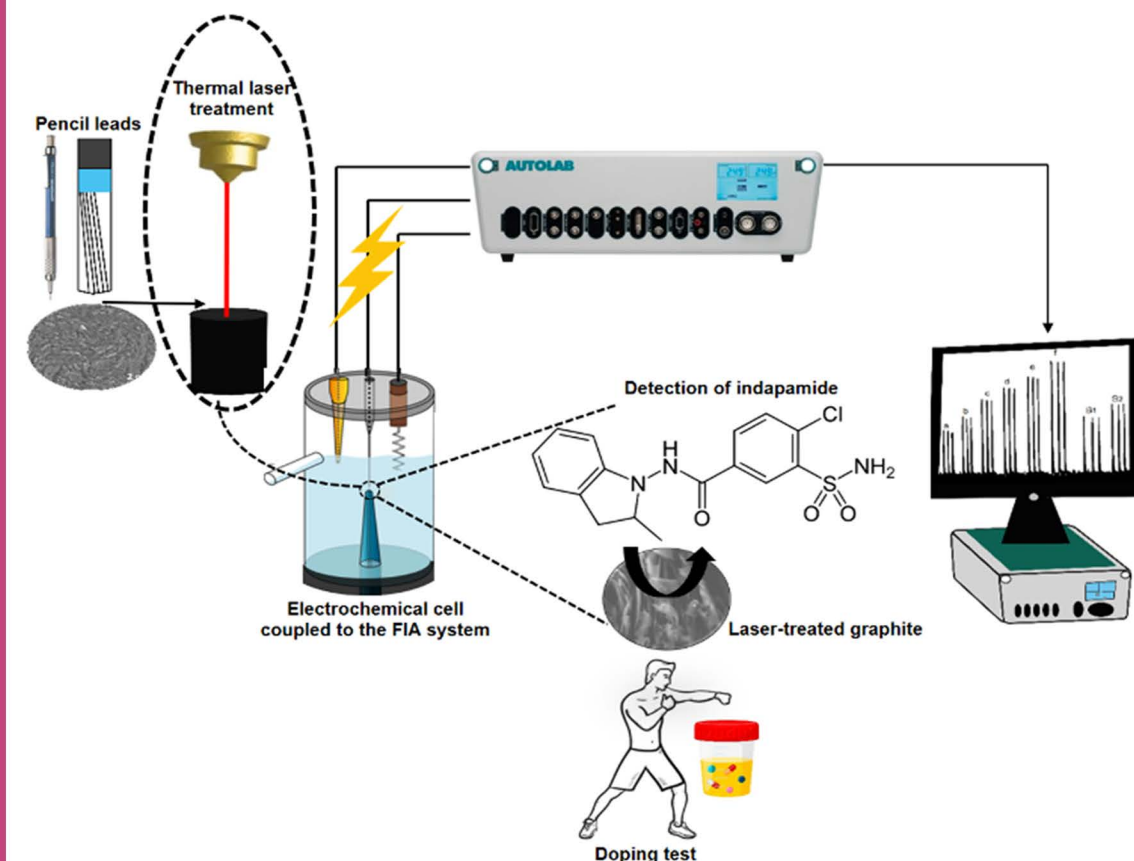


ANAIIS

1 1° Workshop do Mestrado Profissional



Eletrodos de grafite tratado a laser para
quantificação amperométrica de indapamida
Oliveira, T.W. et al.

Organização
e apoio:

**MP IQ
USP**
mestrado profissional do
instituto de química da USP

 Universidade de São Paulo
Instituto de Química

Título: 11º Workshop do Programa de Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica da USP – AMPT
© 2023 Paulo Roberto H. Moreno, Maurício da Silva Baptista, Denise Freitas Siqueira Petri (Organizadores)
Editora Edgard Blücher Ltda.

Blucher

Rua Pedrosa Alvarenga, 1245, 4o andar
04531-934 – São Paulo – SP – Brasil
Tel.: 55 11 3078-5366
contato@blucher.com.br
www.blucher.com.br

Segundo o Novo Acordo Ortográfico, conforme 6. ed.
do *Vocabulário Ortográfico da Língua Portuguesa*,
Academia Brasileira de Letras, julho de 2021.

É proibida a reprodução total ou parcial por quaisquer
meios sem autorização escrita da editora.

Todos os direitos reservados pela Editora Edgard Blücher Ltda.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Angélica Ilacqua CRB-8/7057

Workshop do Programa de Mestrado profissional do Instituto
de Química da USP (11. : 2023 : Brasil)

4º Programa de Mestrado Profissional do Instituto de Química
da USP [livro eletrônico]: Anais/Paulo Roberto H. Moreno,
Maurício da Silva Baptista, Denise Freitas Siqueira Petri

. -- São Paulo: Blucher, 2023.

3 Mb ;

Bibliografia

ISBN 978-65-5550-357-9

1. Química I. Moreno, Paulo R. H. II. Baptista, Maurício da Silva
III. Petri, Denise F. S. Petri

23-6482

CDD 540.63

Índices para catálogo sistemático:

1. Química

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Reitor: Carlos Gilberto Carlotti Junior

Vice-Reitora: Maria Arminda do Nascimento Arruda

Pró-Reitor de Pós-Graduação: Aluisio Augusto Cotrim Segurado

INSTITUTO DE QUÍMICA

Diretor: Pedro Vitoriano de Oliveira

Vice-Diretor: Shaker Chuck Farah

Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Prof. Dr. Frederico José Gueiros Filho

Vice-Presidente da Comissão de Pós-Graduação: Profa. Dra. Liane Marcia Rossi

Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

Vice-Presidente da Comissão Coordenadora do Mestrado Profissional: Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista

COMISSÃO EXECUTIVA

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno (IQ-USP)

Prof. Dr. Maurício da Silva Baptista (IQ-USP)

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP)

Prof. Dr. Alcindo Aparecido dos Santos (IQ-USP)

Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP)

Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP)

EQUIPE DE APOIO

Bruna Larotonda - Assessoria de Comunicação

Leticia Facchini - Estagiária de Comunicação

Aldrey Olegario - Estagiária de Comunicação

CAPA

Bruna Larotonda - Assessoria de Comunicação

Leticia Facchini - Estagiária de Comunicação

REVISÃO CIENTÍFICA

Profa. Dra. Denise Freitas Siqueira Petri (IQ-USP); Prof. Dr. Ivano Gebhardt Rolf Gutz (IQ-USP); Prof. Dr. Koiti Araki (IQ-USP); Prof. Dr. Jorge César Masini (IQ-USP)

PATROCÍNIO

3M do Brasil LTDA
ABL Antibióticos do Brasil
Aché Laboratórios Farmacêuticos
Agilent Technologies Brasil Ltda.
Analytics Soluções Administrativas Ltda.
Archroma
ASTRO34 - Advanced Scientific Technologies
Biolab Sanus Farmaceutica
Brainfarma
Buntech
CH5 Comércio e Serviços Em Análise Instrumental Ltda.
Chromatox Laboratórios
Cia. Nitro Química Brasileira
Clariant S/A
Clínica Médica Spazio S/C Ltda.
Compass Minerals (antiga PRODUQUÍMICA)
Criar Pesquisas e Projetos Laboratoriais Ltda.
Diversey Brasil Indústria Química
Dow Brasil Sudeste Industrial Ltda.
Dynatech
EMS
ETEC Cidade Tiradentes - Centro Paula Souza
Eurofarma Laboratórios S/A
Farma Service Bioextract
ICL América do Sul S.A.
IFF Essências e Fragrâncias LTDA
Instituto Butantan
Intercientífica
Kluber Lubrications
LDR Industria e Comercio de Produtos Cosméticos LTDA.
LIBBS
Lorene
Metrohm Brasil

Nova Analítica Importação e Exportação LTDA.

Oxiteno S/A Indústria E Comércio

Petrobras S.A.

PMESP - Corpo ee Bombeiros

PRODUQUÍMICA Indústria e Comércio

Reichold do Brasil

Rhodia Solvay Group

Servmar Serviços Técnicos Ambientais Ltda.

Siegwerk

SM Consultoria em Poliuretanos LTDA

Sociedade Beneficente Israelita Brasileira Hospital Albert Einstein

United States Farmacopéia Brasil Ltda.

Volkswagen do Brasil

Waterflows

Waters Technologies Do Brasil Ltda.

Prefácio

Este ano o **Programa Mestrado Profissional Tecnologia em Química e Bioquímica** completa 11 anos de existência, sendo aprovado pela CAPES no início de 2012 com a primeira turma de 7 alunos ingressantes já em agosto do mesmo ano. Desde então o programa vem crescendo, tendo titulado 32 mestres até o momento e passando da fase de Programa iniciante para a de Programa consolidado. O reconhecimento da qualidade da formação acadêmica aqui oferecida é traduzida nas avaliações quadrienais da CAPES, onde foi concedida a nota máxima em duas avaliações consecutivas. Essa trajetória de sucesso só foi possível graças à excelência dos alunos, docentes e gestores das empresas parceiras.

A missão principal do Programa é capacitar pessoas para a prática profissional avançada e transformadora de procedimentos aplicados para atuar em atividades técnico-científico e de inovação, visando atender demandas sociais, organizacionais ou profissionais do mercado de trabalho. A associação entre a Academia e o Setor Produtivo oferece um ambiente inovador para o aperfeiçoamento dos profissionais atuantes no mercado de trabalho nas áreas da química, bioquímica, farmacêutica e biológica pelo aprendizado rigoroso de métodos e fundamentos científicos, levando à proposição de inovações e aperfeiçoamentos tecnológicos para a solução de problemas específicos.

O workshop anual do Programa é uma atividade que almeja a integração entre os alunos, professores e os gestores das empresas. O evento se torna um fórum para apresentação e discussão dos projetos desenvolvidos por seus alunos, além de proporcionar o encontro com os colegas e discentes dos outros Programas do Instituto além de criar oportunidades para novas parcerias. Desde 2020, os Anais do Workshop são gentilmente publicados pela editora Blücher, com a função de divulgar e valorizar os resultados dos trabalhos desenvolvidos no IQUSP, uma vez que, devido à aceitação do formato, abrimos esse canal de divulgação técnico-científico para todas as produções do Instituto de Química. Os artigos publicados passaram por um rigoroso processo de avaliação por pares, escolhidos de maneira imparcial, com emissão de pareceres circunstanciados.

Na 4ª edição dos Anais do Workshop contamos com a contribuição de resumos expandidos de alunos dos Programas de Pós-graduação Acadêmicos e Profissional e de alunos de Iniciação Científica dentro de várias temáticas das áreas da química e bioquímica. Desta forma, agradecemos as contribuições que compõem este volume, esperando que estas pesquisas sirvam cada vez mais como uma ponte aproximando ainda mais a investigação acadêmica do setor produtivo.

São Paulo, 11 de dezembro de 2023

Paulo R. H. Moreno

Denise F.S. Petri

ÍNDICE DE RETENÇÃO LINEAR EXPERIMENTAL PARA EXTRAÍVEIS ORGÂNICOS SEMIVOLÁTEIS

Ângela Oliveira Francisco ^{1,2*}, Celso Blatt ³, Lourdes Marcela Yataco ², Paulo R. H. Moreno ^{1*}

1 – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

2 – Ache Laboratórios Farmacêuticos

3 – Agilent Technologies do Brasil

prmoreno@iq.usp.br; angela.francisco@ache.com.br

Resumo: Extraíveis orgânicos são compostos que podem ser extraídos de elastômeros, plásticos e revestimentos do material de embalagem do medicamento, na presença de solvente(s) e/ou condição(ões) apropriado(s). A importância dos extraíveis está relacionada à sua identidade, concentração e toxicidade, pois pertencem a uma categoria de impurezas denominadas lixiviáveis, que podem estar presentes no medicamento, afetando sua segurança, qualidade e eficácia. Este artigo analisou padrões de referência conhecidos como extraíveis de materiais de embalagem por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), e suas identidades foram obtidas comparando-se o tempo de retenção, índice de retenção linear, os espectros de massas obtidos com a biblioteca instalada no equipamento e com a literatura, quando disponível. A partir dos padrões de referência dos extraíveis analisados, foi confirmada a identificação de um total de 17 compostos, os principais compostos presentes foram antioxidantes, plastificantes, monômeros e ácido esteárico. Seguindo a metodologia proposta, é possível utilizar os índices de retenção linear determinados neste artigo como referência em um novo experimento, visto que os índices de retenção linear aqui obtidos também foram comparados com os valores disponíveis na NIST e na literatura. Esta correlação possibilita a classificação da identificação de um extraível de uma categoria provisória, para confiável quando o padrão de referência não estiver disponível.

Palavras-chave: *índice de retenção linear, compostos semivoláteis, extraíveis.*

EXPERIMENTAL LINEAR RETENTION INDEX FOR SEMIVOLATILE ORGANIC EXTRACTABLES

Abstract: Organic extractables are compounds that can be extracted from elastomeric, plastic and coatings of the drug product packaging material, in the presence of an appropriate solvent(s) and/or condition(s). The importance of extractables is related to their identity, concentration, and toxicity, as they belong to a category of impurities called leachables, which may be present in drug product, affecting their safety, quality, and efficacy. This article analyzed reference standards known as extractables from packaging material by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), and their identities were obtained by comparing the retention time, linear retention index, mass spectra obtained with the equipment library and with the literature when available. From extractables standards analyzed, a total of 17 compounds had their identification confirmed, the main compounds present were antioxidants, plasticizers, monomers, and stearic acid. Following this methodology, it is possible to use the linear retention index determined in this article as a reference in a new experiment. This is possible because the indexes obtained in this study were validated by comparison with the NIST and literature values. This correlation makes it possible to classify the identification of an extractable from a tentative category to confident when the reference standard is not available.

Keywords: *linear retention index, semi volatiles, extractables.*

Introdução

Extraíveis orgânicos são compostos que podem ser extraídos de componentes elastoméricos, plásticos ou revestimentos do material de embalagem de um medicamento, quando na presença de solvente(s) apropriado(s)¹.

A importância dos extraíveis, está relacionada a sua identidade, concentração e toxicidade, visto que pertencem a uma categoria de impurezas denominadas lixiviáveis, que podem estar presentes no medicamento, afetando sua segurança, qualidade e eficácia.

O foco da etapa de extração é a correta identificação destes extraíveis, visto que a identificação antecede a etapa de avaliação de toxicidade. Uma avaliação de risco significativa, rigorosa, adequada e precisa de um extraível ou lixiviável só pode ser obtida quando o extraível foi corretamente identificado com alto grau de confiança. Por definição, um composto foi identificado se puder ser atribuído um nome químico adequado, uma identificação apropriada número (por exemplo, um número de registro CAS) e uma estrutura química com um grau de confiança aceitavelmente alto².

O grau de confiança atribuído à identificação é classificado como parcial, provisória, confiável e confirmada². Um composto pode ser considerado como parcialmente identificado, se puder ser atribuído a uma classe de compostos que compartilham uma característica funcional comum³. Identificações baseadas unicamente na correspondência espectral de massa são identificações provisórias, pois esta é uma identificação “unidimensional”, onde a peça única de evidência é o seu espectro de massas³.

Uma identificação de categoria provisória, pode se tornar tridimensional, ou como é chamada categoria confirmada, analisando-se um padrão autêntico (espectro de massas e tempo de retenção). Outra possibilidade é que a categoria provisória obtenha evidências adicionais, tornando-se uma identificação confiável, sendo esta considerada bidimensional, por ser baseada em duas peças independentes de informações. Para se tornar confiável, além da correspondência espectral presente na categoria provisória, é preciso contribuir com evidências adicionais³.

É aceito como evidência adicional, informações presentes na documentação de apoio do fabricante, que possibilite correlacionar o composto obtido experimentalmente com a composição do material de embalagem, a confirmação da identidade do composto por análise em técnica ortogonal considerando que o composto produz resposta tanto na cromatografia líquida quanto na cromatografia à gás acoplada a um espectrômetro de massas, comparação do espectro obtido experimentalmente antes e após uma derivatização, ou correspondência com o índice de retenção^{3,9}.

