintas do fruto de *P. edulis*.

Em revisão publicada por Zeraik *et al.* (2010) há a descrição da presença de ácidos orgânicos, carotenoides, antocianinas, flavonoides, alcaloides, entre outras substâncias nos frutos de *P. edulis* e *P. alata*.

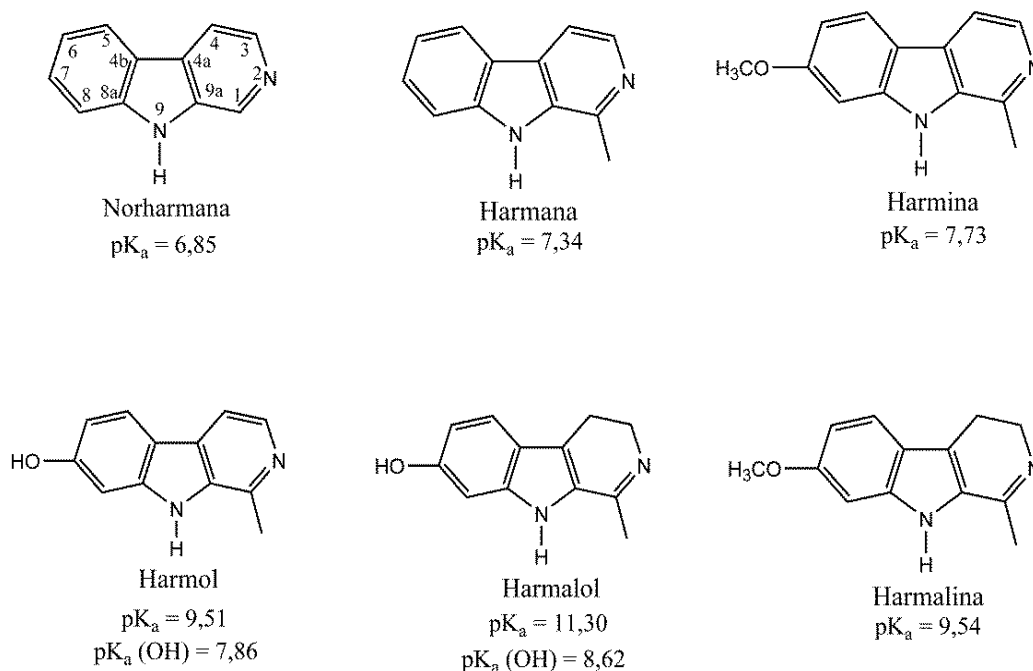
Os flavonoides foram as moléculas mais estudadas, sendo que os flavonoides C-glicosilados, como iso-orientina, orientina, vitexina e isovitexina, se destacam por conta de suas altas capacidades antioxidantes (ZERAİK et al., 2013). O grupo de

alcaloides presente nessas espécies de *Passiflora* é o grupo dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos.

## 1.2 Alcaloides $\beta$ -carbolínicos

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, ou simplesmente  $\beta$ -carbólinas, possuem um esqueleto de 9H-pirido[3,4-b]indol e pertencem ao segundo maior grupo de alcaloides, o dos alcaloides indólicos (ALLEN; HOLMSTEDT, 1980). A Figura 3 apresenta as estruturas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos e também os valores de  $pK_a$  de ionização do grupo amina do anel piridínico e do grupo hidroxila, quando existente, de cada alcaloide apresentado (BALÓN et al., 1993; DOUGLAS et al., 1983).

Figura 3 - Estruturas dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos descritos no gênero *Passiflora* e seus respectivos valores de  $pK_a$ .



Fonte: Autoria Própria.

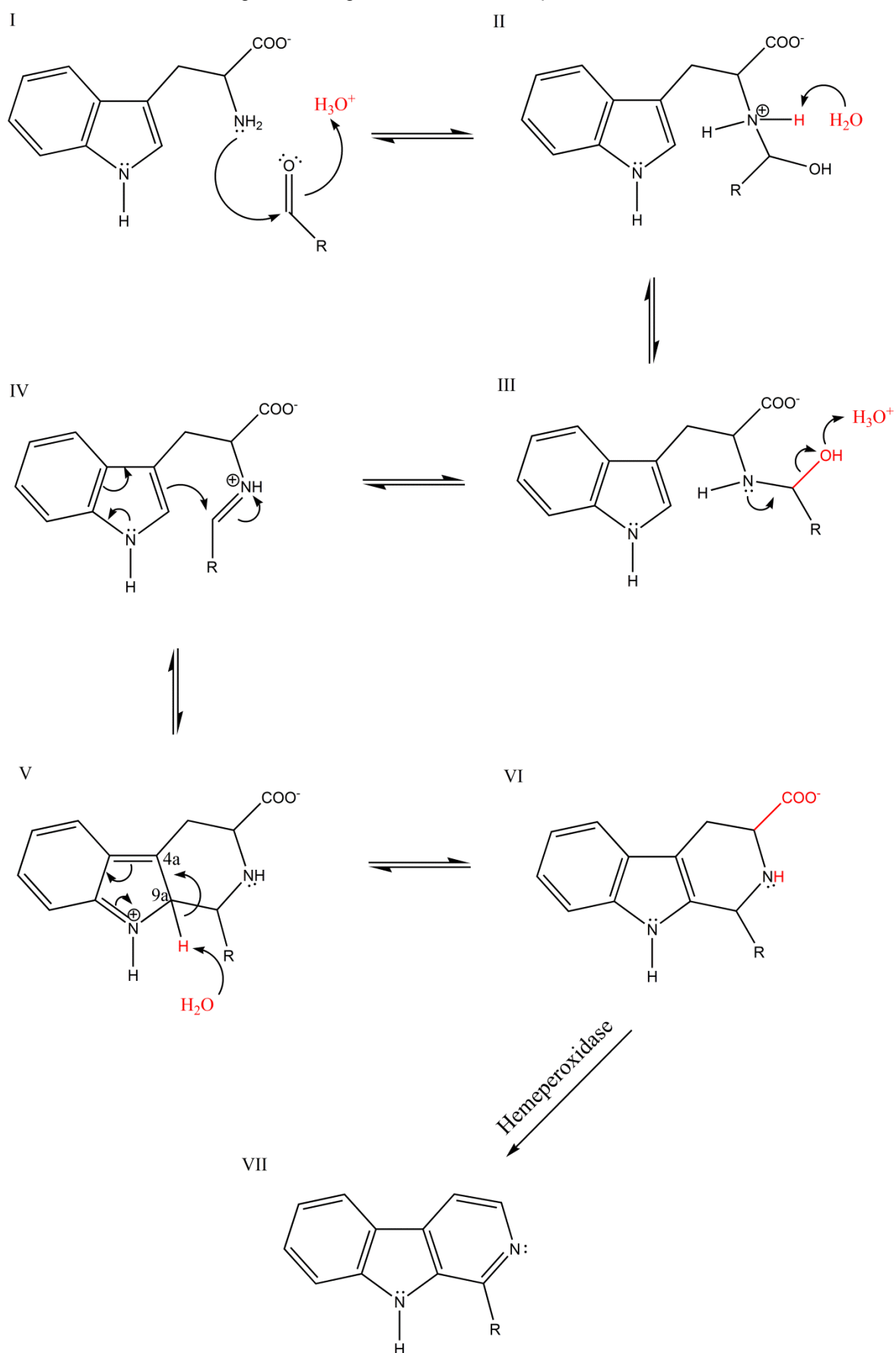
Os compostos completamente insaturados em seu anel piridínico são nomeados como  $\beta$ -carbólinas, enquanto que os parcialmente saturados e os completamente saturados são nomeados como diidro- $\beta$ -carbólinas e tetraidro- $\beta$ -carbólinas, respectivamente. As  $\beta$ -carbólinas com similaridades estruturais com a

harmana são conhecidas como alcaloides harmânicos, pelo fato de terem sido descritas pela primeira vez na espécie *Peganum harmala* (Zygophyllaceae) (CAO et al., 2007). As nomenclaturas usuais e IUPAC apresentadas na Tabela 3 se referem aos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos apresentados na Figura 3 (FooDB, 2016).

Tabela 3 - Nomenclatura usual e IUPAC das  $\beta$ -carbolinas.

Alcaloide	Nome usual	Nome IUPAC
Norharmana	$\beta$ -carbolina	9H-pirido[3,4-b]indol
Harmana	1-metil- $\beta$ -carbolina	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol
Harmina	1-metil-7-metoxi- $\beta$ -carbolina	7-metoxi-1-metil-9H-pirido [3,4-b]indol
Harmol	1-metil-7-hidroxi- $\beta$ -carbolina	1-metil-9H-pirido[3,4-b]indol-7-ol
Harmalina	1-metil-7-metoxi-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolina	7-metoxi-1-metil-3H,4H,9H-pirido[3,4-b]indol
Harmalol	1-metil-7-hidroxi-3,4-dihidro- $\beta$ -carbolina	1-metil-3H,4H,9H-pirido[3,4-b] indol-7-ol

A Figura 4 representa o esquema de biogênese proposto para o esqueleto dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, com base em artigos e livro sobre o tema (DEWICK, 2002; HERRAIZ; GALISTEO, 2014; STÖCKIGT et al., 2011). Inicialmente um resíduo de aminoácido triptofano promove um ataque nucleofílico a um aldeído (ou cetoácido) protonado (Figura 4, I), seguido pela perda de um próton do grupo amino (Figura 4, II). A captura de um próton pela hidroxila enfraquece a ligação  $\sigma$  entre o carbono e o oxigênio, a qual será então rompida, liberando água, por conta da formação da ligação  $\pi$  entre o carbono e o nitrogênio adjacente, formando um grupo imino (Figura 4, III). A seguir, o par de elétrons da ligação  $\pi$  do núcleo indólico, assistido pela ressonância do indol, ataca o carbono imínico, regenerando o par de elétrons não ligante da amina (Figura 4, IV). Por meio da abstração de um próton na posição 9a (Figura 4, V) a ligação  $\pi$  entre os carbonos 4a e 9a é regenerada, formando um ácido 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (Figura 4, VI). Após a formação do ácido 1,2,3,4-tetrahidro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico, uma hemeperoxidase promove a oxidação nas posições 1, 2, 3 e 4 e a descarboxilação na posição 3 para a formação da  $\beta$ -carbolina (Figura 4, VII).

Figura 4 - Biogênese de alcaloides  $\beta$ -carbólicos.

Fonte: Autoria própria.

Herraiz e Galisteo (2014) comprovaram a função catalítica de hemeperoxidases na biotransformação dos ácidos 1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (THCA) e 1-metil-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carbolina-3-carboxílico (MTCA) em norharmana e harmana, respectivamente. As hemeperoxidases estudadas foram *horseradish peroxidase* (HPR), *lactoperoxidase* (LPO) e *myeloperoxidase* (MPO), sendo que a HPR é uma hemeperoxidase de plantas, enquanto a LPO e a MPO pertence aos mamíferos.

### 1.2.1 Distribuição de alcaloides $\beta$ -carbolínicos em diferentes matrizes biológicas

Desde que foram descritos pela primeira vez em *Peganum harmala*, os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos foram identificados nas mais variadas matrizes, tais como plantas, alimentos e bebidas, organismos marinhos e em mamíferos (PFAU; SKOG, 2004).

Dois desses alcaloides, harmina e harmalina, foram isolados de uma bebida alucinógena típica da região amazônica conhecida como *Ayahuasca*, que é preparada utilizando diversas partes das plantas *Banisteriopsis spp.*, *Tetrapteris*, *Virola spp.* e *Anadenathera spp.* Essas duas substâncias foram descritas como responsáveis pelos efeitos alucinógenos da bebida (MARTINEZ; ALMEIDA; PINTO, 2009; PFAU; SKOG, 2004). Mais recentemente foi comprovado que essas duas substâncias possuem efeitos alucinógenos, sendo que a harmalina apresenta maior atividade. Em administração por via intravenosa, a harmalina mostrou efeitos alucinógenos na concentração de 1 mg kg<sup>-1</sup>, já por via oral, foi necessária a concentração de 4 mg kg<sup>-1</sup> (CAO et al., 2007).

Trabalhos anteriores identificaram em *P. alata* alguns alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (harmana, harmina e harmalina), porém os estudos foram realizados utilizando as folhas da planta (ABOURASHED; VANDERPLANK; KHAN, 2003; OGA et al., 1984). Em trabalho anterior do Grupo de Análise Fitoquímica, Silva (2015) identificou por UHPLC/MS/MS, nos frutos de *P. alata*, cinco alcaloides harmânicos (harmana e harmina na polpa e nas sementes e harmol, harmalol e harmalina somente nas sementes) e nos frutos de *P. edulis* três alcaloides (harmana e harmina na polpa e nas sementes, harmalina apenas nas sementes). A harmana e a norharmana foram descritas em diversas outras famílias de plantas além de Passifloraceae, como

Apocynaceae, Bigoniaceae, Elaeagnaceae, Gramineae, Rubiaceae e Zygophyllaceae (PFAU; SKOG, 2004).

Em alimentos proteicos como carnes bovinas, de frango e de peixes, foi demonstrado que a quantidade de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos aumenta conforme o tempo e a temperatura de preparação desses alimentos, demonstrando então que esses alcaloides são formados também durante o processo de aquecimento em altas temperaturas desses alimentos (CROTTI et al., 2010; PFAU; SKOG, 2004). Harmana e norharmana foram identificados em grãos frescos de café e de café torrado, mas não em grãos verdes de café (WOJTOWICZ et al., 2015). Em bebidas alcoólicas como cerveja, vinhos e saquês, a harmana foi encontrada em variadas concentrações, enquanto que a norharmana não foi encontrada em todas as bebidas analisadas (PFAU; SKOG, 2004). Harmina, harmalina e harmalol foram identificados em uma alga comestível conhecida como *wakame*, *Undaria pinnatifida* (TASCON et al., 2015).

Um grande contribuinte para a exposição humana a alcaloides  $\beta$ -carbolínicos são as fumaças de cigarros. Tanto a harmana quanto a norharmana foram encontradas em folhas de tabaco e em cigarros, sendo que no segundo caso, a concentração variou muito de acordo com a existência ou a ausência de filtro nos cigarros (HERRAIZ; CHAPARRO, 2005; PFAU; SKOG, 2004).

A formação endógena de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos em mamíferos foi observada (CAO et al., 2007). Alterações das concentrações naturais também foram observadas em algumas condições controladas, como em um experimento realizado por Fekkes et al. (2001) em que foi observada uma maior concentração de norharmana no plasma de indivíduos fumantes do que em indivíduos não fumantes. Em estudo feito por Rommelspacher, Strauss e Lindemann (1980) foi observada a excreção urinária de tetraidroharmana (harmalana) e de harmana em humanos que haviam ingerido 100 g de etanol, enquanto que esses compostos não haviam sido observados em pessoas que não haviam ingerido etanol.

### 1.2.2 Atividades bioquímicas e farmacológicas

Estudos mostraram que harmana, norharmana e harmina possuem a capacidade de se intercalar entre as bases nitrogenadas do DNA (CAO et al., 2007; DUPORTAIL, 1981). Um desses estudos também mostrou que a harmalina, que é

uma molécula de harmina parcialmente hidrogenada, possui uma capacidade de intercalação no DNA muito menor que a harmina (DUPORTAIL, 1981). Essa diferença pode estar associada ao fato de que a harmalina não possui aromaticidade no anel piridínico, fazendo com que sua estrutura não seja linear, diminuindo assim as interações com as bases nitrogenadas e dificultando sua entrada entre duas bases do DNA. O fato desses alcaloides possuírem capacidade de intercalação leva a efeitos decorrentes, como a diminuição da capacidade de reparo ao DNA, levando a danos no código genético (CAO et al., 2007).

A monoamina oxidase (MAO) é uma enzima que catalisa a desaminação oxidativa de monoaminas endógenas ou exógenas, como dos neurotransmissores dopamina, serotonina, norepinefrina, tiramina e triptamina. Existem duas isoformas descritas dessa enzima, MAO-A e MAO-B, sendo que há evidências de que a isoforma MAO-A está associada com condições como depressão e ansiedade, enquanto que existem indícios de que a isoforma MAO-B está associada com desordens neurológicas como a doença de Parkinson e a doença de Alzheimer (FOLLMER; BEZERRA NETTO, 2013). Norharmana, harmana, harmina e harmalina apresentaram atividade de inibição da MAO. A norharmana inibe preferencialmente a MAO-B, mas também inibe a MAO-A, enquanto a harmana, harmina e harmalina inibem somente a MAO-A, sendo que a harmina e a harmalina apresentaram um potencial de inibição superior ao da harmana para essa isoforma (CAO et al., 2007). A MAO-A e a MAO-B são inibidas também pela fumaça de cigarros e pelo café. Em estudos publicados por Herraiz e Chaparro (2005 e 2006) foram isoladas as substâncias responsáveis por essas atividades de inibição, tendo sido isolados os alcaloides norharmana e harmana.

Além das atividades já descritas, Cao *et al.* (2007) revisaram diversas outras atividades bioquímicas de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos, como interações com diferentes sistemas enzimáticos e receptores, e diversas atividades farmacológicas *in vitro* e *in vivo*, como efeitos neurofarmacológicos, atividade antitumoral, antiviral, antimicrobiana, antiparasitária e antitrombótica.

Com todas essas variadas ocorrências de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos e seus possíveis efeitos toxicológicos e farmacológicos, pode-se afirmar a importância do desenvolvimento de métodos analíticos modernos e eficientes para identificação e quantificação dessas substâncias, visando dar suporte a compreensão da



importância dessas moléculas na natureza e nos diferentes processos biológicos em que estão envolvidas.

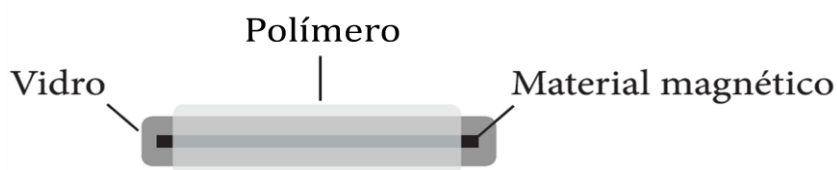
### 1.3 Análise de alcaloides

Extratos vegetais são misturas complexas, constituídas por diversas classes de produtos naturais. O preparo de amostra clássico para análise de alcaloides além de ser dispendioso, possui muitas etapas de partição, solubilização e evaporação, aumentando a probabilidade de erros e interferências, as quais serão observadas no momento da análise. Além dos problemas analíticos que pode acarretar, esse tipo de preparo de amostra não condiz com a realidade atual de desenvolvimento sustentável e com os princípios da química verde. Cada vez mais os métodos tendem a ser desenvolvidos reduzindo ao máximo a utilização de solventes nocivos à saúde humana e ao meio ambiente (LENARDÃO et al., 2003). Com isso, técnicas de preparo de amostra como Extração em Fase Sólida (*solid phase extraction*, SPE), Microextração em Fase Sólida (*solid phase microextraction*, SPME), Microextração em Sorvente Empacotado (*microextraction by packed sorbent*, MEPS), Extração Sortiva em Barra de Agitação (*stir bar sorptive extraction*, SBSE), entre outras, vêm aumentando suas aplicações na área de produtos naturais (NOGUEIRA, 2012). Dentre essas técnicas, a SBSE possui características bastante interessantes para a análise de alcaloides, como demonstrado em trabalho publicado por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014).

#### 1.3.1 SBSE

A SBSE é constituída por uma barra de agitação magnética envolta por um tubo de vidro selado, o qual é revestido por um polímero (Figura 5).

Figura 5 - Ilustração de uma barra de SBSE.



Fonte: Adaptação de Vítor (2016) a partir de NOGUEIRA, 2012.

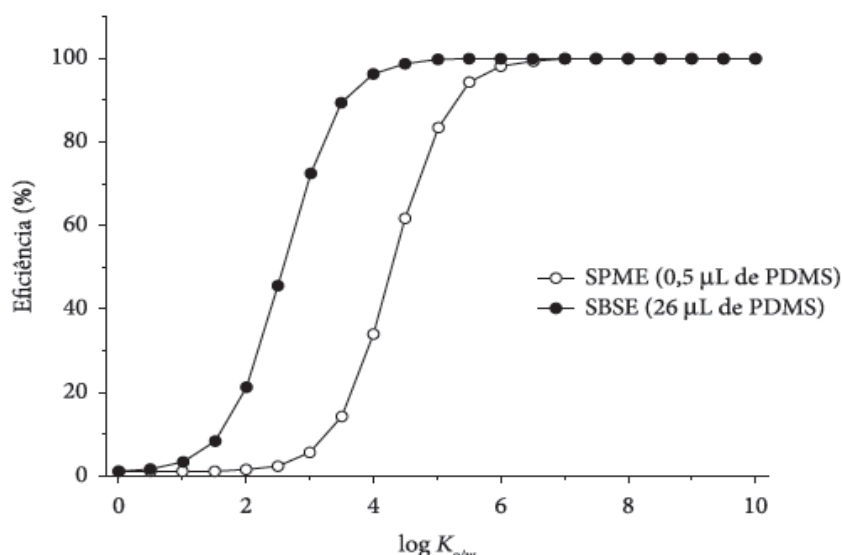
As dimensões da barra variam entre 0,5 e 1,0 mm de espessura e entre 10 e 20 mm de comprimento. Quanto maior o comprimento e a espessura da barra, maior o volume de fase extratora (polímero), sendo assim, maior a capacidade de extração.

Comercialmente existem barras com dois materiais de recobrimento diferentes, a barra com polidimetilsiloxano (PDMS) e a barra com copolímero de polidimetilsiloxano e etilenoglicol-silicone (EG-Silicone) (GERSTEL, 2016).

A barra de PDMS possui o mecanismo de extração conhecido: a fase polimérica de PDMS apresenta propriedades apolares, promovendo interações hidrofóbicas com os analitos, caracterizando a retenção desses analitos principalmente por interações do tipo *Van-der-Waals* (NOGUEIRA, 2012).

Do ponto de vista teórico, o coeficiente de partição de um analito entre a fase polimérica e a fase aquosa ( $K_{PDMS/w}$ ) é similar ao coeficiente de partição octanol-água ( $K_{o/w}$ ). Nogueira (2012) apresentou um gráfico (Figura 6) que representa uma comparação entre a eficiência de recuperação da SBSE-PDMS e da SPME-PDMS, mostrando que a SBSE, por possuir mais volume de fase extratora, é mais eficiente na recuperação do mesmo analito que a SPME.

