



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE
UVA POR EXTRAÇÃO DISPERSIVA EM PONTEIRA E CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA**

Marina Pereira Coelho

Florianópolis

2024

Marina Pereira Coelho

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE
UVA POR EXTRAÇÃO DISPERSIVA EM PONTEIRA E CROMATOGRAFIA
LÍQUIDA**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutora em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira.

Coorientador: Prof. Dr. Luciano Vitali.

Florianópolis

2024

Coelho, Marina

DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES PARA DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE UVA POR EXTRAÇÃO DISPERSIVA EM PONTEIRA E CROMATOGRAFIA LÍQUIDA / Marina Coelho ; orientador, Luiz Augusto Dos Santos Madureira, coorientador, Luciano Vitali, 2024.

144 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostra. 3. DPX. 4. Cromatografia Líquida. 5. Compostos Fenólicos. I. Madureira, Luiz Augusto Dos Santos. II. Vitali, Luciano. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Marina Pereira Coelho

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODOS ANALÍTICOS VERDES PARA
DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE
UVA POR EXTRAÇÃO DISPERSIVA EM PONTEIRA E CROMATOLOGRAFIA
LÍQUIDA**

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Orientador
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Luciano Vitali
Coorientador
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr. Bruno José Gonçalves da Silva
Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof. Dr. Eduardo Sidinei Chaves
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof. Dr^a. Isabela Maia Toaldo Fedrigo
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de doutor em Química com especialização em
Química Analítica.

Prof. Dr. Daniel Lázaro Gallindo Borges
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Química

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
Orientador

*Dedico esta tese aos meus pais,
fontes inesgotáveis de inspiração e suporte. Esta conquista é nossa.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Verônica e Vanderlei, e irmã Daiane. Por nunca terem duvidado dos meus sonhos. Agradeço por serem alicerces sólidos em minha vida, sempre encorajando-me a alcançar novas alturas. Agradeço também, a toda minha família, Vanderléa, Ronaldo, João e Melissa, cada conquista desta jornada acadêmica reflete a união, amor e apoio de vocês.

A Isabel, quero expressar minha profunda gratidão por ter você do meu lado. Seu amor, paciência e incentivo foram luzes constante ao longo desta jornada acadêmica desafiadora. Você é minha base e fonte inesgotável de força e inspiração. Obrigada por tornar essa jornada significativa e inesquecível.

Ao meu estimado orientador Luiz, gostaria de expressar minha sincera gratidão por sua orientação, sabedoria e apoio ao longo desta jornada de pesquisa. Agradeço por seus ensinamentos constantes, que moldaram não apenas este trabalho, mas também meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Luciano, agradeço por abraçar esse projeto. Seu comprometimento e visão foram fundamentais para o sucesso desta tese. Agradeço a sua contribuição valiosa durante o desenvolvimento deste trabalho. É uma honra contar com sua orientação.

Aos meus amigos, em especial a Carol, Diogo e Lucas, este momento é também de celebração da amizade que compartilhamos. Agradeço por estarem ao meu lado, encorajando-me nos desafios e partilhando alegrias.

A todos os colegas do grupo, Heloísa, Suelly, Marcielli e Angela, compartilhar esta jornada acadêmica ao lado de pessoas tão dedicadas e talentosas foi enriquecedor. Agradeço a colaboração, troca de ideias e amizade. Aos também colegas do grupo de pesquisa do professor Luciano, sobretudo, agradeço a Carol, Riani, Camila, e Alan por me recebem tão bem, sempre prontamente disponíveis para me ajudarem.

Ao Jocinei e a Cássia, por me acolherem gentilmente no SENAI Blumenau. O início dessa jornada só foi possível pelo apoio, dedicação e amparo de vocês. Espero que nossos caminhos continuem se entrelaçando com sucesso.

A todas as pessoas que participaram da minha formação profissional, sobretudo aos professores, agradeço ao conhecimento e inspiração que proporcionaram ao longo desta jornada acadêmica.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-Graduação em Química pelo espaço concedido, pela oportunidade e pelo ensino público e de qualidade.

A Capes pela bolsa de estudos permitindo dedicação exclusiva ao Programa de Pós-Graduação em Química.

“Crie o que você gostaria que existisse no mundo.”

Isabella Mezzadri

RESUMO

Os compostos fenólicos não apenas contribuem para as características sensoriais de vinhos e sucos de uva, mas também, quando incorporados regularmente na dieta, desempenham um papel fundamental na promoção da saúde e bem-estar. Nesse contexto, a busca por métodos analíticos alinhados com os princípios de preparo de amostra verde ganha relevância para determinar a composição fenólica dessas bebidas. Este estudo teve como objetivos desenvolver metodologias analíticas simplificadas e eficientes, minimizando o consumo de solventes, para determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva, fazendo uso da técnica de extração dispersiva em ponteira (DPX) com estireno divinil benzeno como fase extratora, e quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência. A otimização dos parâmetros de extração, como volume e pH da amostra, efeito *salting-out*, tempo e ciclos de extração e dessorção, e solvente de dessorção foi realizada por meio de abordagens univariadas e multivariadas, o que permitiu reduzir experimentos e identificar relações estatisticamente significativas entre os parâmetros avaliados. Os parâmetros analíticos foram determinados de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Além disso, para cada método desenvolvido, foi avaliado o caráter "verde" dos procedimentos analíticos e da etapa de preparo de amostra por meio de métricas analíticas, incluindo GAPI, AGREE e AGREEprep. O primeiro método proposto permitiu a determinação de doze compostos fenólicos em vinhos, abrangendo ácidos fenólicos e flavonoides, com identificação e quantificação via LC-MS/MS. Os resultados foram satisfatórios, com coeficientes de correlação superiores ou iguais a 0,9877, precisão abaixo de 20%, e recuperação variando de 87% a 114%. A aplicação do método em vinho tinto revelou a presença de compostos fenólicos majoritários, incluindo (-)-epicatequina (23,5 mg L⁻¹), (+)-catequina (19,2 mg L⁻¹) e miricetina (14,6 mg L⁻¹). O segundo método proposto visou à determinação de onze compostos fenólicos em sucos de uva, abrangendo ácidos fenólicos e flavonoides, com identificação e quantificação por HPLC/DAD. O método apresentou coeficientes de correlação superiores ou iguais a 0,9809, precisão abaixo de 20%, e recuperações variando de 80% a 120%. Notavelmente, o método mostrou ausência de efeito matriz. A aplicação do método em três amostras de suco de uva revelou a presença de ácido clorogênico (70,8-120,7 mg L⁻¹) e ácido gálico (69,6-96,1 mg L⁻¹) como os principais compostos. Ambos os métodos desenvolvidos demonstraram desempenho analítico adequado, aplicabilidade prática e excelente caráter verde. Esses resultados ressaltam a importância de um equilíbrio entre a qualidade analítica, avanços tecnológicos e responsabilidade ambiental na análise de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva. Além disso, os resultados elucidam o potencial de aplicação da DPX em análise de compostos fenólicos para trabalhos futuros com diferentes bebidas. Por fim, este projeto foi desenvolvido em consonância com alguns dos Objetivos de Desenvolvimento Sustentável (ODS) estabelecidos pela Organização das Nações Unidas (ONU). Por exemplo, o nono objetivo, que instiga a pesquisa e desenvolvimento de tecnologias inovadoras para promover a sustentabilidade, e o décimo segundo objetivo, que advoga por práticas de redução de energia e adoção de tecnologias de baixo impacto ambiental.

Palavras-chave: Preparo de amostra, Microextração, DPX, LC-MS/MS, HPLC/DAD.

ABSTRACT

Phenolic compounds not only contribute to the sensory characteristics of wines and grape juices, but also, when incorporated regularly into the diet, play a fundamental role in promoting health and well-being. In this context, the search for analytical methods aligned with the principles of green sample preparation gains relevance to determine the phenolic composition of these beverages. This study aimed to develop simplified and efficient analytical methodologies, minimizing the consumption of solvents, for determining phenolic compounds in wines and grape juices, using the dispersive pipette extraction (DPX) with divinyl benzene styrene as the extractor phase, and quantified by high-performance liquid chromatography. The optimization of extraction parameters, such as sample volume and pH, salting-out effect, extraction and desorption time and cycles, and desorption solvent was carried out through univariate and multivariate approaches, which allowed to reduce experiments and to identify of statistically significant relationship differences between the evaluated parameters. The analytical parameters were determined by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC). Furthermore, for each method developed, the "green" nature of the analytical procedures and the sample preparation stage was evaluated using analytical metrics, including GAPI, AGREE, and AGREEprep. The first proposed method allowed the determination of twelve phenolic compounds in wines, covering phenolic acids and flavonoids, with identification and quantification via LC-MS/MS. The results were satisfactory, with correlation coefficients greater than or equal to 0.9877, precision below 20%, and recovery ranging from 87% to 114%. Application of the method in red wine revealed the presence of major phenolic compounds, including (-)-epicatechin (23.5 mg L⁻¹), (+)-catechin (19.2 mg L⁻¹) and myricetin (14.6 mg L⁻¹). The second proposed method aimed to determine eleven phenolic compounds in grape juices, covering phenolic acids and flavonoids, with identification and quantification by HPLC/DAD. The method presented correlation coefficients greater than or equal to 0.9809, precision below 20%, and recoveries ranging from 80% to 120%. Notably, the method showed no matrix effect. Application of the method to three samples of grape juice revealed the presence of chlorogenic acid (70.8-120.7 mg L⁻¹) and gallic acid (69.6-96.1 mg L⁻¹) as the main compounds. Both developed methods demonstrated adequate analytical performance, practical applicability, and excellent green character. These results highlight the importance of a balance between analytical quality, technological advances, and environmental responsibility in the analysis of phenolic compounds in wines and grape juices. Furthermore, the results elucidate the potential application of DPX in the analysis of phenolic compounds for future work with different beverages. Finally, this project was developed in line with some of the Sustainable Development Goals (SDGs) established by the United Nations (UN). For example, the ninth objective instigates research and development of innovative technologies to promote sustainability and the twelfth objective advocates for energy reduction practices and the adoption of low environmental impact technologies.

Keywords: Sample preparation, Microextraction, DPX, LC-MS/MS, HPLC/DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química de 2-fenil-cromona.	28
Figura 2. Exemplos de compostos fenólicos da classe flavonoides.	28
Figura 3. Exemplos de ácidos derivados hidroxibenzóicos e ácidos derivados hidroxicinâmicos.	30
Figura 4. Representação da ponteira de extração empregada em DPX.	39
Figura 5. Etapas do procedimento padrão de DPX.	39
Figura 6: Pictograma GAPI.	44
Figura 7: Gráfico de barras obtidos na otimização da fase de extração do método para extração de compostos fenólicos em vinho. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de doze compostos fenólicos.	67
Figura 8: Gráfico de contorno obtido do planejamento Simplex Lattice na otimização do solvente de extração do método para extração de compostos fenólicos em vinho. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica das áreas dos picos de doze analitos.	69
Figura 9: Gráfico de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionário 2 ⁷ -3 para avaliação dos parâmetros estatisticamente significativos na extração de compostos fenólicos em vinho.	71
Figura 10. Superfície de respostas do planejamento <i>Doehlert</i> para a otimização do volume e pH da amostra do método de extração de compostos fenólicos em vinho.	72
Figura 11. Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção do método de extração de compostos fenólicos em vinho.	73
Figura 12. Superfícies de respostas do planejamento Composto Central para otimização da concentração de sal, ciclos de extração e tempo de extração no método de extração de compostos fenólicos em vinho.	74

Figura 13. Gráfico de Lenth's para avaliação da robustez do método de extração de compostos fenólicos em vinho. A – Temperatura da coluna (°C), B – Volume de injeção (mL), C – pH, D – Volume de amostra (mL), E – Ciclos de extração, F – Solvente de dessorção, G – Volume de solvente de dessorção.	80
Figura 14. Resultado da avaliação verde da metodologia analítica proposta para determinação de compostos fenólicos em amostras de vinho; A: GAPI, B: AGREE e C: AGREEprep.....	82
Figura 15. Cromatogramas de onze compostos fenólicos por HPLC/DAD. 1) Ácido gálico (4,37 min); 2) Ácido protocateico (7,78 min); 3) (+)-Catequina (10,75 min); 4) Ácido clorogênico (13,07 min); 5) Ácido vanílico (13,74 min); 6) (-)-Epicaquina (14,73 min); 7) Ácido ferúlico (18,38 min); 8) Ácido <i>p</i> -cumárico (18,98 min); 9) Miricetina (24,69 min); 10) Quercetina (27,96 min) e 11) Kaempferol (30,74 min).	102
Figura 16. Gráfico de barras obtido na otimização da diluição da amostra para o método de extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze compostos fenólicos.	104
Figura 17. Gráfico de barras obtido na otimização da fase de extração do método para extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze compostos fenólicos.	105
Figura 18. Gráfico de contorno obtido do planejamento <i>Simplex Lattice</i> na otimização do solvente de extração do método para extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze analitos.....	106
Figura 19: Gráfico de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} para avaliação dos parâmetros estatisticamente significativos na extração de compostos fenólicos em suco de uva.....	108
Figura 20. Superfícies de respostas do planejamento Composto Central para otimização do volume de amostra, ciclos de extração e pH no método de extração de compostos fenólicos em suco de uva.....	110