O índice de retenção de um componente é um número, obtido por interpolação, relacionando-se o tempo de retenção do componente em estudo com o tempo de retenção de dois padrões, geralmente hidrocarbonetos na cromatografia à gás, que são eluídos antes e após o pico do composto de interesse⁴. A correlação do índice de retenção obtido experimentalmente, com o índice de retenção presente em bibliotecas como a NIST, permite a obtenção de um critério adicional para elevar a classificação da identificação dos extraíveis, através da comprovação de evidência adicional do índice de retenção.

O objetivo deste estudo foi a construção de uma base de dados através da injeção de padrões de referência, conhecidamente atribuídos à extraíveis orgânicos de materiais de embalagens, e sua comparação com os índices de retenção presentes na literatura e na NIST, quando disponíveis.

Experimental

As vidrarias empregadas para preparação e análise foram previamente descontaminadas em solução de ácido nítrico 5%.

Os padrões analisados para determinação do índice de retenção foram preparados em diclorometano na concentração de 5µg/mL a partir da solução estoque 200µg/mL em metanol sendo estes: 2-fluorobifenila, bisfenol A, Bis-2-etil-ftalato, Irganox 415, caprolactama, BHT, difenilamina, ácido esteárico e Irgafos 168. Adicionalmente contemplou-se os padrões para teste de Grob diluindo-se 1mL do padrão de referência disponível comercialmente em 20mL de diclorometano.

A mistura de padrões foi analisada por injeção direta em Cromatógrafo a gás Agilent 7890B Series GC (Agilent Santa Clara, CA, USA) acoplado a detector de massas 5977B Quadrupolo (Agilent Santa Clara, CA, USA) e equipado com coluna HP-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm) (Agilent, Santa Clara, CA, USA). As condições cromatográficas seguiram conforme descrito: 40°C por 1 minuto, com aquecimento subsequente de 10°C/minuto até 280°C, manteve-se por 2 minutos, na sequência aqueceu-se 15°C/minuto até 310°C, manteve-se por 10 minutos; gás de arraste Hélio fluxo de 1,2 mL/minuto; temperatura do injetor de 300°C; modo *splitless*, *liner* 900µL, volume de injeção de 1µL, temperatura da linha de transferência 320°C, fonte de ionização por elétrons 70 eV, temperatura da fonte 300°C, temperatura do quadrupolo 150°C, intervalo de detecção do MS 33-650 (*m/z*).

O índice de retenção de linear (IR) foi calculado de acordo com Dool e Kratz⁶, utilizando uma série homóloga de *n*-alcanos (Sigma Aldrich, C8-C40). A identificação dos compostos semivoláteis foi realizada através da injeção dos padrões de referência, comparação dos índices de retenção, espectros de massa obtidos com as bibliotecas instaladas no equipamento (NIST 08/Willey 2014) e literatura^{6,7,8,9}.

Resultados e discussão

A Tabela 1 contém a composição química, o número CAS, o tempo de retenção do composto, o índice de retenção calculado, o índice de retenção da NIST/literatura e o valor do *match factor* atribuído pela NIST.

Tabela 1: Nomenclatura do composto identificado, número CAS, tempo de retenção, índice de retenção linear experimental, índice de retenção da base de dados/literatura, desvio padrão e *match factor* NIST.

Composto	CAS	Tempo de retenção do Composto	IA ^a	NIST (Base de dados)/Literatura ^b	Desvio Padrão	Match Factor NIST ^c
1-Octanol	111-87-5	8,368	1071	1068	1,8	NI
Nonanal	124-19-6	8,918	1106	1102	2,5	798
2,6-dimetil-fenol	576-26-1	8,967	1109	1105	2,7	871
Ácido 2-etil-hexanoico	149-57-5	9,030	1113	1122	6,4	675
2,6-dimetil-anilina	87-62-7	9,915	1172	1167	3,4	NI
Caprolactama	105-60-2	11,078	1252	1244	5,5	880
2-Fluorobifenila	321-60-8	12,770	1375	1346	20,5	944
Metil undecanoato	1731-86-8	13,425	1425	1427	1,3	859
Diciclo-hexilamina	101-83-7	13,565	1436	1431	3,6	771
Di- <i>terc</i> -butil metil fenol (BHT)	128-37-0	14,623	1520	1518	1,5	935
Metil laurato	111-82-0	14,679	1525	1527	1,5	844
Difenilamina	122-39-4	15,933	1631	1637	4,5	921
Ácido esteárico	57-11-4	21,275	2158	2178	14,1	778
Bisfenol A	80-05-7	21,527	2186	2192	4,2	925
Bis-2-etil-ftalato	117-81-7	24,578	2555	2550	3,8	911
Irganox 415	96-69-5	26,465	2784	ND	ND	754
Irgafos 168	31570-04-4	32,310	3439	3396	30,2	797

^aÍndice de Retenção Calculado, ^bÍndice de Retenção da Literatura, ^cValor de *match factor* atribuído pela NIST.

NI: Não identificado, ND: não disponível

A tabela 1 apresenta os resultados experimentais obtidos para o índice de retenção dos padrões de referência de extraíveis orgânicos, e o comparativo destes resultados experimentais com os resultados já disponíveis em base de dados NIST, ou literatura.

Foram analisados 17 compostos, sendo padrões de referência de extraíveis e padrão para teste de Grob, utilizado para avaliação da performance do equipamento. Dos padrões de extraíveis identificados temos representantes de antioxidantes, plastificantes, monômeros, e o ácido esteárico que é o produto da reação do estearato de cálcio, empregado para capturar resíduos de ácidos fortes durante o processo de manufatura do polímero¹⁰.

Para maioria dos compostos o índice de retenção linear experimental está muito próximo ao índice de retenção presente na NIST ou na literatura. O intervalo de desvio padrão encontrado está entre 1,3 e 30,2. O valor mais discrepante de desvio padrão é observado para o Irgafos 168, sendo este um antioxidante adicionado no processo de fabricação de material polimérico para evitar degradação térmica e oxidativa¹⁰. Para o Irganox 415 não foram encontrados valores de índice de retenção na NIST nem na literatura.

Conclusões

Através do estudo realizado foi possível obter o índice de retenção linear experimental para compostos conhecidamente atribuídos à extraíveis orgânicos de materiais de embalagens e comparar com os índices de retenção presentes na literatura e na NIST, quando disponíveis. Seguindo a metodologia proposta, é possível utilizar os índices de retenção linear determinados neste artigo como referência em um novo experimento. Visto que os índices de retenção linear determinados neste estudo também foram comparados com a NIST e com a literatura. Esta correlação possibilita a classificação da identificação de um extraível de uma categoria provisória, para confiável quando o padrão de referência não estiver disponível.

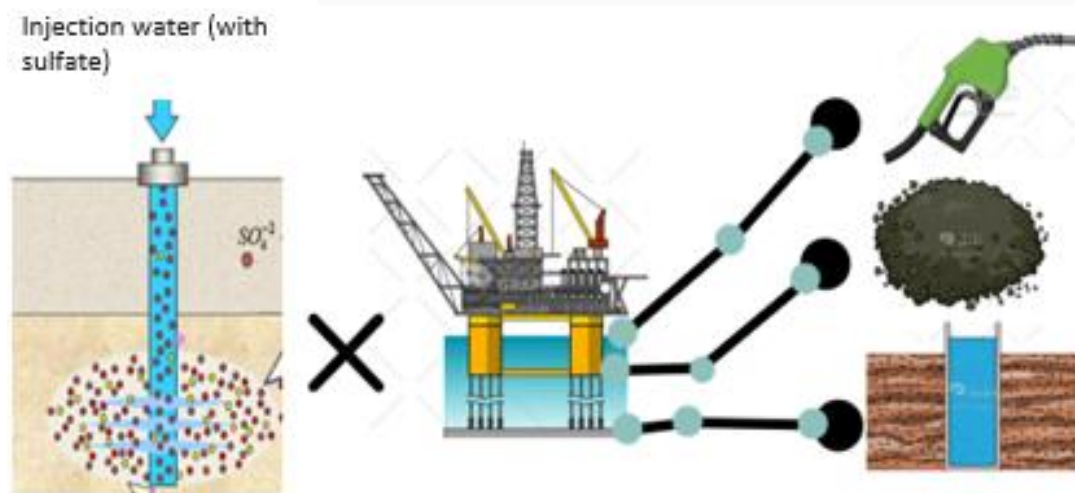
O intuito futuro deste estudo é ampliar a base de dados da metodologia proposta desafiando o índice de retenção linear de outros compostos extraíveis de materiais de embalagem, disponíveis como padrões de referência.

Agradecimentos

Agradecemos ao apoio do Aché Laboratórios Farmacêuticos, Agilent Technologies do Brasil e Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Referências

1. Ball, D. et al.; *Leachables and Extractables Handbook*, 1^ª ed., Wiley: New Jersey: 2012.
2. Jenke, D. *Extractables and Leachables Characterization of Drug Products, Packaging, Manufacturing and Delivery Systems, and Medical Devices*; Hoboken, NJ :Wiley, 2022.
3. https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/09/Good-ID-PracticesE_L_FINAL.pdf, disponível em novembro de 2023.
4. Viegas, M. C., Bassoli, D. G.; *Química Nova*, 2007, 2031-2034.
5. Jenke, D. et al.; *PDA J Pharm Sci.* 2013, 67, 448-511.
6. Dool, V. D. H., Kratz, P. D. *Journal Chromatography A* **1963**, 11, 463-471. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)80947-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)80947-X)
7. NIST. National Institute of Standards and Technology. US. Department of Commerce. <https://webbook.nist.gov>, disponível em outubro de 2023.
8. Kuhn, E. R.; *J. Sep. Sci.* 2001, 24, 473-476.
9. https://www.nelsonlabs.com/wp-content/uploads/2020/12/Good-ID-Practices_Part4-002.pdf, disponível em novembro 2023.
10. Christiaens, Piet.; *Universe of Pre-filled Syringes and Injection Devices*, Gotemburgo, Suécia, 2023.



Challenges for water injection that maintains the quality of offshore oil production.

ALTERNATIVAS PARA OTIMIZAÇÃO DO TRATAMENTO DA ÁGUA DE INJEÇÃO NO PRÉ-SAL

João P. Abreu^{1,*}, Denise F. S. Petri¹

1- Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

*e-mail: jpabreu@usp.br

Resumo: Uma parte da população ainda tem o pré-sal como uma novidade promissora para o futuro, mas o fato é que a produção de petróleo a partir desta camada ultra profunda do território brasileiro, já corresponde a quase 75% de toda a produção nacional, para a surpresa de muitos. Isso quer dizer que grande parte dos combustíveis que movimentam o país, transportam pessoas e mercadorias, assim como também os mais diversos produtos de origem petroquímica do nosso uso diário, são produtos compostos de elementos destas valiosas reservas. Quando se fala em desafios promissores atualmente, estamos falando da margem equatorial, em processo de solução de questões ambientais. Sobre o pré-sal, os desafios do presente estão ligados à manutenção dos níveis de produção e para tal é necessário manter a pressão dos reservatórios, que devem ser recuperados constantemente ao longo da vida produtiva. Nesta resenha, será comentado um processo específico de recuperação que é a

injeção contínua de água nos reservatórios. Em alto mar, esta tecnologia tem desafios muito particulares, principalmente quando se fala da injeção da própria água do mar, o que acontece na maioria dos casos da Bacia de Santos.

Palavras-chave: pré-sal, produção, petróleo

Alternatives for optimizing water injection in the pre-salt layer

Abstract: Some people still perceive the pre-salt as an exciting prospect for the future, but in fact oil production from these ultra-deep layers already accounts for nearly 75% of Brazilian total production. It means that a significant portion of the fuels powering our nation, transporting people and goods, as well as a wide array of petrochemical products used in our daily lives, are derived from these valuable resources. When we discuss current promising challenges, the focus shifts to the equatorial margin, where environmental issues are in the process of being addressed. Regarding the pre-salt, the present challenges revolve around maintaining production levels. To achieve this, it is crucial to sustain the reservoir pressure, a task that demands continuous injection of a fluid throughout their productive life. This mini-review delves into a specific recovery method, namely the continuous injection of water into reservoirs. In offshore locations, this process presents unique challenges, particularly when it involves injection of seawater, a common practice in the Santos Basin.

Keywords: pre-salt, production, oil

INTRODUÇÃO

A história da produção do pré-sal começa em 2008, quando foi produzido o primeiro óleo do campo de Jubarte, na Bacia de Campos. Após 2 anos, já em 2010, foi instalada a primeira plataforma na Bacia de Santos, inteiramente dedicada ao pré-sal e que inaugurou uma nova era de produção de petróleo no país. Hoje são cerca de 30 plataformas produzindo da camada pré-sal, sendo que 23 inteiramente dedicadas, produzindo a maioria de todo o volume de petróleo gerado no país. Em 2023, em média se produz 3,3 milhões de óleo equivalentes por dia (boe/d) do pré-sal, 75% da produção total do Brasil.

No desenvolvimento da produção de petróleo em campos terrestres e marítimos há um desafio comum que é a queda de pressão dos reservatórios ao longo da sua vida produtiva. É compreensível que à medida que a mistura de óleo e gás é produzida, a força para que estes fluidos cheguem de forma natural à superfície seja reduzida ao longo do tempo. Para a manutenção da produtividade dos campos se faz necessária a aplicação de métodos de recuperação¹, como mostra a Figura 1.

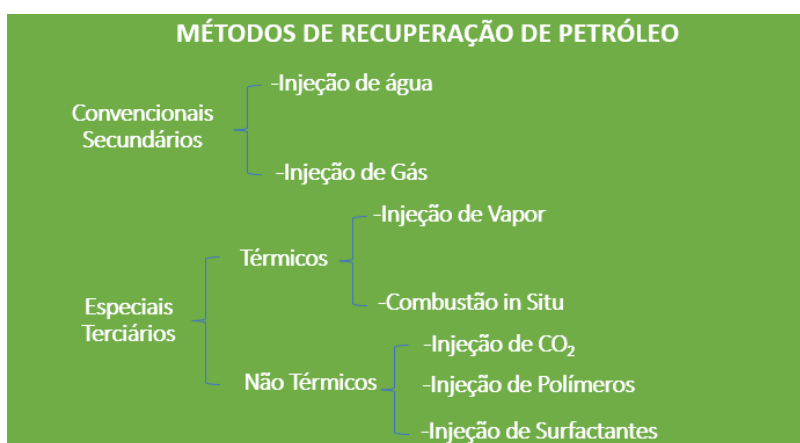


Figura 1. Principais métodos de recuperação de reservatórios de petróleo

O método de injeção de água é um método convencional secundário, que visa manter a pressão (energia) e fazer o varrido do reservatório (deslocamento do óleo para os poços produtores). Na Figura 2, para ilustrar a importância da injeção de água, são mostradas as projeções calculadas no estudo de um reservatório real (Campo de Marlim – Petrobras), para o fator de recuperação (FR) do campo com e sem injeção de água.