Figura 6 - Recuperação teórica de analitos com diferentes  $\log K_{o/w}$  em SBSE e SPME.



Fonte: NOGUEIRA, 2012.

A barra de SBSE-PDMS é eficiente para sorção de compostos apolares, com  $\log K_{o/w} > 4$ , sendo que a recuperação de compostos com  $\log K_{o/w} < 4$  pode

aumentar com a adição de sal na amostra, promovendo o efeito conhecido como *salting out*. Já a SBSE-EG-Silicone tem se mostrado eficiente para a extração de compostos apolares, especificamente para compostos doadores de hidrogênio por ligação de hidrogênio, como fenóis (GERSTEL, 2015).

Os alcaloides  $\beta$ -carbolínicos citados na Figura 3 possuem ampla faixa de  $\log K_{o/w}$ . Segundo dados disponíveis em FooDB (2016), os valores de  $\log K_{o/w}$  estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 -  $\log K_{o/w}$  para os alcaloides da Figura 3.

<b>Alcaloide</b>	<b><math>\log K_{o/w}</math> (teórico, <u>ALOGPS</u>*)</b>	<b><math>\log K_{o/w}</math> (experimental)</b>
Harmana	3,36	3,10
Norharmana	2,56	3,17
Harmina	3,05	3,56
Harmalina	2,61	-
Harmol	2,07	2,84
Harmalol	1,94	2,19

\*ALOGPS é programa gratuito disponibilizado pelo *Virtual Computational Chemistry Laboratory*, VCCLAB (2005).

### 1.3.2 Cromatografia líquida

A diversidade química dos produtos naturais está diretamente associada com a alta variabilidade nas propriedades físico-químicas das substâncias, algo que torna a separação, a detecção e a identificação em matrizes naturais desafiadora (WOLFENDER et al., 2015). Neste contexto, a cromatografia líquida de alta eficiência (*high performance liquid chromatography*, HPLC) é reconhecida desde o início dos anos 1980 como a mais versátil técnica para a separação eficiente de produtos naturais. A HPLC foi bastante desenvolvida ao longo dos anos em termos de conveniência, rapidez, escolha de fases estacionárias, aplicabilidade para ampla variedade de matrizes e a capacidade de acoplar os cromatógrafos com detectores espectroscópicos, tornando-a cada vez mais importante para a área. Do ponto de vista cromatográfico, o desenvolvimento de colunas com diferentes fases químicas (especialmente fase reversa) permitiu a separação da maioria dos tipos de produtos naturais. Os recentes avanços em HPLC como a introdução de partículas de

tamanho  $\leq 2 \mu\text{m}$  e a criação de novas fases estacionárias têm melhorado a performance de separação em termos de resolução, rapidez e reprodutibilidade (WOLFENDER, 2009).

A Figura 7 apresenta um HPLC, composto de: um computador, o qual possui um software que permite o envio de comandos para o HPLC, além de receber e tratar os sinais vindos do detector, gerando um cromatograma; os reservatórios com os solventes (ou eluentes, ou fases móveis) que serão bombeados por bombas de alta pressão em direção à coluna de separação; o injetor, que tem como função introduzir a amostra a fase móvel, essa mistura então é eluída pela coluna de separação para posteriormente ir ao detector, o qual irá verificar a presença do analito e transmitir essa informação ao computador; a seguir, o efluente desse processo é descartado em um reservatório.

Figura 7 - Esquema geral de um HPLC



Fonte: AUTORIA PRÓPRIA

O desenvolvimento de colunas com tamanho de partículas  $\leq 2 \mu\text{m}$  fez com que fosse necessária uma modificação nos instrumentos de cromatografia líquida (*liquid chromatography*, LC), visto que colunas com partículas com esse tamanho ocasionam uma pressão de retorno muito grande. Desse modo, fez-se necessário o desenvolvimento de equipamentos adaptados para o trabalho com pressões superiores a 15.000 psi. Com isso, em 2004, o primeiro equipamento dedicado à cromatografia líquida de ultra eficiência (*ultra-high performance liquid*

*chromatography*, UHPLC) foi lançado comercialmente. Do ponto de vista prático, as vantagens trazidas por esses equipamentos são a diminuição do tempo de análise, diminuindo por consequência a quantidade de fase móvel utilizada, gerando menor quantidade de resíduos, melhor resolução e detectabilidade, necessidade de menor volume de amostra, tornando a técnica mais moderna, vindo ao encontro da Química Verde (MALDANER; JARDIM, 2012; WOLFENDER et al., 2015).

#### 1.3.2.1 Detectores em cromatografia líquida

O uso de detectores como ultravioleta (UV), fluorescência (Flu), espectrômetro de massas (*mass spectrometry*, MS), dentre outros, aliados a softwares próprios, tornam possíveis análises qualitativas ou quantitativas de componentes com concentrações extremamente baixas em misturas complexas.

O detector de fluorescência proporciona alta sensibilidade. Na fluorescência, a molécula absorve um fóton, promovendo excitação do analito, fazendo com que este analito seja promovido do estado fundamental e para o estado excitado. Ao retornar ao estado fundamental, essa molécula emite um fóton com comprimento de onda maior do que o fóton absorvido inicialmente, sendo, então, a intensidade do fóton de emissão medida. Pelo fato de que não são todas as moléculas que possuem a capacidade de fluorescer, esse detector possui a aplicação limitada, no entanto, também faz com que possua maior seletividade frente a outros detectores (WOLFENDER, 2009). Trabalhos anteriores (PEREIRA; RODRIGUES; YARIWAKE, 2014; TSUCHIYA et al., 1994a, 1994b, 1999) mostraram a aplicabilidade da detecção de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos por fluorescência.

Apesar de bastante úteis, as informações obtidas utilizando o detector de fluorescência, de forma isolada, não podem ser utilizadas para a identificação dos analitos presentes em uma amostra. Com o desenvolvimento de novas tecnologias para o acoplamento entre a cromatografia líquida e a espectrometria de massas, a identificação de analitos em misturas complexas torna-se cada dia mais comum (LANÇAS, 2009). De acordo com o Prof. J. B. Fenn (apud LANÇAS, 2009), vencedor do prêmio Nobel em Química do ano 2002:

“A **Espectrometria de Massas** é a arte de medir átomos e moléculas para determinar suas massas moleculares. Tal informação sobre a

massa ou peso é muitas vezes suficiente, frequentemente necessária, e sempre útil na determinação da identidade de uma espécie. Para praticar esta arte, colocamos carga nas moléculas de interesse, isto é, os analitos, e então medimos como as trajetórias dos íons resultante respondem, sob vácuo, a várias combinações de campos elétricos e magnéticos. Claramente, a condição '*sine qua non*' deste método é a conversão de moléculas neutras de um analito em íons”.

A aplicação da espectrometria de massas na análise e caracterização de produtos naturais é reconhecida com um grande avanço. Apesar de seu alto custo, a utilização de espectrometria de massas como método de detecção em equipamentos de LC oferece excelentes resultados para a análise de produtos naturais em matrizes complexas. Mais do que isso, a espectrometria de massas fornece importantes informações como a massa molecular, fórmula molecular e fragmentos diagnósticos. Para aplicações da LC/MS, muitos tipos de espectrômetros de massa podem ser utilizados. Aqueles que são de baixa resolução, como o quadrupolo único, são mais comuns e menos caros. Aqueles que fornecem dados em alta resolução, como o de tempo de voo, estão tornando-se populares por fornecerem informações de fórmula molecular e sobre íons-traço muito precisas. Para fragmentos estruturais relevantes ou para detecção específica, o sistema triplo quadrupolo é o mais comumente utilizado, sendo particularmente usados para ensaios bioanalíticos e para o propósito de quantificação em matrizes complexas através do monitoramento de múltiplas reações. Espectrômetros de massas com analisador por captura de íons (*ion-trap*) possuem a capacidade de fornecer informações de múltiplos estágios que pode ser essencial para elucidação estrutural. Além desses quatro tipos principais de espectrômetros de massas existem outros, incluindo alguns sistemas híbridos que combinam analisadores de baixa e alta resolução para aplicações específicas (WOLFENDER, 2009). Trabalhos anteriores apresentaram a utilização da espectrometria de massas para a análise de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (CROTTI et al., 2010; LI et al., 2014; SILVA, 2015; TASCAN et al., 2015; ZHAO et al., 2012).

### 1.3.3 Planejamento experimental

O planejamento experimental é uma ferramenta utilizada para triagem e/ou otimização de condições experimentais. Pode ser utilizado com diferentes finalidades, desde a otimização de condições para a extração de analitos e condições cromatográficas de análise, até para aumentar a eficiência de uma síntese (HIBBERT, 2012). O planejamento experimental utiliza modelos estatísticos que torna possível a avaliação de múltiplos fatores ao mesmo tempo (análise multivariável), diferentemente do que se fez por muito tempo, a avaliação de um fator por vez (análise univariável). O planejamento multivariável possui diversas vantagens, como a necessidade de um número menor de experimentos, conseqüentemente tornando o trabalho mais eficiente e gerando menor quantidade de resíduos. No entanto, a principal vantagem é analítica: ao avaliar mais de um fator por vez, passa a ser possível observar as interações entre os fatores, algo que não é passível de avaliação ao realizar um planejamento univariável (LEARDI, 2009).

Para que um planejamento experimental seja eficiente, é importante o analista definir o objetivo a ser atingido. Uma vez definido o objetivo, o analista decide qual tipo de planejamento experimental é o mais apropriado para seu problema. É importante a definição da resposta a ser observada, já que esta deve refletir o seu objetivo. Por exemplo, em um planejamento experimental que visa melhorar o rendimento de uma determinada síntese, a porcentagem de rendimento da síntese será a resposta a ser avaliada. A definição de quais fatores serão avaliados é de suma importância, pois esses serão analisados para a obtenção da melhor resposta, logo, devem ser avaliados todos os fatores que podem afetar a resposta. Uma vez escolhidos os fatores deve-se definir os níveis em que os fatores serão avaliados, delimitando assim, o campo de avaliação com o qual se trabalhará. Após essas definições o analista deverá realizar os experimentos e interpretar os dados adquiridos experimentalmente (HIBBERT, 2012; LEARDI, 2009).

Existem diversos modelos de planejamento experimental como por exemplo, o planejamento fatorial, os planejamentos de Plackett-Burman, os planejamentos de superfície de resposta e o planejamento de mistura (BEZERRA et al., 2008; HIBBERT, 2012; LEARDI, 2009).

O planejamento fatorial mais simples contém dois níveis dos fatores,  $2^k$  (sendo  $k$  o número de fatores), o nível inferior (-1) e o nível superior (+1). Em um planejamento fatorial completo todos os experimentos são realizados, enquanto que em um planejamento fatorial fracionário um número menor de experimentos é realizado, sendo que com esses experimentos é possível avaliar os quais são os fatores que mais influenciam e os melhores níveis de cada fator para de terminada resposta, além de avaliar a existência de interação entre os fatores para aquela resposta observada (HIBBERT, 2012; LEARDI, 2009). Um planejamento fatorial completo que tenha cinco fatores e dois níveis,  $2^5$ , resultará em 32 experimentos, enquanto que se for realizado o planejamento fatorial fracionário de  $\frac{1}{2}$ ,  $2^{5-1}$ , resultará em 16 experimentos. O resultado desse tipo de planejamento pode ser utilizado para triagem dos fatores importantes para o processo ou para a otimização do processo, caso se obtenha resultado satisfatório utilizando esse tipo de planejamento.



## 2 OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi ampliar a compreensão sobre a fitoquímica dos frutos de espécies de maracujá com importância comercial no Brasil (*Passiflora edulis* e *Passiflora alata*), tendo como objetivos específicos:

- Quantificação de harmana e harmina na polpa e nas sementes de *P. alata*;
- Identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos presentes nas cascas de *P. edulis*;
- Estudo da aplicação de barras SBSE-EG-Silicone e SBSE-PDMS para análise de norharmana.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Materiais

Para o desenvolvimento do trabalho foram utilizados, metanol grau HPLC (Tedia, Fairfield, EUA), acetonitrila grau HPLC e UHPLC (Tedia, Fairfield, EUA), ácido fórmico P. A. (Tedia, Fairfield, EUA), hidróxido de amônio P. A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), ácido clorídrico P. A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), éter de petróleo P. A. (Synth, Diadema, Brasil), clorofórmio P. A. (Qhemis, Indaiatuba, Brasil), cloreto de sódio grau analítico (Spectrum, Gardena, EUA), água purificada pelo sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, EUA), filtro Millex-HV hidrofílico PVDF de 0,45 µm (Millipore, Irlanda). Os padrões analíticos utilizados foram norharmana, harmana, harmina, harmol, harmalina e harmalol, com 98% de pureza (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha). As barras de agitação (SBSE) comerciais são registradas com a marca Twister™, sendo utilizadas barras de SBSE-PDMS com volume de fase extratora de 47 µL, 20 mm de comprimento e 0,5 mm de espessura e barras de SBSE-EG-Silicone com 10 mm de comprimento e 32 µL de volume de fase extratora. A coluna utilizada para as análises por HPLC/Flu foi a XTerra® RP18, de 4,6 X 250 mm e partículas de 5 µm de tamanho (Waters, Ireland) e com a pré-coluna XTerra® RP18, de 3,9 X 20 mm e partículas de 5 µm de tamanho (Waters, Irlanda). Para as análises por UHPLC/MS foi utilizada coluna XBridge™ BEH Shield RP18, de 2,1 X 150 mm, com partículas de 2,5 µm de tamanho (Waters, Irlanda).

#### 3.2 Material Vegetal

Os frutos de *P. edulis* e *P. alata* utilizados para o desenvolvimento desse trabalho foram adquiridos no comércio da cidade de São Carlos-SP, sendo a *P. edulis* adquirida em junho de 2013 e a *P. alata* em fevereiro de 2015. Uma vez adquiridos, os frutos foram lavados e cortados. Separou-se as cascas da polpa e das sementes com o auxílio de uma colher. A separação da polpa das sementes foi feita utilizando uma peneira comum, com abertura de 1,4 mm. Após as separações, a polpa foi congelada e as sementes e as cascas foram secas em estufa a 40 °C até que a massa se mantivesse constante. Após a secagem, tanto as sementes quanto as cascas, separadamente, foram trituradas em um liquidificador e fracionadas

utilizando um jogo de peneiras. A peneira utilizada possui abertura de 16 mesh (1,00 mm), fracionando então as amostras em maior que 16 mesh e menor que 16 mesh.

### 3.3 Quantificação de alcaloides presentes na polpa e nas sementes de *P. alata*

Em trabalho anterior do Grupo de Análise Fitoquímica, desenvolvido por Silva (2015), foi realizada a identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos na polpa e nas sementes de *P. alata*, assim, nesse trabalho, foi realizada a quantificação de harmana e de harmina nessas partes do fruto. A confirmação de presença de harmana e harmina nos extratos da polpa e das sementes de *P. alata* foi realizada através da comparação dos tempos de retenção e dos espectros de fluorescência obtidos com os padrões, em análises por HPLC/Flu.

A quantificação foi feita adaptando o método desenvolvido por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014) para análise de harmana e harmina no fruto de *P. edulis*, o qual utiliza a SBSE-PDMS como fase extratora. A curva analítica foi construída com adição de padrão em análises por HPLC/Flu. O volume total de solução aquosa foi de 10,000 mL, portanto, os volumes de reagentes utilizados foram dimensionados para esse volume final (Tabela 5).

Tabela 5 - Condições do método de extração para quantificação de harmana e harmina utilizando SBSE-PDMS.

<b>Materiais e reagentes</b>	<b>Polpa</b>	<b>Sementes</b>
NaCl	5,00 g	5,00 g
Água Milli-Q	7,700 mL	8,700 mL
Solução padrão do alcaloide	Entre 10 e 300 $\mu$ L	Entre 10 e 300 $\mu$ L
Metanol	Entre 290 e 0 $\mu$ L	Entre 290 e 0 $\mu$ L
Material Vegetal	1,000 mL	1,00 g
Solução básica para ajuste do pH	1,000 mL	1,000 mL

O NaCl foi adicionado na solução para aumentar a eficiência da extração dos alcaloides, os quais estarão em suas formas não ionizadas. Assim, ao aumentar a força iônica da solução aquosa os analitos apolares tendem a migrar para a fase extratora (PDMS).

As soluções estoque dos padrões harmana e harmina utilizadas foram preparadas em metanol 100 %, com concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$ . As curvas analíticas para a quantificação dos alcaloides foram construídas utilizando as concentrações de  $0,10 \mu\text{g L}^{-1}$ ,  $1,50 \mu\text{g L}^{-1}$  e  $3,00 \mu\text{g L}^{-1}$ , em triplicatas com desvio padrão relativo (DPR) abaixo de 5 %.

O metanol foi adicionado para manter constante a proporção água/metanol, sendo que o volume total de metanol ( $300 \mu\text{L}$ ) representa 3 % do volume total da solução (10 mL). Não se conhece a influência do volume de metanol no processo de extração, uma vez que esse fator não foi avaliado no desenvolvimento do método por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014). Portanto, optou-se por manter constante o volume de metanol para que esta variável não alterasse a recuperação do método.

O pH para a extração de harmana foi ajustado para 13 utilizando solução de NaOH  $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ , enquanto que para a extração de harmina foi ajustado para 10 utilizando solução de  $\text{NH}_4\text{OH}$   $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ . Esses valores de pH foram testados durante a avaliação dos fatores para extração por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014). Em soluções com esses valores de pH, ambos os analitos encontram-se na forma não ionizada, tendendo a interagir com a fase extratora.

Por ser um método dual, as extrações de harmana e de harmina foram feitas em paralelo, ou seja, em um béquer foi adicionado o padrão de harmana e em outro béquer o padrão de harmina. Posteriormente, ambos os alcaloides foram dessorvidos em um mesmo *vial* para análise cromatográfica simultânea.

O tempo de extração utilizado foi de 120 min, sob agitação em velocidade constante, em cerca de 900 rpm. Após esse tempo, as barras foram lavadas com água e secas cuidadosamente com papel macio, com o intuito de retirar impurezas que poderiam ficar aderidas. Posteriormente, a barra com o alcaloide harmana foi colocada em um *vial* contendo  $150 \mu\text{L}$  de metanol e sonicada durante 60 min. Depois, essa barra foi retirada do *vial* e colocou-se no mesmo *vial* outra barra, sendo que esta barra continha o alcaloide harmina, e então esta barra contendo harmina foi sonicada por 60 min.

Após o processo de dessorção, a amostra foi injetada no HPLC/Flu (módulo de separação Waters Alliance 2695 acoplado ao detector *photodiode array* de fluorescência Waters 2475) e analisado utilizando o *software* Empower 2. Na Tabela 6 estão descritas as condições cromatográficas da análise, as quais foram desenvolvidas por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014).

Tabela 6 - Condições cromatográficas e de detecção por HPLC/Flu.

Fase Móvel	Fase Estacionária	Deteção
Solventes: A - água Milli-Q + 0,5% de ác. fórmico B - acetonitrila + 0,5% de ác. fórmico	Pré-coluna: X-Terra RP18, 5 µm, de 3,9 X 20 mm	$\lambda_{\text{excitação}}$ : 254 nm
Eluição: 80 - 66% de A, entre 0 e 10 min; 66 - 80% de A, entre 10 e 18 min; Isocrático em 80% entre 18 e 20 min	Coluna: X-Terra RP18, 5 µm, de 4,6 X 250 mm	$\lambda_{\text{emissão}}$ harmana: 425 nm
Vazão: 1 mL min <sup>-1</sup>	Temperatura da coluna: 25 °C	$\lambda_{\text{emissão}}$ harmina: 410 nm
Volume de injeção: 10 µL		

A limpeza das barras foi feita em 20 mL de solução de metanol:acetonitrila (1:1) por agitação durante 120 min. A limpeza da coluna cromatográfica foi feita utilizando uma mistura de metanol:água (70:30) em modo isocrático, durante 30 min e com vazão de 1 mL min<sup>-1</sup>, ao final de cada dia de análise.

### 3.4 Identificação de alcaloides $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis*

Os extratos das cascas de *P. edulis* foram preparados segundo método descrito em artigo de Kartal, Altun e Kurucu (2003). 5 g de cascas (>16 mesh) foram macerados quatro vezes em 125 mL de metanol a 40 °C por 1 h. Os extratos foram combinados e rotaevaporados até secura. O resíduo foi dissolvido em 50 mL de HCl 2 % e filtrado com papel filtro qualitativo. O filtrado foi particionado com 20 mL de éter de petróleo por duas vezes. A fração aquosa foi alcalinizada até pH 10 com NH<sub>4</sub>OH e particionada com 50 mL de clorofórmio por quatro vezes. As frações de clorofórmio foram combinadas, totalizando 200 mL, seguindo para a rotaevaporação até secura. O resíduo foi solubilizado em 5 mL de metanol e filtrado com filtro Millipore Millex-HV 0,45 µm (*Hydrophilic PVDF*).

Foram comparados dois métodos para extração de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos das cascas de *P. edulis* por HPLC/Flu, seguindo as condições cromatográficas apresentadas na Tabela 6 do item 3.3. A comparação foi realizada entre o método

clássico de extração, descrito nesse item, e o método de preparo utilizando SBSE-PDMS, descrito no item 3.3 (condições de extração do alcaloide harmana).