Figura 21. Gráfico de Lenth's para avaliação da robustez do método de extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Diluição da amostra, B – pH, C – Volume da amostra (mL), D – Ciclos de extração, E – Volume de solvente (μL), F – Ácido fórmico (%) e G – Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$). 115

Figura 22. Resultado da avaliação verde da metodologia analítica proposta para determinação de compostos fenólicos em amostras de suco de uva; A: GAPI, B: AGREE e C: AGREEprep. 118

Figura 23: Gráfico de barras obtido no estudo de reuso da ponteira..... 122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fases extratoras com potencial para extração de compostos fenólicos em vinho e suco de uva.....	42
Tabela 2: Descrição dos parâmetros GAPI.	45
Tabela 3. Matriz de planejamento de misturas de superfície ternária <i>Simplex Lattice</i> para escolha do solvente de dessorção.	58
Tabela 4. Matriz de planejamento fatorial fracionário (2^{7-3}). A – Volume de amostra (mL), B – Tempo de extração (s), C – Ciclos de extração, D – Concentração de sal (% [m/v] de NaCl), E – Tempo de dessorção (s), F – Ciclos de dessorção e G – pH.....	59
Tabela 5. Matriz de planejamento <i>Doehlert</i> para otimização do pH e volume de amostra.	60
Tabela 6. Matriz do projeto composto central para otimização da concentração de sal, tempo de extração e ciclos de extração.	61
Tabela 7. Matriz de planejamento para avaliação da robustez do método por DPX para extração de compostos fenólicos em vinho. A – Temperatura da coluna (°C), B – Volume de injeção (mL), C – pH, D – Volume de amostra (mL), E – Ciclos de extração, F – Solvente de dessorção, G – Volume de solvente de dessorção.	63
Tabela 8. Massa molecular, pKa, íons precursores e produtos (m/z íon precursor \rightarrow m/z produtos) dos analitos.....	65
Tabela 9. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação de doze compostos fenólicos.....	77
Tabela 10. Precisão intradia e interdia e recuperação relativa obtida em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10).....	79
Tabela 11: Aplicação do método proposto para determinação de polifenóis em vinho.	81
Tabela 12. Comparação do método DPX e LC-MS/MS com métodos reportados na literatura para determinação de compostos fenólicos em vinho.....	86

Tabela 13. Matriz de planejamento de misturas de superfície ternária <i>Simplex Lattice</i> para escolha do solvente de dessorção do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva.....	95
Tabela 14. Matriz de planejamento fatorial 2^{7-3} do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Volume de amostra (mL), B - Tempo de extração (s), C – Ciclos de extração, D – Concentração de sal (% [m/v] de NaCl), E – Tempo de dessorção (s), F – Ciclos de dessorção e G – pH.....	96
Tabela 15. Matriz do projeto composto central para otimização do volume de amostra, pH, e ciclos de extração do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva.	97
Tabela 16. Matriz de planejamento para avaliação da robustez do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Diluição da amostra, B – pH, C – Volume da amostra (mL), D – Ciclos de extração, E – Volume de solvente (μ L), F – Ácido fórmico (%) e G – Temperatura da coluna ($^{\circ}$ C).....	99
Tabela 17. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação de onze compostos fenólicos.....	112
Tabela 18. Precisão intradia e interdia e recuperação relativa obtida em soluções de suco de uva e água ultrapura (1:20).	114
Tabela 19. Aplicação do método proposto para determinação de compostos fenólicos em suco de uva.	116
Tabela 20. Comparação do método DPX e HPLC/DAD com métodos reportados na literatura para determinação de compostos fenólicos em suco de uva.	121

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

AGREE – Analytical Greenness Calculator Metric

AGREEprep – Analytical Greenness Calculator Metric for Sample Preparation

ANOVA – Análise de Variância

DAD – Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Diode Array Detector*

DPR – Desvio Padrão Relativo

DPX – Extrao em Ponteiras Descartáveis, do inglês *Disposable Pipette Extraction*

EM – Efeito de Matriz

ESI – Ionizao por Eletrospray, do inglês *Electrospray Ionization*

FFD – Planejamento Fatorial Fracionário, do inglês *Fractional Factorial Design*

GAC – Química Analítica Verde, do inglês *Green Analytical Chemistry*

GAPI – Green Analytical Procedure Index

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do ingls *High Performance Liquid Chromatography*

LC – Cromatografia Líquida, do ingls *Liquid Chromatography*

LC-MS/MS – Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

LLE - Extrao Líquido-Líquido, do ingls *Liquid-Liquid Extraction*

LOD - Limite de Deteco, do ingls *Limit of Detection*

LOQ - Limite de Quantificao, do inglês *Limit of Quantification*

MEPS - Microextrao por Sorventes Empacotados, do inglês *Microextraction by Packaged Sorbents*

MRM – Monitoramento de Reaoes Múltiplas, do inglês *Multiple-reaction Monitoring*

MS – Espectrometria de Massas, do inglês *Mass Spectrometry*

ODS – Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

ONU – Organização das Nações Unidas

PTFE – Politetrafluoretileno

RP – Fase Reversa, do inglês *Reverse Phase*

SAX – Troca forte de ânions, do inglês *Strong Anion Exchange*

SCX – Troca forte de cátions, do inglês *Strong Cation Exchange*

Si – Sílica

SBSE - Extração Sortiva com Barra de Agitação, do inglês *Stir-Bar Sorptive Extraction*

SLE – Extração Sólido-Líquido, do inglês *Solid-Liquid Extracion*

SPE - Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*

SPME - Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction*

WAX – Troca fraca de ânions, do inglês *Weak Anion Exchange*

WCX – Troca fraca de cátions, do inglês *Weak Cation Exchange*

μ -QuEChERS – Micro QuEChERS, rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês *Quick, Easy, Cheap, Effective, Robust and Safe*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	22
CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA.....	26
1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	26
1.1.1 Flavonoides.....	27
1.1.2 Não flavonoides.....	29
1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE UVA.....	31
1.2.1 Vinho	32
1.2.2 Suco de uva.....	33
1.3 PREPARO DE AMOSTRA	35
1.3.1 Extração dispersiva em ponteira (DPX).....	38
1.4 MÉTRICAS DE QUÍMICA ANALÍTICA VERDE.....	43
1.4.1 Green Analytical Procedure Index (GAPI)	43
1.4.2 Analytical Greenness Calculator Metric (AGREE).....	47
1.4.3 Analytical Greenness Calculator Metric for Sample Preparation (AGREEprep)	47
CAPÍTULO II - OBJETIVOS	50
2.1 Objetivo Geral	50
2.2 Objetivos específicos.....	50
CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHO POR DPX E LC-MS/MS.....	53
3.1 INTRODUÇÃO.....	53
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	56
3.2.1 Materiais, reagentes e amostras	56
3.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas	56
3.2.3 Delineamento experimental.....	57
3.2.4 Otimização do método.....	58

3.2.5 Parâmetros analíticos de mérito.....	61
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	64
3.3.1 Otimização dos parâmetros do MS/MS para os analitos e separação cromatográfica.....	64
3.3.2 Otimização do método.....	66
3.3.3 Parâmetros analíticos.....	76
3.3.4 Aplicação do método.....	81
3.3.5 Avaliação do caráter verde do método.....	82
3.3.6 Comparação com outros métodos da literatura.....	83
3.4 CONCLUSÃO PARCIAL.....	87
CAPÍTULO IV – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUCO DE UVA POR DPX E HPLC/DAD.....	89
4.1 INTRODUÇÃO.....	89
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	92
4.2.1 Materiais, reagentes e amostras.....	92
4.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas.....	92
4.2.3 Delineamento experimental.....	93
4.2.4 Otimização do método.....	93
4.2.5 Parâmetros analíticos de mérito.....	97
4.2.6 Limpeza e reuso do material sorvente.....	99
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	101
4.3.1 Análise cromatográfica.....	101
4.3.2 Otimização do método.....	103
4.3.3 Parâmetros analíticos.....	111
4.3.4 Aplicação do método.....	116
4.3.5 Avaliação do caráter verde do método.....	117
4.3.6 Comparação com outros métodos da literatura.....	119
4.3.7 Limpeza e reuso do material sorvente.....	122

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL.....	124
CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
REFERÊNCIAS	127
APÊNDICE	143

INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de métodos analíticos superou as barreiras dos métodos clássicos de extração, levando a uma expansão dos chamados métodos modernos de extração. Esse progresso teve início com a concepção da química analítica verde e se expandiu com a introdução dos princípios de preparo de amostras verde. O motor principal dessa transformação tem sido a evolução da química analítica, especialmente na melhoria dos instrumentos analíticos que possibilitam a obtenção de informações mais precisas e confiáveis das amostras analisadas. Isso, juntamente com a disseminação da quimiometria para tratar a vasta quantidade de dados gerados.

Mesmo com os avanços notáveis na instrumentação analítica, ainda existem desafios tecnológicos a serem superados na etapa de preparo de amostras. O preparo de amostra é uma etapa crítica do procedimento analítico, onde as amostras são adaptadas para serem compatíveis com os instrumentos de análise, redução de interferentes da matriz e, em alguns casos, enriquecidas para atender às demandas de sensibilidade dos métodos analíticos. Os químicos analíticos têm concentrado seus esforços no desenvolvimento de métodos de preparo de amostra por meio de técnicas de microextração, abordando questões críticas, como a redução da quantidade de amostra necessária, a minimização ou eliminação do uso de solventes orgânicos, a busca por abordagens multianalitos e a integração de etapas do processo. Esses avanços são fundamentais para promover tanto a segurança do analista quanto a preservação do meio ambiente, uma vez que essas preocupações têm sido as principais limitações dos métodos clássicos de extração, que foram utilizados ao longo de muitos anos para a determinação de diversos compostos em uma ampla variedade de amostras.

À medida que se enfrenta esses desafios, cresce a necessidade de desenvolver métodos analíticos que permitam a determinação de compostos bioativos em alimentos, alinhando-se com esses avanços. O interesse por compostos bioativos tem aumentado nos últimos anos, em resposta à busca por uma alimentação mais saudável e rica em nutracêuticos. Esses compostos, com ação direta na promoção da saúde e bem-estar, são variados em estrutura química e incluem os compostos fenólicos, carotenoides e glicosinolatos, três grandes grupos de compostos bioativos presentes na dieta humana habitual.

Os compostos fenólicos, objeto de estudo dessa tese, estão naturalmente presentes em várias plantas e desempenham papéis essenciais nas características sensoriais,

estabilidade oxidativa e propriedades antioxidantes dos alimentos de origem vegetal. Além disso, eles possuem propriedades biológicas valiosas, como atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, vasodilatadora, antimicrobiana, potencial antitumoral e neuroprotetora. Alimentos como uvas e seus derivados, como vinhos e sucos, são ricos em compostos fenólicos, e a composição química dessas bebidas está relacionada principalmente à variedade da uva, fatores de cultivo e condições de produção, o que confere propriedades bioativas únicas a essas bebidas.

Portanto, a necessidade de desenvolver métodos analíticos contemporâneos que garantam a qualidade das análises e promovam o compromisso com o meio ambiente é evidente, especialmente para atender às demandas de análises de alto padrão na identificação e quantificação desses compostos. Nesse contexto, este trabalho se concentra na técnica de extração dispersiva em ponteira (DPX), que ganhou destaque na última década pela sua simplicidade. O dispositivo de extração, com sua fase extratora livre contida numa ponteira, viabiliza a realização da extração dispersiva em ponteira. Este estudo propõe o uso da técnica DPX para a determinação de compostos fenólicos, como uma alternativa ao uso de métodos clássicos de extração, como extração líquido-líquido (LLE) e extração em fase sólida (SPE). A DPX corrobora vários princípios dos conceitos de preparo de amostra verde, com destaque para a maximização do rendimento da amostra, minimização das quantidades de amostras, solventes e reagentes necessários, e redução da quantidade de resíduos. Além disso, oferece um procedimento de extração seguro ao analista.