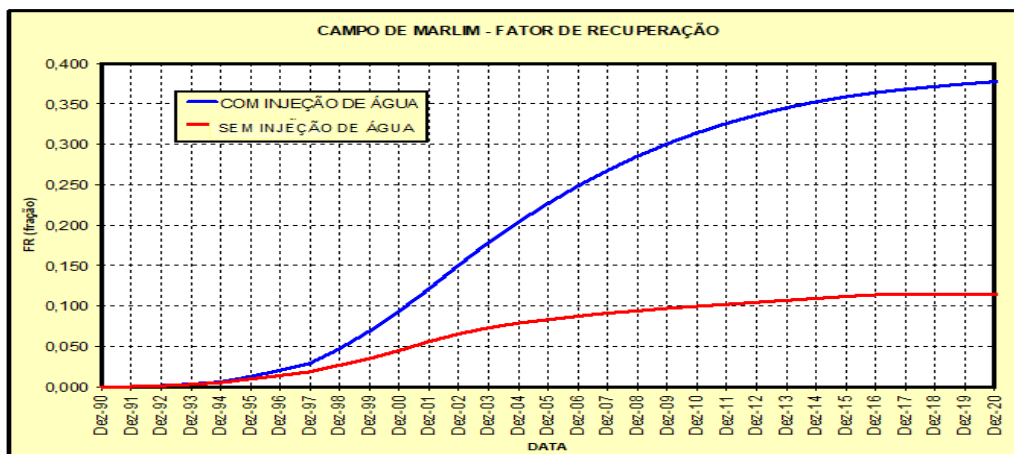


Figura 2. Fator de recuperação (FR) calculado para o campo de Marlim sem injeção de água (linha vermelha) e com injeção de água (linha azul).

Na produção de petróleo dos campos do pré-sal, mais especificamente na Bacia de Santos, a importância da injeção de água com qualidade é notável e essa qualidade é garantida nas instalações de superfície, mais especificamente nas unidades de remoção de sulfato, que se encontram instaladas nas plataformas de produção. Em grande parte das plataformas de produção, existem sistemas dedicados à injeção de água. A maioria das plataformas se localizam entre 100 e 450 km da costa do Sudeste. As plataformas que são vistas próximas à costa no Sudeste são de águas rasas (pós-sal) ou unidades de manutenção. Na Figura 3, a foto representa em destaque à direita uma plataforma na costa litorânea. Se trata de uma das principais produtoras da Bacia de Santos, ficando a 400 km aproximadamente da cidade de Santos e a 250 km da cidade do Rio de Janeiro².

Abaixo desta plataforma, que é um grande navio (casco) adaptado com instalações de produção, há uma lâmina d'água e toda uma extensão de solo que foi perfurado anteriormente por uma outra unidade específica até o alcance das rochas que contêm óleo e gás no pré-sal. A soma de lâmina d'água e solo perfurado pode atingir até 7 mil metros no pré-sal. Daí saem diversos dutos ligados às perfurações que formam os poços produtores. O Brasil, através da Petrobras, está na vanguarda deste tipo de produção em águas ultra-profundas. É interessante também observar, que distintamente do senso comum, os reservatórios não são formados de bolsões de óleo e gás e são na verdade constituídos das rochas, com os seus poros impregnados por óleo e gás em alta pressão².



Figura 3. Exemplo de plataforma de produção real, a 400 km aproximadamente da cidade de Santos

Conforme dito anteriormente, há uma queda natural desta pressão com a evolução da produção e este é o motivo pelo qual há necessidade de injeção de água pressurizada nos reservatórios. São diversos os problemas relacionados à especificação da água para injeção, sendo os principais a possibilidade de danos à integridade do reservatório, perda de injetividade, corrosão, incrustação e acidulação biogênica ou “souring”³. A unidade de remoção de sulfato em superfície adequa a concentração de sulfato na água a ser injetada, principalmente porque a água de injeção utilizada no caso de estudo é a água do mar. Existem outras fontes de água para injeção, como água de aquífero, água produzida e separada do petróleo, além de outras fontes menos disponíveis e não aplicáveis ao cenário, como água de rios e lagos¹.

A água do mar carrega grandes concentrações do íon sulfato, que é o elemento causador da acidulação biogênica, mecanismo em que bactérias ao consumirem o sulfato acabam gerando como produto o sulfeto de hidrogênio (H₂S), extremamente prejudicial aos processos de produção de petróleo, pela sua toxicidade e corrosividade³. A Figura 4 ilustra o mecanismo proposto para a produção de H₂S.

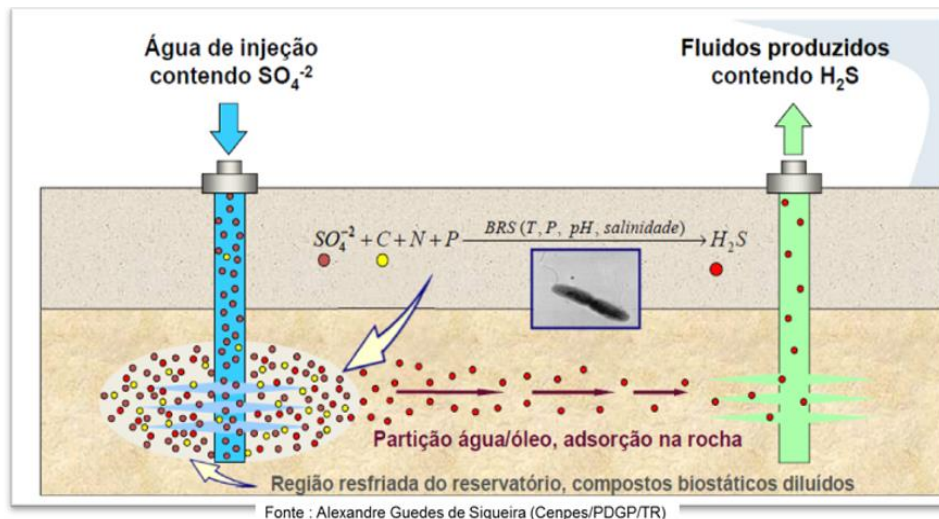


Figura 4. Ilustração do processo de “souring” biogênico (por Alexandre Guedes Siqueira – Cenpes)

Para evitar a concretização do processo de acidulação, a água é tratada nas unidades de remoção de sulfato sendo submetida à nanofiltração através de membranas com graduação específica para retenção e rejeito dos íons sulfato. O problema é a contaminação dessas membranas pela formação de incrustações inorgânicas e orgânicas, tendo como consequência direta a perda de eficiência de separação e o aumento de diferencial de pressão no fluxo através dessas membranas. Isto encurta os tempos de operação das membranas, até serem paradas para um processo de limpeza, que pode causar prejuízos diretos com impactos em custos de operação, investimento e perdas de cota de injeção de água e conseqüentemente de produção de óleo e gás. Se os ciclos de contaminação e limpeza das membranas não ocorrer de forma otimizada, as perdas são ainda maiores com a necessidade de troca das membranas antes do tempo de vida útil esperado em condições normais e as perdas decorrentes destas trocas são ainda maiores.

O problema de incrustação e depósitos nas membranas já é amplamente conhecido e tratado com tecnologias consolidadas de dosagens de inibidores de incrustação de depósitos inorgânicos e cloração da água para evitar a proliferação de matéria orgânica (biofilme). Todavia, no ambiente de estudo (pré-sal da Bacia de Santos), na maior parte dos casos, as alternativas convencionais não têm apresentado a eficiência esperada ou ao menos deixam margem para melhorias e ganhos com evoluções nos métodos de pré-tratamento da água que irá passar pelas membranas⁴. É nessa margem para avanços tecnológicos que surgem as alternativas de utilização de campo magnético para

influenciar nos mecanismos de formação de sais e até mesmo de colônias de bactérias. Embora se trate de uma tecnologia consolidada em tratamento de água, com inúmeras aplicações, registros de produtos e patentes, no tratamento de água do mar para injeção são requeridos estudos e propostas para otimizar e maximizar os ganhos com aumento dos tempos de operação (chamados de tempos de campanha) dos trens de membranas utilizados nas unidades de remoção de sulfato.

Aplicação de campo magnético na água de injeção como alternativa de tratamento complementar

Esta alternativa, ou seja, a utilização de campos magnéticos para interferência nos processos de formação de cristais pelos sais presentes na água já foi implementada em escala de produção. Este mecanismo encontra fundamentação teórica nas forças de Lorentz exercidas sobre os íons pelo magnetismo⁵, que muda a forma com que principalmente as moléculas de água envolve os íons, dificultando a expansão dos cristais, retardando o seu crescimento e deposição nos sistemas^{6,7}.

Consideremos uma situação em que uma carga elétrica está sujeita à força magnética e a força eletrostática, ou seja, na presença de um campo elétrico e de um campo magnético. Neste caso, temos então a atuação da assim denominada **Força de Lorentz (F)**, que é a resultante das forças de interação da carga (q) com o campo elétrico (E) e com o campo magnético (B). O fluxo da solução eletrolítica é representado por v ⁵:

$$F = q \cdot E + q \cdot (v \cdot B) \quad (1)$$

Considerando o meio eletrolítico, ou seja, tendo íons dissolvidos em sua composição, os efeitos gerador e motor, explicados anteriormente, ocorrerão sobre as moléculas deste meio líquido de forma similar ao ocorrido com o condutor sólido (4). Na prática, quando uma carga é submetida a um campo magnético, seu momento magnético μ tende a se alinhar com o campo e este núcleo sofre um movimento de precessão, que é um movimento rotacional com determinada frequência radial⁵. Esta teoria se aplica a este caso, onde as nuvens eletrônicas dos íons presentes sofrem com esta desorientação rotacional provocada pelo campo magnético, o que interfere no modo como os íons interagem para a formação dos cristais^{6,7}.

A teoria que se sustenta em experimentos mostra que as soluções eletrolíticas fluindo perpendicularmente e sendo submetidas às linhas de força do campo magnético acabam tendo alterada a forma com que as moléculas de água promovem a solvatação dos íons presentes. Isso acaba interferindo na formação dos cristais e a tendência de deposição dos mesmos^{6,7}.

Um ensaio teste em escala laboratorial foi realizado para investigar o efeito de campo magnético aplicado em soluções de carbonato de cálcio e as interferências nas incrustações formadas por depósitos de sais da solução⁷. As soluções de carbonato de cálcio foram submetidas a campos magnéticos de até 7.000 Gauss. A incrustação ocorreu em superfície metálica com temperatura entre 40 °C e 60 °C. Alterações na química da solução, potencial zeta e tamanho de partícula também foram investigados. Os depósitos de incrustações foram analisados por microscopia eletrônica de varredura⁷. Os resultados mostraram que o tratamento magnético teve um efeito significativo na precipitação/deposição de carbonato de cálcio da solução sob condições físico-químicas controladas. A escala foi afetada pela temperatura do sistema, pH e grau de supersaturação. O campo magnético mostrou influenciar significativamente o potencial zeta e a distribuição granulométrica das partículas formadas em solução, bem como a morfologia cristalina dos depósitos de carbonato de cálcio⁷.

É necessário pontuar o efeito memória, em que a mudança no modo de interação entre as moléculas e os íons permanece mesmo após horas. Isso é o que viabiliza a utilização nos processos, já que seria oneroso e de difícil aplicação ao longo de todos os pontos da unidade de processo em que se deseja obter o efeito anti-incrustação. Este efeito é reduzido ou totalmente eliminado pelo aumento de temperatura e/ou alteração de pH do meio⁶.

A exposição a campo magnético criado por ímãs permanentes aparenta ser a forma mais viável de tratamento de água em escala de produção pois já é aplicado amplamente em processos de produção de água potável⁸, por exemplo. Os ímãs permanentes trazem a vantagem de não necessitarem de consumo de energia elétrica para a geração de campo magnético, o que poderia ser muito oneroso e inviável economicamente para uma unidade de produção em ampla escala. Adicionalmente, a instalação desses ímãs é um processo relativamente simples por não ser invasivo e não requererem contato direto com fluidos de processo já que podem ser instalados na parte externa das tubulações⁸. A Figura 6 mostra fotografia de uma tubulação de água a montante dos trens de membranas em unidade de remoção de sulfato, com ímãs permanentes instalados ao seu redor.



Figura 5. Fotografias de imãs instalados ao redor de tubulação de água a montante dos trens de membranas em unidade de remoção de sulfato

CONCLUSÃO

O pré-sal não só é uma realidade, como atualmente trata-se de um dos grandes motores de desenvolvimento do país, seja através das receitas geradas por exportação de óleo, seja pelo abastecimento de toda a cadeia de refino e indústria. Na busca por fontes de menor impacto ambiental ou “mais limpas” há uma tendência mundial de mudança na matriz energética nos próximos anos, mas a importância do petróleo permanecerá relevante nas próximas décadas. Neste contexto e com o desenvolvimento contínuo das tecnologias de exploração e produção, o petróleo do pré-sal é um recurso economicamente muito atrativo a ser aproveitado intensamente pelo país nos próximos anos. Para manter a produtividade dos campos é fundamental o sistema de recuperação de pressão dos reservatórios através da injeção de água, um recurso que exige uma engenharia focada para que se tenha um processo contínuo e eficiente. A utilização do magnetismo para mitigar o problema de incrustações em membranas e tubulações é uma estratégia barata, segura e não-invasiva que tem trazido bons resultados não só no tratamento de água para injeção, mas também na produção de água potável e água de utilidades (resfriamento e aquecimento).

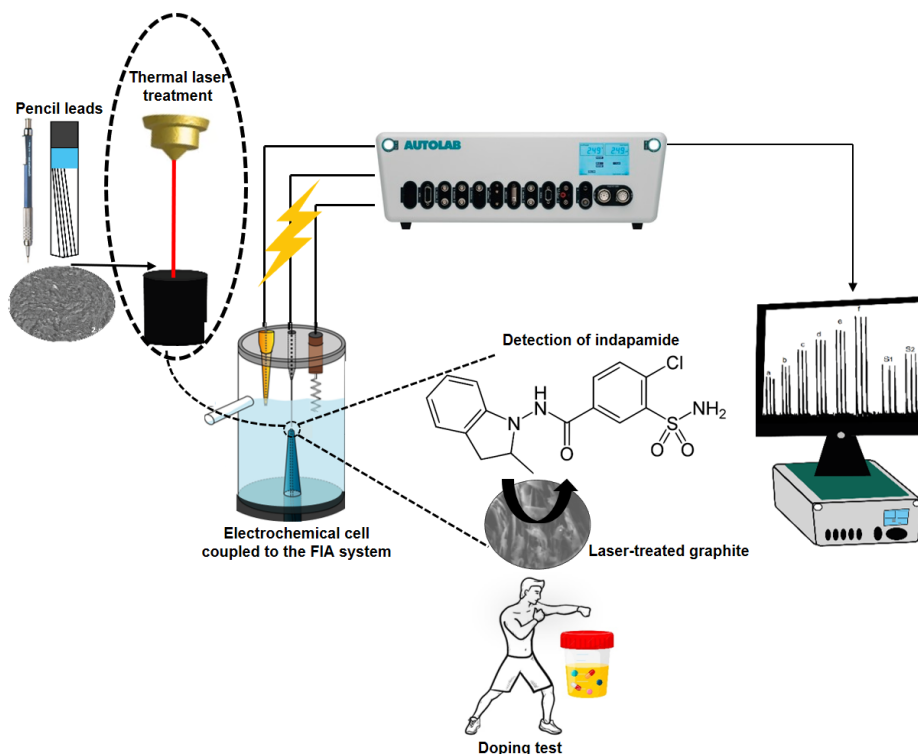
AGRADECIMENTOS

Petrobras, USP, H. E. P. Schlüter.

REFERÊNCIAS

1. Thomas, J. E.; *Fundamentos de Engenharia de Petróleo*, Editora Interciência, 2001.
2. https://www.gov.br/anp/pt-br/canais_atendimento/imprensa
3. Ollivier, B.; Magot, M.; *Petroleum Microbiology*. ASM Press, Washington, Estados Unidos, p.25-215, ISBN: 1-55581-327-5, 2005.
4. Queiroz, J.C.; Controle da incrustação através do uso de campo magnético. RT TEP 024/2009.
5. Resnick, R.; Halliday, D.; Krane, K. S.; Stanley, P. E. Física 3, LTC, 2004.
6. Silva, I. B.; Queiroz Neto, J. C.; Petri, D. F. S.; *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* **2015**, 465, 175.
7. Parsons, S.; Judd, S. J.; Stephenson, T.; Udol, S.; Wang, B. L.; *Trans. Inst. Chem. Eng.* **1997** 75(B), 98–104.
8. Schlüter, H. E. P.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ/COPPE, 2014.
9. Schlüter, H. E. P.; Martins, A. L.; Santos, H. F. L.; *Resumos da Rio Oil & Gas Expo and Conference*, 2016.