Nas análises por UHPLC/MS mantiveram-se as mesmas condições cromatográficas da análise por HPLC/Flu, exceto a coluna que foi utilizada a XBridge™ BEH Shield RP18, de 2,1 X 150 mm, com partículas de 2,5 µm de tamanho e a vazão que foi alterada para 0,3 mL min<sup>-1</sup>. As análises foram realizadas utilizando um cromatógrafo à líquido de ultra-performance (UHPLC) Accela High Speed LC (Thermo Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução LTQ Orbitrap Velos equipado com interface de ionização por electrospray (ESI) (Thermo Scientific) alocado na Central de Análises Químicas Instrumentais (CAQI) do Instituto de Química de São Carlos (IQSC) da Universidade de São Paulo (USP). As condições do espectrômetro de massas foram definidas a partir do trabalho de Silva (2015) para a análise de alcaloides β-carbolínicos: voltagem do electrospray + 3,7 kV, vazão de gás (N<sub>2</sub>) de nebulização 35 (unidades arbitrárias), vazão de gás auxiliar (N<sub>2</sub>) 10 (unidades arbitrárias) e temperatura do capilar aquecido 350 °C. Os dados foram adquiridos no modo positivo, no intervalo *m/z* 50-250, modo *full scan*, assim como o monitoramento dos íons selecionados (*selected ions monitoring*, SIM). Todos os processos foram comandados utilizando o *software* Xcalibur™ (Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

### 3.5 Estudo do processo de extração de norharmana por SBSE

Para o estudo do processo de extração de norharmana foram avaliadas barras de SBSE com duas fases extratoras diferentes, PDMS e EG-Silicone. Os fatores pH, tempo de extração, porcentagem de metanol, porcentagem de NaCl e *phase ratio* (p/r) foram escolhidos por serem fatores que são costumeiramente avaliados ao se trabalhar com SBSE, possibilitando conhecer o comportamento da recuperação do analito nos níveis avaliados (GILART et al., 2013; NOGUEIRA, 2012; PEREIRA; RODRIGUES; YARIWAKE, 2014; TANWAR; DI CARRO; MAGI, 2015). O *phase ratio* é a razão entre o volume total de solução e o volume de fase extratora. As barras de PDMS utilizadas possuem volume de fase extratora de 47 µL enquanto que as barras de EG-Silicone possuem 32 µL de volume de fase extratora. Pelo fato de os volumes de fase extratora serem diferentes, para simplificação do

raciocínio e do procedimento experimental, na sequência desse trabalho o volume total de solução será apresentado como o *phase ratio*.

Para avaliar a influência dos fatores no processo de extração de norharmana, foi utilizado um tipo de planejamento experimental multivariável, o planejamento fatorial fracionário. Para gerar o planejamento fatorial fracionário é necessário além de definir os fatores, definir também os níveis mínimos (-1) e máximos (+1) de cada fator. A Tabela 7 apresenta os fatores escolhidos para avaliação e seus respectivos níveis (-1) e (+1).

Tabela 7 - Fatores e níveis avaliados pelo planejamento fatorial.

<b>Fatores</b>	<b>(-1)</b>	<b>(+1)</b>
pH	4	10
Tempo de extração	30 min	120 min
Porcentagem de metanol	0,50 %	5,00 %
Porcentagem de NaCl	0 %	30 %
<i>phase ratio</i>	3,0 mL	10,0 mL

Foi gerado um planejamento fatorial fracionário ( $2^{5-1}$ ), com ponto central em triplicata, usando *software* MiniTab® (Minitab Inc, USA), versão 13, totalizando 19 experimentos. A resposta avaliada foi a recuperação percentual (R) de norharmana, calculada a partir da Equação 1 para cada experimento.

$$R = \frac{\text{Área do pico (depois da extração)}}{\text{Área do pico (antes da extração)} \times \left(\frac{\textit{phase ratio}}{150 \mu\text{L}}\right)} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

A Tabela 8 apresenta a matriz com os 19 experimentos do planejamento experimental. Para a execução dos experimentos foram utilizados os volumes 15  $\mu\text{L}$ , 32  $\mu\text{L}$  e 50  $\mu\text{L}$  de solução padrão de norharmana, em metanol, com concentração de 1000  $\mu\text{g L}^{-1}$ , para os valores de *phase ratio* de 3,0 mL, 6,5 mL e 10,0 mL, respectivamente, obtendo-se assim a concentração de 5,00  $\mu\text{g L}^{-1}$  de norharmana na solução. Foram utilizadas soluções de hidróxido de sódio (0,001 mol  $\text{L}^{-1}$ ) e de ácido fórmico (0,55 mol  $\text{L}^{-1}$ ) para ajustar os valores de pH para 10 e 4, respectivamente, sendo que os volumes utilizados foram de 1,0 mL e 0,3 mL para os valores de *phase ratio* de 10,0 e 3,0, respectivamente. O volume de metanol utilizado para atingir o nível (+1) foi 135  $\mu\text{L}$  para *phase ratio* de 3,0 mL, de 450  $\mu\text{L}$

para *phase ratio* 10,0 mL e para o *phase ratio* de 6,5 mL foi utilizado 178  $\mu$ L para atingir o nível (0). A massa de NaCl utilizada para atingir o nível (+1) foi de 0,900 g para o *phase ratio* de 3,0 mL, 3,000 g para o *phase ratio* de 10,0 mL e para o *phase ratio* de 6,5 mL foi utilizada massa de 0,975 g. Para cada *phase ratio* (3,0 mL, 6,5 mL e 10,0 mL), o volume final foi completado com água Milli-Q. O processo de dessorção foi feito utilizando 150  $\mu$ L de metanol 100 % e sonicação por 60 min. A limpeza das barras foi feita em 1,8 mL de metanol 100 % por sonicação durante 60 min. As condições cromatográficas utilizadas para análise por HPLC/Flu utilizadas foram descritas na Tabela 6 do item 3.3, com exceção do tempo de análise, que foi diminuído para 10,0 min, conseqüentemente, levando à uma alteração do gradiente para 80 - 70 % de A, entre 0 e 7,0 min, 70 - 80 % de A, entre 7,0 e 9,5 min e isocrático em 80 % de A entre 9,5 e 10,0 min, e do  $\lambda_{\text{emissão}}$  da norharmana que é de 440 nm.

Tabela 8 - Matriz dos experimentos do planejamento fatorial fracionário.

Ordem de execução	pH	Tempo (min)	MeOH (%)	NaCl (%)	p/r (mL)
1	10	120	0,50	0	10,0
2	4	30	0,50	30	3,0
3	10	30	5,00	0	10,0
4	7	75	2,75	15	6,5
5	4	120	0,50	0	3,0
6	4	30	5,00	30	10,0
7	4	120	5,00	0	10,0
8	10	30	0,50	0	3,0
9	4	30	0,50	0	10,0
10	7	75	2,75	15	6,5
11	4	120	5,00	30	3,0
12	10	120	5,00	0	3,0
13	4	120	0,50	30	10,0
14	10	120	0,50	30	3,0
15	7	75	2,75	15	6,5
16	4	30	5,00	0	3,0
17	10	30	5,00	30	3,0
18	10	30	0,50	30	10,0
19	10	120	5,00	30	10,0



Após a realização dos 19 experimentos, foram gerados, utilizando o *software* MiniTab<sup>®</sup>, os gráficos de Pareto, os gráficos dos Efeitos Principais e os gráficos das Interações entre Fatores, para as barras de PDMS e de EG-Silicone.

Com a definição dos fatores que alteram significativamente a extração de norharmana e em quais níveis, foram realizados experimentos para avaliar a recuperação percentual, utilizando o *phase ratio* de 3,0 mL, pH 10, tempo de extração de 120 min, 5,00 % de metanol e 30 % de NaCl.

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Quantificação de harmana e harmina na polpa e nas sementes de *P. alata*

Em trabalho anterior do Grupo de Análise Fitoquímica do IQSC, Silva (2015) identificou nos frutos de *P. alata* cinco alcaloides  $\beta$ -carbolínicos (harmana e harmina na polpa e nas sementes e harmol, harmalol e harmalina somente nas sementes), por UHPLC/MS. Por esse motivo, seguiu-se para os experimentos de quantificação de harmana e de harmina dessas partes do fruto.

A confirmação da existência de harmana e harmina nos extratos da polpa e das sementes de *P. alata* foi feita por comparação entre o tempo de retenção ( $T_R$ ) no cromatograma e o comprimento de onda de emissão ( $\lambda_{\text{emissão}}$ ) no espectro de fluorescência nas análises dos padrões analíticos e dos extratos. A Figura 8 apresenta o cromatograma e o espectro de fluorescência do padrão de harmana (Figura 8A) e do padrão de harmina (Figura 8B), ambos na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$ . Na Figura 9 estão apresentados os cromatogramas e os espectros de fluorescência dos picos cromatográficos referentes aos analitos de interesse, nos extratos da polpa (Figura 9A) e das sementes (Figura 9B) de *P. alata* sem a adição de padrões.

Como apresentado na Figura 8A, o  $T_R$  no cromatograma do pico do padrão de harmana foi de 5,68 min, enquanto que o  $T_R$  no cromatograma do extrato da polpa (Figura 9A) encontrou-se um pico com  $T_R$  de 5,75 min e no cromatograma do extrato das sementes (Figura 9B) um pico com  $T_R$  de 5,73 min. Pela comparação dos  $T_R$  e dos  $\lambda_{\text{emissão}}$  (425 nm) é possível confirmar a existência de harmana em ambos os extratos.

A Figura 8B apresenta o cromatograma do padrão de harmina, sendo que este apresentou um pico cromatográfico com  $T_R$  de 7,14 min e  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 415 nm. Não foi encontrado nos cromatogramas dos extratos da polpa e das sementes nenhum pico com este  $T_R$ . No entanto, prosseguiu-se para a quantificação desse alcaloide visto que o trabalho de Silva (2015) descreveu a existência dessa substância nos frutos dessa espécie utilizando análise por UHPLC/MS.

Figura 8 - Cromatogramas por HPLC/Flu e espectros de fluorescência dos padrões de harmana (A) e harmina (B).

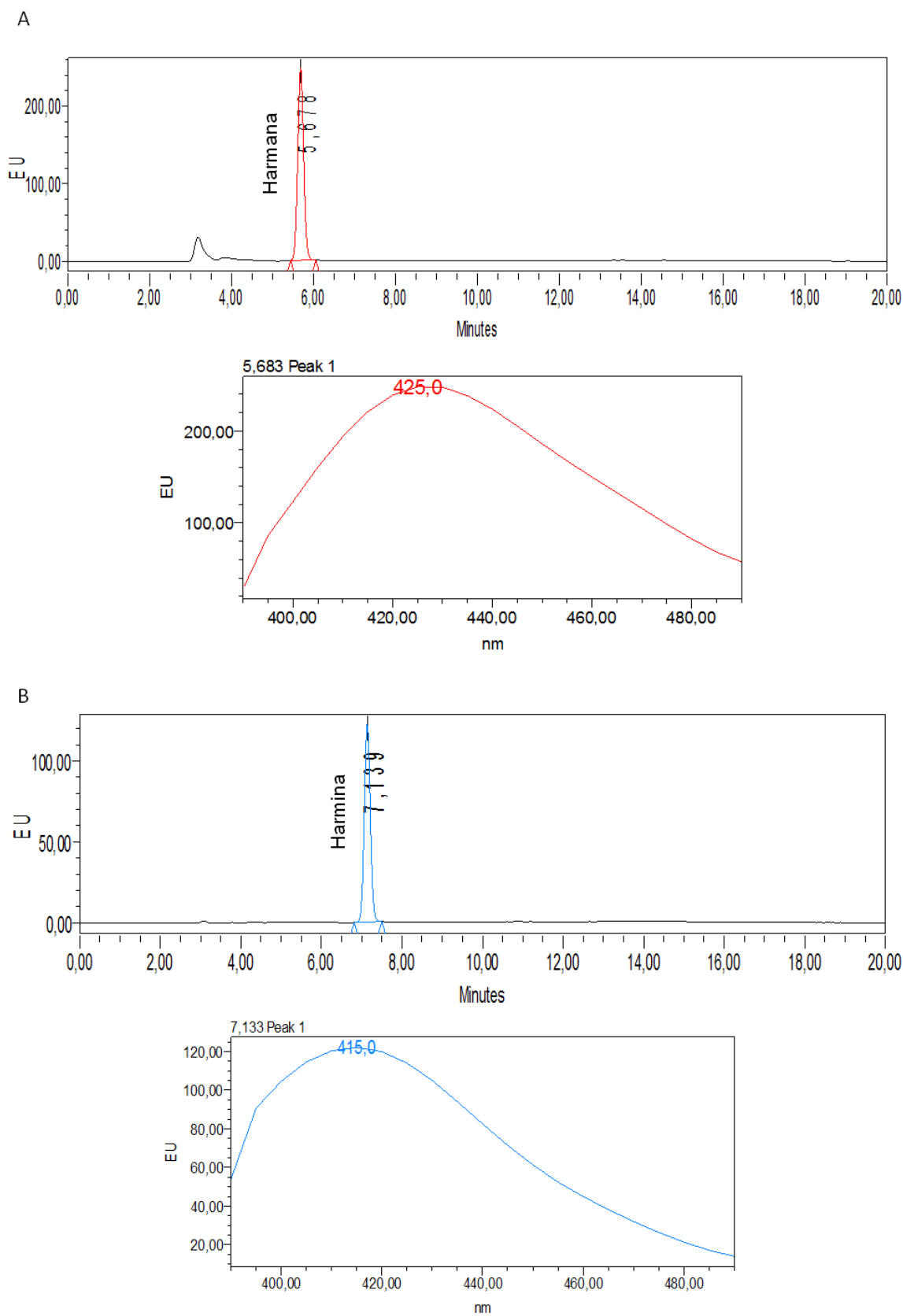
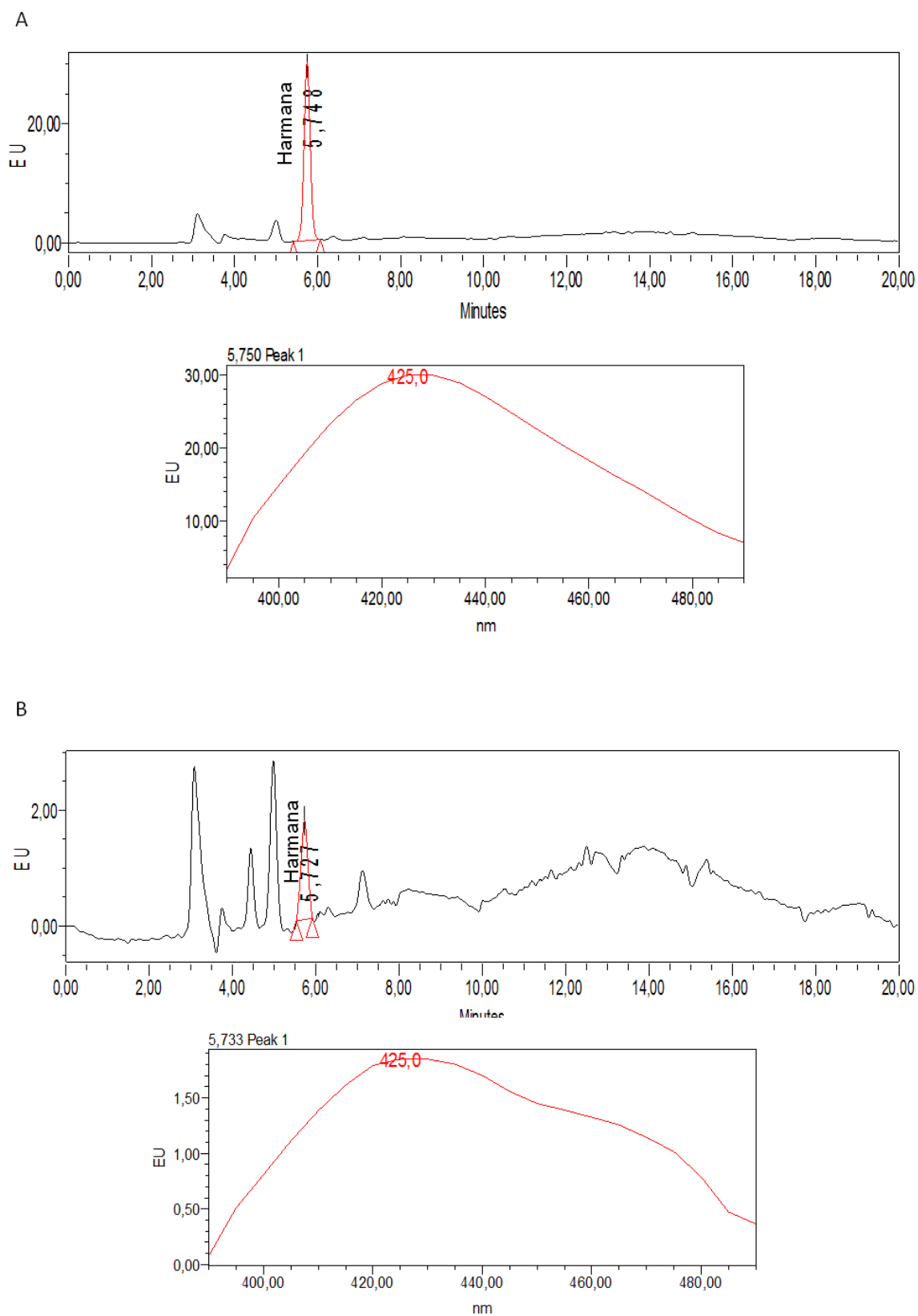
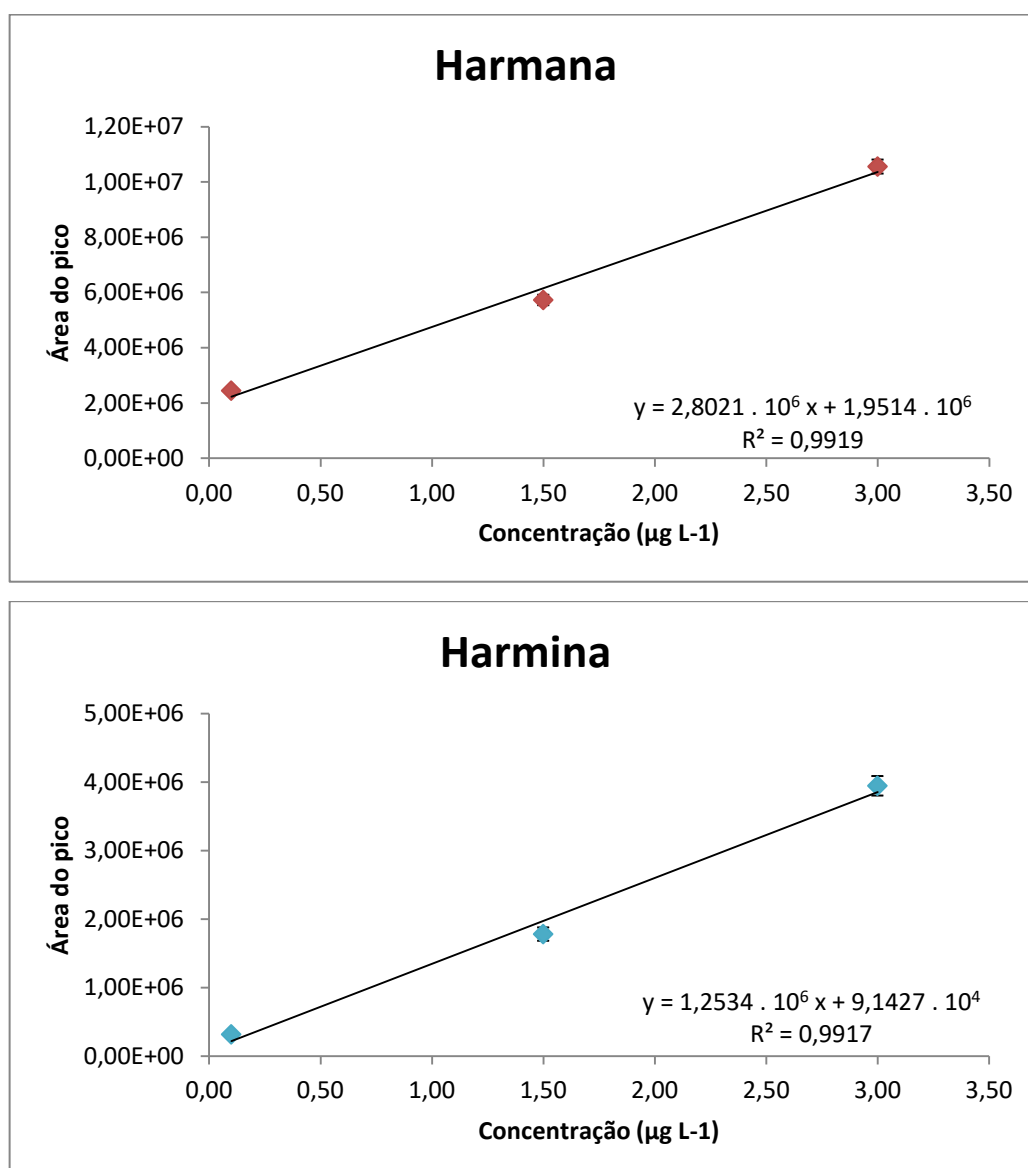


Figura 9 - Cromatogramas por HPLC/Flu e espectros de fluorescência do pico cromatográfico identificado como harmana nos extratos da polpa (A) e das sementes (B) de *P. alata*.



Para a quantificação de harmana e de harmina na polpa e nas sementes de *P. alata* foram construídas curvas de adição de padrão. As concentrações dos padrões adicionados para a construção da curva foram de 0,10, 1,50 e 3,00  $\mu\text{g L}^{-1}$ , tanto para harmana quanto para harmina. As curvas analíticas foram plotadas com os valores das áreas dos picos referentes ao alcaloide contra as concentrações de padrão adicionadas daquele alcaloide. A Figura 10 apresenta as curvas analíticas de harmana e de harmina na polpa.

Figura 10 - Curvas de adição de padrão de harmana e de harmina na polpa de *P. alata*.



Os cálculos a seguir são referentes aos dados da curva de harmana na polpa (Figura 10). A extrapolação da reta no eixo das abcissas define a concentração da

substância na amostra analisada (intercepto no eixo x). Como apresentado na Equação 2, para calcular a concentração de harmana na solução analisada, é calculada a razão entre o coeficiente linear e o coeficiente angular da reta.