Este trabalho tem como foco o desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva, atendendo aos requisitos de preparo de amostra verde, sendo o primeiro estudo aplicando DPX para extração de compostos fenólicos. Foram avaliadas as vantagens e limitações em comparação com os métodos clássicos de extração e as técnicas de microextração já relatadas na literatura.

A presente tese está estruturada em quatro capítulos. No Capítulo I, revisão da literatura, são abordados os aspectos teóricos dos analitos de interesse, compostos fenólicos, incluindo compostos fenólicos em vinhos e sucos de uvas. Além disso, a revisão aborda o preparo de amostra, contemplando os avanços da química analítica verde e preparo de amostra verde, bem como aborda aspectos teóricos sobre a técnica objeto desse estudo, DPX. Por fim, a revisão aborda ferramentas recentes aplicadas para avaliar o verde dos procedimentos analíticos. No capítulo II estão apresentados o objetivo geral e os objetivos específicos da tese. No capítulo III, está apresentado o

desenvolvimento do método analítico para determinação de compostos fenólicos em vinhos. No capítulo IV, está apresentado o desenvolvimento do método analítico para determinação de compostos fenólicos em sucos de uva.

CAPÍTULO I
Revisão da literatura

CAPÍTULO I - REVISÃO DA LITERATURA

1.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos são compostos que consistem em, pelo menos, um anel aromático conjugado com um ou mais grupos hidroxilas, além de outros grupos funcionais, como ésteres, glicosídeos e éteres metílicos. Esses compostos são amplamente distribuídos nas plantas e desempenham múltiplas funções importantes. A síntese dos compostos fenólicos ocorre naturalmente como parte dos processos metabólicos secundários das plantas, tendo um papel essencial na proteção contra fatores externos, tais como radiação, danos mecânicos e infecções microbianas (SINGH et al., 2020). Quando relacionados a alimentos de origem vegetal, os compostos fenólicos estão diretamente atrelados a características sensoriais como cor, aroma e sabor, além da estabilidade oxidativa e propriedades antioxidantes (DE ARAÚJO et al., 2021).

Além de desempenharem um papel fundamental na proteção das plantas e nas suas características sensoriais, os compostos fenólicos possuem propriedades biologicamente ativas. Entre essas propriedades, destacam-se suas ações antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, vasodilatadoras, antimicrobiano, potencial antitumoral e neuroprotetor (HAAS et al., 2019; MITHUL ARAVIND et al., 2021; YAMAGATA, 2019). Nos últimos anos os compostos fenólicos têm sido objeto de crescente interesse tanto na comunidade científica como na indústria, especialmente devido às suas notáveis propriedades antioxidantes. Essas propriedades permitem que esses compostos neutralizem os radicais livres no corpo humano, reduzindo assim o estresse oxidativo e prevenindo danos celulares. A capacidade antioxidante está diretamente relacionada à presença de grupos funcionais altamente redutores nas estruturas dos compostos fenólicos (SEIFRIED; PILCH, 2012; SZABÓ et al., 2021). Radicais livres são naturalmente produzidos em todas as células como parte da função celular normal, desempenhando papéis essenciais em processos corporais. No entanto, a produção em excesso de radicais livres, proveniente de disfunções biológicas ou fatores externos como dieta inadequada, sedentarismo, exposição à radiação e o consumo regular de álcool e tabaco, pode resultar em um desequilíbrio interno no organismo humano (LOBO et al., 2010; WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Esse desequilíbrio aumenta substancialmente o risco de desenvolvimento de doenças crônicas, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer e envelhecimento precoce. Nesse contexto, os compostos fenólicos possuem estruturas químicas que lhes permitem reagir com os radicais livres

por meio de reações de transferência de átomo de hidrogênio. A estabilidade dos radicais polifenólicos resultantes está relacionada à presença de ressonância em suas estruturas, que é proporcionada pelos anéis aromáticos (SEIFRIED; PILCH, 2012).

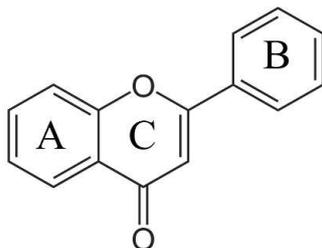
Um equilíbrio entre radicais livres e antioxidantes é necessário para o funcionamento fisiológico adequado. Os efeitos benéficos associados à introdução de compostos fenólicos na dieta humana são comprovadamente relatados na literatura (WOJTUNIK-KULESZA et al., 2020). Estudos clínicos e pré-clínicos têm demonstrado que produtos alimentícios vegetais apresentam um grande potencial como agentes terapêuticos na prevenção de diversas patologias, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas como Alzheimer, Parkinson, epilepsia e câncer (HAAS et al., 2020; REHMAN et al., 2019; YAMAGATA, 2019). Vale ressaltar que as atividades bioativas desses compostos, associados ao consumo de alimentos, dependem de alguns fatores, como concentração nos alimentos, bioacessibilidade após a ingestão, grau de polimerização, interação com outras moléculas, entre outros (DE ARAÚJO et al., 2021).

Os compostos fenólicos representam um amplo grupo de compostos orgânicos. De acordo com o número de anéis fenólicos e a variabilidade dos substituintes, são classificados em flavonoides e não flavonoides (DE CARVALHO et al., 2020). Os flavonoides incluem os subgrupos de flavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis, antocianidinas e isoflavonas. Enquanto os não flavonoides incluem os subgrupos de estilbenos, lignanas, taninos e ácidos fenólicos, esse último, inclui compostos derivados de ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos (MITHUL ARAVIND et al., 2021).

1.1.1 Flavonoides

Os flavonoides constituem um grupo de compostos de baixa massa molecular, caracterizados pelo núcleo 2-fenil-cromona em sua estrutura química. Esse núcleo inclui dois anéis aromáticos, designados como A e B, que se encontram ligados a um anel heterocíclico contendo oxigênio, denominado anel C (Figura 1) (WANG; LI; BI, 2018).

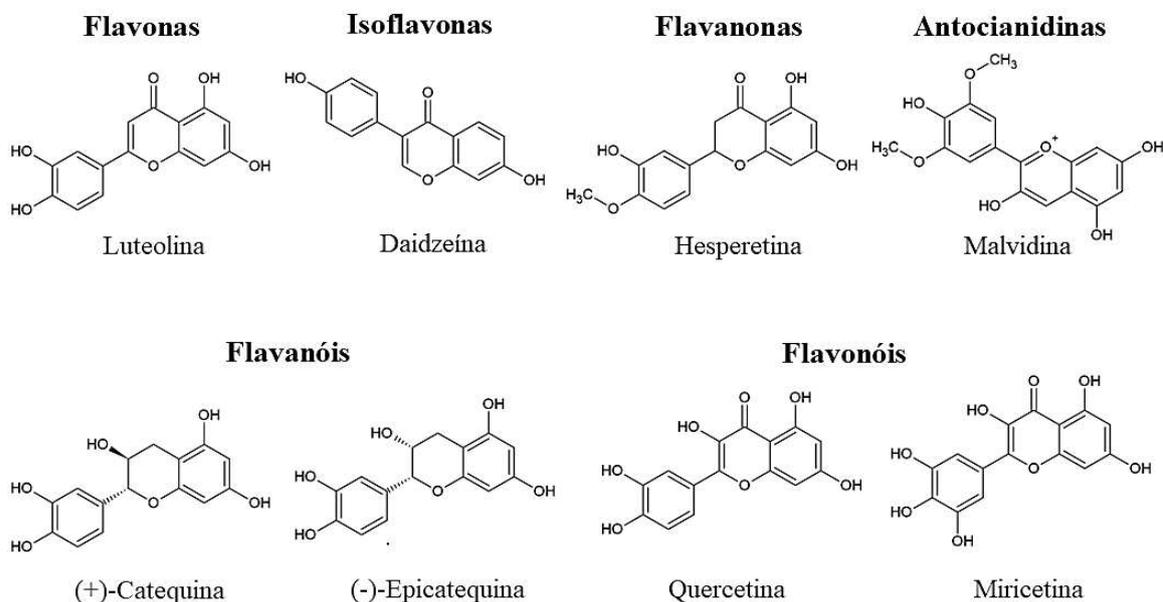
Figura 1. Estrutura química de 2-fenil-cromona.



Adaptado de WANG; LI; BI, 2018.

As subclasses dos flavonoides são categorizadas com base em diversas características, incluindo as ligações variadas entre os anéis B e C, a configuração do anel B e os padrões de hidroxilação e glicosilação dos três anéis. Na Figura 2, é apresentada a estrutura química básica das diversas classes de flavonoides, incluindo flavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis, antocianidinas e isoflavonas, juntamente com exemplos de compostos fenólicos (WANG; LI; BI, 2018).

Figura 2. Exemplos de compostos fenólicos da classe flavonoides.



Adaptado de WANG; LI; BI, 2018.

As flavonas compõem a classe predominante de flavonoides encontrados em alimentos. As principais flavonas representativas são luteolina, oroxilina, crisina e

apigenina. As principais fontes naturais de flavona são cascas de frutas e vegetais, vinho tinto e pimenta. Em relação as isoflavonas, elas são encontradas principalmente em plantas leguminosas como a soja e alguns micróbios. As isoflavonas representativas são daidzeína, pomiferina, irigenina e irisolidona. Estudos sugerem que esses compostos possuem potencial de prevenção do câncer, propriedades antioxidantes e benefícios cardiovasculares. Flavanonas, por sua vez, constituem uma classe relevante de flavonoides, abundantes em frutas cítricas, como limões, laranjas e uvas. Hesperetina, pinocembrina e naringenina são exemplos proeminentes de flavanonas que ocorrem em diversas plantas (WANG; LI; BI, 2018).

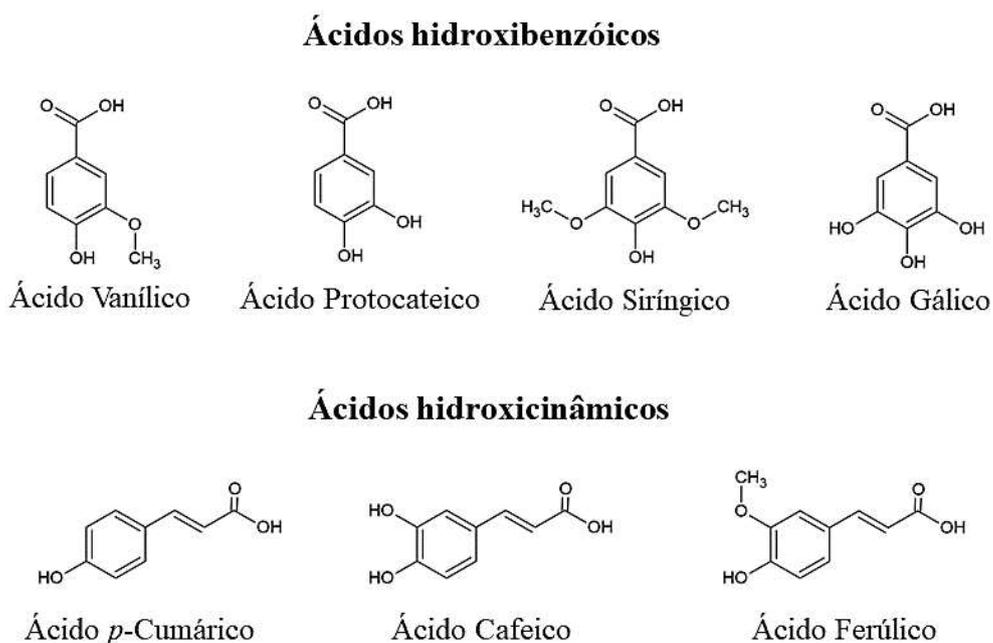
Antocianidinas, como pigmentos naturais, conferem cores vibrantes, como vermelho, azul e roxo, a uma variedade de frutas, vegetais e flores, sendo encontradas em uvas, amoras, cerejas, mirtilos e flores, como as petúnias. Os flavonóis e flavanóis representam uma importante classe de compostos fenólicos. A quercetina, kaempferol, miricetina (flavonóis) e catequinas (flavanóis) são exemplos amplamente estudados por sua presença em diferentes chás, vegetais e frutas, como a uva, que apresenta uma rica composição fenólica associada a esses compostos, predominantemente nas sementes (DECROIX et al., 2018; REHMAN et al., 2019). Além disso, o interesse nesses compostos é impulsionado por suas notáveis propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e seu potencial para fortalecer o sistema imunológico (LI et al., 2023). É importante notar que os flavonoides formam uma vasta categoria de compostos, com mais de 4 mil identificados até o momento (LI et al., 2023). Os exemplos mencionados são destacados na literatura devido ao seu papel na prevenção de doenças, uma vez que a diversidade estrutural dos flavonoides lhes confere uma ampla gama de propriedades bioativas. Estudos correlacionam a abundância desses compostos fenólicos com seus benefícios para a saúde humana (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019; SANDU; CHILOM; POPESCU, 2021).