Graphical Abstract



ELETRODOS DE GRAFITE TRATADO A LASER PARA QUANTIFICAÇÃO AMPEROMÉTRICA DE INDAPAMIDA

Thawan G. Oliveira¹, Irlan S. Lima¹, Wilson A. Ameku¹, Josué M. Gonçalves¹, Henrique E. Toma¹ and Lúcio Angnes^{1,*}.

¹ – Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP
Thawan.oliveira@usp.br

Resumo: A gravação a laser é uma técnica conveniente, rápida, de uma etapa e ecologicamente correta, usada para produzir superfícies mais condutoras por pirólise local. O tratamento térmico do laser também pode remover materiais não condutores das superfícies dos eletrodos e melhorar o desempenho eletroquímico. A melhoria foi avaliada por ferramentas eletroquímicas como voltamogramas cíclicos e espectroscopia de impedância eletroquímica usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e dopamina como sondas redox. Os resultados eletroquímicos observados mostraram que uma superfície tratada apresentou melhora na transferência de elétrons e menor resistência à transferência de carga. Otimizamos os parâmetros da máquina a laser para alcançar o desempenho eletroquímico aprimorado da mina de grafite, como tipo de grafite e potência do laser, taxa de varredura e distância de saída. O material resultante foi adequadamente caracterizado por espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV), onde foi observada uma superfície irregular composta por partículas cristalinas de grafite. Além disso, como prova de conceito, foi aplicado para detectar indapamida (IND) em urina sintética por análise de injeção em fluxo (FIA), uma droga diurética frequentemente usada por atletas para alterar a composição da urina e ocultar o consumo proibido de substâncias. em testes de doping.

Palavras-chave: laser; sensor eletroquímico; diurético; análise por injeção em fluxo (FIA).

Laser-scribed pencil lead electrodes for amperometric quantification of indapamide

Abstract: Laser engraving is a convenient, fast, one-step, and environmentally-friendly technique used to produce more conductive surfaces by local pyrolysis. The laser's thermal treatment can also remove non-conductive materials from the electrode surfaces and improve electrochemical performance. The improvement was assessed by electrochemical tools such as cyclic voltammograms and electrochemical impedance spectroscopy using $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ and dopamine as redox probes. The electrochemical results observed showed that a treated surface showed an improvement in electron transfer and less resistance to charge transfer. We optimized laser machine parameters to reach the enhanced electrochemical performance of the graphite mine, such as graphite grade and laser power, scan rate, and output distance. The resultant material was adequately characterized by Raman spectroscopy and scanning electron microscopy (SEM), where an irregular surface composed of crystalline graphite particles was noticed. Furthermore, as a proof-of-concept, it was applied to detect indapamide (IND) in synthetic urine by flow injection analysis (FIA), a diuretic drug often used by athletes to alter urine composition to hide forbidden substance consumption in doping tests.

Keywords: *pencil lead; laser; electrochemical sensor; diuretic; flow injection analysis (FIA).*

Introdução

A técnica de gravação a laser é uma maneira rápida, prática e ecológica de padronizar trilhas condutoras de grafeno tridimensionais em materiais com teor de carbono por pirólise local direta [1]. Permite a produção em massa e a miniaturização de dispositivos eletroquímicos sem a necessidade de reagentes ou de um ambiente controlado. Além do tratamento superficial de materiais carbonáceos, a gravação a laser também tem sido utilizada para produzir superfícies de carbono em substratos poliméricos como poliimida [2], polieterimida [3] e papelão [4], gerando sensores eletroquímicos para as mais diversas aplicações [1].

O processo de gravação a laser melhora o desempenho eletroquímico dos eletrodos. Entre os fatores que contribuem para essa melhoria podem ser listados o aumento da cristalinidade e da área superficial do material, a remoção de materiais não condutores e até mesmo a geração de grafeno [5]. No caso de eletrodos construídos com grafite, a remoção de detritos torna-se um dos fatores mais importantes [6]. Além disso, foi demonstrado que a associação de gravação a laser e tratamento eletroquímico foi eficaz na otimização da estrutura de grafite do eletrodo serigrafado comercial, resultando em melhor desempenho [7].

Na literatura, existem muitos estudos utilizando lápis de grafite para aplicações de eletroanálise. No entanto, até onde sabemos, as minas de grafite usadas para carregar lapiseiras ainda não foram submetidas a tratamento a laser para melhorar o desempenho eletroquímico. As minas de grafite são materiais acessíveis e econômicos encontrados em vários graus (de 10B a 10H) [8]. As minas de grafite são constituídas por uma mistura de ligantes de argila/cera e pó de grafite. Quanto mais argila e cera tiverem, mais duros (H) e mais claros serão os traços deixados no papel; por outro lado, quanto mais grafite em sua composição, mais macias ou mais pretas (B) serão as minas de grafite [8]. Sua estrutura é composta por ligações de carbono pendentes e átomos de carbono hibridizados com sp^2 no plano basal e nas bordas, e a presença de grupos de oxigênio, como carboxila e carbonila, proporciona desempenho eletroquímico diferenciado [9]. Devido às suas propriedades, é amplamente aplicado em diversas áreas, como a biomedicina, para medir a concentração de anticorpos anti-toxina diftérica em amostras de soro para avaliar o grau de imunização [9].

Neste estudo, os cabos de grafite foram tratados com laser para melhorar suas características eletroquímicas. Após estabelecidas as melhores condições, as grafites tratadas foram aplicadas à quantificação de indapamida em baixas concentrações. Esse diurético de intensa ação anti-hipertensiva [10] está proibido no esporte desde 1988, pois é utilizado para reduzir o peso corporal para qualificar o competidor em uma categoria de menor peso, bem como para manipular a urina a fim de mascarar resultados positivos nos testes antidoping [11]. Portanto, sete graus diferentes de eletrodos de grafite foram testados usando diferentes parâmetros da laser de CO₂, como taxa de varredura, potência do laser e distância focal da fonte do laser, para encontrar o melhor eletrodo de grafite e condições ideais de tratamento. Experimentos eletroquímicos foram explorados para selecionar o melhor eletrodo. Caracterizações adicionais das superfícies dos eletrodos gravados a laser foram feitas por espectroscopia Raman e microscopia eletrônica de varredura (MEV). O eletrodo de grafite otimizado foi aplicado para a análise de indapamida em amostras de urina sintética utilizando amperometria e análise de injeção em fluxo (FIA).

Experimental

Tratamento a laser dos eletrodos de grafite

Após a série de experimentos, as minas de grafite H apresentaram o melhor desempenho, e cerca de 70% da extensão de cada mina era envernizada. A extremidade revestida foi lixada para retirada do revestimento e em seguida polida em papel de escritório até obter uma superfície lisa e brilhante. Na sequência, as minas de lápis foram fixadas (individualmente ou em grupos) na massa de modelar em uma posição que formasse um ângulo de 90° com a base da máquina a laser. Posteriormente, a saída do laser foi posicionada a 10 mm da superfície polida do grafite do lápis. O laser escaneou uma área de 3 × 3 mm usando uma potência e taxa de varredura de 50% e 1 mms⁻¹. O tratamento durou aproximadamente 10 s quando unidades individuais foram tratadas. Em experimentos envolvendo grupos de minas, a área foi aumentada para 5 x 5 mm. Durante o uso como eletrodo o contato elétrico foi estabelecido no lado oposto, na região não revestida.

Caracterização eletroquímica

Voltamogramas cíclicos (CVs) e espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foram registrados usando o potenciostato PGSTAT 128N com o módulo FRA2. Para avaliar o desempenho dos eletrodos gravados a laser, foram realizados experimentos utilizando um eletrodo de carbono vítreo (GCE), um grafite não tratado (NTGr) e o grafite tratado a laser (LTGr) como eletrodo de trabalho. Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e Pt como eletrodo de referência e auxiliar, respectivamente, completaram o arranjo. Os (três) diferentes eletrodos de trabalho foram avaliados por experimentos de voltametria cíclica utilizando solução de 1 mmol L⁻¹ de [Fe(CN)₆]^{3-/4-} preparada em 0,10 mol L⁻¹ de KCl e também utilizando 1,0 mmol L⁻¹ de dopamina em tampão acetato 0,10 mol L⁻¹, utilizando uma taxa de varredura de 50 mV s⁻¹. A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) também foi explorada para comparar os eletrodos de grafite não tratados e tratados. Os experimentos foram realizados no potencial de circuito aberto (usando o mesmo Ag/AgCl (3,0 mol L⁻¹ KCl) e eletrodo de Pt empregado em CVs) em uma solução contendo 4,0 mmol L⁻¹ [Fe(CN)₆]^{3-/4-} preparado em solução de KCl 0,10 mol L⁻¹ aplicando potencial alternado com amplitude de 10 mV operando na faixa de frequência de 0,10 Hz a 100 kHz.

Resultados e Discussão

Comportamento eletroquímico

O tratamento a laser melhorou o desempenho eletroquímico do grafite. Para demonstrar esse aspecto, duas espécies bem conhecidas, $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ e dopamina foram selecionadas para testes comparativos. A separação pico a pico (ΔE_p) da sonda redox da esfera interna $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ diminuiu de 467 mV para 112 mV (Figura 1A). No caso da dopamina, o ΔE_p diminuiu de 249 mV para 138 mV (Figura 1B), indicando que a transferência de elétrons entre o eletrodo e a molécula orgânica tornou-se rápida [12].

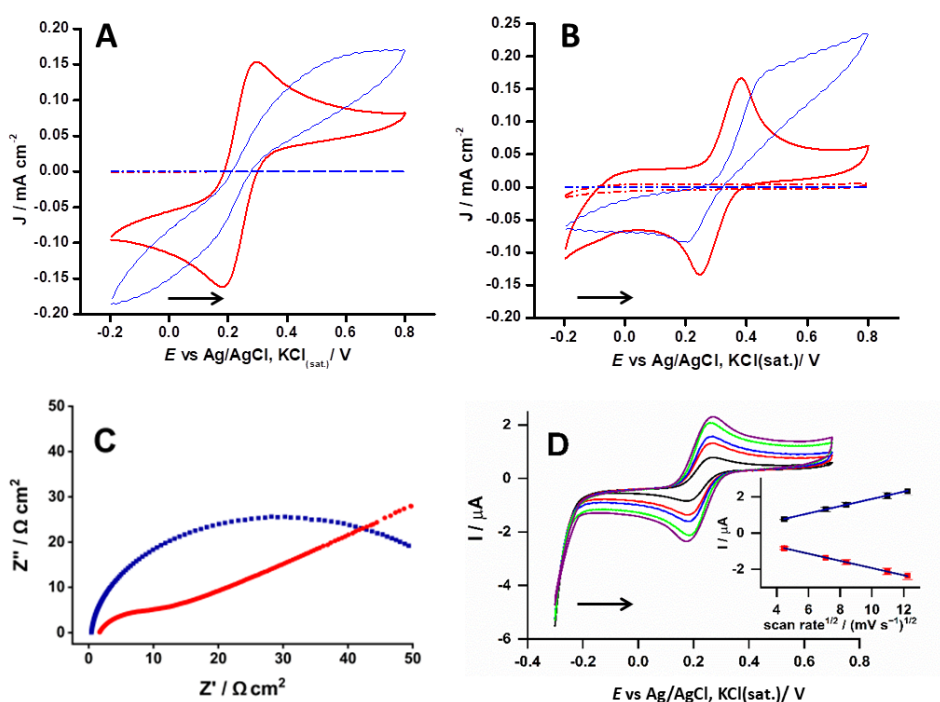


Figura 1– Voltamogramas cíclicos (CVs) registrados com uma taxa de varredura de 50 mV s^{-1} usando grafite tipo H não tratado - NTGr (azul) e tratado - LTGr (vermelho). (A) Solução aquosa de KCl $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ contendo $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; (B) Solução tampão acetato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ com dopamina $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$. (C) A espectroscopia de impedância eletroquímica (EIS) foi realizada no potencial de circuito aberto usando um eletrodo de referência Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl) em solução de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ KCl contendo $4,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$; (D) Estudo em diferentes taxas de varredura em $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$.

Caracterização Morfológica

O efeito do tratamento a laser na estrutura morfológica do eletrodo LTGr tipo H foi analisado usando FE-SEM [13]. A superfície do NTGr polida em papel sulfite apresenta uma superfície relativamente áspera e escamosa (Coluna 2A). Após o tratamento com laser (coluna 2B), a superfície do eletrodo apresenta uma morfologia mais complexa (como solos erodidos) com um aumento visível na área de superfície com plaquetas expostas à grafite mais visíveis (tactóides)[14]. Na verdade, o tratamento a

laser introduziu intensas alterações morfológicas que suportam uma resposta eletroquímica melhorada [15].

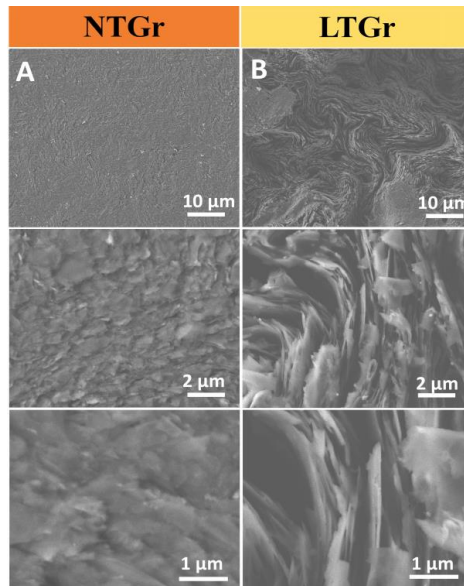


Figura 2– Imagens FE-SEM de grafite (Coluna A) não tratada e (Coluna B) tratada com laser de duas regiões diferentes e em ampliação crescente (as ampliações das imagens aumentam de cima para baixo: $\times 1000$, $\times 10\ 000$ e $\times 25\ 000$).

Detecção amperométrica de indapamida por FIA

O sistema FIA é composto por uma válvula de injeção em acrílico, com alça de amostragem que delimita o volume injetado. A parte de propulsão do fluido é governada pela gravidade, que possui um reservatório a uma determinada altura. A célula de fluxo eletroquímica foi fabricada em nosso próprio laboratório. Tubo de polietileno com diâmetro interno de 1,5 mm foi utilizado para o sistema de fluxo de linha única. A célula de fluxo eletroquímica foi construída com ponta de micropipeta de polipropileno (com volume de $\sim 1000\ \mu\text{L}$) e apresenta configuração de jato de parede, conforme mostrado na **Figura 3**.

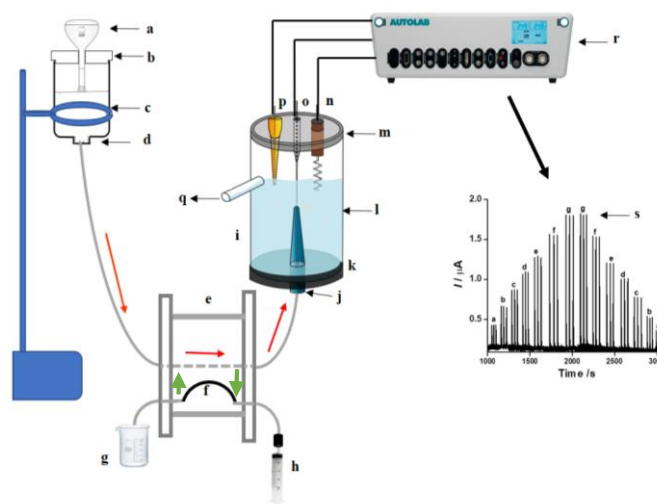


Figura 3 – Diagrama esquemático mostrando a configuração experimental para estudos baseados em FIA: A, balão volumétrico de 500 mL; B, suporte PLA (ácido polilático) impresso em impressora 3D; C, frasco de polietileno (1 L); D, tubo de polietileno adaptado à tampa do frasco para condução do eletrólito; E, injetor de comutação; F, circuito amostral; G, amostra; H, siringe; I, célula eletroquímica; J, pipeta (volume interno 1 mL) – entrada de fluxo; k, suporte para fixação da pipeta; L, tubo cônico de acrílico; M, tampa da célula com três furos centrais; N, contraeletrodo; O, eletrodo de trabalho (LTGr); P, eletrodo de referência; R, potenciostato; S, amperograma.