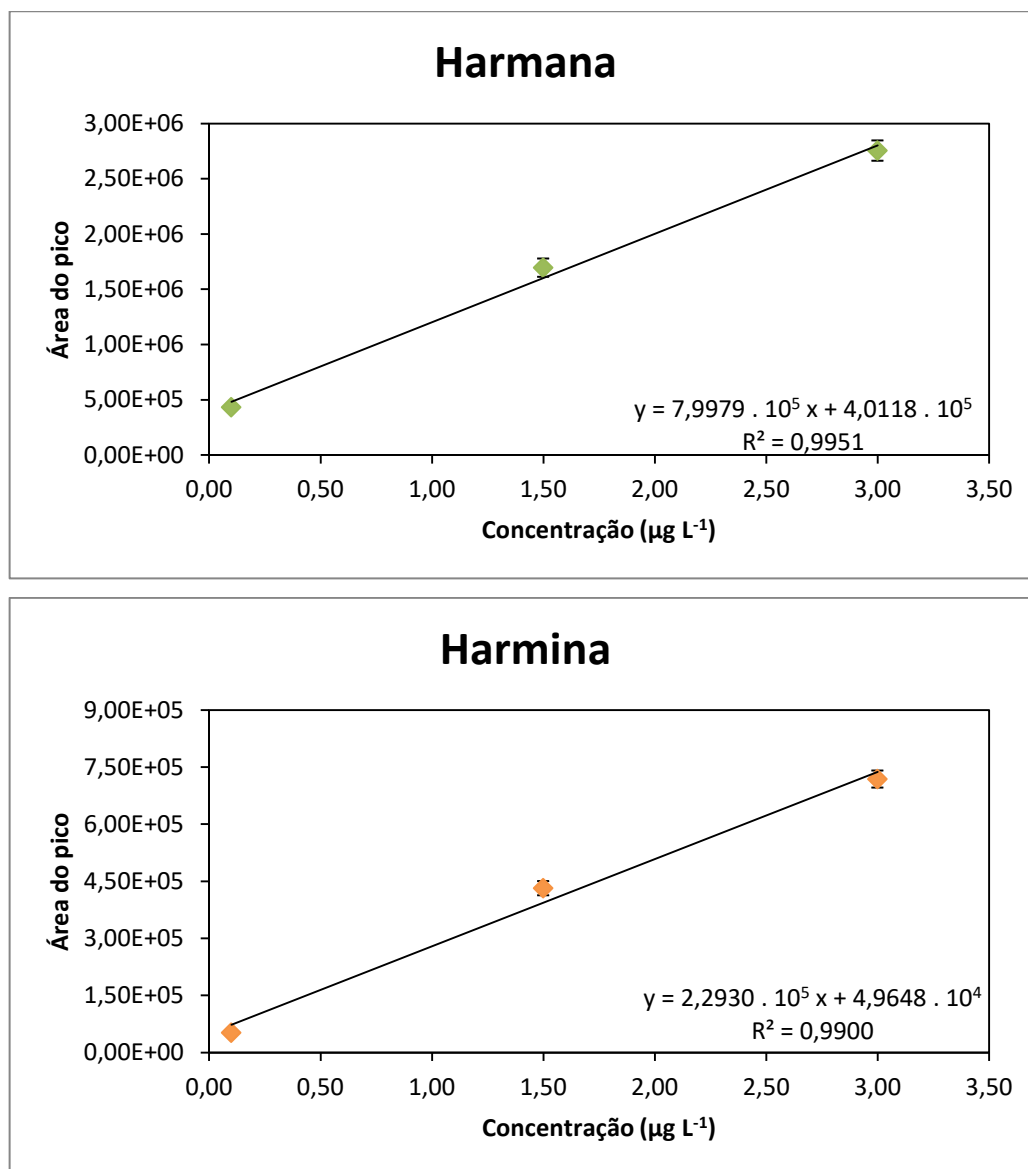
$$\frac{1,9514 \cdot 10^6}{2,8021 \cdot 10^6} = 6,9640 \cdot 10^{-1} \mu\text{g L}^{-1} \quad \text{Equação 2}$$

A quantidade de alcaloide calculada pela Equação 2 é expressa em  $\mu\text{g L}^{-1}$  de solução, então, para calcular a concentração de alcaloide presente em 1 L de polpa é necessário calcular a massa de alcaloide presente em 150  $\mu\text{L}$  de amostra, corrigir o valor utilizando a recuperação do método (98,87% para harmana) e calcular a concentração em 1 L de polpa levando em consideração que foi utilizado 1 mL de polpa para a análise, como na Equação 3:

$$\frac{\left[ \left( \frac{6,9640 \cdot 10^{-1} \mu\text{g} \times 1,50 \cdot 10^{-4} \text{L}}{1 \text{L}} \right) * 9,887 \cdot 10^{-1} \right]}{1 \cdot 10^{-3} \text{L}} = 1,0328 \cdot 10^{-1} \mu\text{g L}^{-1} \quad \text{Equação 3}$$

Para as sementes o raciocínio é o mesmo, no entanto, ao invés de calcular a quantidade de alcaloide presente em 1 mL de polpa, deve-se calcular a quantidade existente em 1 g de sementes. Para isso, são utilizados os valores presentes na equação da reta da curva de harmana nas sementes (Figura 11), através da Equação 4:

$$\frac{\left[ \left( \frac{5,0161 \cdot 10^{-1} \mu\text{g} \times 1,50 \cdot 10^{-4} \text{L}}{1 \text{L}} \right) * 9,887 \cdot 10^{-1} \right]}{1 \text{g}} = 7,4391 \cdot 10^{-5} \mu\text{g g}^{-1} \quad \text{Equação 4}$$

Figura 11 - Curva de adição de padrão de harmana e harmina nas sementes de *P. alata*.

Segundo descrito por Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014), o limite de detecção (LOD) para harmana é  $0,030 \mu\text{g L}^{-1}$  e para a harmina de  $0,100 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que o limite de quantificação (LOQ) para a harmana é  $0,100 \mu\text{g L}^{-1}$  e para a harmina é  $0,400 \mu\text{g L}^{-1}$ . Os limites de quantificação devem ser comparados ao intercepto, pois este se refere à concentração de alcaloide na solução. O intercepto da curva construída para a harmana presente na polpa foi de  $0,6964 \mu\text{g L}^{-1}$  e para harmina foi de  $0,0729 \mu\text{g L}^{-1}$ , enquanto que para as sementes o intercepto da curva para harmana foi de  $0,5016 \mu\text{g L}^{-1}$  e para a harmina foi de  $0,2165 \mu\text{g L}^{-1}$ . A Tabela 9 apresenta a concentração de cada alcaloide em determinada parte do fruto.

Tabela 9 - Concentração de harmana e harmina em polpa e sementes dos frutos de *P. alata*.

Alcaloide	Polpa	Sementes
Harmana	$1,0328 \cdot 10^{-1} \pm 3,1217 \cdot 10^{-3} \mu\text{g L}^{-1}$	$7,4391 \cdot 10^{-5} \pm 2,5501 \cdot 10^{-6} \mu\text{g g}^{-1}$
Harmina	Abaixo do LOD	Abaixo do LOQ

A quantificação de harmana na polpa e nas sementes de *P. alata* foi realizada com sucesso, enquanto que a quantificação de harmina não foi possível por esse método. O fato de não ser possível a quantificação de harmina não implica na inexistência desse alcaloide, visto que a harmina foi identificada em outro trabalho do grupo, por Silva (2015), embora tenha existido diferença na época de obtenção dos frutos analisados nos dois trabalhos.

É possível fazer uma relação entre a concentração calculada com o consumo do fruto. No caso de *P. alata*, são consumidos frutos frescos *in natura*, por conta de seu sabor adocicado. Segundo trabalho publicado por Dutra et al. (2016), o fruto de *P. alata* possui em média 22 % de sua massa total como polpa e 4 % como sementes. Assim, estima-se que um fruto médio (263 g) de *P. alata* possua 57 mL de polpa e 10 g de sementes. Dessa forma, a quantidade total de harmana (polpa mais sementes) ingerida ao consumir um fruto médio de *P. alata* é de 7 ng.

O fruto da *P. edulis*, maracujá azedo, é consumido principalmente como suco por conta de seu sabor azedo. Pereira, Rodrigues e Yariwake (2014) quantificaram harmana e harmina na polpa e nas sementes de *P. edulis*, encontrando na polpa  $3,00 \mu\text{g L}^{-1}$  de harmana e  $2,72 \mu\text{g L}^{-1}$  de harmina, enquanto que nas sementes foi encontrada harmana na concentração de  $3,09 \cdot 10^{-2} \mu\text{g g}^{-1}$  e harmina na concentração de  $8,11 \cdot 10^{-3} \mu\text{g g}^{-1}$ . No lote de frutos analisado por SANTOS et al. (2009), a massa média de um fruto de *P. edulis* foi de 199 g, sendo que a porcentagem em massa da polpa e das sementes são 52 % e 4 %, respectivamente. Dessa forma, um fruto médio possui cerca de 102 mL de polpa e 9 g de sementes. Assim, a quantidade total de harmana e harmina (polpa mais sementes) num fruto médio de *P. edulis* é de 920 ng.

Portanto, comparativamente, ao consumir um fruto de *P. edulis*, o indivíduo ingere cerca de 140 vezes mais alcaloides  $\beta$ -carbólicos do que ao consumir um fruto de *P. alata*. Levando em consideração que cerca de 95 % do consumo de

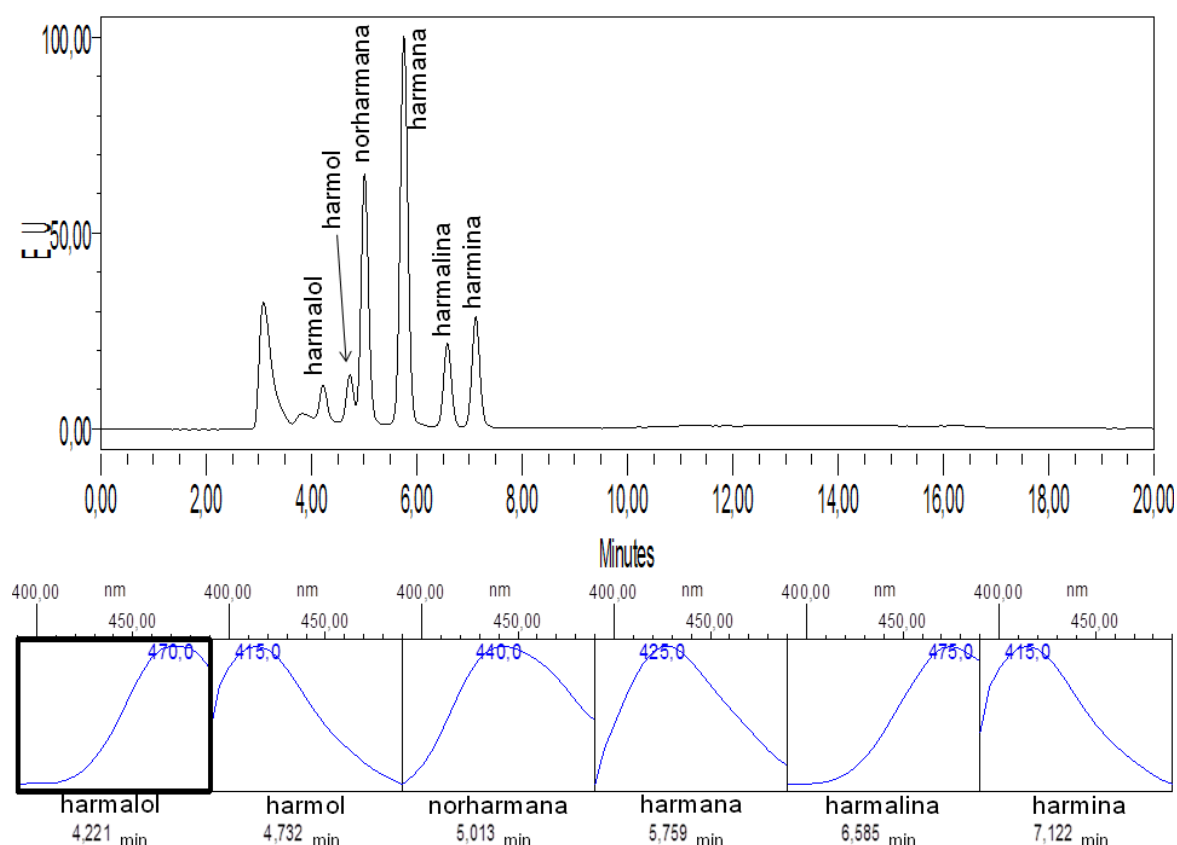


maracujá é referente à *P. edulis*, é clara a necessidade de conhecer melhor os efeitos toxicológicos dessas substâncias visando garantir a segurança alimentar dos consumidores.

#### 4.2 Identificação de alcaloides $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis*

Uma mistura de padrões dos alcaloides harmana, harmina, norharmana, harmol, harmalina e harmalol, com concentrações de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  cada alcaloide, foi analisada por HPLC/Flu. A Figura 12 apresenta o cromatograma da mistura e o espectro de fluorescência de cada pico.

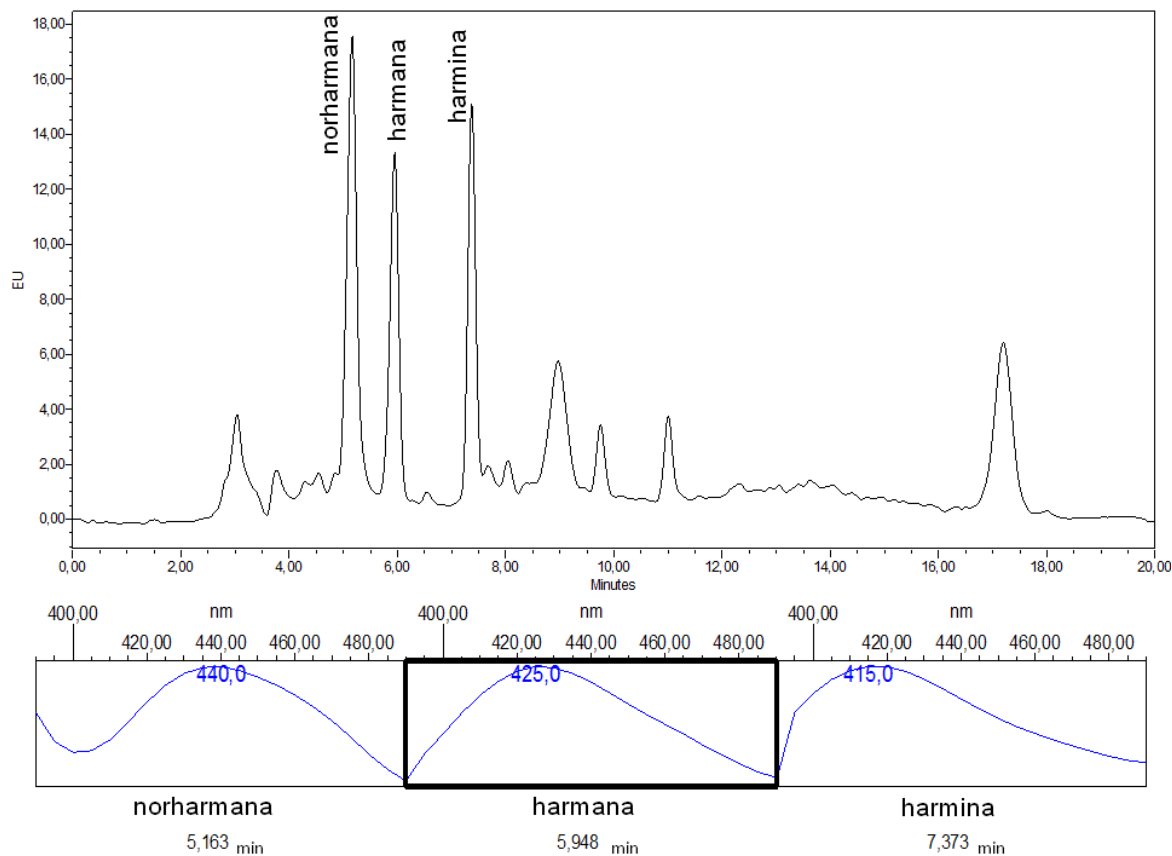
Figura 12 - Cromatograma por HPLC/Flu da mistura de padrões de alcaloides em  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 470 nm e espectros de fluorescência dos picos analisados.



A Figura 13 apresenta o cromatograma do extrato das cascas de *P. edulis* preparado pelo método clássico, descrito no item 4.3, analisado por HPLC/Flu. Nesse cromatograma é possível identificar três picos por meio da comparação dos  $T_R$  e dos espectros de fluorescência com os encontrados para os padrões. O

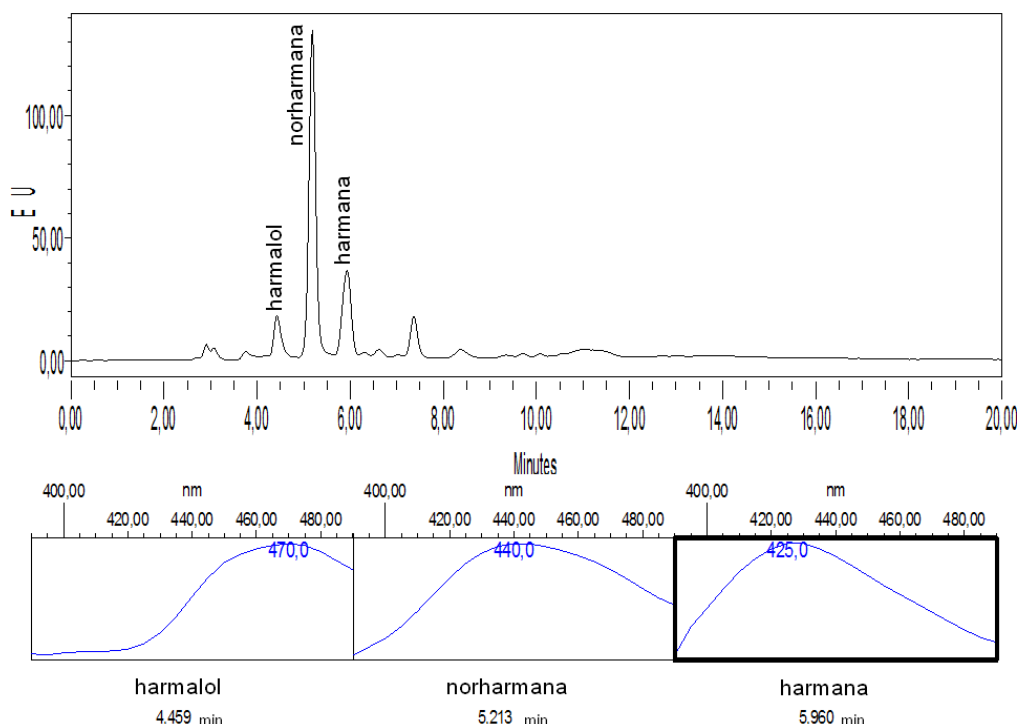
primeiro pico é referente à norharmana, o segundo referente à harmana e terceiro referente à harmina.

Figura 13 - Cromatograma por HPLC/Flu do extrato das cascas de *P. edulis* preparado pelo método clássico em  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 440 nm e espectros de fluorescência dos picos selecionados.



O cromatograma de um extrato das cascas de *P. edulis* preparado utilizando SBSE-PDMS, como descrito na Tabela 5 do item 3.3 e analisado por HPLC/Flu, está apresentado na Figura 14. Nesse extrato é possível identificar três picos por meio da comparação com os  $T_R$  e espectro de emissão dos padrões. O primeiro se refere ao harmalol, o segundo à norharmana e o terceiro à harmana. Há a presença de um quarto pico com  $T_R$  próximo ao encontrado para o padrão harmina, porém, com  $\lambda_{\text{emissão}}$  diferente (440 nm). Isso pode ser resultado da coeluição de harmina com outra substância não identificada.

Figura 14 - Cromatograma por HPLC/Flu do extrato das cascas de *P. edulis* preparado utilizando SBSE-PDMS em  $\lambda_{\text{emissão}}$  de 440 nm e espectros de fluorescência dos picos selecionados.



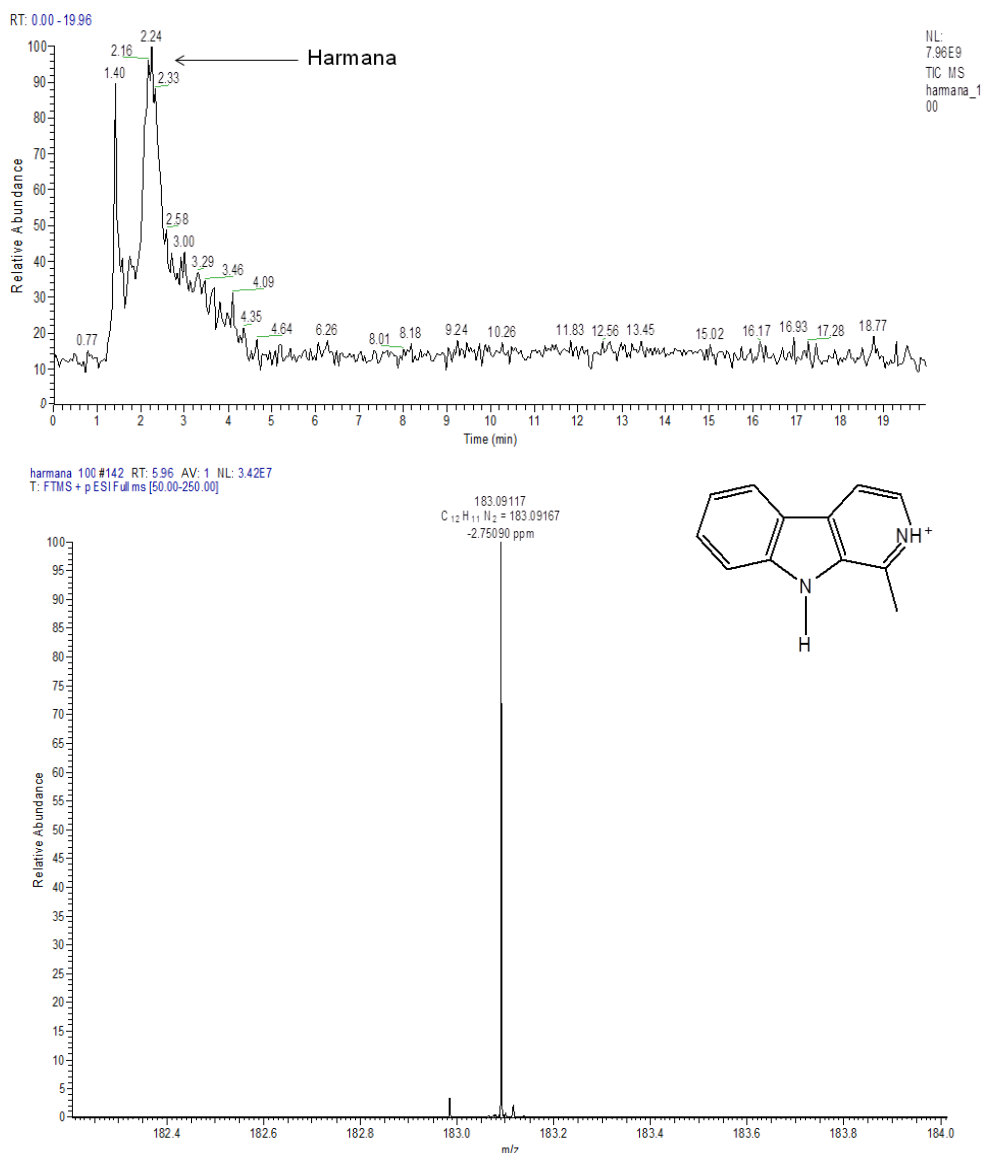
Ao comparar os cromatogramas obtidos pelos dois métodos de extração, extração clássica (Figura 13) e extração por SBSE-PDMS (Figura 14), é possível observar um menor número de picos no cromatograma referente à extração por SBSE-PDMS. Isso se deve ao fato da área do pico de norharmana, que é o maior pico em ambos os cromatogramas, ser cerca de cinco vezes maior no cromatograma do extrato obtido por SBSE-PDMS em comparação ao cromatograma obtido pela extração clássica. Assim, os picos com áreas muito pequenas tendem a desaparecer. Em ambos os cromatogramas foram identificados três picos, sendo que o cromatograma do extrato preparado pelo método clássico possui um pico atribuído à harmina, enquanto o extrato preparado utilizando SBSE-PDMS possui um pico atribuído ao harmalol. Essas diferenças nos cromatogramas ocorrem por causa da diferença nos métodos de preparo dos extratos. O extrato clássico foi preparado por maceração em metanol seguida por extrações líquido-líquido, ou seja, ocorre partição das substâncias entre os solventes com polaridades diferentes. Já o extrato por SBSE-PDMS foi preparado utilizando um polímero, polidimetilsiloxano, que extrai os analitos por sorção das espécies químicas não ionizadas, por interações hidrofóbicas.