1.1.2 Não flavonoides

Entre os não flavonoides, o grupo dos ácidos fenólicos são divididos em dois grupos principais, ácidos hidroxibenzóicos e ácidos hidroxicinâmicos (Figura 3). Quimicamente, apresentam uma estrutura com pelo menos um anel aromático e um substituinte hidroxila ligado ao anel (HELENO et al., 2015). Ácidos hidroxibenzóicos são derivados do ácido benzóico e são encontrados em alimentos na forma solúvel, conjugados com açúcares ou ácidos orgânicos, e ligados na parede celular, como ligninas.

Os derivados ácidos mais comuns são o ácido vanílico, protocateico, siríngico, gálico e elágico. Os ácidos hidroxicinâmicos são derivados do ácido cinâmico, normalmente presente nos alimentos como ésteres, ácido quínico ou glicose. Os ácidos mais comuns derivados são os ácidos ferúlico, caféico, *p*-cumárico, sinápico e clorogênico. Ácidos fenólicos são comumente encontrados em vegetais, frutas, especiarias, grãos e bebidas. Estes são responsáveis por características organolépticas típicas dos alimentos, como cor, sabor, adstringência e aspereza. Estudos sobre ácidos fenólicos ganharam grande impulso devido aos inúmeros benefícios dietéticos para a saúde humana, como atividades antioxidantes, anti-inflamatórias, imunorregulatórias, antialérgicas, antiaterogênicas, antimicrobianas, antitrombóticas, cardioprotetoras, anticâncer e propriedades antidiabéticas (KUMAR; GOEL, 2019; RASHMI; NEGI, 2020).

Figura 3. Exemplos de ácidos derivados hidroxibenzóicos e ácidos derivados hidroxicinâmicos.



Adaptado de KRAWCZYK, 2019.

Os estilbenos apresentam uma estrutura comum de 1,2-difeniletileno e são biossintetizados por plantas em resposta ao estresse biótico e abiótico. Essa classe de compostos apresenta extraordinário potencial a saúde humana, como atividades anticâncer e antioxidante. As principais fontes dietéticas de estilbenos são frutas como uvas, mirtilos e cacau (GUERRERO et al., 2020; KRAWCZYK, 2019). O resveratrol,

composto que apresenta duas formas isoméricas, *cis* e *trans*, está entre os estilbenos mais relevantes na natureza. Sua estrutura consiste em dois anéis aromáticos unidos por uma cadeia etilênica. O *trans*-resveratrol está especialmente relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares (ZHOU et al., 2020).

Os taninos são substâncias fenólicas macromoleculares com massa molar entre 300 e 3000 g mol⁻¹ que apresentam diferentes propriedades estruturais. São normalmente classificados de acordo com suas estruturas moleculares em taninos hidrolisáveis e taninos condensados (CAPRARULO; GIROMINI; ROSSI, 2021). Os taninos hidrolisáveis são subdivididos em galotaninos e elagitaninos. Taninos hidrolisáveis são constituídos por combinações de fenólicos, como ácido gálico, ácido elágico, ácido digálico e ésteres de açúcares. Os taninos condensados, também conhecidos como proantocinidinas, consistem em polímeros polifenólicos de flavonoides de unidade de poli-hidroxi-flavan-3-ol (IBRAHIM; YASER; LAMAMING, 2021). De modo geral, os taninos são amplamente distribuídos em diversas espécies de plantas (KUMAR et al., 2020).

Lignan são compostos fenólicos com estrutura química complexa categorizados em vários subgrupos. Os monolignóis são lignanas derivadas da dimerização de ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos sinápico, *p*-cumárico e ferúlico, que dão origem a dímeros denominados de neolignanos. Ademais, as lignanas também se apresentam como oligômeros complexos, como dilignanas e sesquilignanas. As lignanas não são facilmente encontrados na natureza em sua forma livre, mas ligadas a outras moléculas, principalmente como derivados glicosilados (SOLEYMANI et al., 2020; ZHANG et al., 2021).

1.2 COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHOS E SUCOS DE UVA

A uva (*Vitis spp*) é uma das frutas mais cultivadas mundialmente, destinada principalmente à produção de vinhos e sucos. Entre as espécies, a *Vitis vinífera* é explorada para vinhos finos, enquanto a *Vitis labrusca* é preferida para vinhos de mesa e sucos. Tanto a uva quanto seus derivados, como sucos e vinhos, exibem um rico perfil fenólico que desempenha um papel fundamental nas características sensoriais, incluindo cor, aroma, sabor, amargor e adstringência, além de serem uma importante fonte de compostos bioativos. Os compostos fenólicos estão concentrados principalmente na casca, caule, folha e sementes (GARRIDO; BORGES, 2013; TOALDO et al., 2016). A composição fenólica em produtos como suco de uva e vinho está diretamente ligada à

fatores como variedade da uva, práticas de cultivo e métodos de produção (HAAS et al., 2019).

1.2.1 Vinho

O vinho é uma bebida alcoólica resultante da fermentação total ou parcial do mosto da uva. O processo de vinificação está intimamente ligado a qualidade e variedade da composição fenólica dos vinhos. O processamento inicia-se com a colheita das uvas, que são destinadas à etapa de desengace. Após a etapa de desengace, é realizado o esmagamento das uvas para a extração do suco. Em seguida, ocorre a maceração, na presença de cascas e sementes de uvas (vinho tinto), com objetivo de extrair os compostos fenólicos e os pigmentos da casca. Após esta etapa é realizada a fermentação primária (fermentação alcoólica), que se inicia com a inoculação de levedura no mosto (BAUTISTA-ORTÍN et al., 2005).

O processo de fermentação alcoólica é a etapa em que ocorrem as principais transformações bioquímicas na elaboração dos vinhos, como a transformação da glicose e frutose, levando à formação de etanol e gás carbônico, além de produtos secundários como glicerol, ácidos, entre outros. Diferentemente do processo de vinificação da uva tinto, com a uva branca as cascas e sementes normalmente não estão envolvidas na etapa de fermentação, o que altera significativamente a composição fenólica do produto final (DWYER; HOSSEINIAN; ROD, 2014). Após a primeira fermentação, no vinho tinto é realizada a separação das cascas e sementes na etapa de prensagem e opcionalmente é realizada a fermentação secundária (fermentação malolática), em que as bactérias lácticas transformam o ácido málico (dicarboxílico) em ácido lático (monocarboxílico). Este, por sua vez, contribui para a complexidade de aromas e sabores do vinho, além de conferir estabilidade microbiológica ao produto. Por fim, o vinho é maturado, clarificado, estabilizado e engarrafado, para então ser comercializado (PEIXOTO et al., 2018).

Os benefícios do vinho para a saúde são amplamente relatados devido às inúmeras propriedades bioativas apresentadas pela bebida. Entre os potenciais efeitos positivos à saúde relacionado ao consumo de compostos fenólicos presentes no vinho já relatados na literatura, destacam-se seu potencial contra alguns tipos de câncer, diabetes tipo 2, obesidade e doenças cardiovasculares (GREYLING et al., 2016). Atualmente, o conhecimento da relação entre a qualidade e composição fenólica de vinhos é um dos grandes desafios em enologia. Os compostos fenólicos mais recorrentes em uvas e vinhos incluem flavonoides, como antocianidinas, flavonóis e flavanóis e não flavonoides como

estilbenos, ácidos fenólicos e taninos (NASH et al., 2018). Diversos ácidos hidroxibenzóicos já foram identificados em vinhos. Entre os mais abundantes estão os ácidos protocateico, vanílico, gálico e serínico. O ácido gálico está presente em maior abundância, além disso, atua como precursor de todos os taninos hidrolisáveis e está contido nos taninos condensados (BADERSCHNEIDER; WINTERHALTER, 2001). Os ácidos hidroxicinâmicos são uma das classes mais representativas de ácidos fenólicos presentes no vinho, incluindo os ácidos *p*-cumárico, caféico, ferúlico e sinápico (KALLITHRAKA; SALACHA; TZOUROU, 2009). A (+)-catequina e seu enantiômero (-)-epicatequina, bem como seus derivados, incluindo epigalocatequina, galato de epicatequina, galocatequina e galato de epigalocatequina são os flavanóis mais abundantes na natureza, estão presentes nas cascas e sementes das uvas, e consequentemente presentes nos vinhos. Entre os flavonóis, a quercetina, kaempferol, miricetina, laricitrina e siringetina são comumente encontradas em diferentes tipos de vinhos e uvas *Vitis Vinifera* (GARRIDO; BORGES, 2013). Além disso, diferentes açúcares podem estar ligados aos flavonóis, produzindo glicosídeos, glicuronídeos, galactosídeos e diglicosídeos (JEFFERY; PARKER; SMITH, 2008). Entre os estilbenos, o *trans*-resveratrol é amplamente relatado em vinhos de diferentes origens (FABJANOWICZ; PŁOTKA-WASYLKA; NAMIEŚNIK, 2018).

É importante ressaltar que a diversidade de compostos fenólicos presentes no vinho depende da variedade de uva utilizada na elaboração da bebida e de fatores como maturidade da uva, fatores ambientais nas vinhas (solo, clima, estágio sanitário), condições de cultivo, tecnologia de vinificação, bem como as condições de fermentação e envelhecimento. Adicionalmente, além dos processos básicos já descritos, práticas pré-fermentativas, como adição de dióxido de enxofre e ácido ascórbico anterior ao esmagamento ou maceração, fermentação primária e secundária, fenômenos de precipitação, oxidação, adsorção, inoculação de diferentes cepas de leveduras, juntamente com atividade de β -glicosidase e clarificação com alguns agentes de colagem (usados nas operações de clarificação e filtração do vinho) também podem influenciar os níveis de compostos fenólicos durante o processo de vinificação (GARRIDO; BORGES, 2013).

1.2.2 Suco de uva

O suco de uva é uma bebida natural e não alcoólica que contém os nutrientes presentes nas uvas, como açúcares, minerais e compostos fenólicos. A produção de sucos é realizada principalmente pela exploração das variedades americanas *Vitis labrusca*,

incluindo a Isabel, Bordô, Concord e Niágara (HAAS et al., 2016). É um dos sucos de frutas preferidos devido ao seu sabor, aroma, cor e frescor aceitáveis e aos atributos funcionais e potenciais benefícios à saúde (GULER, 2023). De acordo com a Organização Internacional da Vinha e do Vinho (OIV), os Estados Unidos, Espanha, Brasil e Alemanha são os maiores consumidores de suco de uva no mundo. Além disso, o Brasil se destaca na liderança de maior extensão de plantação de videiras da espécie *Vitis labrusca*.

A composição química dos sucos é influenciada por fatores como condições de cultivo, condições climáticas e variedade da uva, cada cultivar apresenta uma composição fenólica peculiar e a avaliação deste perfil é sugerida como ferramenta de autenticidade, qualidade e identificação de bebidas de uva (GRANATO et al., 2016). Além disso, o processamento da bebida também possui influência na composição fenólica do produto. Cabe ressaltar, que diferentemente do processamento do vinho, os sucos de uva não são submetidos à fermentação, o que pode levar a propriedades particulares para o suco da uva (HAAS et al., 2016).

O processamento da bebida inicia-se com a separação do engaço das bagas, seguido por esmagamento das uvas, realizado por desengaçadeira e esmagadeira mecânica, respectivamente. Seguidamente é realizada etapa de maceração, que pode ser realizado por duas principais técnicas: maceração a quente e maceração a frio. No método de maceração a quente, enzimas pectolíticas são adicionadas às uvas esmagadas em temperatura entre 60 e 62 °C, e o mosto de uva é incubado durante 30 a 60 minutos para aumentar a liberação de compostos fenólicos e outros componentes solúveis. O tratamento enzimático é realizado para reduzir a turbidez do suco de uva. No método de maceração a frio, o mosto de uva é resfriado e o dióxido de enxofre é adicionado para inibir enzimas oxidativas e microrganismos indesejáveis. Em seguida, as enzimas pectolíticas são misturadas ao mosto para a degradação estrutural e transferência de compostos fenólicos e outros componentes solúveis (GULER, 2023). Após essas etapas, o suco extraído segue para etapa de clarificação, onde ocorre a remoção dos sólidos suspensos por centrifugação ou filtração. Seguido por pasteurização, engarrafamento e armazenamento (LIMA et al., 2015).