Para aplicação na quantificação de indapamida (IND) foram avaliados o comportamento eletroquímico do fármaco por voltametria cíclica (CV), sendo testada a repetibilidade do sinal (corrente de pico) realizando ciclagens na mesma faixa de potencial (**Figura 4B**). No segundo ciclo, observou-se um intenso bloqueio da superfície do eletrodo, possivelmente produto da adsorção do analito/produzidos da reação na superfície do eletrodo. No terceiro ciclo o efeito de "envenenamento" da sua superfície se intensificou.

Com estes experimentos ficou evidente que o bloqueio ocorre devido à adsorção dos produtos gerados na oxidação. Passou-se então a buscar uma condição favorável de trabalho. Após diversas tentativas, descobriu-se que restringindo a janela de potencial entre $E_i = -0,20$ V a $E_f = 0,23$ V, (onde apenas o primeiro processo ocorre), o envenenamento da superfície do eletrodo não ocorre (**Figura 4C**). Então adota-se 0,2 V para quantificação de IND por FIA.

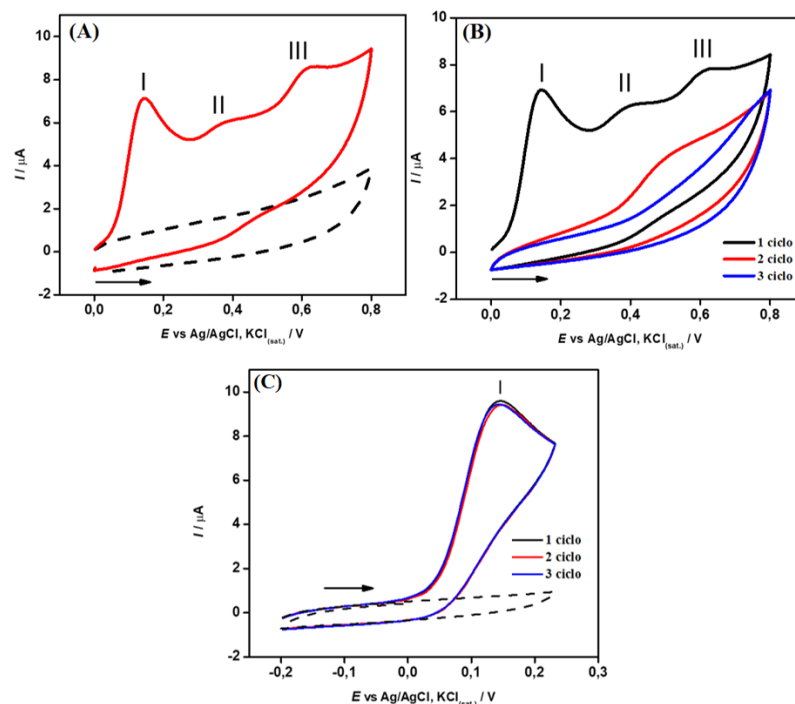


Figura 4 - Voltamogramas cíclicos de: tampão fosfato, (pH = 12), 0,10 mol L⁻¹ (**tracejado**); solução de IND 1,0 mmol L⁻¹ em tampão fosfato, (pH 12), 0,10 mol L⁻¹ (**vermelho**). **(B)** Três ciclos em sequência na mesma solução contendo 1,0 mmol L⁻¹ de IND em tampão fosfato, pH = 12, 0,10 mol L⁻¹. **(C)** Restrito na região do

processo I, três ciclos repetidos na presença de $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$ de IND. Condições experimentais: ET = GCE, EA = platina, ER = Ag/AgCl/KCl_(sat.).

A **Figura 5** avalia se houve efeito memória durante as medições amperométricas, sendo realizada uma curva com concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de 10 a $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (**Figura 5A**). Uma boa linearidade das respostas nesta faixa de concentração fica clara na **Figura 5B**. A regressão linear da série crescente resultou em ($I_p = 0,023 [\text{IND}] + 0,182$, $R^2 = 0,998$) e a série decrescente foi calculada como ($I_p = 0,025 [\text{IND}] + 0,037$, $R^2 = 0,991$). Para avaliar a repetibilidade na análise, foi realizada uma série de 10 injeções de indapamida $1,0 \text{ mmol L}^{-1}$, fixando o potencial em $0,2 \text{ V}$ (**Figura 5C**). O desvio padrão relativo foi calculado em $0,70\%$, atestando a boa precisão do método FIA-amperométrico. Para demonstrar a viabilidade da análise em amostras reais, duas amostras enriquecidas de urina sintética foram preparadas e testadas (**Figura 5D**).

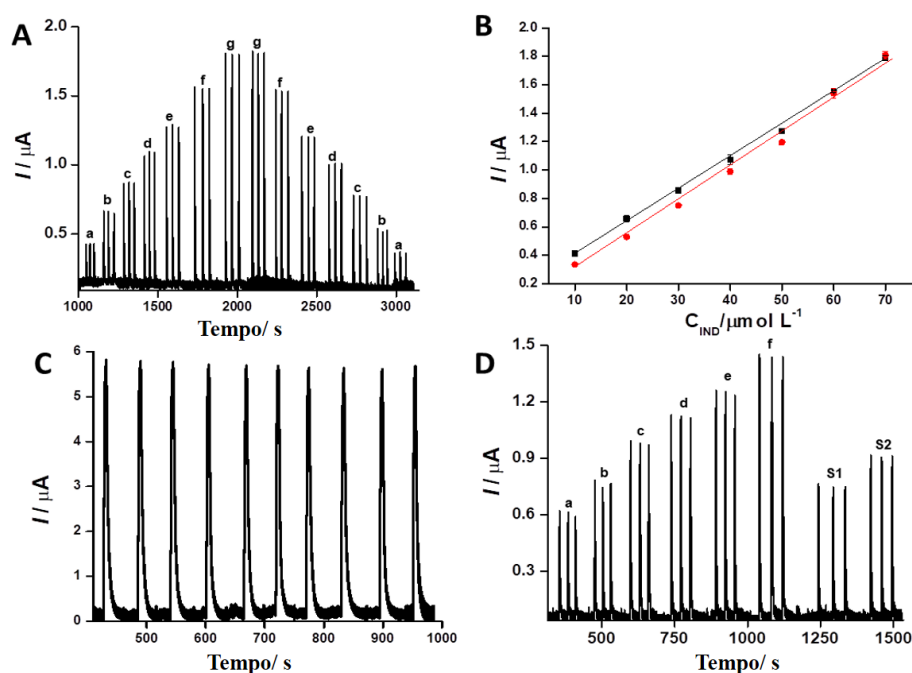


Figura 4– (A) Curvas analíticas com concentrações crescentes e decrescentes de IND variando de (a) 10, (b) 20, (c) 30, (d) 40, (e) 50, (f) 60, (g) $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$. (B) Ajustes lineares nas curvas de calibração com aumento e diminuição da concentração de IND. (C) Estudos de repetibilidade ($n=10$) de 1 mmol L^{-1} IND. (D) Amperograma para determinação de IND pelo sistema FIA em urina sintética enriquecida. Curva analítica (a) 20, (b) 30, (c) 40, (d) 50, (e) 60, (f) $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$, (S1) amostra 1 e (S2) amostra 2. Condições experimentais : tampão fosfato $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ ($\text{pH}=12$), loop de amostragem de $150 \text{ } \mu\text{L}$, vazão $1,6 \text{ mL/min}$ e potencial $+0,20 \text{ V}$ vs Ag/AgCl ($3,0 \text{ mol L}^{-1}$ KCl).

O procedimento para quantificação de indapamida foi realizado em amostras de “urina enriquecida” (30 e $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) preparadas. A regressão linear dos sinais gerados pelas seis primeiras soluções (20 a $70 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) seguiu o ajuste ($I_p = 0,016 [\text{IND}] + 0,278$, $R^2 = 0,996$). As duas amostras de urina sintética enriquecida com IND foram injetadas, na concentração de $30 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 1) e $40 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ (amostra 2) conforme ilustrado na (Figura 4D). A recuperação foi calculada em $94,5\%$ e $94,7\%$. O limite de detecção de $5,0 \times 10^{-7} \text{ mol L}^{-1}$ de indapamida foi determinado experimentalmente

(O L). Estes resultados indicam que o método apresenta um bom desempenho analítico para avaliação de IND em amostras de interesse clínico e de doping.

Conclusões

O tratamento a laser demonstrou-se uma técnica eficaz, rápida e conveniente para tratar minas de grafite sem a necessidade de produtos químicos. Poderia eliminar materiais não condutores e pequenas partículas de grafite menos cristalinas para melhorar a transferência de elétrons, que foi avaliada por CVs usando dopamina e $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ como sondas redox e EIS usando $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$. Os resultados eletroquímicos mostraram diminuição nas diferenças pico a pico do CV e um incremento na cinética de transferência de carga. O tratamento produziu uma superfície mais rugosa composta por partículas cristalinas que foram adequadamente caracterizadas por espectros Raman e MEV. Usando a técnica FIA, a mina de grafite foi aplicada com sucesso para detectar a indapamida como prova de conceito em urina sintética. Portanto, o tratamento a laser mostrou-se um procedimento verde e conveniente para melhorar o desempenho eletroquímico dos materiais eletródicos, comprovando seu potencial para fabricar eletrodos de baixo custo e alto desempenho de forma massiva.

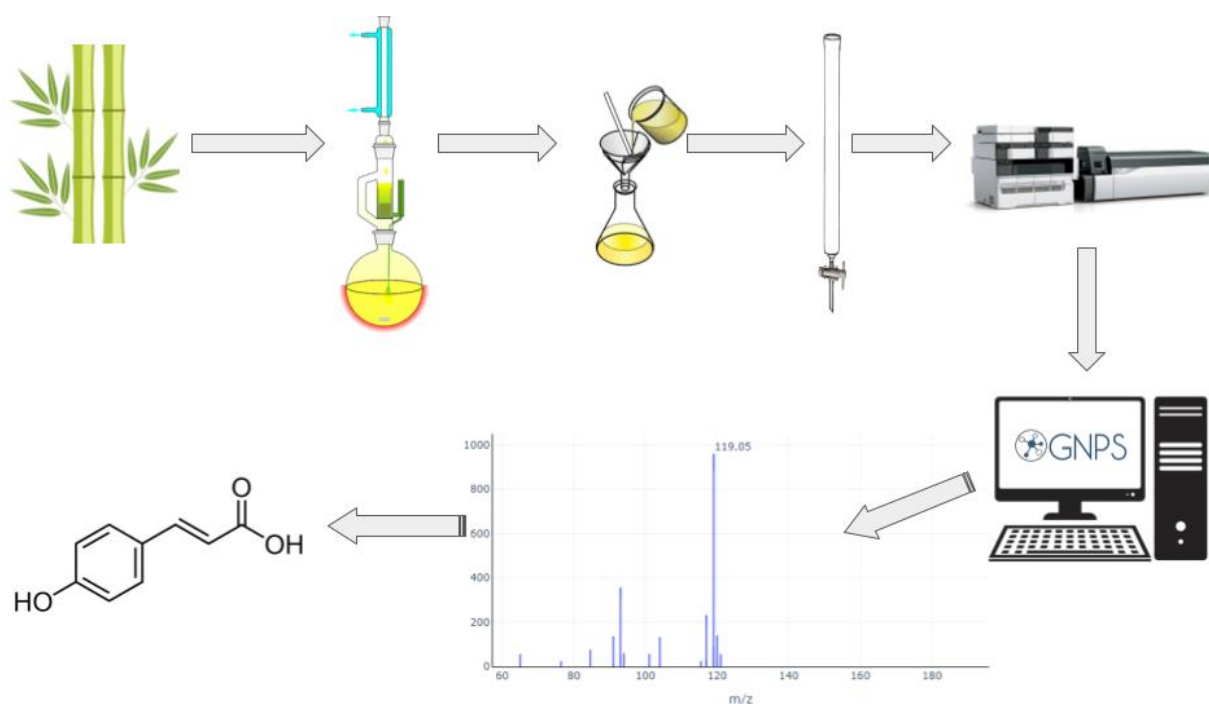
Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP (números de bolsas: 2019/22126-2, 2018/16896-7, 2017/13137-5 e 2014/50867-3) e Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq (processos 311847-2018-8, 465389/2014-7, 305247/2022-0 e 131305/2021-2). Os autores agradecem também ao Dr. Fabio Rodrigues e ao MSc. Evandro Pereira da Silva pelas medidas de espectroscopia Raman.

Referências

1. Ameku, W.A.; Negahdary, M.; Lima, I.S.; Santos, B.G.; Oliveira, T.G.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L. Laser-Scribed Graphene-Based Electrochemical Sensors: A Review. *Chemosensors* **2022**, *10*, 505, doi:10.3390/chemosensors10120505.
2. Mendes, L.F.; Pradela-Filho, L.A.; Paixão, T.R.L.C. Polyimide Adhesive Tapes as a Versatile and Disposable Substrate to Produce CO₂ Laser-Induced Carbon Sensors for Batch and Microfluidic Analysis. *Microchemical Journal* **2022**, *182*, 107893, doi:10.1016/j.microc.2022.107893.
3. Kawai, M.S.; de Lima, L.F.; de Araujo, W.R. A Disposable and Low-Cost Laser-Scribed Graphene Electrochemical Sensor for Simultaneous Detection of Hydroquinone, Paracetamol and Methylparaben. *Materials Letters* **2023**, *330*, 133211, doi:10.1016/j.matlet.2022.133211.
4. de Araujo, W.R.; Frasson, C.M.R.; Ameku, W.A.; Silva, J.R.; Angnes, L.; Paixão, T.R.L.C. Single-Step Reagentless Laser Scribing Fabrication of Electrochemical Paper-Based Analytical Devices. *Angewandte Chemie* **2017**, *129*, 15309–15313, doi:10.1002/ange.201708527.
5. Rocha, D.P.; Ataíde, V.N.; de Siervo, A.; Gonçalves, J.M.; Muñoz, R.A.A.; Paixão, T.R.L.C.; Angnes, L. Reagentless and Sub-Minute Laser-Scribing Treatment to Produce Enhanced Disposable Electrochemical Sensors via Additive Manufacture. *Chemical Engineering Journal* **2021**, *425*, 130594, doi:10.1016/j.cej.2021.130594.