Em trabalho anterior do Grupo de Análise Fitoquímica, desenvolvido por Silva (2015), percebeu-se dificuldade na identificação de alcaloides  $\beta$ -carbolínicos por UHPLC/MS utilizando a SBSE-PDMS no preparo de amostra. Assim, para esse trabalho, optou-se por prosseguir a identificação dos alcaloides nas cascas de *P. edulis* por UHPLC/MS utilizando o método clássico de preparo de amostra.

Foram feitas análises por UHPLC/MS dos padrões harmana, harmina, harmol, harmalina e harmalol, com concentração de  $100 \mu\text{g L}^{-1}$  cada alcaloide.

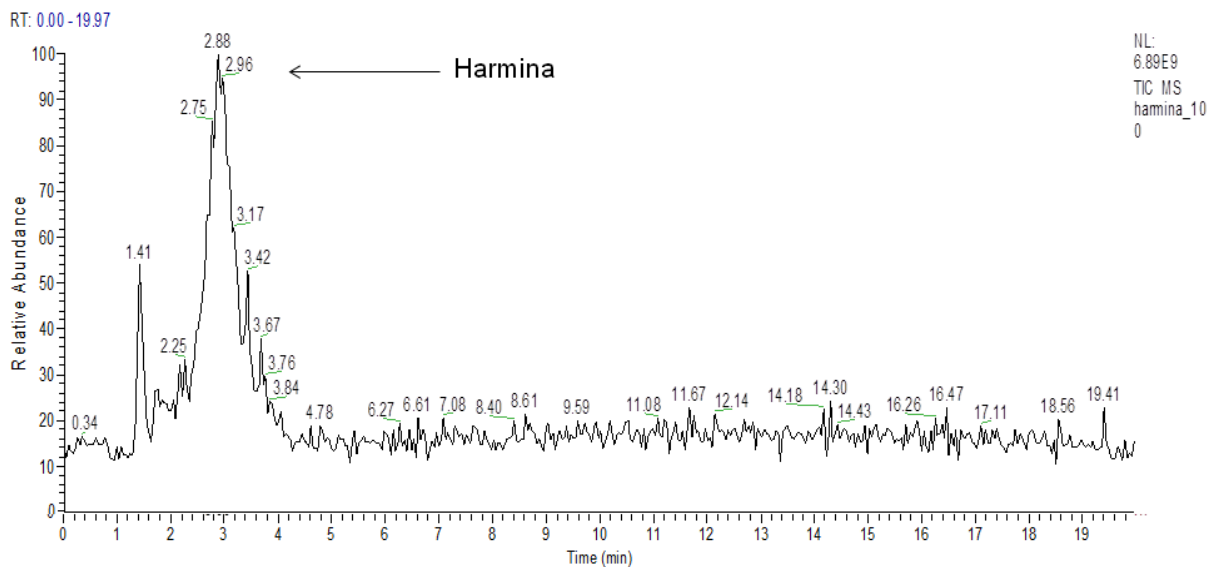
A Figura 15 apresenta o cromatograma dos íons totais (*total ion chromatogram*, TIC) e o espectro de massas do padrão de harmana, com um pico com  $T_R$  2,24 min referente à molécula protonada ( $[M+H]^+$ ) de  $m/z$  183,09117.

Figura 15 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmana.

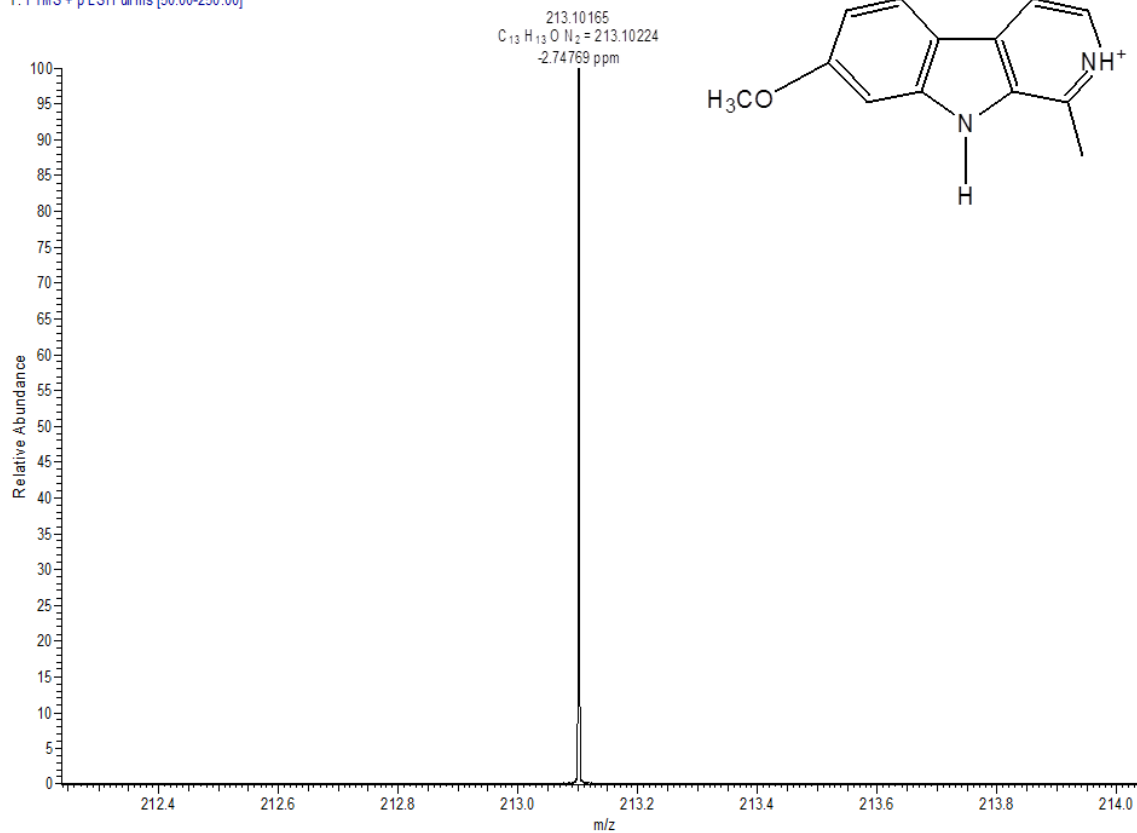


A Figura 16 apresenta o TIC e o espectro de massas do padrão de harmina, com um pico com  $T_R$  2,88 min referente à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  213,10165.

Figura 16 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmina.

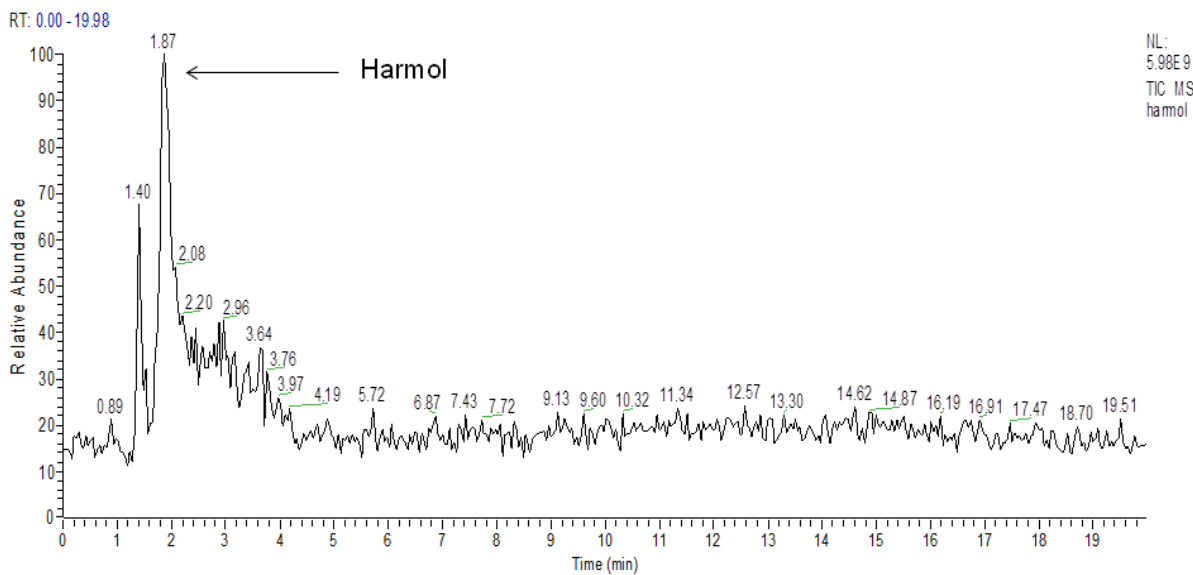


harmina 100 #67 RT: 2.80 AV: 1 NL: 3.58E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-250.00]

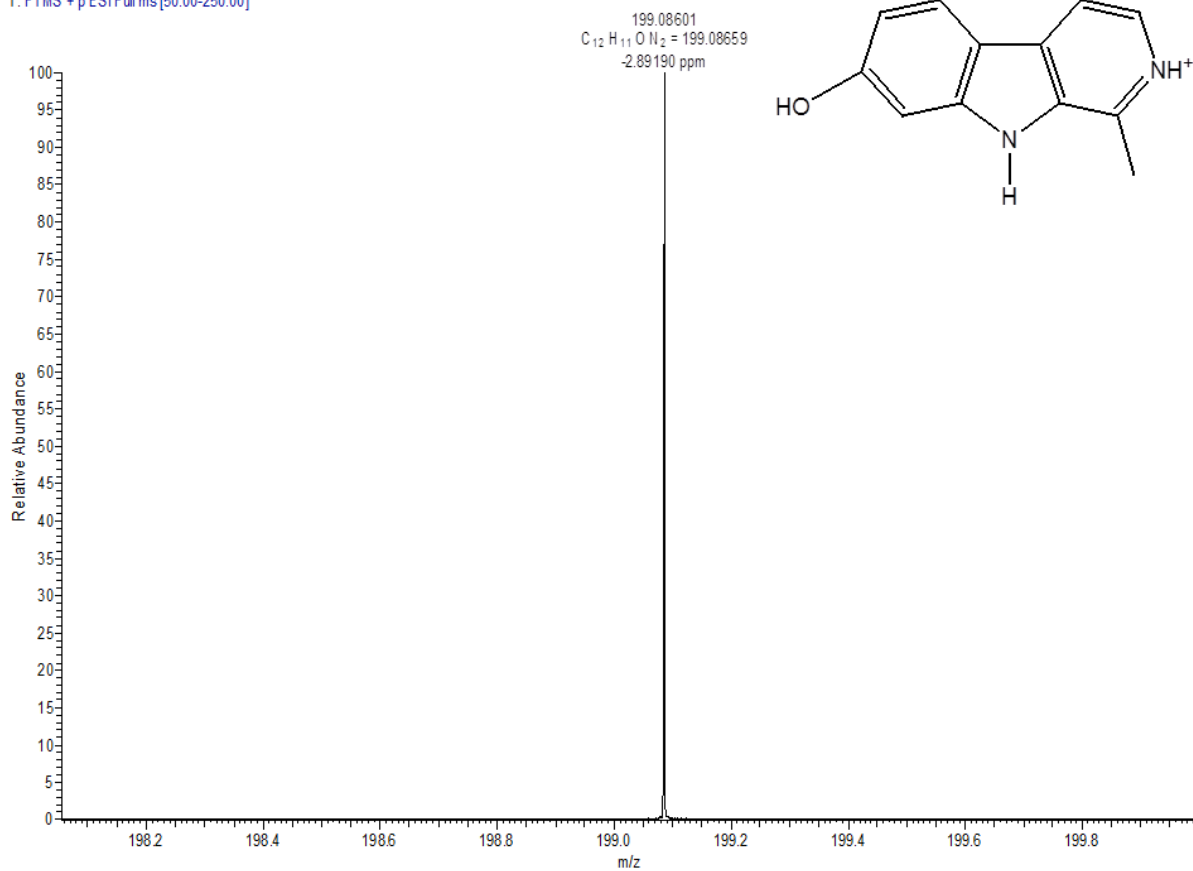


A Figura 17 apresenta o TIC e o espectro de massas do padrão de harmol, com um pico com  $T_R$  1,87 min referente à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  199,08601.

Figura 17 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmol.

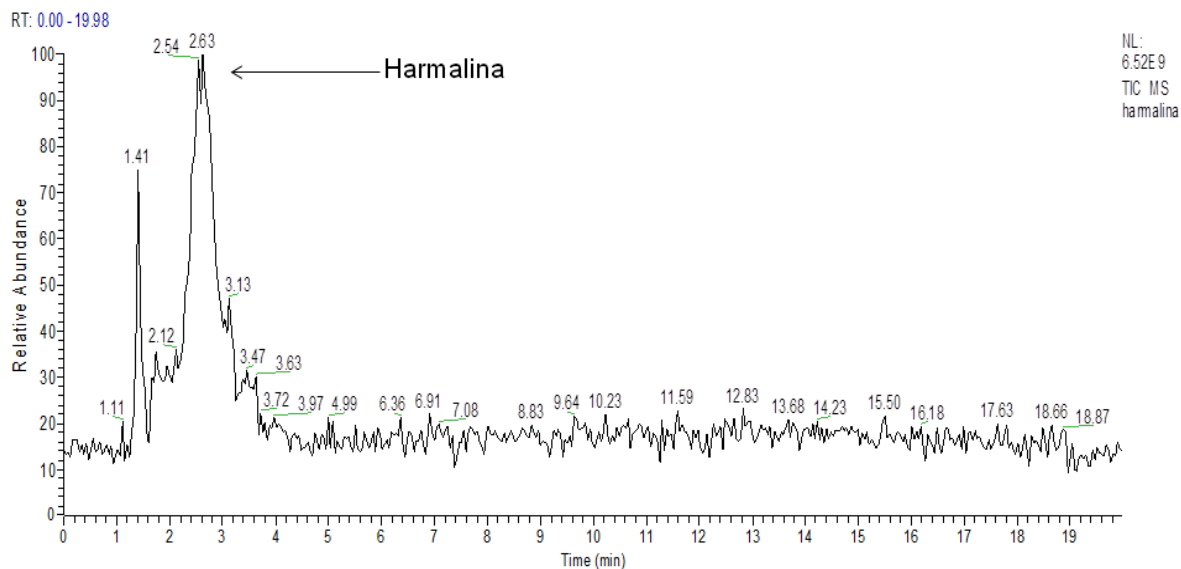


harmo #50 RT: 2.08 AV: 1 NL: 1.62E9  
T: FTMS + pESI Full ms [50.00-250.00]

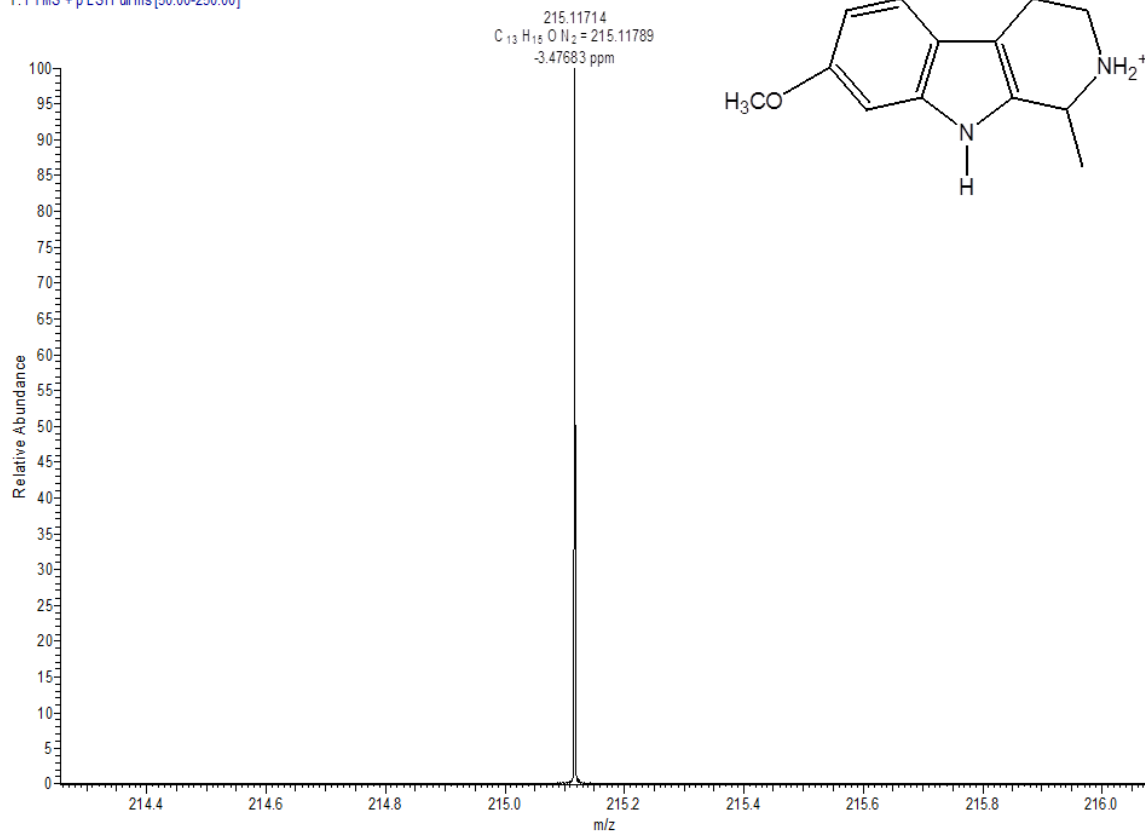


A Figura 18 apresenta o TIC e o espectro de massas do padrão de harmalina, com um pico com  $T_R$  2,63 min referente à  $[M+H]^+$  de  $m/z$  215,11714.

Figura 18 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmalina.

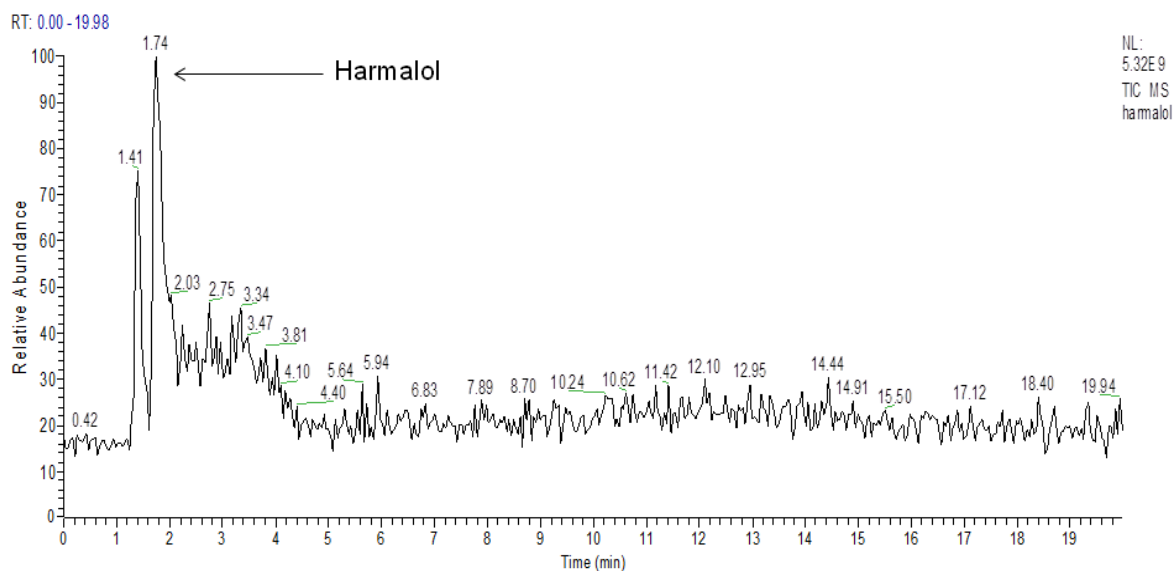


harmalina #67 RT: 2.79 AV: 1 NL: 2.71E9  
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-250.00]

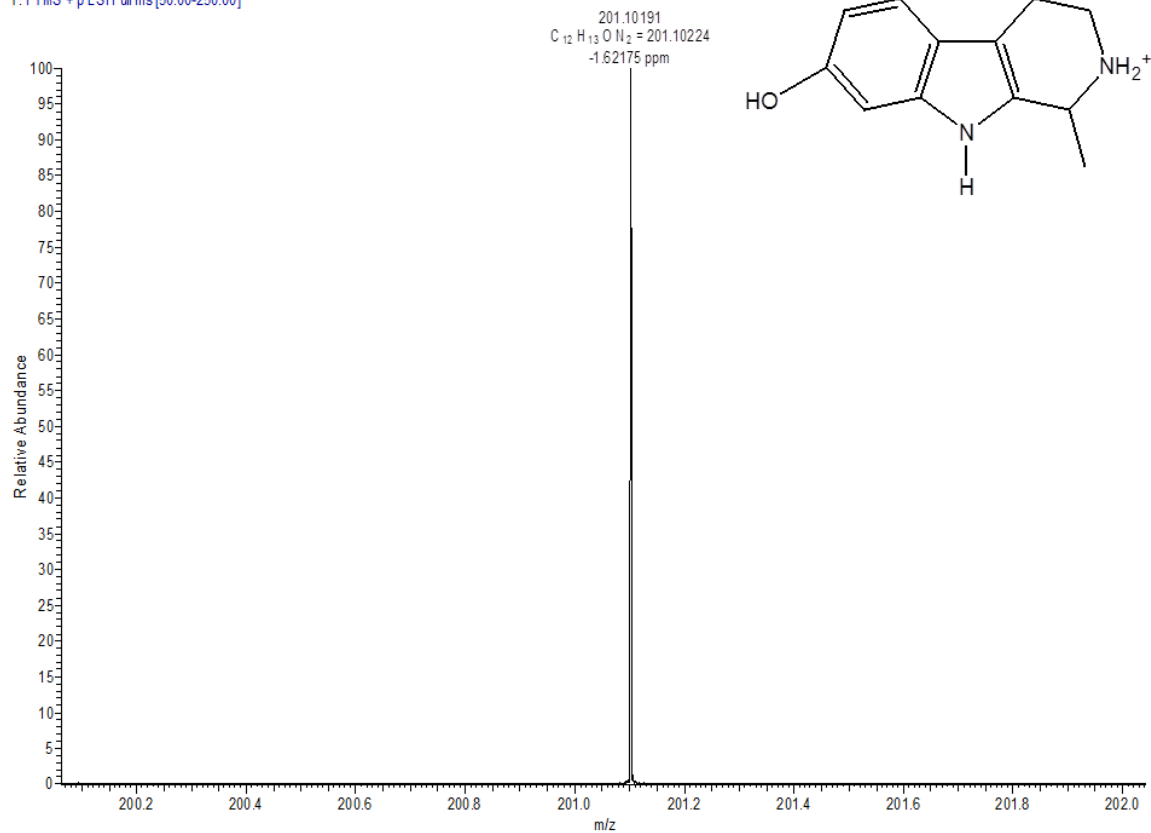


A Figura 19 apresenta o TIC e o espectro de massas do padrão de harmalol, com um pico com  $T_R$  1,74 min referente à  $[M+H]^+$  com  $m/z$  201,10191.