O suco de uva é relatado como uma excelente alternativa de bebida não alcoólica. Além disso, o suco de uva está atrelado a diversos benefícios a saúde associados a composição fenólica, tais como, aumento da capacidade antioxidante, melhora da função endotelial, inibição da agregação plaquetária, diminuição da oxidação das proteínas

plasmáticas, redução da oxidação da lipoproteína de baixa densidade e melhora da função cardiovascular e neurocognitiva (NATIVIDADE et al., 2013). Os principais compostos fenólicos geralmente presentes nos sucos de uva são antocianidinas, flavanóis, flavonóis, ácidos fenólicos e resveratrol (ARESTA et al., 2018). Os compostos fenólicos amplamente relatados em sucos de uva de variedades americanas *Vitis labrusca* incluem, ácido clorogênico, ácido cinâmico, ácido gálico, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido protocateico, ácido cafeico, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico entre os ácidos fenólicos, e quercetina, kaempferol, miricitina, (+)-catequina, (-)-epicatequina entre os flavonoides (TASHAKKORI; TAĞAÇ; MERDIVAN, 2021; TOALDO et al., 2015). Os compostos fenólicos da uva têm sido extensivamente relatados na literatura, principalmente em relação aos vinhos finos (*Vitis vinifera*). No entanto, o aumento na produção de uvas *Vitis Labrusca* e, conseqüentemente, de suco de uva com grande potencial econômico, tem movido um crescente interesse na pesquisa das propriedades bioativas e na composição fenólica desse suco (TOALDO et al., 2013).

As propriedades bioativas dos polifenóis presentes no suco de uva e nos vinhos, aliadas às características organolépticas como sabor, aroma e cor, desempenham um papel crucial na apreciação dessas bebidas, não apenas pelo prazer sensorial, mas também pela promoção da saúde e bem-estar. Esta interação entre características sensoriais e benefícios à saúde tem impulsionado pesquisas, buscando correlacionar a presença de compostos fenólicos com os potenciais benefícios associados ao consumo regular. Contudo, a análise química dessas amostras enfrenta desafios consideráveis devido à sua complexidade, exigindo precisão na identificação dos diversos polifenóis presentes. Diante desse cenário, destaca-se a importância de métodos analíticos eficientes para uma caracterização mais detalhada e precisa, proporcionando uma compreensão abrangente dos elementos que contribuem para a qualidade e potenciais benefícios à saúde dessas bebidas.

1.3 PREPARO DE AMOSTRA

A análise de amostras alimentícias é um desafio a ser cumprido, principalmente quando o objetivo é isolar os analitos da matriz, uma vez que os alimentos compreendem um grupo de matrizes complexas que apresentam uma grande variedade em sua composição (MALEKI; CRESPO; CABANILLAS, 2019). Atualmente, não existe um procedimento único para a recuperação de compostos fenólicos a partir de materiais vegetais. Desse modo, há uma crescente necessidade de estabelecer métodos otimizados

de preparo de amostra para a extração de compostos fenólicos presentes em diferentes amostras. Além disso, deve-se considerar quais compostos deseja-se extrair, como compostos fenólicos totais, classes específicas de compostos fenólicos ou apenas um composto fenólico em particular, bem como, considerar para quais fins a extração está sendo realizada, como quantificação, identificação ou elucidação estrutural. Os procedimentos de extração e quantificação de compostos fenólicos são úteis para determinar seus efeitos na bioatividade, bioacessibilidade e biodisponibilidade na determinação de benefícios à saúde (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Um procedimento analítico para determinação de algum analito compreende etapas resumidas como amostragem, preparo de amostra, medição analítica e avaliação dos dados. O preparo de amostras desempenha um papel crucial no procedimento analítico. Durante essa etapa, os objetivos podem incluir a extração, isolamento, limpeza, remoção de interferentes e a pré-concentração dos analitos. Ou seja, é nessa etapa que as amostras são frequentemente convertidas para um formato compatível com o instrumento de análise, limpas de interferentes da matriz e em alguns casos, o preparo de amostra envolve o enriquecimento do analito para atender às necessidades de sensibilidade do método analítico (SAMMANI; CLAVIJO, 2021). Na literatura, técnicas clássicas têm sido amplamente aplicadas com eficiência bastante satisfatória para diversos analitos para uma ampla gama de matrizes, incluindo extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) e extração sólido-líquido (SLE, do inglês *solid-liquid extraction*) (CARASEK; MORÉS; MERIB, 2018). Em especial, para compostos fenólicos, além das técnicas mencionadas, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é frequentemente relatada (ANTICONA et al., 2022; SILVA et al., 2011). No entanto, uma série de limitações estão atreladas a essas técnicas, incluindo os altos volumes de amostras e solventes orgânicos tóxicos e os longos períodos associados a extração, o que resulta em preparos de amostras extremamente laboriosos (DESEO et al., 2020).

Atualmente, há um crescente interesse em técnicas modernas de preparo de amostras, com ênfase na miniaturização das abordagens tradicionais. O principal objetivo é substituir as técnicas clássicas, simplificando o processo de análise, utilizando técnicas mais econômicas, e com menor uso de solventes orgânicos tóxicos. Estas devem assegurar resultados consistentes para análises de rotina e estar em conformidade com os princípios da química verde. O conceito de química verde surgiu na década de 1990 como uma forma de promover escolhas mais conscientes em termos de saúde humana e meio ambiente em todos os processos químicos. Seguidamente, Paul Anastas reconheceu o

papel crucial do desenvolvimento de métodos analíticos e designou a química analítica verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*) como uma área emergente na Química Verde, relevante para a área de pesquisa e para o setor industrial (ANASTAS, 1999). O GAC teve como objetivo redefinir e reavaliar métodos analíticos abordando a aplicação de solventes e reagentes tóxicos, geração de resíduos, segurança do analista e eficiência energética.

Anos mais tarde, doze princípios da GAC foram introduzidos por Galuska, Migaszewski e Namiesnik (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). A saber:

1. Técnicas analíticas diretas devem ser aplicadas para evitar o preparo de amostra;
2. Menor quantidade e número de amostras;
3. Medições *in situ* devem ser realizadas;
4. A integração de processos analíticos e operações que economizem energia e reduzam o uso de reagentes;
5. Métodos automatizados e miniaturizados devem ser selecionados;
6. Derivatização deve ser evitada;
7. A geração de um grande volume de resíduos deve ser evitada e a gestão adequada dos resíduos deve ser fornecida;
8. Métodos multi-analitos ou multi-parâmetros são preferidos *versus* métodos que analisem um analito de cada vez;
9. O uso de energia deve ser minimizado;
10. Os reagentes obtidos a partir de fontes renováveis devem ser preferidos;
11. Os reagentes tóxicos devem ser eliminados ou substituídos;
12. A segurança do operador deve ser aumentada.

Recentemente, os princípios do preparo de amostra verde foram introduzidos por López-Lorente et al. como uma forma de contemplar os avanços tecnológicos e esforços científicos na área de preparo de amostra. Uma vez que, o primeiro princípio de GAC sugere a aplicação de técnicas analíticas diretas para evitar a preparo de amostras (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Porém, em grande parte dos procedimentos de medições, a etapa de preparo de amostra é indispensável e crucial para obtenção de bons resultados. Nesse sentido, foram definidos dez princípios do Preparo de Amostra Verde (LÓPEZ-LORENTE et al., 2022). A saber:

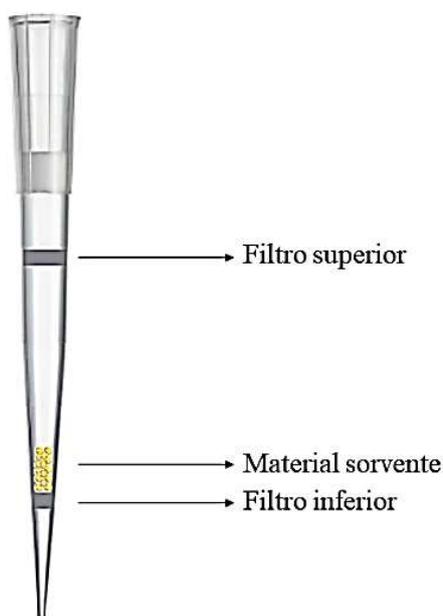
1. Favorecer o preparo de amostras *in situ*;
2. Usar solventes e reagentes mais seguros;
3. Visar materiais sustentáveis, renováveis e reutilizáveis;
4. Minimizar resíduos;
5. Minimizar a quantidade de amostra, produtos químicos e materiais;
6. Maximizar o rendimento da amostra;
7. Integrar etapas e promover automação;
8. Minimizar o consumo de energia;
9. Escolher o método de análise mais verde após o preparo de amostra;
10. Garantir procedimentos mais seguros para o operador.

Nesse sentido, as técnicas de microextração baseiam-se na miniaturização das técnicas clássicas de extração, apresentando características baseadas nesses princípios. (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015). Técnicas de microextração em fase sólida baseadas em sorventes vem permitindo desenvolver métodos analíticos mais sensíveis e seletivos, resultado em maior eficiência de extração e limpeza da amostra, além de notável pré-concentração do analito, quando comparadas as técnicas clássicas. Até o momento, diversas técnicas baseadas em sorvente foram aplicadas para extrair compostos bioativos de matrizes complexa, incluindo microextração em fase sólida (SPME), μ -QuEChERS (acrônimo de rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro), microextração por sorventes empacotados (MEPS), μ SPEed® e extração sortiva com barra de agitação (SBSE) (CASADO et al., 2020).

1.3.1 Extração dispersiva em ponteira (DPX)

A extração dispersiva em ponteira (DPX, do inglês *dispersive pipette extraction*) foi desenvolvida em 2003 pelo Dr. William Brewer na Universidade da Carolina do Sul, EUA, baseada nos princípios da técnica de extração em fase sólida (SPE), com o intuito de realizar extrações com reduzido volume de solventes e tempo de preparo de amostra. Nessa técnica, uma ponteira descartável de 1 ou 5 mL é utilizada para acomodar um material sorvente solto entre dois filtros porosos, fornecendo um dispositivo de extração em modo dispersivo, como pode ser observado na Figura 4 (OLIVEIRA; MARCHIONI; QUEIROZ, 2019).

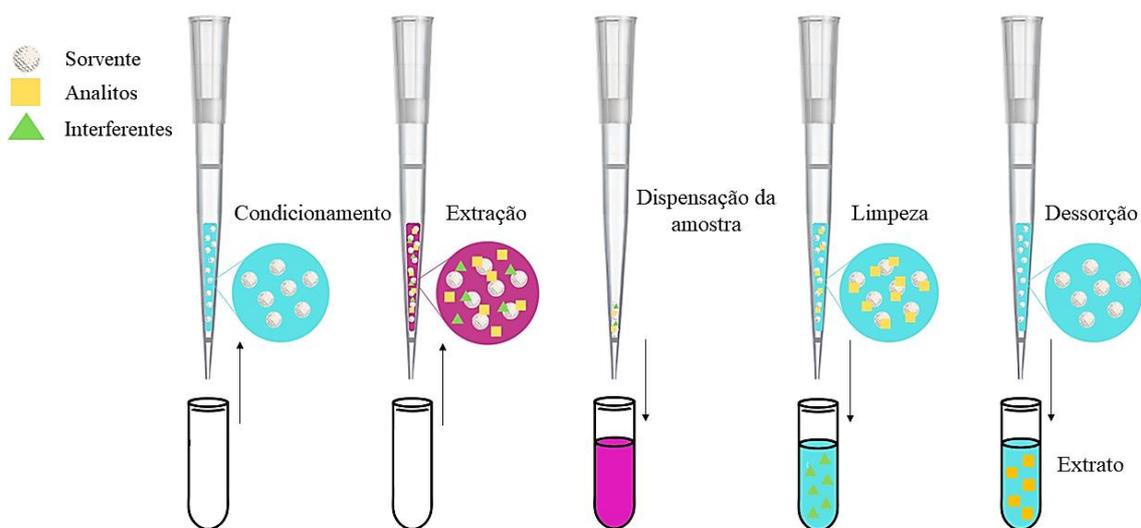
Figura 4. Representação da ponteira de extração empregada em DPX.



Elaborado pela autora (2024).

A técnica DPX apresenta algumas etapas semelhantes a técnica SPE. A extração do analito presente na amostra de interesse ocorre através da afinidade do analito pelo sorvente (fase sólida) presente no interior da ponteira. Na Figura 5 estão apresentadas as etapas envolvidas em um preparo de amostra padrão com DPX.

Figura 5. Etapas do procedimento padrão de DPX.



Elaborado pela autora (2024).