6. N. Ataíde, V.; A. Ameku, W.; P. Bacil, R.; Angnes, L.; Araujo, W.R. de; C. Paixão, T.R.L. Enhanced Performance of Pencil-Drawn Paper-Based Electrodes by Laser-Scribing Treatment. *RSC Advances* **2021**, *11*, 1644–1653, doi:10.1039/D0RA08874A.
7. Alba, A.F.; Totoricaguena-Gorriño, J.; Sánchez-Ilárduya, M.B.; Ruiz-Rubio, L.; Vilas-Vilela, J.L.; Lanceros-Méndez, S.; del Campo, F.J. Laser-Activated Screen-Printed Carbon Electrodes for Enhanced Dopamine Determination in the Presence of Ascorbic and Uric Acid. *Electrochimica Acta* **2021**, *399*, 139374, doi:10.1016/j.electacta.2021.139374.
8. Kaneko, S.; Shimizu, Y.; Rachi, T.; Kato, C.; Tanaka, S.; Naganuma, Y.; Katakura, T.; Satoh, K.; Ushiyama, M.; Konuma, S.; et al. Multigraphene Growth on Lead-Pencil Drawn Sliver Halide Print Paper Irradiated by Scanning Femtosecond Laser. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2015**, *55*, 01AE24, doi:10.7567/JJAP.55.01AE24.
9. Ameku, W.A.; Ataíde, V.N.; Costa, E.T.; Gomes, L.R.; Napoleão-Pêgo, P.; William Provance, D.; Paixão, T.R.L.C.; Salles, M.O.; De-Simone, S.G. A Pencil-Lead Immunosensor for the Rapid Electrochemical Measurement of Anti-Diphtheria Toxin Antibodies. *Biosensors* **2021**, *11*, 489, doi:10.3390/bios11120489.
10. Chaffman, M.; Heel, R.C.; Brogden, R.N.; Speight, T.M.; Avery, G.S. Indapamide. A Review of Its Pharmacodynamic Properties and Therapeutic Efficacy in Hypertension. *Drugs* **1984**, *28*, 189–235, doi:10.2165/00003495-198428030-00001.
11. Cadwallader, A.B.; De La Torre, X.; Tieri, A.; Botrè, F. The Abuse of Diuretics as Performance-Enhancing Drugs and Masking Agents in Sport Doping: Pharmacology, Toxicology and Analysis. *British Journal of Pharmacology* **2010**, *161*, 1–16, doi:10.1111/j.1476-5381.2010.00789.x.
12. Shahzadi, M.; Nisar, S.; Kim, D.-K.; Sarwar, N.; Rasheed, A.; Ahmad, W.; Afzal, A.M.; Imran, M.; Assiri, M.A.; Shahzad, Z.M.; et al. Highly Efficient, Non-Covalent Functionalization of CVD-Graphene via Novel Pyrene-Based Supporter Construct. *Chemosensors* **2023**, *11*, 83, doi:10.3390/chemosensors11020083.
13. Celiešiūtė, R.; Trusovas, R.; Niaura, G.; Švedas, V.; Račiukaitis, G.; Ruželė, Ž.; Pauliukaite, R. Influence of the Laser Irradiation on the Electrochemical and Spectroscopic Peculiarities of Graphene-Chitosan Composite Film. *Electrochimica Acta* **2014**, *132*, 265–276, doi:10.1016/j.electacta.2014.03.137.
14. Li, Z.; Li, K.; Wang, S.; Teng, C. Covalent Patterning of Graphene for Controllable Functionalization from Microscale to Nanoscale: A Mini-Review. *Frontiers in Chemistry* **2022**, *10*.
15. Lenner, M.; Kaplan, A.; Huchon, Ch.; Palmer, R.E. Ultrafast Laser Ablation of Graphite. *Phys. Rev. B* **2009**, *79*, 184105, doi:10.1103/PhysRevB.79.184105.



Steps to analyze the chemical composition of *Guadua angustifolia* var. bicolor leaves.

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DAS FOLHAS DE *GUADUA ANGUSTIFOLIA* VAR. BICOLOR LODOÑO (BAMBUSOIDEAE:POACEAE) POR MEIO DE CLAE-EM COM AUXÍLIO DO GNPS

João Kazlauckas^{1*}, Paulo Roberto H. Moreno^{2*}

¹-Graduação em Farmácia-Bioquímica - Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

joakazlauckas@usp.br

²-Instituto de Química, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, SP

prmoreno@iq.usp.br

Resumo: Os produtos naturais são de extrema importância para a saúde humana, uma vez que essas moléculas podem ser aplicadas como base para o desenvolvimento de novos fármacos, além de auxiliar no entendimento das vias biossintéticas dos seres vivos. *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño é uma variedade da espécie *G. angustifolia* Kunth, nativa da Colômbia e introduzida no Brasil, sendo que ainda não foram realizados estudos de sua composição química. Desse modo, foi preparado um extrato de folhas utilizando o aparelho de Soxhlet. Esse extrato foi posteriormente submetido a um processo de fracionamento sólido-líquido em quatro frações com diferentes polaridades (hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol). Após esse processo, as frações de diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol passaram por uma cromatografia em coluna para uma melhor separação das substâncias presentes nelas. Foi conduzido um estudo para relacionar essas atividades com a composição química das frações, utilizando o método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM). Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 4 ácidos graxos e seus derivados pelo método de CLAE-EM com auxílio do GNPS, dentre eles ácido *p*-cumárico, ácido azelaico, ácido ferúlico, ácido siríngico, apigenina, nevadensina, ácido cumaroilquínico e isovitexina. Este estudo proporcionou uma análise química inicial da espécie *G. angustifolia* var. bicolor. Além de fornecer subsídios para comparação da composição química com outras espécies dentro do gênero *Guadua* para sua diferenciação. Adicionalmente, estes resultados podem orientar futuras investigações na busca por novas moléculas com potencial farmacológico.

Palavras-chave: CLAE-EM, GNPS, *Guadua angustifolia*, ácido *p*-coumárico, ácido azelaico, ácido ferúlico, ácido siríngico, apigenina, isovitexina

STUDY OF THE CHEMICAL COMPOSITION OF *GUADUA ANGUSTIFOLIA* VAR. BICOLOR LODOÑO (BAMBUSOIDEAE:POACEAE) BY USING HPLC-EM WITH THE AID OF GNPS

Abstract: Natural products are of utmost importance for human health, as these molecules can serve as a basis for the development of new pharmaceuticals and also assist in the understanding of the biosynthetic pathways of living organisms. *Guadua angustifolia* var. bicolor Lodoño is a variety of the species *G. angustifolia* Kunth, native to Colombia and introduced in Brazil, with no studies yet conducted on its chemical composition. Thus, an extract of the leaves was prepared using a Soxhlet apparatus. This extract was subsequently subjected to a solid-liquid fractionation process into four fractions with different polarities (hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol). After this procedure, the dichloromethane, ethyl acetate, and *n*-butanol fractions were subjected to column chromatography to enhance the separation of the compounds within them. A study was conducted to relate these activities to the chemical composition of the fractions using the Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry (LC-MS) method. In total, it was possible to annotate 9 phenolic compounds, 12 flavonoids, and 4 species of fatty acids and their derivatives by the LC-MS method with the assistance of GNPS, including *p*-coumaric acid, azelaic acid, ferulic acid, syringic acid, apigenin, and isovitexin. This study provided an initial chemical analysis of the species *G. angustifolia* var. bicolor, offering the basis for comparing the chemical composition with other species within the *Guadua* genus for differentiation. Additionally, these results can guide future investigations in the search for new molecules with pharmacological potential.

Keywords: LC-MS, GNPS, *Guadua angustifolia*, *p*-coumaric acid, azelaic acid, ferulic acid, syringic acid, apigenin, and isovitexin

Introdução

Produtos naturais e bambus

O termo “produtos naturais” é utilizado para se referir às substâncias produzidas pelo metabolismo dos seres vivos (plantas, fungos, bactérias, parasitas, etc.) mais comumente associado àquelas oriundas do metabolismo secundário¹, sendo estas de extrema importância tanto para a saúde humana, uma vez que essas moléculas podem ser aplicadas como base para o desenvolvimento de novos fármacos², como também para o entendimento das vias biossintéticas³.

Nesse contexto, o uso de um método que seja capaz de analisar com facilidade a composição química de uma amostra biológica torna-se imprescindível. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas (CLAE-EM) se mostrou uma técnica eficaz para o mapeamento inicial das possíveis moléculas presentes em uma amostra³. Por outro lado, a interpretação de seus resultados se mostra o principal desafio para seus usuários, sendo necessário o auxílio de bases de dados e artigos científicos para identificar novas substâncias⁴. Dentre as fontes de produtos naturais as plantas são o grupo com a maior variedade^{3,5}, sendo responsáveis por 25% dos fármacos baseados em moléculas de origem natural⁵, o que demonstra a relevância do estudo dessas espécies para o desenvolvimento de novos fármacos.

No campo dos produtos naturais derivados de plantas estão inseridos os bambus, que estão presentes em diversas florestas pelo mundo, com exceção das situadas nos continentes europeu e antártico, esta espécie é frequentemente utilizada na cultura asiática para diversos fins como nutrição, conservação de alimentos⁶, sendo associados principalmente ao seu potencial antioxidante, além de atividade anti-inflamatória, antitumoral, antibacteriana, dentre outras⁷. *G. angustifolia* var. bicolor, objeto deste estudo, trata-se de um bambu nativo da Colômbia⁶, sem relatos de sua composição, no entanto,

estudos realizados com outros bambus corroboram para predizer as possíveis espécies químicas esperadas, como compostos fenólicos, flavonóides, lactonas e glicosídeos^{7,8,9,10,11,12}.

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

O GNPS (<http://gnps.ucsd.edu>) é uma plataforma online que integra diversos bancos de dados públicos relacionados à espectrometria de massas, a fim de facilitar e nortear pesquisas relacionadas à elucidação de estruturas químicas. O pesquisador que deseja usufruir do recurso necessita apenas de se cadastrar e inserir os arquivos obtidos em sua análise na plataforma, selecionando quais parâmetros o programa deve levar em consideração. O GNPS faz uso do algoritmo denominado MS-Cluster para realizar essa busca, ao se basear no fragmento m/z e o MS^2 gerado pelo mesmo. Além da funcionalidade para encontrar estruturas já conhecidas, existem também opções que apresentam redes moleculares inter-relacionando compostos com padrões semelhantes de fragmentação, a fim de auxiliar na elucidação de novas substâncias. Detalhes mais aprofundados da metodologia empregada pelo GNPS e seu funcionamento podem ser encontrados na literatura^{13,14}.

Experimental

Preparo das amostras

A coleta do material vegetal e a preparação das amostras foram relatados anteriormente¹⁵.

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detecção por Arranjo de diodos (CLAE -DAD)

Na cromatografia líquida de alta eficiência, as amostras de extrato e das frações (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol) foram solubilizadas em metanol, exceto para as frações em clorofórmio que foram solubilizadas em acetonitrila, para resultar na concentração de 1,0 mg/mL, sendo realizada em coluna de C18 4,6 x 150 mm com partículas de 3,5 μ m (Zorbax Eclipse Plus C18 p/n959963-902), célula de fluxo de 60 mm, nos comprimentos de onda de 352, 280, 254, 325, 215, 225 nm, sendo a fase móvel ácido acético a 0,1 % e acetonitrila, com fluxo de injeção de 1 mL/min à 45°C, volume de injeção 3,0 μ L. Utilizou-se o gradiente de fase móvel da seguinte maneira: 0-6 min (10% acetonitrila), 6-7 min (10 a 15% acetonitrila), 7-22 min (15% acetonitrila), 22-32 min (15 a 50% acetonitrila), 32-42 min (50 a 100% acetonitrila), 42-50 min (100% acetonitrila).

Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM)

A CLAE-EM foi realizada pela Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo, utilizando os equipamentos acoplados: qTof MAXIS 3GBruker Daltonics e HPLC Shimadzu LC 20AD XR. A coluna cromatográfica utilizada foi Phenomenex Luna C18 5 μ m (250x4.6 mm) à 40 °C utilizando os solventes H₂O 0,1% AF (Solvente A) e Acetonitrila 0,1% AF (Solvente B), cujo gradiente foi expresso no Quadro 2, sob o fluxo de 1,0 mL/min. Enquanto que a espectrometria de massas foi realizada em um sistema à 250 °C e 2 Bar com uma fonte de ionização eletrospray, e 9 detectores de íons em modo negativo, onde foram captados MS^1 e MS^2 . Neste caso, preferiu-se a detecção em modo negativo pela maior quantidade de informações, tanto em bancos de dados como na literatura, de espectros de flavonoides e compostos fenólicos. Os cromatogramas obtidos foram lidos com recurso contido no site denominado GNPS LCMS Dashboard - Version 0.60 (<https://dashboard.gnps2.org/>), no qual é possível analisar o cromatograma obtido por CLAE-EM, além de outras opções que permitem uma melhor compreensão e visualização do mesmo.

Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS)

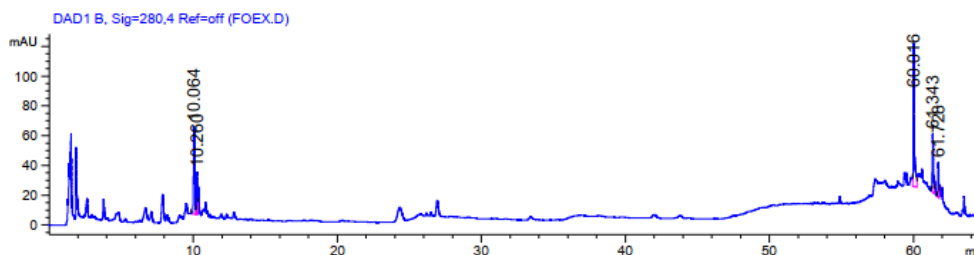
Nesta análise, a tolerância da massa do íon precursor foi determinada como 2,0 Da com tolerância do íon do fragmento MS/MS de 0,5 Da, o valor de cosseno 10 maior ou igual à 0,7 e 6 picos correspondentes para comparar os espectros de massa obtidos por CLAE-EM. O tamanho máximo de nódulos equivalentes a um único composto será definido como 100 e os de menor pontuação serão removidos deste grupo até que a quantidade de semelhantes selecionados esteja abaixo do limite estabelecido¹³. Estes parâmetros foram baseados no “Minicurso: Análise de dados de metabolômica explorando ferramentas do GNPS” oferecido pela Divisão de Produtos Naturais da Sociedade Brasileira de Química¹⁶. Todas as amostras foram analisadas pelo GNPS em um mesmo processo. Ao final desta análise, foram mostradas opções das quais foram utilizadas as contidas em “Default Molecular Networking Results Views” para análise de resultados. Com a opção “View All Library Hits”, foram mostrados uma variedade de 12.649 compostos, contudo muitos destes são repetidos, pois esta opção contém os espectros de massas de diferentes bancos de dados e análises feitas por outros usuários do GNPS¹³. Desse modo, a fim de facilitar a leitura dos resultados obtidos, foi utilizada a opção “View Unique Library Compounds” que se baseia apenas no banco de dados referência do GPNS para interpretação dos espectros, mostrando ao todo 230 compostos distintos. Em seguida, após a apresentação dos dados pelo programa, foram aplicados filtros nos parâmetros “Cosine” com no mínimo 0,7, e “MZErrorPPM” de no máximo 5 ppm, reduzindo o número de resultados para 26. Por fim, os espectros de MS² do cromatograma foram comparados com dados da literatura a partir do que foi proposto pelo GNPS para cada íon MS¹.

Resultados e Discussão

CLAE-DAD

Os compostos fenólicos têm uma estrutura fundamental baseada em um anel aromático, que permite o uso de CLAE e detectores UV-vis conjuntamente para detectá-los, uma vez que os compostos fenólicos exibem distintos níveis de absorção de luz, devido à presença de anéis aromáticos e ligações duplas conjugadas em suas estruturas moleculares. A Figura 1 representa o cromatograma resultante deste método, realizado com o extrato bruto de folhas, os tempos de retenções e os picos foram comparados com uma lista de padrões sob as mesmas condições. Desse modo, foi possível apenas reconhecer o pico de 10.064 minutos em 280 nm a partir de uma série de padrões injetados e analisados, se tratando do ácido *p*-cumárico. Além disso, a presença dessa substância foi constatada em *G. angustifolia* var. *angustifolia*¹¹ e *G. chacoensis*¹² utilizando o mesmo método .