Figura 19 - TIC e espectro de massas por UHPLC/MS do padrão de harmalol.



harmalo #83 RT: 3.47 AV: 1 NL: 5.90E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [50.00-250.00]

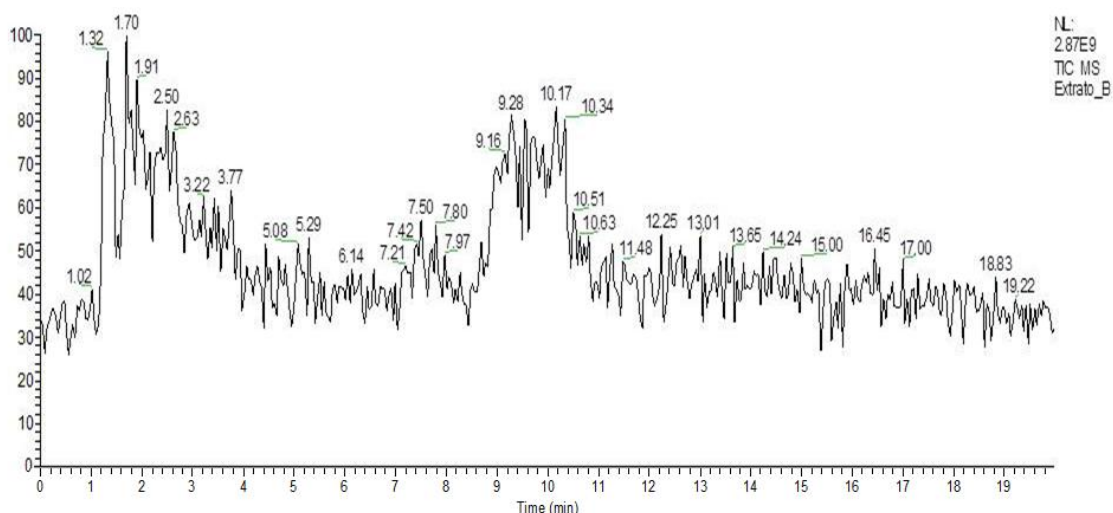




Nas análises dos padrões por UHPLC/MS, os erros referentes às diferenças entre as  $m/z$  teóricas e as  $m/z$  experimentais ficaram dentro do intervalo aceitável de  $\pm 5$  ppm (SENYUVA; GÖKMEN; SARIKAYA, 2015).

O extrato das cascas de *P. edulis* preparado pelo método clássico, descrito no item 3.4, também foi analisado por UHPLC/MS. A Figura 20 apresenta o TIC correspondente ao extrato analisado.

Figura 20 - TIC obtido por UHPLC/MS do extrato das cascas de *P. edulis*.

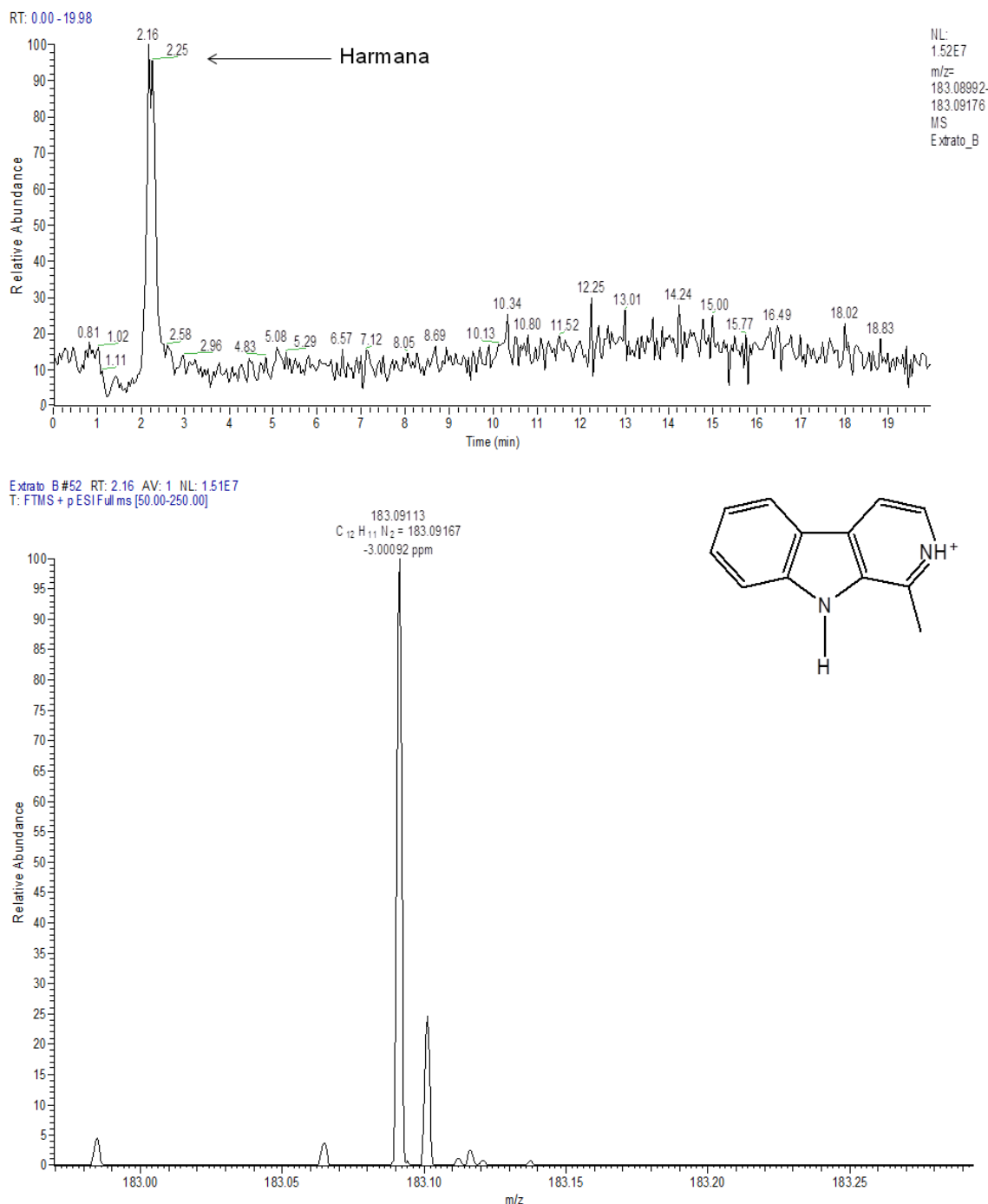


Utilizando o *software* Xcalibur™, foi monitorada a  $m/z$  referente à  $[M+H]^+$  do alcaloide de interesse. Quando encontrou-se um pico com  $m/z$  correspondente à  $[M+H]^+$  do alcaloide, este foi comparado com o  $T_R$  da  $[M+H]^+$ , encontrado para o extrato com o  $T_R$  da  $[M+H]^+$  para o padrão do alcaloide de interesse. Além disso, foi verificado o erro correspondente à diferença entre a  $m/z$  teórica e a  $m/z$  experimental, sendo aceitável erro dentro do intervalo de  $\pm 5$  ppm (SENYUVA; GÖKMEN; SARIKAYA, 2015). Após analisar os parâmetros citados, a substância foi confirmada, ou não, no extrato analisado.

A Figura 21 apresenta o cromatograma e o espectro de massas do monitoramento do íon selecionado (SIM), correspondentes ao íon  $C_{12}H_{11}N_2^+$  com  $m/z$  183,09113. Na análise do padrão de harmana foi encontrado um pico com  $T_R$  2,24 min correspondente à  $m/z$  183,09117, enquanto que na análise do extrato foi encontrado um pico com  $T_R$  2,16 min, correspondente à  $m/z$  183,09113. O valor de  $m/z$  183,09113 correspondente à  $[M+H]^+$  encontrada no extrato, apresentou erro de -3,00092 ppm quando comparado à  $m/z$  teórica 183,09167, correspondente ao íon

$C_{12}H_{11}N_2^+$ . Aliado ao resultado das análises por HPLC/Flu, foi possível a confirmação da presença de harmana no extrato analisado.

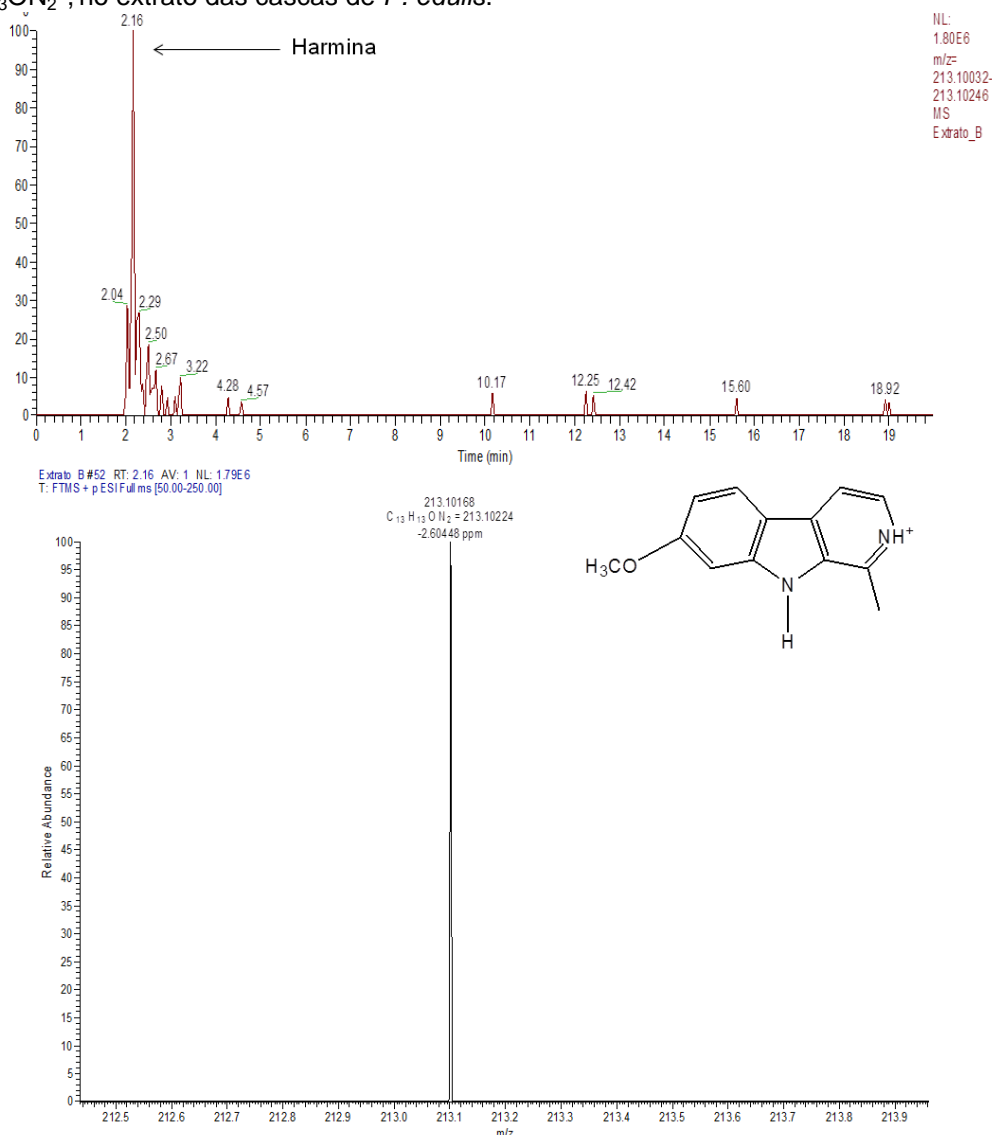
Figura 21 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon  $C_{12}H_{11}N_2^+$ , no extrato das cascas de *P. edulis*.



A Figura 22 apresenta o cromatograma e o espectro de massas, no modo SIM, correspondentes ao íon  $C_{13}H_{13}ON_2^+$  com  $m/z$  213,10168. Na análise do padrão de harmina, foi encontrado um pico com  $T_R$  2,88 min correspondente à

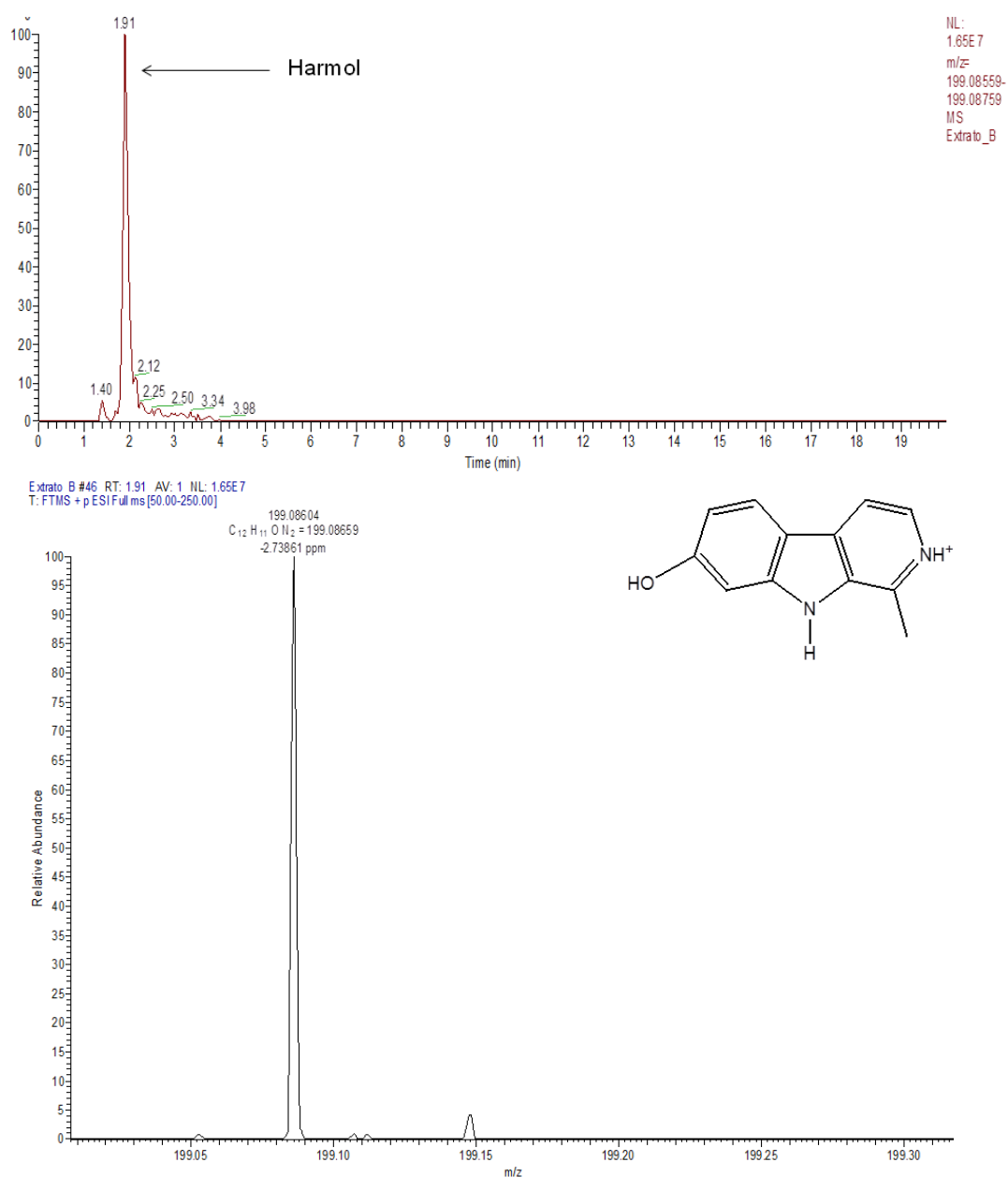
$m/z$  213,10165, enquanto que na análise do extrato foi encontrado um pico com  $T_R$  2,16 min, correspondente à  $m/z$  213,10168. O valor de  $m/z$  213,10168, correspondente à  $[M+H]^+$  encontrada no extrato, apresentou erro de -2,60448 ppm quando comparado à  $m/z$  teórica 213,10224, correspondente ao íon  $C_{13}H_{13}ON_2^+$ . Apesar dos  $T_R$  encontrados nas análises do padrão e do extrato serem diferentes, o erro entre a  $m/z$  teórica e a  $m/z$  experimental encontrado na análise do extrato está dentro do intervalo de  $\pm 5$  ppm. Além disso, a análise por HPLC/Flu do extrato (Figura 13) mostrou um pico com  $T_R$  e espectro de fluorescência semelhantes aos encontrados na análise por HPLC/Flu do padrão de harmina (Figura 12). Assim, foi possível confirmar a presença de harmina nesse extrato.

Figura 22 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon  $C_{13}H_{13}ON_2^+$ , no extrato das cascas de *P. edulis*.



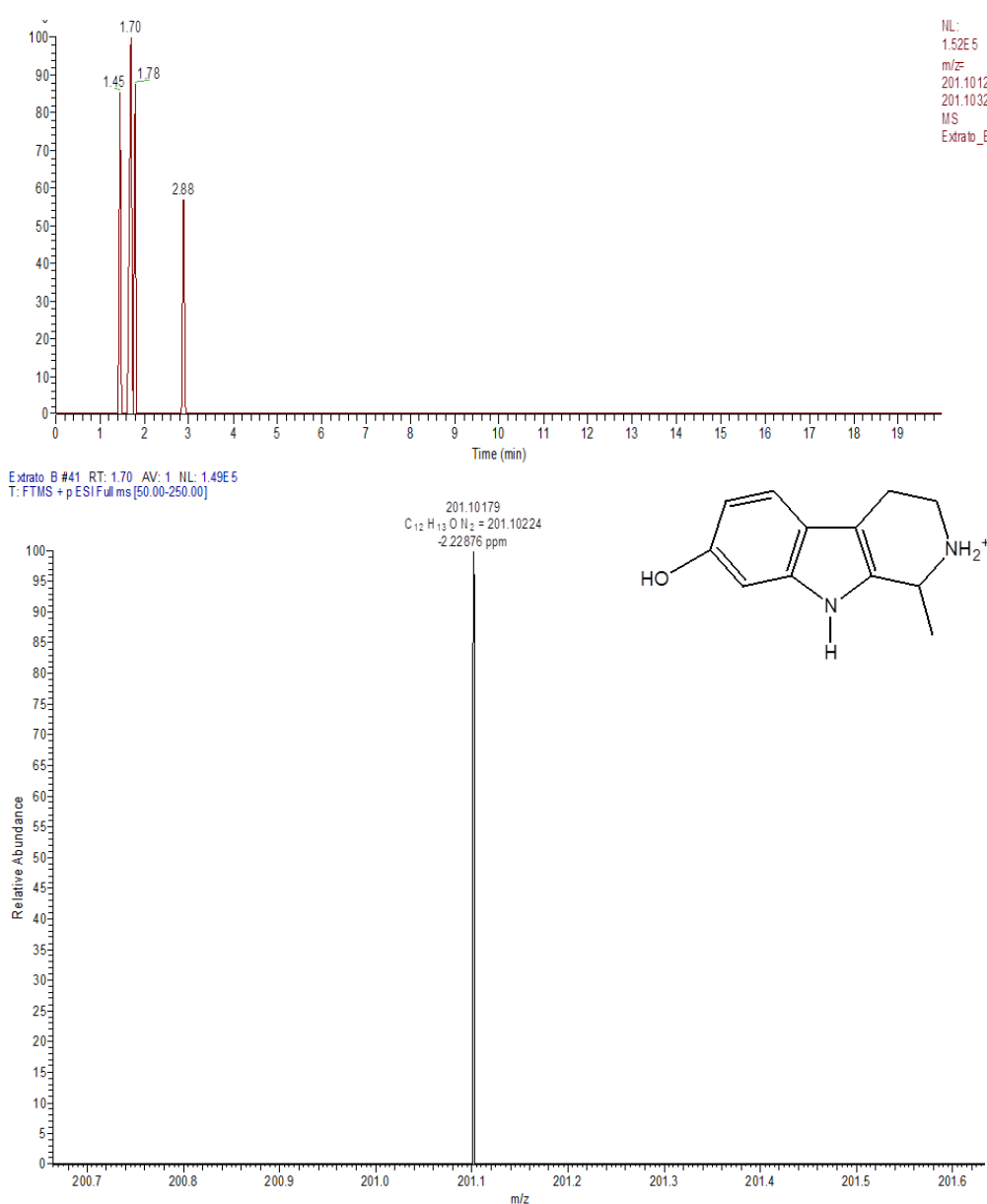
A Figura 23 apresenta o cromatograma e o espectro de massas, no modo SIM, correspondentes ao íon  $C_{12}H_{11}ON_2^+$  com  $m/z$  199,08604. Na análise do padrão de harmol foi encontrado um pico com  $T_R$  1,87 min correspondente à  $m/z$  199,08601, enquanto que na análise do extrato foi encontrado um pico com  $T_R$  1,91 min, correspondente à  $m/z$  199,08604. O valor de  $m/z$  199,08604, correspondente à  $[M+H]^+$  encontrada no extrato, apresentou erro de -2,73861 ppm quando comparado à  $m/z$  teórica 199,08659, correspondente ao íon  $C_{12}H_{11}ON_2^+$ . Dessa forma, foi possível confirmar a presença de harmol nesse extrato.