Em concordância com a Figura 5, o procedimento padrão em DPX inclui: (i) condicionamento do material sorvente com um solvente ou uma mistura deles para ativar os sítios de ligações, permitindo interações moleculares apropriadas entre a fase sólida e o analito. Além disso, essa etapa visa eliminar eventuais impurezas contidas no sorvente; (ii) a amostra aquosa ou extrato orgânico é aspirado para o interior da ponteira, seguido da aspiração de ar. O modo de distribuição do sorvente e a aspiração do ar permitem que ocorra uma mistura dinâmica com a amostra, levando a um rápido equilíbrio de adsorção entre a fase de extração e o analito; (iii) a amostra é descartada da ponteira; (iv) etapa opcional de limpeza, na qual um ou mais solventes são usados para remover interferentes que foram extraídos concomitantemente pelo sorvente e/ou remover amostra residual do interior da ponteira. O processo é semelhante a etapa de extração, nesse caso um solvente é aspirado com ar e descartado, realizado em uma ou mais vezes; e (v) etapa de dessorção dos analitos por um processo também de aspiração com ar. Nessa etapa o objetivo é romper a interação analito-sorvente, fazendo com que o analito migre para a fase orgânica. Após essa etapa, o extrato pode ser submetido a análise instrumental qualitativa ou quantitativa (BORDIN et al., 2016; PINTO; QUEIROZ, 2015)

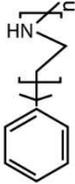
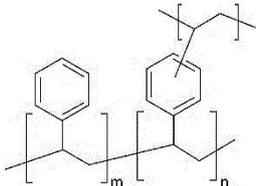
De acordo com as etapas da DPX, alguns parâmetros podem influenciar a eficiência de extração incluindo tempo de extração, quantidade de ciclos de extração, volume, pH e força iônica da solução, tempo de dessorção, quantidade de ciclos de dessorção, solvente de dessorção e escolha da fase extratora. O tempo de extração corresponde ao tempo de contato entre a amostra e o sorvente. Para obter um desempenho de extração eficiente e boa repetibilidade, o tempo de extração deve ser controlado e otimizado, de modo a fornecer um tempo mínimo para que ocorram interações efetivas entre o analito e a fase extratora, seja por forças de Van der Waals ou por interações eletrostáticas. O tipo de interação irá depender da natureza química da fase extratora (BORDIN et al., 2016).

Na etapa da extração, é importante também otimizar a quantidade de ciclos realizados. Um ciclo de extração compreende ao ato de aspirar a amostra e o ar, manter a amostra em contato com o sorvente e por fim dispensar a amostra. Desse modo, é possível realizar um ciclo ou mais na mesma alíquota ou alíquotas adicionais da amostra. O objetivo de utilizar novas alíquotas está relacionado com a demanda por volume de amostra, disponibilizando assim, uma nova porção de analitos para interagir com o sorvente. Essa opção é normalmente requerida quando os analitos encontram-se em baixas concentrações na amostra (BORDIN et al., 2016). Além do volume, o pH e a força

iônica da amostra devem ser avaliados. A avaliação do pH da amostra irá depender do mecanismo de interação entre o analito e o sorvente. Em casos de fases extratoras de troca iônica, é desejável que o analito esteja em sua forma ionizada. Para mecanismo de sorção via forças de Van der Waals, é preferível que o analito esteja em sua forma neutra. Por fim, a presença de sais pode interferir na solubilidade de compostos orgânicos em água, facilitando a migração para o sorvente (CORAZZA et al., 2017).

Após a extração, quando necessário, uma etapa de limpeza com um ou mais solventes deve ser aplicada para remover interferentes. O processo é semelhante a etapa de aspiração da amostra, ou seja, o solvente é aspirado e descartado uma ou mais vezes. A escolha do solvente de lavagem deve considerar a natureza química dos possíveis interferentes da matriz, bem como a interação química estabelecida entre o analito e a fase de extração. Por fim, na etapa de dessorção, onde o analito deve migrar para a fase orgânica para posterior análise instrumental, os parâmetros que devem ser avaliados incluem, tempo, ciclos e solvente de dessorção. Ambos, estão relacionados com o objetivo de romper a interação entre o analito e o sorvente (BORDIN et al., 2016). Em relação à fase extratora, a massa e o tipo de sorvente devem ser avaliados. Na escolha do sorvente, deve-se considerar as características químicas dos analitos e da matriz. Algumas das fases disponíveis comercialmente incluem DPX-WAX (*Weak Anion Exchange*), DPX-WCX (*Weak Cation Exchange*), DPX-SCX (*Strong Cation Exchange*), DPX-SAX (*Strong Anion Exchange*), DPX-Si (Silica), DPX-C₁₈ e DPX-RP (*Reverse Phase*). Na Tabela 1 estão listadas as fases extratoras consideradas para a extração de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva.

Tabela 1. Fases extradoras com potencial para extração de compostos fenólicos em vinho e suco de uva.

Ponteira	Estrutura Química	Composição Química
DPX-WAX		Polímero Estireno Divinil Benzeno com grupos poliamina
DPX-C ₁₈		18-22% de C ₁₈ ligado a sílica gel
DPX-RP		Polímero Estireno Divinil Benzeno

As fases extradoras DPX-RP e DPX-WAX apresentam em sua composição a presença de estireno divinil benzeno que são passíveis de realizar interações do tipo π com moléculas que possuam elétrons π em sua estrutura, como os compostos fenólicos. Adicionalmente a DPX-WAX possui uma fase amina secundária capaz de interagir por ligações de hidrogênio, bem como promover interações de troca aniônica. A DPX-C₁₈ por sua vez, apresenta uma estrutura química simples indicada para interações hidrofóbicas (DPX Technologies).

De modo geral, a extração de analitos com DPX é um método promissor devido as suas diversas vantagens em relação a outras técnicas de extração em fase sólida. A técnica permite realizar um preparo de amostra simples e rápido, que requer baixos volumes de solventes orgânicos. Além disso, o tempo de preparo de amostra é reduzido e a DPX apresenta a possibilidade de realizar extrações em paralelo com dispositivos multicanais para aumentar a frequência analítica, além de requerer pequenas quantidades de amostra, uma vez que quantidades menores de solvente e material sorvente são utilizadas. Por se tratar de uma técnica que envolve diferentes parâmetros é recomendável o uso de ferramentas experimentais multivariadas, uma vez que, o número de experimentos é reduzido e é possível revelar relações entre os parâmetros estudados. A

técnica de DPX ainda permite trabalhar com sistema automatizado, fornecendo análises mais precisas e exatas (OENNING; MERIB; CARASEK, 2018). Porém, a DPX é uma técnica relativamente nova, de modo que as fases de extração disponíveis comercialmente ainda são limitadas. A contrapartida, estudos aplicando DPX com novas matérias sorventes vem sendo relatados na literatura, como materiais sintetizados e sorventes naturais, por exemplo a cortiça (CHAVES et al., 2015; MAFRA et al., 2018).

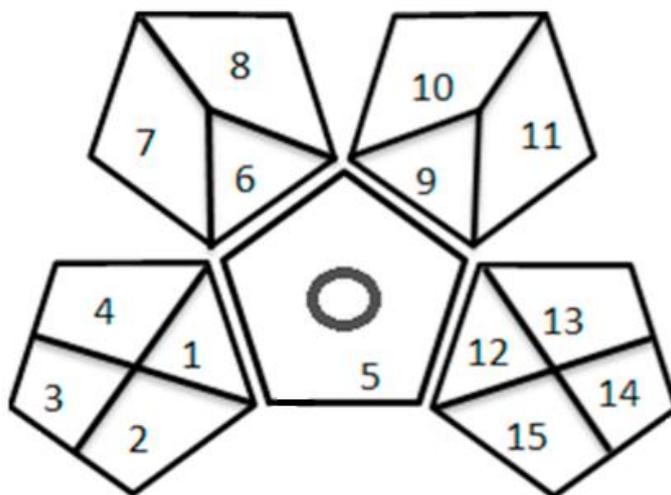
1.4 MÉTRICAS DE QUÍMICA ANALÍTICA VERDE

Métricas de química analítica verde são ferramentas úteis na avaliação do verde dos procedimentos analíticos. Ao longo dos anos, diversas métricas foram desenvolvidas para tal avaliação, considerando aspectos de amostragem, preparo de amostra e análise instrumental. Nesta revisão, será abordado três métricas, incluindo *Green Analytical Procedure Index* (GAPI), *Analytical Greenness Calculator Metric* (AGREE) e *Analytical Greenness Calculator Metric for Sample Preparation* (AGREEprep). As razões para a inclusão dessas métricas são a sua relevância atual e ampla adoção. Essas métricas permitem uma avaliação abrangente de dados, tanto semiquantitativos quanto quantitativos, que determinam se um procedimento analítico pode ser classificado como verde, facilitando assim a tomada de decisões baseada em dados.

1.4.1 Green Analytical Procedure Index (GAPI)

A ferramenta *Green Analytical Procedure Index* (GAPI) desenvolvida em 2018 é capaz de avaliar o caráter verde de toda uma metodologia analítica, desde a coleta da amostra até a determinação final, incluindo avaliação sobre os riscos químicos para a saúde e para o ambiente, quantidade de resíduos e demandas energéticas. Essa ferramenta apresenta o resultado através de um pictograma em cores, com três níveis de avaliação para cada etapa. Onde, verde apresenta baixo impacto ambiental, amarelo médio impacto ambiental e vermelho alto impacto ambiental (PŁOTKA-WASYLKA, 2018). O pictograma GAPI pode ser gerado a partir de um software gratuito (PŁOTKA-WASYLKA; WOJNOWSKI, 2021). A Figura 6 apresenta o pictograma GAPI e a Tabela 2 apresenta a descrição dos parâmetros.

Figura 6: Pictograma GAPI.



Adaptado de (PŁOTKA-WASYLKA, 2018).

Tabela 2: Descrição dos parâmetros GAPI.

Categoria	Verde	Amarelo	Vermelho
Coleta da amostra			
Amostragem (1)	<i>In-line</i>	<i>On-line</i>	<i>Off-line</i>
Preservação da amostra (2)	Nenhuma	Química ou física	Química e física
Transporte da amostra (3)	Nenhum	Obrigatório	-
Armazenamento da amostra (4)	Nenhum	Em condições normais	Sob condições especiais
Preparo de amostra			
Tipo do método (5)	Sem preparo de amostra	Procedimentos simples, por exemplo. filtração, decantação	Extração necessária
Escala da extração (6)	Nano-extração	Microextração	Macroextração
Solventes/Reagentes (7)	Método sem solventes/reagentes	Solvente/reagentes verdes	Solventes/reagentes não verdes usados
Tratamentos adicionais (8)	Nenhum	Tratamentos simples (limpeza, remoção de solventes, etc.)	Tratamentos avançados (derivatização, mineralização, etc.)
Reagentes e solventes			
Quantidade (9)	<10 mL (<10 g)	10–100 mL (10–100 g)	>100 mL (>100 g)

Perigo para a saúde (10)	Ligeiramente tóxico, ligeiramente irritante; Pontuação de risco à saúde da NFPA = 0 ou 1.	Moderadamente tóxico; poderia causar incapacidade temporária; NFPA = 2 ou 3.	Lesões graves em exposição de curto prazo; carcinógeno conhecido ou suspeito para pequenos animais; NFPA = 4.
Risco de segurança (11)	Pontuação mais alta de inflamabilidade ou instabilidade da NFPA de 0 ou 1. Sem riscos especiais.	A pontuação mais alta de inflamabilidade ou instabilidade da NFPA de 2 ou 3, ou um risco especial é usado.	Maior pontuação de inflamabilidade ou instabilidade da NFPA de 4.
Instrumentação			
Energia (12)	≤0,1 kWh por amostra		≤1,5 kWh por amostra >1,5 kWh por amostra
Risco ocupacional (13)	Selagem hermética do processo analítico	-	Emissão de vapores para a atmosfera
Resíduos (14)	<1 mL (<1 g)	1–10 mL (1–10 g)	>10 mL (<10 g)
Tratamento de resíduos (15)	Reciclagem	Degradação, passivação	Sem tratamento
MARCA ADICIONAL			
	Círculo no meio do GAPI: Procedimento para qualificação e quantificação		Nenhum círculo no meio do GAPI: Procedimento apenas para qualificação
NFPA: National Fire Protection Association			

Na Tabela 2, são apresentadas informações abrangentes sobre a avaliação de procedimentos analíticos, considerando diversas pontuações. Essas informações contemplam aspectos relacionados à coleta e preparo da amostra, reagentes, solventes e, por fim, à instrumentação utilizada para a análise dos compostos alvo. Uma diferenciação de cores é aplicada para destacar as distintas características de cada procedimento analítico.