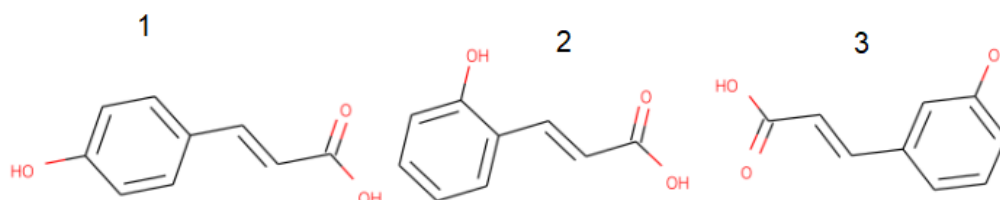
Figura 1- HPLC-DAD realizado com o extrato bruto de folhas de *G. angustifolia* var bicolor



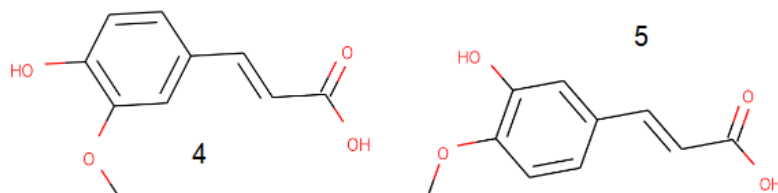
Análise por CLAE-EM com dados obtidos no GPNS

Ao todo, foram possíveis anotar 9 compostos fenólicos, 12 flavonoides, e 4 ácidos graxos e seus derivados. A seguir, foram discutidos os resultados apresentados pela análise gerada no GNPS.

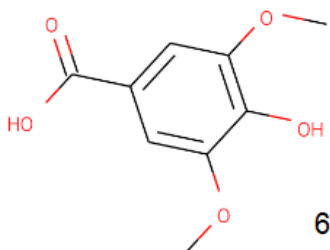
Em primeiro lugar, são apresentados os resultados das análises com as subfrações C, D, E, F e G de diclorometano, a fim de discutir as possíveis moléculas presentes em sua composição. Algumas destas substâncias foram encontradas, em menores quantidades, nas subfrações de acetato de etila e/ou n-butanol, provavelmente devido ao não esgotamento completo dessas substâncias durante o fracionamento, porém serão consideradas como pertencentes às subfrações de diclorometano.



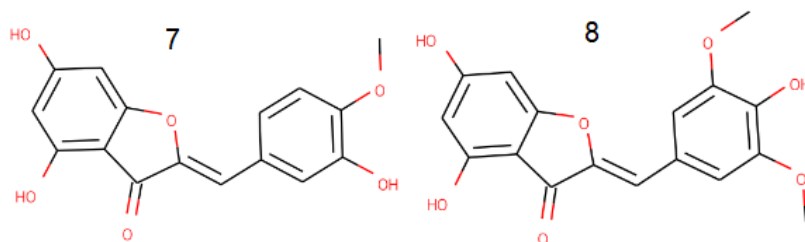
A estrutura de menor massa molar identificada pelo GNPS, podendo se tratar dos isômeros do ácido cumárico (1, 2 e 3), presente em todas as subfrações entre 14,35-1,55 minutos de eluição, foi $C_9H_8O_3$ de massa molar 164,0474 Da. Sendo possivelmente ácido *p*-cumárico (1) sob a forma de íon pseudomolecular 163,0394 m/z $[M-H]^-$, no MS^2 foram detectados dois fragmentos 119,04 m/z $[163-CO_2]^-$ e 93,03 m/z $[119-C_2H_2]^-$. A partir de dados coletados na literatura constatou-se que se trata do ácido *p*-cumárico, uma vez que o mesmo foi relatado como composto mais abundante em outros bambus do mesmo gênero, como *G. angustifolia* var. *angustifolia*¹¹ e *G. chacoensis*¹², além disso, também está de acordo com o que observado pela análise em CLAE-DAD. A presença de ácido *p*-cumárico já foi relatada em diversas espécies de bambu e o composto apresentou atividade anti-tirosinase isoladamente¹⁷.



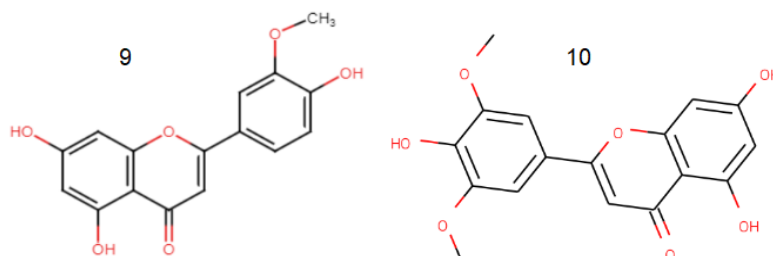
Bastante semelhantes ao ácido *p*-cumárico, presentes em DiC e DiD no tempo de retenção 17,0 à 17,6 minutos, foram propostos os isômeros (C₁₀H₁₀O₅) ácido ferúlico (4) e isoferúlico (5). Ambos com massa molar 194,0577 Da e íon pseudomolecular 193,0497 m/z [M-H]⁻, com apenas um único fragmento em 134,03 m/z compatível com [(M-H)-CH₃-CO₂]⁻. Comparando os dois isômeros em questão, de acordo com a literatura, ambos possuem fragmentação distinta¹⁸. Contudo, existe a possibilidade de se tratar de ácido ferúlico, pois para este isômero pode haver apenas a detecção do fragmento em 134 m/z¹⁹. Assim como o ácido *p*-cumárico, o ácido ferúlico é frequentemente encontrado em bambus tropicais^{20,21}.



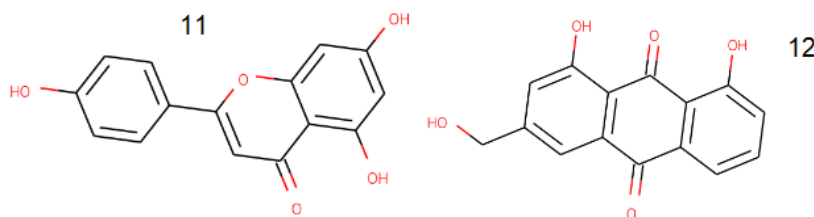
Outro composto fenólico, também identificado em DiC e DiD, foi o ácido sirínico (6), da classe dos ácidos benzóicos, que possui fórmula molecular C₉H₁₀O₅ e massa molar 198,0527 Da. O íon pseudomolecular 197,0447 [M-H]⁻ m/z foi detectado entre 12,8 e 13,9 minutos, constatando dois fragmentos de MS² 123,00 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃-CO₂]⁻ e 95,01 m/z [123-CO]⁻. Na fragmentação do ácido sirínico é possível a formação dos íons detectados, contudo ocorrem juntamente com os fragmentos em 182, 121 e 153 m/z²². Desse modo, os resultados obtidos não permitem confirmar a identidade desta substância.



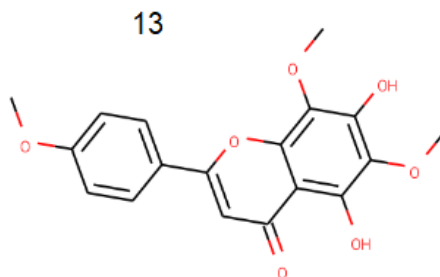
Nas subfrações DiC e DiD, para os tempos de retenção entre 26,2 e 27,0 minutos, o GNPS sugeriu a estrutura de duas substâncias para as quais não há relatos de sua presença em bambus ou mesmo em Poaceae^{23,24}. A primeira sugestão para o íon pseudomolecular 299,0549 m/z [M-H]⁻ foi o composto 4,6-di-hidroxi-3'-metoxi-4'-hidroxi aurona (7), de fórmula molecular C₁₆H₁₂O₆ e massa molar 300,0629 Da.. A segunda sugestão seria a 4,6-di-hidroxi-3',5'-dimetóxi-4'-hidroxi aurona (8), com íon pseudomolecular 329,0653 m/z [M-H]⁻, fórmula molecular C₁₇H₁₄O, e massa molar 330,0733 Da.



O fato de não haver relatos prévios para auronas em bambus, demandou uma pesquisa mais aprofundada desses espectros. A partir de buscas na literatura foram constatados dois isômeros para fórmulas moleculares $C_{16}H_{12}O_6$ e $C_{17}H_{14}O_7$ com o mesmo padrão de fragmentação observados para os íons em 299,0549 m/z e 329,0653 m/z, respectivamente, 284,03 m/z [(M-H)-CH₃]⁻ e 256,03 m/z [284-CO]⁻, e 299,01 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃]⁻ e 271,02 m/z [299-CO]⁻, podendo se tratar respectivamente de crisoerio²⁵ (9) e tricina²⁶ (10), ambos são flavonóides já descritos em bambus asiáticos²⁷.



Neste contexto, a presença de um outro flavonóides ou uma antraquinona foi indicada nas subfrações DiC, DiD e DiE. No tempo de retenção entre 25,6-26,2 minutos ocorreu o fragmento 269,0446 m/z, do qual o GNPS indicou a possibilidade de tratar de duas moléculas, apigenina (11) ou alo-emodina (12), ambas de fórmula molecular $C_{16}H_{12}O_3$ e massa molar 270,0526 Da. O MS² apresentou fragmentos em 269,04 m/z, 151,00 m/z, 117,03 m/z e 107,01 m/z. A análise dos dados relacionados ao MS² da alo-emodina, indicou uma inconsistência entre a fragmentação observada e àquela relatada na literatura^{28,29,30}. Contudo, ao observar o mecanismo de fragmentação apresentado para flavonas³⁴, foi possível estabelecer uma relação com o resultado obtido, levando a crer que o composto alvo se trata de fato da apigenina³¹. Adicionalmente, a apigenina é a genina mais comum encontrada nos flavonóides isolados de diversas espécies de bambu³².

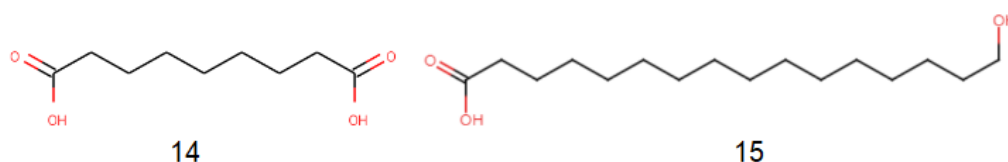


Além da apigenina, também foi proposta a estrutura de outro flavonoide no tempo de retenção 33,0-33,6 minutos a partir do íon pseudomolecular 343,0806 m/z [M-H]⁻, a nevadensina (13), de fórmula

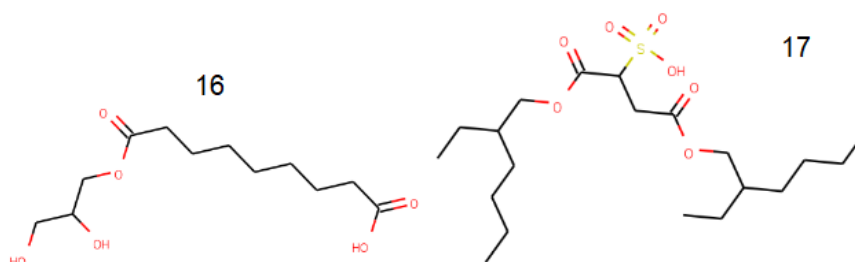
molecular $C_{18}H_{16}O_7$ e massa molar 344,088 Da. Os fragmentos 313,03 m/z [(M-H)-CH₃-CH₃]⁻, 285,03 m/z [313-CO]⁻, 241,04 m/z [285-CO₂]⁻ e 226,02 m/z [241-CH₃]⁻ estão de acordo com os mecanismos propostos^{31,33} e os dados reportados na literatura³⁴.

Os flavonoides, podem ocorrer sob diferentes formas, como agliconas (forma livre) e glicosídeos, variando em termos de substituintes (tipo, quantidade e localização) e grau de insaturação³⁵. Além disso são frequentemente encontrados em bambus, estando associados à propriedades antioxidantes²⁷, assim como estudos apontam sua atividade inibidora da enzima tirosinase³⁶.

Além dos polifenóis, as plantas contém uma notável variedade de ácidos graxos que variam em comprimento de cadeia, quantidade e posição de ligações π (também conhecidas como insaturações), ou na incorporação de grupos funcionais não convencionais (por exemplo, hidróxi, epóxi, cetona, acetilênico)³⁷. Neste contexto, para quatro dos íons detectados foram propostas estruturas dos ácidos graxos e seus derivados.



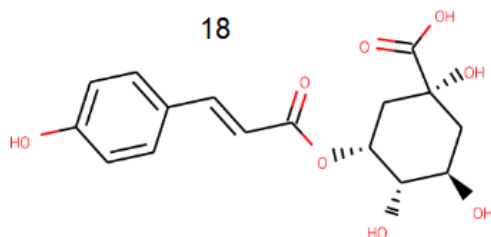
Em dois casos, ambos foram detectados em praticamente todas as subfrações, com exceção de nButD e AcI. O ácido azelaico (14) de fórmula molecular $C_9H_{16}O_4$ e massa molar 188,1051 Da foi indicado para o íon pseudomolecular 187,0971 m/z [M-H]⁻ no tempo de retenção 18,9-19,6 minutos. Sua fragmentação inclui 125,09 m/z [(M-H)-CO₂-H₂O]⁻, 97,06 m/z [125-C₂H₄]⁻ e 69,03 m/z [97-C₂H₄]⁻. que coincidem com a literatura³⁸. Além disso, esse composto tem eficácia comprovada no tratamento de rosácea, acne vulgar e desordens de pigmentação da pele FDA dos estados unidos³⁹. O outro composto detectado nessas subfrações foi o de íon pseudomolecular 271,2277 m/z, referenciado como ácido junípero (15) ($C_{16}H_{32}O_3$), embora não haja registro em literatura sobre sua fragmentação. No entanto, com base na literatura é possível inferir que os íons em 271,23 e 225,22 m/z podem corresponder ao íon pseudo molecular e ao produto de descarboxilação³⁹.



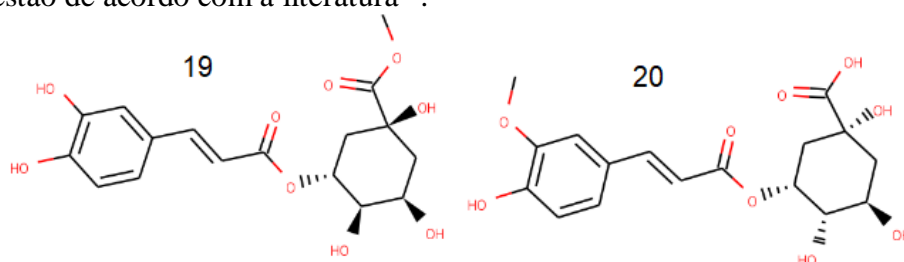
Os outros dois ácidos graxos foram encontrados apenas nas subfrações DiC e DiD, e menor quantidade em DiE. No tempo de retenção 18-18,5 minutos, com fragmento 261,1337 m/z foi proposto o ácido 9-(2,3-dihidroxiopropoxi)-9-oxononanoico (16) de fórmula molecular $C_{12}H_{22}O_6$ e massa molar 272,2357 Da, sua fragmentação apresentou picos em 235,02 m/z, 187,09 m/z, 125,10 m/z e 97,06 m/z. Com base nos dados da literatura para o composto, os resultados obtidos indicam que se trata do mesmo composto⁴⁰. O composto com tempo de retenção de 61,8-62,2 min e íon pseudomolecular em 421,2241 m/z foi identificado como sulfossuccinato de dioctila (17) ($C_{20}H_{37}O_7S$), sendo observado apenas um fragmento em 80,96 m/z. O resultado está de acordo com

com os dados previamente reportados na literatura⁴¹. A substância também é descrita como um componente de pesticidas para plantas, indicando que em nosso caso não se trata de um produto natural, mas um artefato^{42,43}.