Figura 23 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon  $C_{12}H_{11}ON_2^+$ , no extrato das cascas de *P. edulis*.



A Figura 24 apresenta o cromatograma e o espectro de massas, no modo SIM, correspondentes ao íon  $C_{12}H_{13}ON_2^+$  com  $m/z$  201,10179. Na análise do padrão de harmalol, foi encontrado um pico com  $T_R$  1,74 min correspondente à  $m/z$  201,10191, enquanto que na análise do extrato foi encontrado um pico com  $T_R$  1,70 min, correspondente à  $m/z$  201,10179. O valor de  $m/z$  201,10179, correspondente à  $[M+H]^+$  encontrada no extrato, apresentou erro de -2,22876 ppm quando comparado à  $m/z$  teórica 201,10224, correspondente ao íon  $C_{12}H_{13}ON_2^+$ . Dessa forma, foi possível confirmar a presença de harmalol nesse extrato.

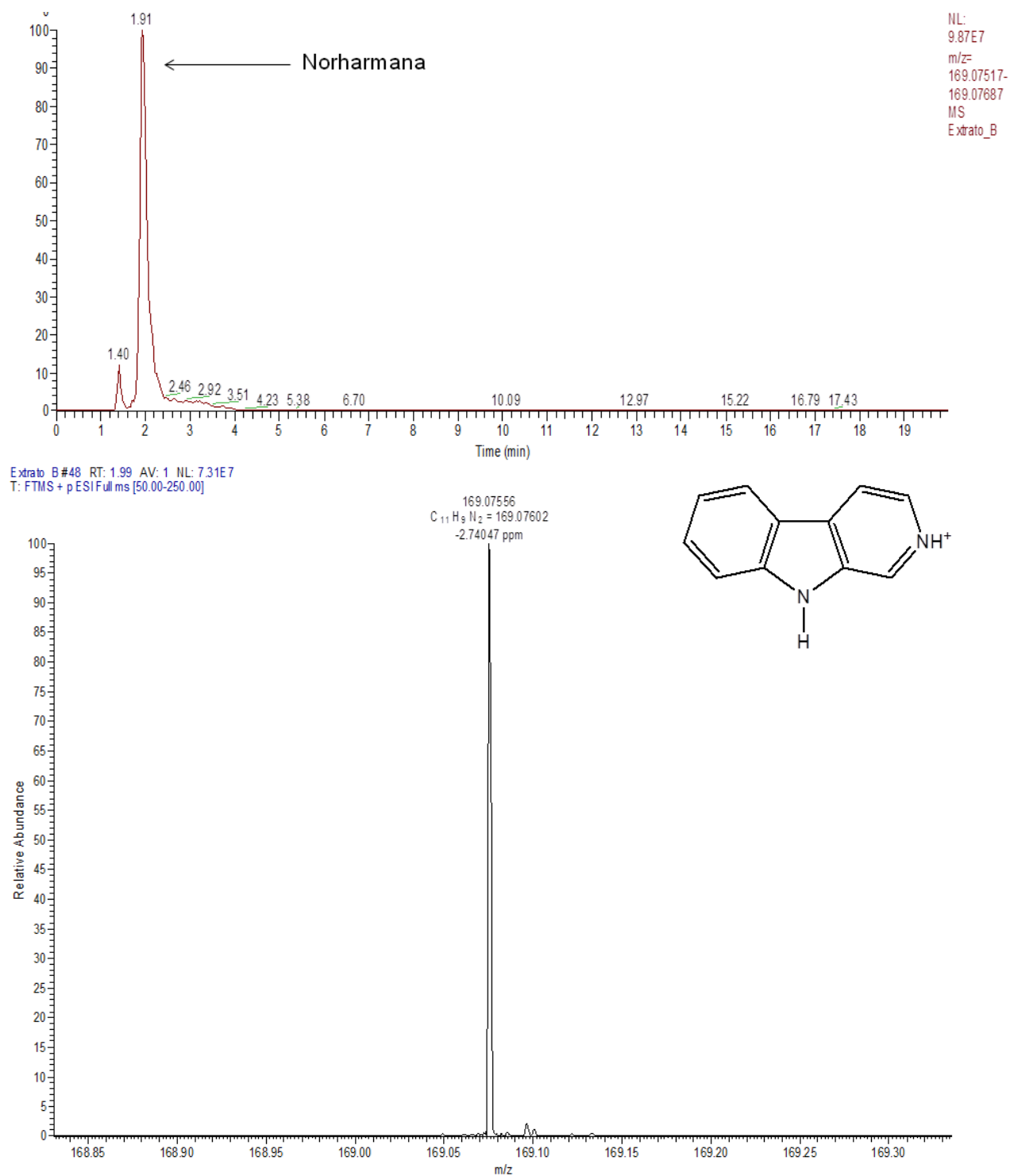
Figura 24 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon  $C_{12}H_{13}ON_2^+$ , no extrato das cascas de *P. edulis*.



O pico com  $m/z$  215,11714, correspondente ao íon  $C_{13}H_{15}ON_2^+$ , não foi encontrado no extrato. Assim, a análise por UHPLC/MS confirmou as análises por HPLC/Flu, que também indicavam a ausência de harmalina.

Nas análises dos extratos das cascas de *P. edulis* por HPLC/Flu (Figuras 13 e 14), foi observado um pico de grande intensidade com  $T_R$  5,16 min e  $\lambda_{\text{emissão}}$  em 440 nm. Tsuchiya et al. (1999) detectaram e quantificaram alcaloides  $\beta$ -carbolínicos por HPLC/Flu em diversas plantas medicinais e alimentícias, sendo que um dos alcaloides quantificados foi a norharmana, que apresentou  $\lambda_{\text{máximo}}$  de 447 nm. Desse modo, na análise do extrato das cascas por UHPLC/MS a  $m/z$  169,07602 correspondente ao íon  $C_{11}H_9N_2^+$ , foi monitorada no cromatograma do extrato das cascas de *P. edulis* por possivelmente se tratar da  $[M+H]^+$  de norharmana. Como apresentado na Figura 25, encontrou-se um pico com  $T_R$  1,91 min, sendo esse  $T_R$  menor que o encontrado para o padrão harmana ( $T_R$  2,24 min) e maior do que o encontrado para o padrão harmalol ( $T_R$  1,70 min), respeitando a ordem de eluição observada nas Figuras 13 e 14. O valor de  $m/z$  169,07556 correspondente à  $[M+H]^+$  encontrada na análise do extrato apresentou erro de -2,74047 ppm quando comparado à  $m/z$  teórica 169,07602, correspondente ao íon  $C_{11}H_9N_2^+$ . As análises por UHPLC/MS e por HPLC/Flu do extrato e do padrão de norharmana, possibilitou a confirmação da presença de norharmana no extrato das cascas de *P. edulis* analisado.

Figura 25 - Cromatograma e espectro de massas por UHPLC/MS no modo SIM correspondentes ao íon  $C_{11}H_9N_2^+$ , no extrato das cascas de *P. edulis*.



A Tabela 10 apresenta um resumo dos resultados da identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbólicos presentes no extrato das cascas de *P. edulis*.

Tabela 10 - Alcaloides  $\beta$ -carbolínicos identificados no extrato das cascas de *P. edulis*.

Alcaloide	Presença
Norharmana	Sim
Harmana	Sim
Harmina	Sim
Harmol	Sim
Harmalol	Sim
Harmalina	Não

Os dados apresentados na Tabela 10 não são inequívocos quanto à existência desses alcaloides nas cascas de *P. edulis*, pois há a necessidade de análises complementares que confirmem esses resultados. Contudo, os dados apresentados são indicativos positivos quanto à provável presença desses alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas cascas de maracujá azedo, parte do fruto que deve ser melhor explorada em futuras análises fitoquímicas da espécie, seja para prospecção de moléculas bioativas, seja para identificar as substâncias presentes nessa parte do fruto, visando análises toxicológicas que garantam a segurança alimentar do consumidor de produtos derivados das cascas de *P. edulis*.

#### 4.3 Estudo do processo de extração de norharmana por SBSE

O cromatograma por HPLC/Flu do extrato preparado por SBSE-PDMS, apresentado na Figura 14 do item 4.2, mostrou que o pico de maior intensidade era o pico referente ao alcaloide norharmana. Assim, por a SBSE ter-se mostrado promissora para a extração dessa substância e por ser uma técnica de preparo de amostra mais conveniente e condizente com os princípios da química verde do que o método de extração clássico para esse alcaloide, optou-se por realizar um estudo do processo de extração de norharmana por SBSE visando futuro desenvolvimento de um método de quantificação para essa substância.

Os fatores avaliados pelo planejamento fatorial fracionário  $2^{5-1}$  foram pH, porcentagem de NaCl, *phase ratio*, tempo de extração e porcentagem de metanol. Os níveis de pH, tempo de extração e porcentagem de NaCl foram escolhidos com base nas instruções de uso do fabricante (Gerstel) das barras com fase extratora de

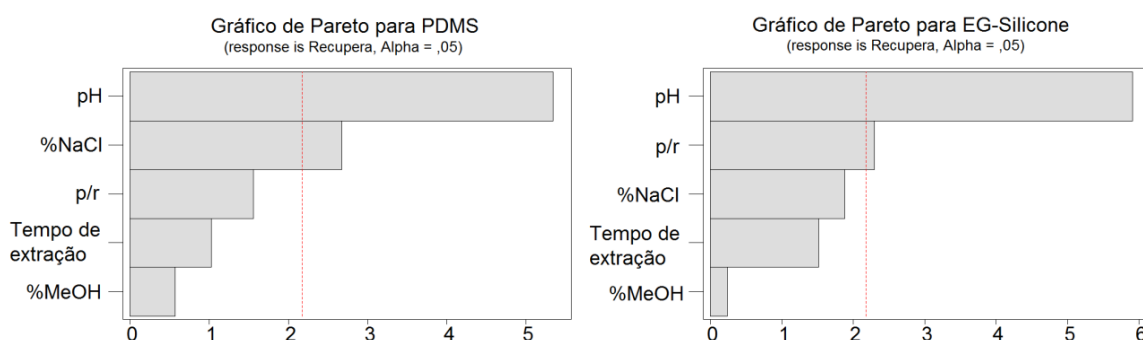


PDMS e EG-Silicone, sendo que para as barras de EG-Silicone, não é recomendado trabalhar com valores de pH menores do que 4 nem maiores do que 10, por causa dos grupos hidroxilícos do polímero. É recomendado que não haja NaCl como corpo de fundo na solução, já que isso pode aumentar o desgaste das barras por conta do atrito, então, o nível máximo de NaCl foi de 30 %. Além disso, para soluções que contenham grandes quantidades de NaCl, não é recomendado que o tempo de extração seja superior a 120 min, também para evitar maiores desgastes nas barras. A porcentagem de metanol foi avaliada para se determinar a influência desse fator na recuperação de norharmana, visto que um mínimo de metanol deve ser adicionado já que a solução de norharmana é preparada em metanol. Os *phase ratio* avaliados foram escolhidos com base em testes preliminares. Como resposta dos experimentos foi usada a recuperação percentual de norharmana na análise por HPLC/Flu.

Após a realização dos 19 experimentos do planejamento experimental, foram analisados os gráficos de Pareto, dos Efeitos Principais e das Interações entre Fatores, gerados pelo *software* MiniTab<sup>®</sup>, considerando o intervalo de confiança de 95%.

Os gráficos de Pareto estão apresentados na Figura 26. Nesse tipo de gráfico, os fatores que apresentam barras acima da linha tracejada são os fatores que influenciam significativamente a resposta. No caso do PDMS, dois fatores são os mais relevantes, o pH e a porcentagem de NaCl. Para o EG-Silicone, existem também dois fatores com maior influência, o pH e o *phase ratio*.

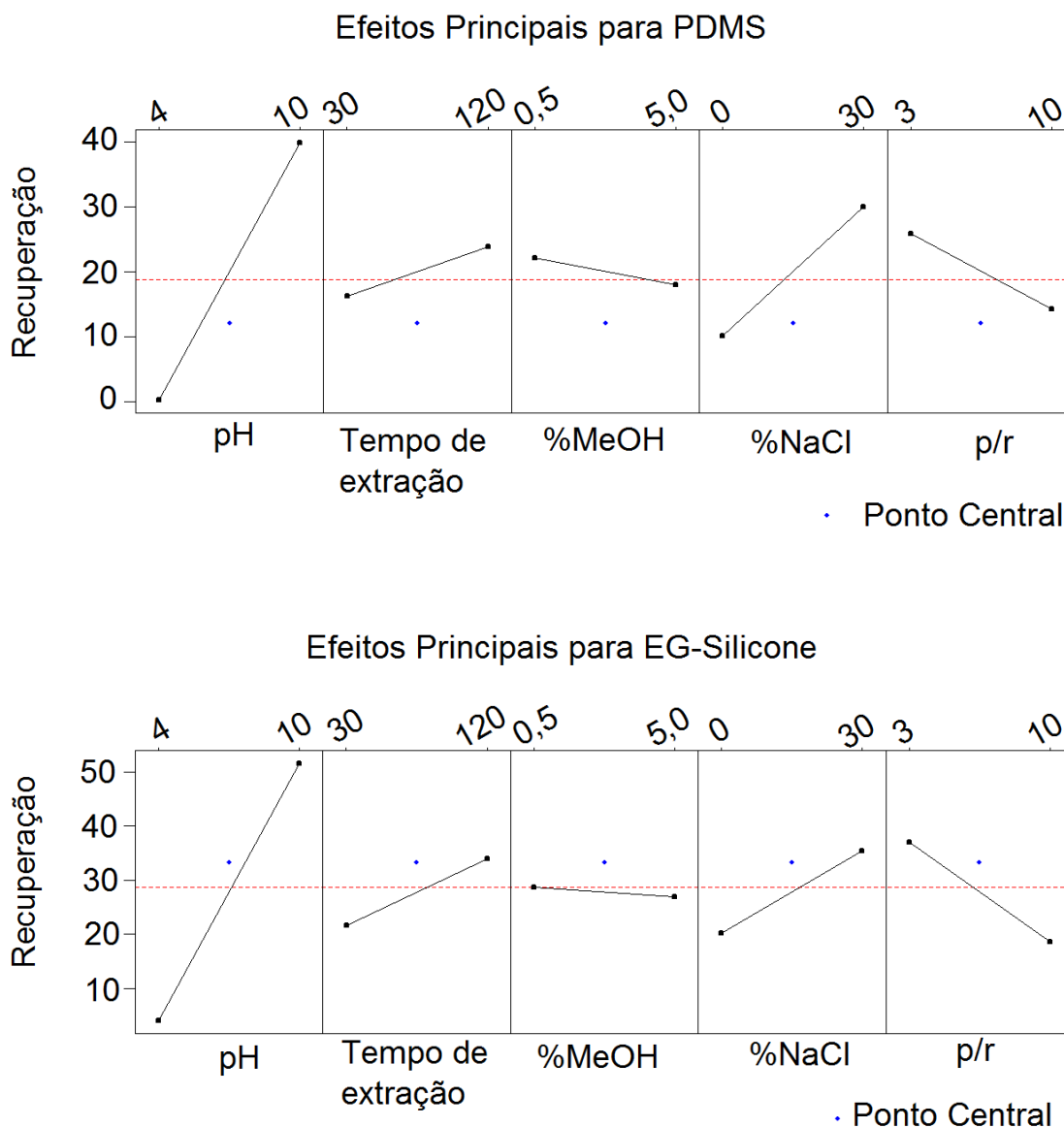
Figura 26 - Gráficos de Pareto para as barras com fase extratora de PDMS e de EG-Silicone.



Os gráficos dos Efeitos Principais, apresentados na Figura 27, apresentam o nível de determinado fator que apresenta a melhor resposta. No caso do PDMS, é

possível observar que o pH, a porcentagem de NaCl e o tempo de extração, em seus níveis (+1), apresentaram maior recuperação percentual, sendo que os fatores significativos para a análise são pH e porcentagem de NaCl, como mostrado no gráfico de Pareto (Figura 26). O *phase ratio* e a porcentagem de metanol forneceram melhor resposta nos níveis (-1), mas foram menos significativos. Já no gráfico dos Efeitos Principais para EG-Silicone, o pH mostrou melhor resposta em seu nível (+1). Quanto ao tempo de extração e a porcentagem de NaCl, o ponto central apresentou recuperação percentual próxima aos níveis (+1), já para o *phase ratio*, a recuperação percentual do ponto central foi próxima a do nível (-1), enquanto que para a porcentagem de metanol o ponto central obteve melhor recuperação percentual do que os níveis (+1) e (-1). Isso pode ser reflexo da influência do *phase ratio* no processo de extração pelas barras de EG-Silicone. No *phase ratio* de 10 mL, o número de mols de analito é maior que no *phase ratio* de 6,5 mL, visto que o volume de solução do padrão de norharmana adicionada para cada *phase ratio* é diferente, uma vez que a concentração final de norharmana é a mesma,  $5,00 \mu\text{g L}^{-1}$ . É possível que no *phase ratio* de 10,0 mL o número de mols do analito em solução seja maior que a capacidade de extração desse analito pela barra, sendo esse efeito diminuído ao usar o *phase ratio* de 6,5 mL. Isso leva o ponto central a ter uma resposta parecida ou superior à dos níveis (+1) e/ou (-1) dos fatores que tendem a alterar menos significativamente a resposta. Na porcentagem de metanol, o ponto central teve resposta acima dos níveis (+1) e (-1), sendo que, como pode ser observado no gráfico de Pareto (Figura 26), essa é a variável que possui menor influência na resposta. A resposta dos fatores *phase ratio*, da porcentagem de NaCl e do tempo de extração, que possuem maior influência que a porcentagem de metanol, foi parecida com a do ponto central para o melhor nível de cada fator. Assim, suspeita-se que a recuperação percentual máxima de norharmana utilizando as barras de EG-Silicone em *phase ratio* de 10,0 mL seja menor que a recuperação percentual máxima em *phase ratio* de 6,5 mL de solução. Com esse conjunto de experimentos realizados não foi possível confirmar essa hipótese e nem mensurar a capacidade máxima de extração de norharmana pelas barras de EG-Silicone, porém, a tendência dos resultados leva à lógica apresentada.

Figura 27 - Gráfico dos Efeitos Principais para as fases extratoras PDMS e EG-Silicone.



É esperado que o pH possua grande influência na recuperação percentual de norharmana tendo em vista que o  $pK_a$  do nitrogênio do grupo piridínico da norharmana é de 6,85 (BALÓN et al., 1993). No nível (+1) o pH da solução é 10, assim, a molécula de norharmana encontra-se não-protonada, diminuindo sua solubilidade em água e, conseqüentemente, tendendo a interagir com a fase extratora.

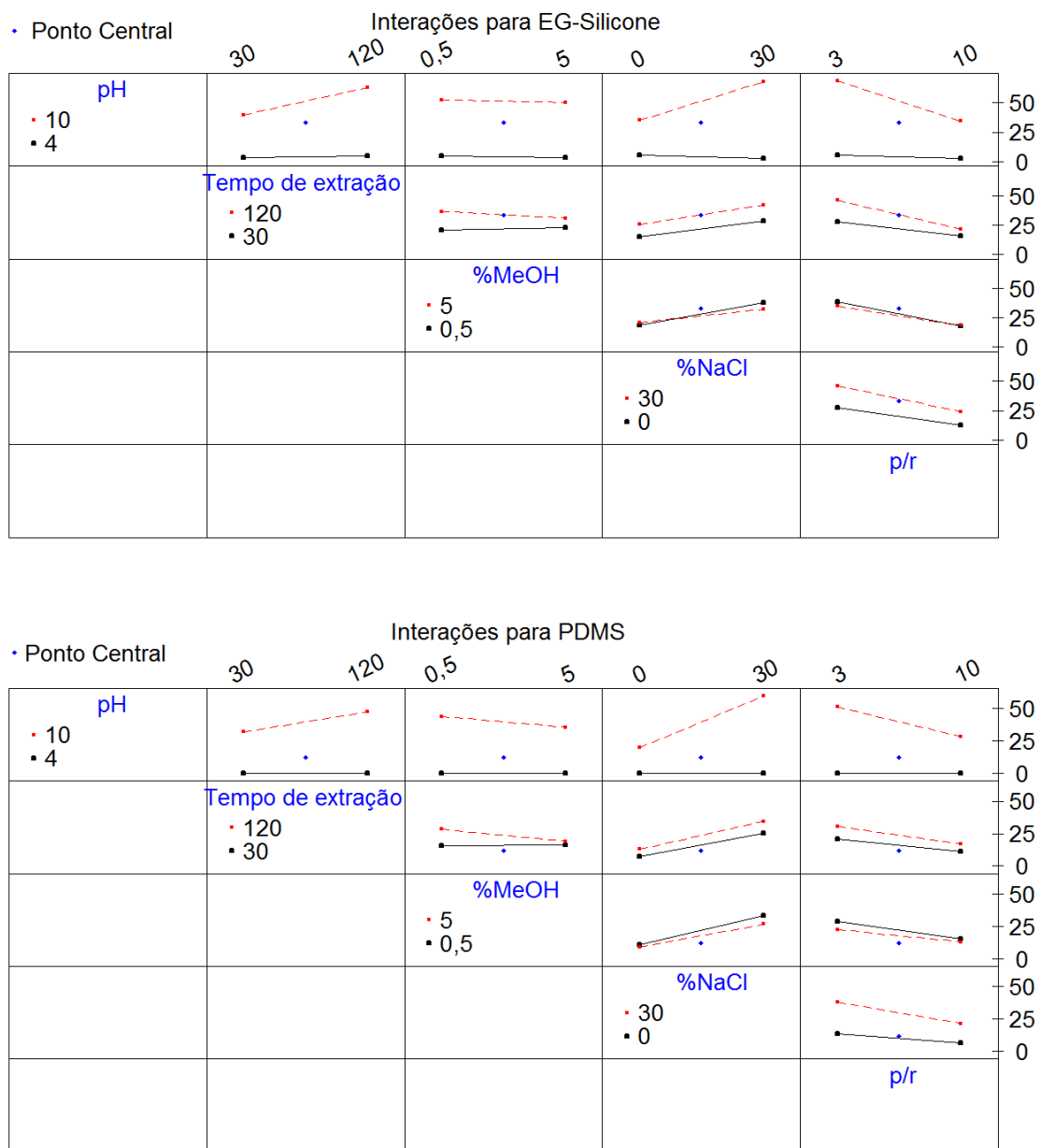
O tempo de extração não se mostrou significativo para as barras de PDMS e nem para as barras de EG-Silicone. No entanto, para ambas o tempo de extração de 120 min, nível (+1), levou à uma melhor recuperação percentual de norharmana.