1.4.2 Analytical Greenness Calculator Metric (AGREE)

A ferramenta *Analytical Greenness Calculator Metric* (AGREE) foi desenvolvida em 2020 e avalia o caráter verde de procedimentos analíticos considerando os doze princípios da GAC sugeridos por Galuska, Migaszewski e Namiesnik (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). O resultado é apresentado por meio de um pictograma em cores que variam entre escalas de verde, amarelo e vermelho. E adicionalmente uma pontuação é atribuída ao procedimento analítico de acordo com os dados qualitativos e quantitativos do procedimento analítico avaliado, considerando 1,0 como uma pontuação excelente. Com o resultado, é possível estimar quais parâmetros do procedimento analítico estão adequados segundo as diretrizes de GAC, e quais precisam ser aprimorados. O pictograma AGREE pode ser gerado a partir de um software gratuito (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020).

1.4.3 Analytical Greenness Calculator Metric for Sample Preparation (AGREEprep)

A ferramenta *Analytical Greenness Calculator Metric for Sample Preparation* (AGREEprep) foi desenvolvida em 2022 com o objetivo de avaliar especificamente o preparo de amostra em termos de “verdura” dentro dos procedimentos analíticos. A utilização dessa métrica é proposta para complementar sinergicamente com outras ferramentas, como GAPI e AGREE. A preparação da amostra é uma etapa fundamental no procedimento analítico. Porém, essa etapa foi identificada com uma das etapas mais críticas segundo os princípios de GAC. No entanto, a possibilidade de incorporar metodologias analíticas diretas em todas as aplicações é bastante limitada, tornando a implementação de estratégias de preparo de amostras crítica para enfrentar desafios analíticos. Nesse sentido, nos últimos anos, novas abordagens de preparo de amostras estão sendo desenvolvidas com o intuito de não afetar negativamente a saúde humana ou o meio ambiente. Com isso, considerando os diferentes parâmetros que influenciam o

verde de preparo de amostra, criou-se a necessidade de desenvolver um sistema métrico específico para essa etapa que contemple os avanços tecnológicos em preparo de amostra.

A ferramenta AGREEprep avalia o caráter verde de procedimentos analíticos considerando os dez princípios de preparo de amostra verde, discutidos na seção 1.3. De forma semelhante a AGREE, o resultado é apresentado através de um pictograma em cores que variam entre escalas de verde, amarelo e vermelho, e uma pontuação é atribuída ao preparo de amostra. Cada um dos critérios de preparo de amostra verde é calculado e após uma avaliação quantitativa, o resultado do cumprimento dos critérios é refletido como uma pontuação de impacto numa escala de 0 a 1. O pictograma AGREEprep pode ser gerado a partir de um software disponível gratuitamente (WOJNOWSKI et al., 2022).

CAPÍTULO II

Objetivos

CAPÍTULO II - OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver metodologias analíticas verdes para determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva, empregando a técnica de extração dispersiva em ponteira (DPX), seguida de identificação e quantificação por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (HPLC/DAD).

2.2 Objetivos específicos

Determinação de compostos fenólicos em vinho por DPX e LC-MS/MS

- Avaliar a eficiência de extração de diferentes materiais sorventes comercialmente disponíveis para DPX, incluindo estireno divinil benzeno (DPX-RP), estireno divinil benzeno com grupos poliamina (DPX-WAX) e C₁₈ (DPX-C₁₈).
- Otimizar os principais parâmetros de extração por meio de planejamentos multivariados e univariados, incluindo pH, volume de amostra, tempo de extração, ciclos de extração, adição de sal, tempo de dessorção, ciclos de dessorção e solvente de dessorção.
- Avaliar o desempenho da metodologia analítica proposta por meio da determinação da faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e efeito de matriz.
- Aplicar a metodologia analítica desenvolvida em amostra comercial de vinho.
- Avaliar o caráter verde da metodologia por meio de três métricas verdes, incluindo GAPI, AGREE e AGREEprep.
- Avaliar as vantagens e limitações da metodologia em relação a outras publicadas na literatura.

Determinação de compostos fenólicos em suco de uva por DPX e HPLC/DAD

- Avaliar a eficiência de extração de diferentes materiais sorventes comercialmente disponíveis para DPX, incluindo estireno divinil benzeno (DPX-RP) e estireno divinil benzeno com grupos poliamina (DPX-WAX).
- Otimizar os principais parâmetros de extração por meio de planejamentos multivariados e univariados, incluindo pH, volume de amostra, tempo de extração,

ciclos de extração, adição de sal, tempo de dessorção, ciclos de dessorção e solvente de dessorção.

- Otimizar um procedimento de limpeza do material sorvente após cada extração e avaliar a estabilidade do material sorvente em extrações subsequentes.
- Avaliar o desempenho da metodologia analítica proposta por meio da determinação da faixa linear de trabalho, precisão, exatidão, robustez, limite de detecção, limite de quantificação e efeito de matriz.
- Aplicar a metodologia analítica desenvolvida em amostras comerciais de sucos de uva.
- Avaliar o caráter verde da metodologia por meio de três métricas verdes, incluindo GAPI, AGREE e AGREEprep.
- Avaliar as vantagens e limitações da metodologia em relação a outras publicadas na literatura.

CAPÍTULO III

Determinação de compostos fenólicos em vinho por DPX e LC-MS/MS

CAPÍTULO III – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM VINHO POR DPX E LC-MS/MS

3.1 INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos desempenham um papel central na complexidade do vinho, com forte influência na coloração, aroma, adstringência e sabor. Além de contribuírem para essas características sensoriais, esses compostos têm sido associados a uma gama de benefícios à saúde, como atividade antioxidante, propriedades antibacterianas e anti-inflamatórias, desempenhando um papel crucial na prevenção de condições como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (ESPITIA-LÓPEZ et al., 2015; HELM; MACDONALD, 2015). Os compostos fenólicos são produzidos naturalmente pelas plantas como parte de seu mecanismo de defesa, através de processos metabólicos secundários. Esses compostos são caracterizados por diferentes estruturas químicas e classificados em flavonoides e não flavonoides. Os flavonoides abrangem subgrupos como flavonas, flavanonas, flavanóis, flavonóis, antocianidinas e isoflavonas. Por outro lado, os não flavonoides incluem estilbenos, lignanas, taninos e ácidos fenólicos (MITHUL ARAVIND et al., 2021). Nas uvas, os compostos fenólicos podem ser encontrados em diversas partes, incluindo casca, polpa e sementes (GOMES et al., 2019). A composição fenólica da uva se estende aos seus produtos, incluindo vinho e suco de uva.

Neste estudo, os compostos fenólicos avaliados foram flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol), flavanóis ((+)-catequina, (-)-epicatequina e epigallocatequina), ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogênico, ácido cafeico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) e ácidos hidroxibenzóicos (ácido protocateico e ácido siríntrico). Estudos revelaram que quercetina e kaempferol apresentam atividades na prevenção de cancro, inflamações crônicas e doenças cardiovasculares (TOALDO et al., 2013). A miricetina possui uma variedade de atividades biológicas, como capacidade antitumoral em diferentes tipos de câncer (SONG et al., 2021). As catequinas são excelentes antioxidantes e são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos (GARRIDO; BORGES, 2013). Estudos sugerem que o consumo dessas substâncias melhora a função vascular e redução do estresse oxidativo (DECROIX et al., 2018). Os ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzóicos são encontrados em abundância em frutas e derivados, principalmente em frutos avermelhados. Ambos estão associados a modulação da defesa antioxidante em decorrência da inflamação, apresentando benefícios associados

à redução do risco de problemas cardiovasculares e outras enfermidades crônicas. Estudos epidemiológicos revelaram associação inversa entre a ingestão de ácidos hidroxibenzóicos e o risco de doenças cardiovasculares e obesidade (YAO et al., 2022). Cabe ressaltar que diversos fatores podem influenciar a composição fenólica dos vinhos, como a variedade da uva, as condições geográficas, condições de cultivo, condições climáticas e sazonais das épocas de maturação e colheita das uvas e a tecnologia aplicada durante o preparo da bebida. O controle desses fatores é o que permite obter como resultado um vinho de qualidade (GARRIDO; BORGES, 2013).

Dada a importância dos compostos fenólicos nas características sensoriais e bioativas do vinho, é essencial estabelecer métodos analíticos para determinar estes compostos nos vinhos, que sejam práticos, acessíveis e que acompanhem os avanços tecnológicos em preparo de amostra verde. O desenvolvimento de novos métodos analíticos, em especial para determinação dos compostos fenólicos no vinho, é um desafio complexo que requer atenção a diversos fatores, incluindo a baixa concentração desses compostos na amostra e a ampla diversidade de classes de compostos presentes no vinho, como ácidos orgânicos, minerais e açúcares (CAI et al., 2009). Uma parcela expressiva das análises quantitativas de compostos fenólicos em alimentos relatadas na literatura recorrem ao preparo de amostra para extração, limpeza e pré-concentração dos compostos alvos (SOUZA-SILVA; GIONFRIDDO; PAWLISZYN, 2015). Atualmente, há um interesse crescente em técnicas miniaturizadas de preparo de amostras com alta precisão e exatidão que possam substituir as técnicas clássicas de extração, uma vez que é de conhecimento geral que as técnicas clássicas, incluindo a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE), são laboriosas, demandam um longo período de extração, e, por vezes, requerem altos volumes de amostra e solventes orgânicos (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022; RUTKOWSKA et al., 2019).

Com o objetivo de aprimorar as técnicas tradicionais de extração, estão em desenvolvimento métodos de microextração avançados. Dentro desse contexto, a extração dispersiva em ponteira (DPX) tem se destacado, devido à sua capacidade de simplificar o preparo da amostra, realizar a extração em curtos períodos, e reduzir o consumo de solventes quando comparada às técnicas convencionais baseadas em extração em fase sólida (SPE). Resumidamente, a técnica DPX utiliza uma ponteira para acomodar livremente a fase de extração entre dois filtros porosos. A extração ocorre aspirando a amostra através do filtro inferior. Nesta etapa o ar é aspirado em conjunto com a amostra, promovendo uma mistura dispersiva entre a amostra e a fase de extração, resultando em

uma extração rápida e eficiente. Seguidamente, os analitos são desorvidos da fase de extração com um solvente adequado (BORDIN et al., 2016). Esse processo possibilita a pré-concentração dos analitos, permitindo a detecção de compostos mesmo em baixas concentrações, ao mesmo tempo que realiza a limpeza da amostra, removendo compostos que possam interferir na análise (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022).

Como destacado anteriormente, dada a significativa relevância dos compostos fenólicos nos vinhos e a necessidade de métodos analíticos contemporâneos para determinar sua composição fenólica, este estudo propôs o desenvolvimento de um método analítico com preparo de amostra por extração dispersiva em ponteira (DPX) para a extração de doze compostos fenólicos em vinhos, seguido por Cromatografia Líquida acoplada à Espectrometria de Massas (LC-MS/MS) para sua identificação e quantificação. As condições de extração foram otimizadas utilizando delineamentos univariados e multivariados. Os parâmetros analíticos foram determinados de acordo a Association of Official Analytical Chemists e aplicado a uma amostra de vinho tinto. O aspecto verde do método foi avaliado usando duas ferramentas analíticas, incluindo GAPI e AGREE. Por fim, o aspecto verde da etapa de preparo de amostra foi avaliado utilizando a ferramenta AGREEprep. O método desenvolvido neste estudo corrobora diversos critérios do preparo de amostra verde, com destaque para o curto tempo de extração e baixo consumo de amostras e solventes.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Materiais, reagentes e amostras

As ponteiras de extração com capacidade de 1 mL, incluindo as fases de extração: RP (Reverse Phase, polímero estireno-divinilbenzeno, massa: 20 mg, e tamanho de partícula: 75 μm), WAX (Weak Anion Exchange, fase de amina secundária com estireno-divinilbenzeno, massa: 20 mg e faixas de tamanho de partícula: 55-65 μm) e C₁₈ (massa: 50 mg e faixas de tamanho de partículas: 40-63 μm) foram adquiridas da DPX Technologies (Columbia, EUA).

Os padrões de compostos fenólicos (ácido siríngico ($\geq 98\%$), ácido protocateico ($\geq 98\%$), ácido *p*-cumárico ($\geq 98\%$), ácido ferúlico ($\geq 99\%$), ácido cafeico ($\geq 98\%$), epigallocatequina ($\geq 90\%$), (-)-epicatequina ($\geq 97\%$), (+)-catequina ($\geq 99\%$), kaempferol ($\geq 99\%$), ácido clorogênico ($\geq 99\%$), quercetina ($\geq 95\%$) e miricetina ($\geq 98\%$)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A solução estoque de cada padrão analítico e a solução da mistura de padrões, foram preparadas em solvente metanol e acondicionada ao abrigo da luz em temperatura de refrigeração (4 °C). O cloreto de sódio (grau ACS) utilizado para avaliar o efeito salino foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os solventes acetona, metanol, etanol, acetonitrila com pureza superior a 99,8% foram adquiridos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Água ultrapura (UPW) (18,2 M Ω cm⁻¹) foi obtida por meio de um sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, MA, EUA).