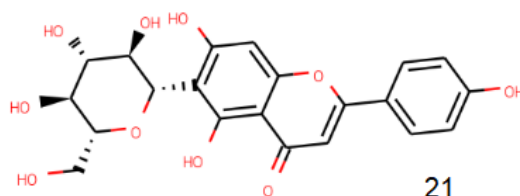
Como comentado anteriormente, compostos fenólicos e flavonóides também podem se apresentar sob a forma conjugada com glicosídeos. Nas subfrações AcG, AcH, AcI e nButD foram encontradas algumas dessas estruturas.



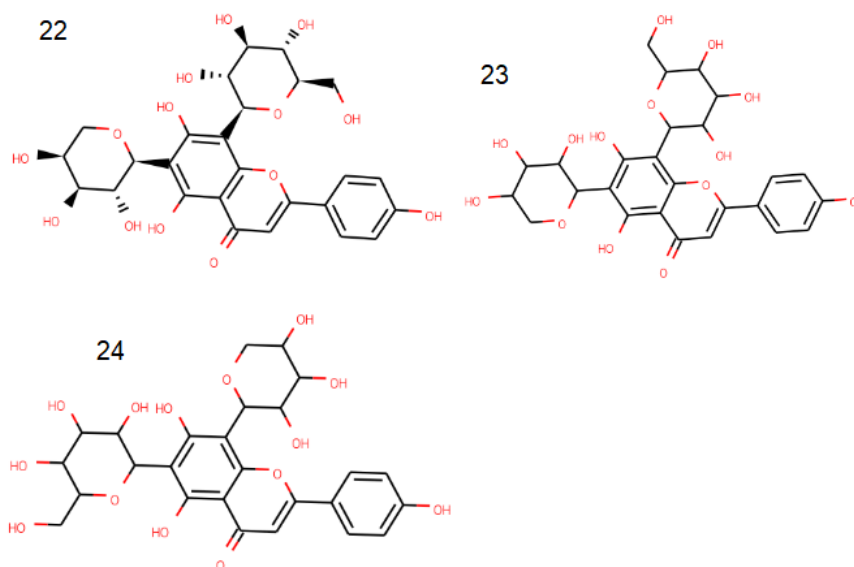
Um desses derivados esterificados foi o ácido cumaroilquínico (18) (C₁₆H₁₈O₈) de massa molar 338,1009 Da. Sendo detectado na subfração nButC e AcH entre 13,0 e 14,0 minutos à partir do íon pseudomolecular 337,0929 m/z. O Dentre os íons obtidos 191,06 m/z, 173,04 m/z, 119,05 m/z e 93,03 m/z, todos estão de acordo com a literatura⁴⁴.



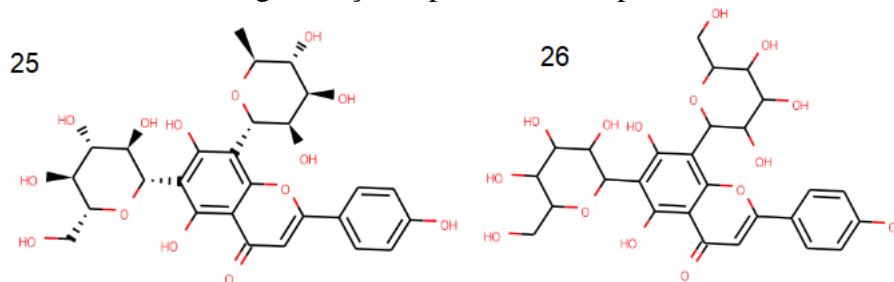
O íon pseudo molecular 367,1027 m/z também foi sugerido pelo GNPS como um possível composto fenólico esterificado. Neste caso, foram propostos dois isômeros de fórmula molecular C₁₇H₂₀O₉, sendo clorogenato de metila (19) e/ou ácido 3'-metoxi-clorogénico (20), ambos de massa molar 368,1107 Da. O íon se faz presente majoritariamente em AcH, com pequenos resquícios em DiG, nos respectivos tempos de retenção de 11,6-12,0 e 13,4-14,0 minutos, com fragmentos em MS² em 193,04 m/z, 173,04 m/z, 134,03 m/z e 93,03 m/z. Segundo a literatura consultada⁴⁴, os padrões observados não se tratam de nenhum dos dois compostos, provavelmente se tratando de um outro isômero. Vale ressaltar que fenóis conjugados, como os apresentados, são os compostos abundantes em bambus de origem sul-americana¹⁰, além disso possuem relatada atividade antioxidante⁴⁵.



Seis flavonóides glicosilados também foram sugeridos pelo GNPS. Um deles sendo isovitexina (21) (C₂₁H₂₀O₁₀) no tempo de retenção entre 15,6-15,9 minutos, presente em AcI e com íon pseudo molecular 431,0904 m/z [M-H]⁻, com fragmentos 341,06 m/z, 323,05 m/z, 311,05 m/z e 283,06 m/z, estando de acordo com os resultados encontrados na literatura⁴⁶.



As cinco substâncias discutidas a seguir compreendem formas C-glicosiladas da apigenina, portanto possuem padrões de íons em MS² muito semelhantes entre si, assim como seus mecanismos de fragmentação, sendo reportadas estruturas muito semelhantes na espécie de bambu *P. praecox*⁴⁷. No tempo de retenção 13,9-14,7 minutos em AcH, DiG e nButC, referente ao íon pseudo molecular 563,1385 m/z, foram propostas as estruturas de isoschaftosídeo (22), neoeixosídeo (23) e Vicenina-3 (24). Os fragmentos analisados foram 563,14 m/z, 473,10 m/z, 443,09 m/z, 383,07 m/z e 353,07 m/z, que estão de acordo com os resultados descritos para esta série de compostos⁴⁸, não sendo encontradas propostas para um mecanismo de fragmentação especificamente para as mesmas.



Violantina (25), de fórmula molecular C₂₇H₃₀O₁₄ e massa molar 578,1638 Da, foi candidata ao íon 577,1558 m/z no tempo de retenção 15,12-16,30 minutos em nButC e DiG, com fragmentos 577,16 m/z, 503,11 m/z, 473,10 m/z, 457,09 m/z, 383,08 m/z e 353,07 m/z, estes dados são semelhantes ao reportados na literatura⁴⁹, e estão de acordo com mecanismos de fragmentação⁵⁰. Enquanto que em AcH aos 12,4 minutos, a apigenina 6,8-digalactosídeo (26) (C₂₇H₃₀O₁₅) foi proposta para o fragmento 593,1497 m/z, com íons 593,15 m/z, 503,11 m/z, 473,10 m/z, 383,08 m/z e 353,07 m/z. Do ponto de vista biossintético, essas substâncias podem estar presentes na composição do vegetal, uma vez que sua precursora a apigenina é a estrutura de genina mais presente bambus, além de que, como foi citado anteriormente, arranjos de cadeias bastante semelhantes podem ocorrer na espécie vegetal.

Conclusões

O uso do GNPS se mostrou uma ferramenta extremamente facilitadora na triagem de 26 possíveis substâncias presentes na composição química da espécie *G. angustifolia* var. *bicolor*, sendo algumas dessas análises com extrema acurácia ao se comparar com dados da literatura, levando a crer com muita confiança de sua identidade. Vale ressaltar que em função de condições experimentais distintas as fragmentações podem não ser exatamente iguais aquelas presentes na literatura, variando a intensidade dos íons formados e os mecanismos de fragmentação que ocorrem. Contudo, a partir do que foi notado nos cromatogramas, ainda existem diversas outras substâncias a serem esclarecidas na espécie.

Os fenóis não glicosados (ácido ferúlico, isoferúlico, ácido siríngico e nevadensina) foram encontrados na fração diclorometano, enquanto as formas glicosiladas foram identificadas nas frações acetato de etila e *n*-butanol (ácido cumaroilquínico, violantina, apigenina 6,8-digalactosídeo, isoschaftosídeo, neoeixosídeo e vicenina-3), com exceção do ácido *p*-cumárico que se mostrou presente em todas as frações.

Por fim, este estudo proporcionou uma análise química inicial da espécie *G. angustifolia* var. *bicolor*. A análise abre caminho para comparações com outras espécies dentro do gênero *Guadua* e pode orientar futuras investigações na busca por novas moléculas com potencial farmacológico.

Agradecimentos

Instituto de Química da USP

Referências

1. Johnson, S. R.; Lange, B. M. *Front. in Bioeng. and Biotechnol.*, **2015**. Doi: 10.3389/fbioe.2015.00022.
2. Alan L.H. *Nat. produc. in drug disc.*, **2008**. Doi: 10.1016/j.drudis.2008.07.004.
3. Sawada, Y.; Hirai M.Y. *Comput. Struct. Biotechnol. J.* **2013**. Doi: 10.5936/csbj.201301011.
4. Sorokina, M.; Steinbeck, C. *J. of Cheminform.*, **2020**. Doi: 10.1186/s13321-020-00424-9.
5. Najmi, A.; Sadique, A.J.; Mohammed, A.B.; Hassan, A.A. *Mol.*, **2022**. Doi: [10.3390/molecules27020349](https://doi.org/10.3390/molecules27020349).
6. Singhal, P. et al. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutri.*, **2013**. Doi: 10.1080/10408398.2010.531488.
7. Gagliano, J.; Anselmo-Moreira, F.; Sala-Carvalho, W.R.; Furlan, C.M. *Adv. in Trad. Med.*, **2021**. Doi: 10.1007/s13596-020-00536-5.
8. Afifi, F.; Shervington, A.; Darwish, R. M; *Acta Techno. et Legis Medic.*, **1997**. Doi: 10.4103/0973-1296.204551.
9. Lu, B.; Wu, X.; Tie, X.; Zhang, Y; *Food Chem. Toxicol.*, **2005**. Doi: 10.1016/j.fct.2005.01.019.
10. Wróblewska, K. B: *Tese de doutorado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019.
11. Oliveira, D. C. S.: *Tese de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2019.
12. Nunes, F. A.: *Tese de mestrado*, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil, 2020.
13. Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Luzzatto-knaan, t.; *Nature Biotech.*, **2016**. Doi: 10.1038/nbt.3597.
14. Aron, A.T., et al. *Nature Protocols*, **2020**. Doi: [10.1038/s41596-020-0317-5](https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5).
15. Corrêa, J.K.C.; Moreno, P.R.H.; *10º Workshop do Mestrado Profissional – USP, IQ* , **2022**. Doi: 10.5151/9786555502084-07.
16. <https://www.youtube.com/watch?v=QVw1K1dkpIc>. Acessado em outubro de 2023.

17. Ilham, A.; Vimala, S.; Rashih, A.; Sahdan, R.; Jamaluddin, M.; Juliza, M., *J. of Trop. For. Sci.*, **2008**, 20, 123.
18. Kuhnert, Nikolai, et al. *Rapid Commun. in Mass Spec.*, **2010**. Doi: 10.1002/rcm.4537.
19. Sinosaki, N., et al. *J. of the Brazilian Chem. Soc.*, **2020**. Doi: [10.21577/0103-5053.20190197](https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190197).
20. Kweon, M.H, Hwang, H.J.; Sung, H.C. *J. of Agric. and Food Chem.*, **2001**. Doi: 10.1021/jf010514x
21. Choi, M.H. et al.. *J. of Mol. Sci.*, **2018**. Doi: 10.3390/ijms19020409
22. Biesaga, M.; Pyrzynska, K. *J. of Chromatography A*, **2009**. Doi: 10.1016/j.chroma.2009.07.066
23. Yang, J., et al. *Crit. Rev. in Food Sci. and Nutri.*, **2023**. Doi: [10.1080/10408398.2023.2248244](https://doi.org/10.1080/10408398.2023.2248244).
24. Iwashina, T. *J. of Plant Res.*, **2000**. Doi: [10.1007/pl00013940](https://doi.org/10.1007/pl00013940).
25. Frišćić, M.; Bucar, F.; Hazler Pilepić, K. *J. of Mass Spec.*, **2016**, 51, 1211.
26. Kang, J. et al., *Food Chem.*, **2016**, 211, 215.
27. Gong, J. et al. *J. of Med. Food.*, **2015**. Doi: 10.1089/jmf.2014.3189.
28. Fengguo, X.; Ying, L.; Zunjian, Z.; Rui, S.; Haijuan, D.; Yuan, T., *J. of Pharma. and Biomed. Analysis*, **2008**. Doi: [10.1016/j.jpba.2008.02.005](https://doi.org/10.1016/j.jpba.2008.02.005).
29. Qin, Y.; Jin, X.; Wenfu, T.; Maozhi, L.; Yongping, Q.; Feng, N., *J. of Chromatography B*, **2009**. Doi: [10.1016/j.jchromb.2009.05.030](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2009.05.030).
30. Zhang, Y.; et al. *Int. J. of Pharma. Sci.*, **2013**. Doi: [10.1691/ph.2013.2855](https://doi.org/10.1691/ph.2013.2855).
31. Fabre, N.; Rustan, I.; De Hoffman, E.; Quetin-leclercq, J. *J. Am. Soc. of Mass Spec.*, **2001**. Doi: 10.1016/S1044-0305(01)00226-4.
32. Kim, C.Y. et al., *J. of the Korean Soc. for Ap. Bio. Chem.*, **2009**. Doi: 10.3839/jksabc.2009.102.
33. Liang, C., et al. *J. of Chromatography B*, **2018**. Doi: [10.1016/j.jchromb.2018.03.032](https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.03.032).
34. Gómez, J., et al., *Mol.*, **2019**. Doi: [10.3390/molecules24061085](https://doi.org/10.3390/molecules24061085).
35. Iwashina, T. *J. of Plant Res.*, **2000**. Doi: [10.1007/pl00013940](https://doi.org/10.1007/pl00013940).
36. Rho, H.S., et al. *Bioorg. & Med. Chem. Letters*, **2010**. Doi: [10.1016/j.bmcl.2010.09.082](https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2010.09.082).
37. Kazaz, S., et al. *Prog. in Lipid Res.*, **2022**. Doi: [10.1016/j.plipres.2021.101138](https://doi.org/10.1016/j.plipres.2021.101138).
38. Farhat, Y., et al. *J. Mass of spec.*, **2011**. Doi: <https://doi.org/10.1002/jms.1911>.
39. Searle, T., et al. *J. of Dermat. Treat.*, **2020**. Doi: [10.1080/09546634.2020.1800579](https://doi.org/10.1080/09546634.2020.1800579).
40. Xu, H.; Gao, H.; Liu, F.; Gong, L.; *Foods*, **2022**. Doi: [10.3390/foods11142085](https://doi.org/10.3390/foods11142085).
41. <https://citeseerx.ist.psu.edu/document?repid=rep1&type=pdf&doi=d848b91d7193e9e69d2600a70f17841aa61142f5>. Acessado em setembro de 2023.
42. Li, Y., et al. *Front. in Plant Sci.*, **2023**. Doi: <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1257672>.
43. Azizi, K. *Plant Protec. (Sci. J. of Agriculture)*, **2023**. Doi: [10.22055/ppr.2023.17998](https://doi.org/10.22055/ppr.2023.17998).
44. Szymborska, K.; Frański, R.; Beszterda-Buszczak, M. *Mol.*, **2022**. Doi: [10.3390/molecules27217543](https://doi.org/10.3390/molecules27217543).
45. Dangles, O. *Current Org. Chem.*, **2012**. Doi: [10.2174/138527212799957995](https://doi.org/10.2174/138527212799957995).
46. Guo, X.; Yue, Y.; Tang, F.; Wang, J.; Yao, X.; Sun, J. *Int. J. of Mass Spec.*, **2013**. Doi: doi.org/10.1016/j.ijms.2012.08.035.
47. Wang, Y., et al. *J. of Func. Foods*, **2020**, Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2020.104015>.
48. Raffaelli, A., et al. *J. of Chromatography A*, **1997**. Doi: [10.1016/s0021-9673\(97\)00260-4](https://doi.org/10.1016/s0021-9673(97)00260-4).
49. Koike, A.C.R. *Tese Doutorado*, Universidade de São Paulo, Brasil, 2015.
50. De Athayde, A. E.; *Tese Mestrado*, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2019.