A porcentagem de metanol mostrou-se pouco significativa para a recuperação de norharmana nos níveis (+1) e (-1) estudados, visto que nos gráficos de Pareto (Figura 26) para as barras com fase extratora de PDMS e de EG-silicone, as respostas referentes a esse fator foram as de menor tamanho. Apesar de a recuperação percentual ter sido ligeiramente superior quando foi utilizado 0,50 % de metanol, nível (-1), o intuito de incluir essa variável no planejamento era avaliar o quanto esse fator influi na recuperação percentual. Uma vez que a influência é pequena, por questão de simplificação do procedimento experimental em uma futura quantificação, optou-se por 5,00 % de metanol, nível (+1), para os ensaios de recuperação percentual.

Para a barra de PDMS, a porcentagem de NaCl é um fator significativo na recuperação percentual. Isso é algo esperado tendo em vista que para analitos com  $\log K_{o/w} < 4$ , a adição de NaCl na amostra eleva a força iônica da solução, promovendo o efeito do *salting out*, sendo que esse é o caso da norharmana que possui  $\log K_{o/w}$  teórico de 2,56 (FooDB, 2016). Embora a porcentagem de NaCl não seja um fator significativo para as barras de EG-Silicone, o nível (+1) levou à uma melhor recuperação percentual.

Outro conjunto de gráficos gerados são os gráficos de Interações entre os Fatores, apresentados na Figura 28. Nesse tipo de gráfico, a interação entre os fatores é mostrada pelo cruzamento de duas linhas referentes aos fatores analisados. Por exemplo, no segundo quadro do gráfico de Interações entre Fatores para PDMS, da Figura 28, é possível observar uma linha vermelha tracejada, que representa a variação da recuperação percentual quando o pH da solução é igual a 10, já a linha preta contínua representa a variação da recuperação percentual quando o pH da solução é igual a 4, sendo que o ponto da esquerda representa o tempo de extração de 30 min e o ponto da direita representa o tempo de extração de 120 min. Nesse caso, essas duas linhas não se cruzam, logo, não há interação entre os fatores pH e tempo de extração. Assim, caso haja necessidade, pode-se alterar o nível do fator pH sem a necessidade de se alterar o nível do fator tempo de extração. Tanto para as barras de PDMS quanto para as barras de EG-Silicone não foi observado nenhum tipo de interação entre os fatores avaliados.

Figura 28 - Gráfico das Interações entre os fatores para as barras com fase extratora de PDMS e de EG-Silicone.



Após a análise dos gráficos apresentados, foram escolhidas as condições em que se obtém a melhor recuperação percentual, levando em consideração os níveis analisados para cada fator. Foram realizados experimentos, com as barras de PDMS e com as barras de EG-Silicone, utilizando as seguintes condições de extração: *phase ratio* de 3,0 mL, pH 10, 120 min de tempo de extração, 5,00 % de metanol e 30 % de NaCl. Para PDMS foi obtida recuperação percentual de 51,73 % com DPR de 2,36 %. Para EG-Silicone foi obtida recuperação percentual de 80,54 % com DPR de 2,45 %.

O planejamento fatorial fracionário mostrou-se adequado para avaliarem-se os fatores mais importantes, e seus níveis mais apropriados, para a extração de norharmana utilizando as barras de PDMS e de EG-Silicone com a necessidade de um número de experimentos menor do que se fosse realizado um planejamento univariável. Era esperada uma recuperação percentual menor de norharmana pelas barras de PDMS, em comparação com as barras de EG-Silicone, por conta da polaridade da molécula, que possui  $\log K_{o/w}$  teórico de 2,56. Utilizando as barras de EG-Silicone, a recuperação percentual foi superior a 80 %, mostrando o promissor uso dessas barras para o desenvolvimento de um método de quantificação de norharmana por HPLC/Flu, utilizando SBSE-EG-Silicone para o preparo de amostra.

## 5 CONCLUSÕES

O estudo realizado permitiu avanços no conhecimento sobre um alimento amplamente consumido no Brasil, o maracujá, trazendo aprofundamento na fitoquímica de uma planta originária de nosso território.

A quantificação de harmana na polpa e nas sementes de *P. alata* fornece informações relevantes sobre a quantidade de alcaloides que podem ser consumidos com a utilização do maracujá doce na alimentação. A polpa e as sementes de *P. alata* não apresentaram quantidades apreciáveis do alcaloide harmina.

A identificação dos alcaloides  $\beta$ -carbolínicos nas cascas de *P. edulis* permitiu a identificação de cinco alcaloides nos extratos das cascas de *P. edulis* analisados por HPLC/Flu e por UHPLC/MS.

A partir dos resultados conseguidos utilizando o planejamento experimental fatorial, foi observado que a SBSE-EG-Silicone apresentou melhor recuperação percentual para a extração de norharmana. Desse modo, esse procedimento se apresenta como o mais indicado para o futuro desenvolvimento de um método de quantificação de norharmana nas cascas de maracujá.

## 6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O gênero *Passiflora* possui ampla distribuição no território brasileiro, sendo relatadas, até o momento, 82 espécies endêmicas (REFLORA, 2014). Em trabalhos futuros seria interessante a exploração da fitoquímica de espécies silvestres de *Passiflora*, em especial das espécies endêmicas, para a prospecção de compostos bioativos. Outro trabalho, também interessante seria o estudo fitoquímico de novos cultivares de maracujás silvestres, que têm sido desenvolvidos em projetos da Rede Passitec (EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA, 2016) visando a identificação de compostos com o intuito de conhecer as substâncias constituintes e suas quantidades de maneira a garantir a segurança alimentar dos consumidores.



## REFERÊNCIAS

ABOURASHED, E. A.; VANDERPLANK, J.; KHAN, I. A. High-speed extraction and HPLC fingerprinting of medicinal plants – II. Application to harman alkaloids of genus *Passiflora*. **Pharmaceutical Biology**, v. 41, n. 2, p. 100–106, 2003.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopéia Brasileira**. Brasília, 2010. Disponível em:  
<[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/pdf/volume2.pdf](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume2.pdf)>.  
Acesso em: 20 jan. 2016.

ALLEN, J. R. F.; HOLMSTEDT, B. R. The simple  $\beta$ -carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v. 19, n. 8, p. 1573–1582, 1980.

AYMONE, Ana Carolina Bahi. **Restrições ontogenéticas e filogenéticas na evolução da forma da cápsula cefálica em oito espécies de Heliconíneos (Lepidoptera: Nymphalidae)**. 2009. 108 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009. Disponível em:<<http://hdl.handle.net/10183/17314>>. Acesso em: 22 ago. 2016.

BALÓN, M.; HIDALGO, J.; GUARDADO, P.; MUÑOZ, M. A.; CARMONA, C. Acid–base and spectral properties of  $\beta$ -carbolines. Part 2. Dehydro and fully aromatic  $\beta$ -carbolines. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 2, n. 1, p. 99–104, 1993.

BENSON, W. W.; BROWN, K. S.; GILBERT, L. E. Coevolution of plants and herbivores: passion flower butterflies. **Evolution**, v. 29, n. 4, p. 659, 1975.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P.; VILLAR, L. S.; ESCALEIRA, L. A. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, n. 5, p. 965–977, 2008.

BIBLIOTECA VIRTUAL EM SAÚDE DO MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Dicas de saúde**. 2009. Disponível em:  
<[http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220\\_alimentos\\_funcionais.html](http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/dicas/220_alimentos_funcionais.html)>.  
Acesso em: 8 fev. 2016.

BRASIL, Ministério do Meio Ambiente. Portaria nº 443 de 17 de dezembro de 2014. **Diário Oficial da União**, Brasília, 18 dez. 2014, Seção 1, p. 110 - 121. Disponível em:

<<http://sintse.tse.jus.br/documentos/2014/Dez/18/portaria-no-443-de-17-de-dezembro-de-2014>>. Acesso em: 15 mar. 2016.

CAO, R.; PENG, W.; WANG, Z.; XU, A.  $\beta$ -carboline alkaloids: biochemical and pharmacological functions. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 479–500, 2007.

CROTTI, A. E. M.; GATES, P. J.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Electrospray MS-based characterization of  $\beta$ -carbolines - mutagenic constituents of thermally processed meat. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 54, n. 3, p. 433–439, 2010.

DA SILVA, J. K.; CAZARIN, C. B. B.; JUNIOR, S. B.; AUGUSTO, F.; JUNIOR, M. R. M. Passion fruit (*Passiflora edulis*) peel increases colonic production of short-chain fatty acids in Wistar rats. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, n. 2, p. 1252–1257, 2014.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2ª edição. New York: John Wiley, 2002. 507 p.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DOUGLAS, K. T. SHARMA, R. K.; WALMSLEY, J. F.; HIDER, R. C. Ionization processes of some harmala alkaloids. **Molecular Pharmacology**, v. 23, n. 3, p. 614–618, 1983.

DUPORTAIL, G. Linear and circular dichroism of harmine and harmaline interacting with DNA. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 3, n. 3, p. 188–192, 1981.

DUTRA, G. A. P.; DE CARVALHO, A. J. C.; FREITAS, M. S. M.; DOS SANTOS, P. C.; FREITAS, J. A. A.; MARINHO, C. S. Sweet passion fruit yield and fruit quality related to fertilization with urea and cattle manure. **Journal of Plant Nutrition**, v. 39, n. 6, p. 828–834, 2016.

EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA (EMBRAPA). **Rede passitec**. Planaltina, DF, 2003. Disponível em: <<http://www.cpac.embrapa.br/passitec/>>. Acesso em: 15 out. 2016.

FALEIRO, F. G.; JUNQUEIRA, N. T. V.; BRAGA, M. F. **Maracujá**: germoplasma e melhoramento genético. Planaltina, DF: EMBRAPA CERRADOS, 2005. 670 p.

FEKKES, D.; TUITEN, A.; BOM, I.; PEPPLINKHUIZEN, L. Tryptophan: a precursor for the endogenous synthesis of norharman in man. **Neuroscience Letters**, v. 303, n. 3, p. 145–148, 2001.

FOLLMER, C.; BEZERRA NETTO, H. J. C. Fármacos multifuncionais: monoamina oxidase e  $\alpha$ -sinucleína como alvos terapêuticos na doença de Parkinson. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 306–313, 2013.

FooDB. **The Metabolomics Innovation Centre**. Canadá. 2009. Disponível em: <<http://foodb.ca/>>. Acesso em: 21 fev. 2016.

GERSTEL. **Gerstel supplies**. 2015. Disponível em: <<http://www.gerstel.com/pdf/s00135-707-02-Supplies-Twister-en.pdf>>. Acesso em: 2 fev. 2016.

GILART, N.; MIRALLES, N.; MARCÉ, R. M.; BORRULL, F.; FONTANALS, N. Novel coatings for stir bar sorptive extraction to determine pharmaceuticals and personal care products in environmental waters by liquid chromatography and tandem mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 774, p. 51–60, 2013.

GILBERT, L. E. Butterfly-plant coevolution: has *Passiflora adenopoda* won the selectional race with Heliconiine butterflies? **Science**, v. 172, n. 3983, p. 585–586, 1971.

GREMILION, K.J. The development of a mutualistic relationship between humans and maypops (*Passiflora incarnata* L.) in the Southeastern United States. **Journal of Ethnobiology**, v. 9, n. 2, p. 135-155, 1989.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase is inhibited by tobacco smoke:  $\beta$ -carboline alkaloids act as potent and reversible inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 326, n. 2, p. 378–386, 2005.

HERRAIZ, T.; CHAPARRO, C. Human monoamine oxidase enzyme inhibition by coffee and  $\beta$ -carbolines norharman and harman isolated from coffee. **Life Sciences**, v. 78, n. 8, p. 795–802, 2006.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Naturally-occurring tetrahydro- $\beta$ -carboline alkaloids derived from tryptophan are oxidized to bioactive  $\beta$ -carboline alkaloids by heme peroxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 451, n. 1, p. 42–47, 2014.

HIBBERT, D. B. Experimental design in chromatography: a tutorial review. **Journal of Chromatography B**, v. 910, p. 2–13, 2012.

ICHIMURA, T.; YAMANAKA, A.; ICHIBA, T.; TOYOKAWA, T.; KAMADA, Y.; TAMAMURA, T.; MARUYAMA, S. Antihypertensive effect of an extract of *Passiflora edulis* rind in spontaneously hypertensive rats. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 70, n. 3, p. 718–721, 2006.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Produção Agrícola Municipal**. 2016. Disponível em: <<https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#/n1/all/n2/all/v/214,215,2313/p/2010,2011,2012,2013,2014/c82/0,2738/l/t,v+c82,p/resultado>>. Acesso em: 22 jan. 2017.

JANEIRO, D. I.; DE QUEIROZ, M. S. R.; RAMOS, A. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; DA CUNHA, M. A. L.; DINIZ, M. F. F. M. Efeito da farinha da casca do maracujá-amarelo (*Passiflora edulis f. flavicarpa Deg.*) nos níveis glicêmicos e lipídicos de pacientes diabéticos tipo 2. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. suppl., p. 724–732, 2008.

KARTAL, M.; ALTUN, M. L.; KURUCU, S. HPLC method for the analysis of harmol, harmalol, harmine and harmaline in the seeds of *Peganum harmala* L. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 31, n. 2, p. 263–269, 2003.

LANÇAS, F. M. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: finalmente “compatíveis”? **Scientia Chromatographica**, v. 5, n. 1, p. 27–46, 2009.

LEARDI, R. Experimental design in chemistry: a tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 652, n. 1–2, p. 161–172, 2009.

LENARDÃO, E. J.; FREITAG, R. A.; DABDOUB, M. J.; BATISTA, A. C. F.; SILVEIRA, C. C. "Green chemistry": os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. **Química Nova**, v. 26, n. 1, p. 123–129, 2003.

LI, S; LIU, W.; TENG, L.; CHENG, X.; WANG, Z.; WANG, C. Metabolites identification of harmine in vitro/in vivo in rats by ultra-performance liquid chromatography combined with electrospray ionization quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 92, p. 53–62, 2014.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197–207, 2012.

MARTINEZ, S. T.; ALMEIDA, M. R.; PINTO, A. C. Alucinógenos naturais: um voo da Europa Medieval ao Brasil. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2501–2507, 2009.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, p. 83–91, 2011.

MILLÁN C, CHACÓN C, C. G. Desarrollo, longevidad y oviposición de *Heliconius charitonia* (Lepidoptera: Nymphalidae) en dos especies de *Passiflora*. **Revista Colombiana de Entomología**, v. 36, n. 1, p. 158–164, 2010.

MOON, P. **Estudo quer identificar as 150 espécies brasileiras de maracujá**. 2016 Disponível em: <[http://www.jb.com.br/ciencia-e-tecnologia/noticias/2016/02/15/estudo-quer-identificar-as-150-especies-brasileiras-de-maracuja/?from\\_rss=None](http://www.jb.com.br/ciencia-e-tecnologia/noticias/2016/02/15/estudo-quer-identificar-as-150-especies-brasileiras-de-maracuja/?from_rss=None)>. Acesso em: 15 fev. 2016.

NOGUEIRA, J. M. F. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 4, p. 259–269, 2012.

OGA, S.; DE FREITAS, P.; DA SILVA, A.; HANADA, S. Pharmacological trials of crude extract of *Passiflora alata*. **Planta Medica**, v. 50, n. 4, p. 303–306, 1984.

PEREIRA, C. A. M.; RODRIGUES, T. R.; YARIWAKE, J. H. Quantification of harmine alkaloids in sour passion fruit pulp and seeds by a novel dual SBSE-LC/Flu (stir bar sorptive extraction-liquid chromatography with fluorescence detector) method. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 8, p. 1472–1483, 2014.

PFAU, W.; SKOG, K. Exposure to  $\beta$ -carbolines norharman and harman. **Journal of Chromatography B**, v. 802, n. 1, p. 115–126, 2004.

RAMOS, A. T.; CUNHA, M. A. L.; SABAA-SRUR, A. U. O.; PIRES, V. C. F.; CARDOSO, M. A. A.; DINIZ, M. F. M.; MEDEIROS, C. C. M. Uso de *Passiflora edulis f. flavicarpa* na redução do colesterol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 4, p. 592–597, 2007.

REFLORA. *Passiflora* em **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2014. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12506>>. Acesso em: 13 set. 2016.

ROMMELSPACHER, H.; STRAUSS, S.; LINDEMANN, J. Excretion of tetrahydroharmane and harmane into the urine of man and rat after a load with ethanol. **FEBS Letters**, v. 109, n. 2, p. 209–212, 1980.

SANTOS, C. E. M.; BRUCKNER, C. H.; CRUZ, C. D.; SIQUEIRA, D. L.; PIMENTEL, L. D. Características físicas do maracujá-azedo em função do genótipo e massa do fruto. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 31, n. 4, p. 1102–1119, 2009.

SENYUVA, H. Z.; GÖKMEN, V.; SARIKAYA, E. A. Future perspectives in Orbitrap<sup>TM</sup>-high-resolution mass spectrometry in food analysis: a review. **Food Additives & Contaminants: Part A**, v. 32, n. 10, p. 1568–1606, 2015.

SILVA, Gabriela Ribeiro. **Estudo de alcaloides dos frutos de *Passiflora alata* e de *Passiflora edulis* por SBSE, CLAE-Flu e identificação por CLUE-EM**. 2015. 105 f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica e Biológica) - Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2015. doi:10.11606/D.75.2015.tde-17082015-143533.

STÖCKIGT, J; ANTONCHICK, A. P.; WU, F.; WALDMANN, H. The pictet-spengler reaction in nature and in organic chemistry. **Angewandte Chemie - International Edition**, v. 50, n. 37, p. 8538–8564, 2011.

TANWAR, S.; DI CARRO, M.; MAGI, E. Innovative sampling and extraction methods for the determination of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in water. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 106, p. 100–106, 2015.

TASCON, M.; BENAVENTE, F.; SANZ-NEBOT, V. M.; GAGLIARDI, L. G. Fast determination of harmala alkaloids in edible algae by capillary electrophoresis mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 13, p. 3637–3645, 2015.

THE PLANT LIST. **Passifloraceae**. 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 10 fev. 2016.

TSUCHIYA, H.; OHTANI, S.; YAMADA, K.; TAKAGI, N.; TODORIKI, H.; HAYASHI, T. Quantitation of Urinary 1,2,3,4-Tetrahydro- $\beta$ -carboline and 1-Methyl-1,2,3,4-tetrahydro- $\beta$ -carboline by High-Performance Liquid Chromatography. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 83, n. 3, p. 415–418, 1994a.

TSUCHIYA, H.; OHTANI, S.; YAMADA, K.; TAKAGI, N.; HAYASHI, T. Determination of tetrahydro- $\beta$ -carbolines in urine by high-performance liquid chromatography with suppression of artefact formation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 12, n. 12, p. 1547–1553, 1994b.

TSUCHIYA, H.; HAYASHI, H.; SATO, M.; SHIMIZU, H.; IINUMA, M. Quantitative analysis of all types of  $\beta$ -carboline alkaloids in medicinal plants and dried edible plants by high performance liquid chromatography with selective fluorometric detection. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 5, p. 247–253, 1999.

VIRTUAL COMPUTATIONAL CHEMISTRY LABORATORY (VCCLAB). **ALOGPS**. 2005. Disponível em: <<http://www.vcclab.org/>>. Acesso em: 21 fev. 2016.

WOJTOWICZ, E.; ZAWIRSKA-WOJTASIAK, R.; PRZYGOŃSKI, K.; MILDNER-SZKUDLARZ, S. Bioactive  $\beta$ -carbolines norharman and harman in traditional and novel raw materials for chicory coffee. **Food Chemistry**, v. 175, p. 280–283, 2015.

WOLFENDER, J. L. HPLC in natural product analysis: the detection issue. **Planta Medica**, v. 75, n. 7, p. 719–734, 2009.

WOLFENDER, J. L.; MARTI, G.; THOMAS, A.; BERTRAND, S. Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. **Journal of Chromatography A**, v. 1382, p. 136–164, 2015.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 3, p. 459–471, 2010.

ZERAIK, M.; WAUTERS, J.; ANGENOT, L.; YARIWAKE, J. H. Quantification of isoorientin in *Passiflora edulis* rinds by HPTLC-densitometry and HPLC/DAD methods and evaluation of radical scavenging capacity of the extracts. **Planta Medica**, v. 79, n. 13, p. 1223, 2013.

ZHAO, T.; ZHENG, S. S.; ZHANG, B. F.; LI, Y. Y.; BLIGH, S. W. A.; WANG, C. H.; WANG, Z. T. Metabolic pathways of the psychotropic-carboline alkaloids, harmaline and harmine, by liquid chromatography/mass spectrometry and NMR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2, p. 1096–1105, 2012.

ZIBADI, S.; FARID, R.; MORIGUCHI, S.; LU, Y.; FOO, L. Y.; TEHRANI, P. M.; ULREICH, J. B.; WATSON, R. R. Oral administration of purple passion fruit peel extract attenuates blood pressure in female spontaneously hypertensive rats and humans. **Nutrition Research**, v. 27, n. 7, p. 408–416, 2007.