Uma solução hidroalcoólica (etanol 12 %, v/v) com 5 g L⁻¹ de ácido tartárico (grau ACS) foi utilizada como vinho sintético. Um vinho tinto comercial (variedade Carménère; safra 2020; origem Chile) foi adquirido comercialmente em um supermercado local. A amostra de vinho foi filtrada com um filtro de membrana de PTFE de 0,45 μm e utilizada na etapa de otimização, validação e aplicação do método.

3.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido (1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) acoplado a um espectrômetro de massas no modo de ionização negativa em um triplo quadrupolo (G6420A, Agilent Technologies) equipado com uma interface de ionização por eletrospray (ESI). A condição de separação foi desenvolvida com modificações em relação ao método descrito por Lang et al. 2019, variando o gradiente de eluição, temperatura da coluna e vazão da

fase móvel. O nitrogênio foi usado como gás de dessolvatação e gás de colisão. A separação foi realizada em uma coluna C₁₈ (50 × 2,1 mm DI, tamanho de partícula de 1,8 µm; modelo Zorbax, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany). A fase móvel foi ajustada para uma vazão de 0,350 mL min⁻¹ e consistia em (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) metanol. O programa de gradiente foi realizado da seguinte forma: 2% de B de 0 a 0,5 min, 2 a 85% de B de 0,5 a 5 min e mantido nessa proporção até o final da análise (9,5 min). O volume de injeção foi de 5 µL e a temperatura da coluna foi mantida em 30 °C. A identificação dos tempos de retenção de cada composto foi determinada pela injeção dos padrões individuais. A obtenção do conjunto de dados relacionando o íon precursor e seus respectivos produtos para cada composto foi realizada pela infusão dos padrões analíticos diretamente no sistema do espectrômetro de massas (MS). Os analitos foram monitorados e quantificados usando Monitoramento de Reação Múltipla (MRM). O íon precursor de cada analito em seu espectro de massa foi utilizado para quantificação, e os íons dos produtos obtidos foram monitorados para fins de confirmação. O software MassHunter Quantitative Analysis 10.0 foi usado para processar os resultados cromatográficos.

3.2.3 Delineamento experimental

A extração de doze compostos fenólicos em vinho foi realizada por meio da técnica DPX. Inicialmente, uma alíquota de 3200 µL de amostra de vinho e água ultrapura (1:10) com pH 3,0 foi fracionada em 4 alíquotas de 800 µL. Uma ponteira DPX com capacidade de 1 mL, contendo 20 mg da fase extratora (DPX-RP) foi utilizada. As etapas do procedimento de preparo de amostra por DPX são descritas abaixo:

- i) Condicionamento: O condicionamento da fase extratora foi realizado com 800 µL de água ultrapura.
- ii) Extração: A extração foi realizada com 5 ciclos (aspiração e dispensação) de 10 s em cada alíquota de 800 µL de amostra.
- iii) Dessorção: A dessorção foi realizada com 200 µL de metanol:acetonitrila (1:1, v/v) em 2 ciclos de 10 s.

Após o procedimento de preparo de amostra por DPX, o extrato obtido foi armazenado até o momento da análise cromatográfica. Antes da análise instrumental por LC-MS/MS, 100 µL de água ultrapura com 2% de ácido fórmico foram adicionados ao extrato.

3.2.4 Otimização do método

A otimização do método proposto foi realizada em solução de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10) enriquecida com padrões analíticos de compostos fenólicos (20 a 80 mg L⁻¹). Para realizar a otimização, o processo foi dividido em três etapas que serão descritas nos tópicos a seguir. Os tratamentos estatísticos foram realizados nos softwares Statsoft Statistica 8.0 (Statsoft, EUA) e Microsoft Excel® 365 (EUA).

3.2.4.1 Etapa 1

Inicialmente, a fase de extração e o solvente de dessorção foram otimizados. A fase de extração foi otimizada por meio de um projeto univariado, onde foram avaliadas a eficiência de extração de três fases de extração disponíveis comercialmente, incluindo DPX-RP, DPX-WAX e DPX-C₁₈. Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$) e os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e *post hoc* de teste de Tukey. O solvente de dessorção foi otimizado por meio de planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice*. Os solventes estudados foram metanol, acetonitrila e etanol. A matriz de planejamento está descrita na Tabela 3. Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de doze compostos fenólicos.

Tabela 3. Matriz de planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice* para escolha do solvente de dessorção.

Ensaio/Solvente	Metanol	Acetonitrila	Etanol
1	1,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00
4	0,50	0,50	0,00
5	0,50	0,00	0,50
6	0,00	0,50	0,50
7	0,33	0,33	0,33
8	0,33	0,33	0,33
9	0,33	0,33	0,33

3.2.4.2 Etapa II

Na etapa seguinte da otimização, um planejamento fatorial fracionário (FFD) 2^{7-3} foi realizado para selecionar as variáveis que afetam significativamente o processo de extração de compostos fenólicos em vinho por DPX. As variáveis e seus respectivos níveis foram: volume de amostra (0,8 e 3,2 mL), tempo de extração (10 e 60 s), ciclos de extração (1 e 5), adição de sal (0 e 20 % (m/v) de NaCl), tempo de dessorção (10 e 60 s), ciclos de dessorção (1 e 5) e pH (2 e 8). A matriz de planejamento está descrita na Tabela 4. Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de doze compostos fenólicos.

Tabela 4. Matriz de planejamento fatorial fracionário (2^{7-3}). A – Volume de amostra (mL), B – Tempo de extração (s), C – Ciclos de extração, D – Concentração de sal (% [m/v] de NaCl), E – Tempo de dessorção (s), F – Ciclos de dessorção e G – pH.

Experimento/ Parâmetro	A	B	C	D	E	F	G
1	0,8	10,0	1,0	0,0	10,0	1,0	2,0
2	3,2	10,0	1,0	0,0	60,0	1,0	8,0
3	0,8	60,0	1,0	0,0	60,0	5,0	2,0
4	3,2	60,0	1,0	0,0	10,0	5,0	8,0
5	0,8	10,0	5,0	0,0	60,0	5,0	8,0
6	3,2	10,0	5,0	0,0	10,0	5,0	2,0
7	0,8	60,0	5,0	0,0	10,0	1,0	8,0
8	3,2	60,0	5,0	0,0	60,0	1,0	2,0
9	0,8	10,0	1,0	20,0	10,0	5,0	8,0
10	3,2	10,0	1,0	20,0	60,0	5,0	2,0
11	0,8	60,0	1,0	20,0	60,0	1,0	8,0
12	3,2	60,0	1,0	20,0	10,0	1,0	2,0
13	0,8	10,0	5,0	20,0	60,0	1,0	2,0
14	3,2	10,0	5,0	20,0	10,0	1,0	8,0
15	0,8	60,0	5,0	20,0	10,0	5,0	2,0
16	3,2	60,0	5,0	20,0	60,0	5,0	8,0

3.2.4.3 Etapa III

Após a etapa 2 realizada como etapa de triagem, os parâmetros que influenciaram significativamente a extração, incluindo pH e volume da amostra, ciclos de extração, tempo de extração, tempo de dessorção e presença de sal foram otimizados. O volume da amostra e o pH foram otimizados usando um planejamento *Doehlert* (Tabela 5). Diferentes tempos de dessorção (10, 30 e 50 s) foram avaliados em um delineamento univariado, os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$) e os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). Por fim, a concentração de sal, o tempo de extração e os ciclos de extração foram otimizados por meio de um projeto composto central (Tabela 6). Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de doze compostos fenólicos.

Tabela 5. Matriz de planejamento *Doehlert* para otimização do pH e volume de amostra.

Experimento/parâmetros	pH	Volume de amostra (mL)
1	4,0	0,8
2	2,4	1,6
3	5,6	1,6
4	5,6	3,2
5	2,4	3,2
6	4,0	4,0
7	4,0	2,4
8	4,0	2,4
9	4,0	2,4

Tabela 6. Matriz do projeto composto central para otimização da concentração de sal, tempo de extração e ciclos de extração.

Experimentos/ Paramêtros	Concentração de sal (% (m/v) NaCl)	Tempo de extração (s)	Ciclos de extração
1	4	10	2
2	4	10	6
3	4	30	2
4	4	30	6
5	12	10	2
6	12	10	6
7	12	30	2
8	12	30	6
9	1	20	4
10	15	20	4
11	8	3	4
12	8	37	4
13	8	20	1
14	8	20	7
15	8	20	4
16	8	20	4
17	8	20	4

3.2.5 Parâmetros analíticos de mérito

As figuras analíticas de mérito foram obtidas através de curvas de calibração por adição de padrão. As soluções de calibração foram preparadas adicionando padrões analíticos de doze compostos fenólicos (ácido protocateico, (+)-catequina, epicatequina, ácido clorogênico, epigallocatequina, ácido caféico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina e kaempferol) a soluções de vinho tinto comercial (variedade Carménère; safra 2020; origem Chile) e água ultrapura (1:10) em concentrações entre 0,1 e 7,5 mg L⁻¹. A extração dos analitos foi realizada em triplicata (*n*=3), usando condições otimizadas seguidas de análise por LC-MS/MS para identificação e quantificação dos analitos. Os resultados foram avaliados individualmente, para cada analito, sendo avaliada a área do pico cromatográfico correspondente.

Os parâmetros avaliados na etapa de avaliação do desempenho do método foram: coeficiente de correlação linear (R), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), exatidão, precisões intradia e interdia e efeito de matriz. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração dividido pela inclinação da curva de calibração, e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD. A exatidão do método foi estimada usando ensaios de recuperação relativa em três níveis de concentração. A precisão foi calculada com base no desvio padrão relativo dos testes intradia e interdia, e os valores foram considerados aceitáveis quando inferiores a 20% (AOAC, 2016). A precisão intradia foi avaliada em três níveis de concentração e a precisão interdia em um nível de concentração. Os testes de precisão e exatidão foram realizados em soluções de vinho tinto e água ultrapura (1:10).

A avaliação do efeito de matriz (EM) foi realizada através da construção de curva de calibração com soluções de vinho sintético e água ultrapura (1:10) enriquecidos com padrões analíticos de doze compostos fenólicos em concentrações entre 0,1 e 7,5 mg L⁻¹. O efeito da matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares (*s*) das curvas de calibração com a matriz correspondente e as curvas de calibração em vinho sintético utilizando a Equação 1, de acordo com método descrito por (AGUIAR JÚNIOR; SANTOS; FARIA, 2020).

$$\%EM = \left(\frac{s_{matriz}}{s_{vinho\ sintético}} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

3.2.5.1 Robustez

A análise de robustez foi realizada para garantir a qualidade do método desenvolvido, de modo a avaliar a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução. Para isso, o teste de robustez do método foi conduzido por meio de um planejamento fatorial fracionário de acordo com a Abordagem de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YODEN, 1972; YODEN; STEINER, 1975). A matriz com as combinações de parâmetros e seus níveis é apresentada na Tabela 7. Os parâmetros avaliados foram pH da amostra, volume da amostra, ciclos de extração, solvente de dessorção e volume do solvente de dessorção, inerentes ao preparo da amostra e temperatura da coluna e volume de injeção, inerentes ao método cromatográfico. O teste foi realizado em dois níveis proximais aos níveis

estabelecidos de cada parâmetro, com valores variando em níveis ligeiramente inferiores e superiores ao valor estabelecido.

Tabela 7. Matriz de planejamento para avaliação da robustez do método por DPX para extração de compostos fenólicos em vinho. A – Temperatura da coluna (°C), B – Volume de injeção (mL), C – pH, D – Volume de amostra (mL), E – Ciclos de extração, F – Solvente de dessorção, G – Volume de solvente de dessorção.

Experimento/ Parâmetro	A	B	C	D	E	F	G
1	28	4,8	2,5	3,28	21	A	180
2	32	4,8	2,5	3,12	19	A	220
3	28	5,2	2,5	3,12	21	B	220
4	32	5,2	2,5	3,28	19	B	180
5	28	4,8	3,5	3,28	19	B	220
6	32	4,8	3,5	3,12	21	B	180
7	28	5,2	3,5	3,12	19	A	180
8	32	5,2	3,5	3,28	21	A	220

Solvente de dessorção A: Metanol:Acetonitrila (60:40) e B: Metanol: Acetonitrila (40:60).

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.3.1 Otimização dos parâmetros do MS/MS para os analitos e separação cromatográfica

Um método cromatográfico baseado no método descrito por Lang et al. 2019 foi adaptado com modificações em um cromatógrafo líquido acoplado à um espectrômetro de massas triplo quadrupolo. Na Tabela 8 estão apresentadas as principais informações dos compostos avaliados, bem como o conjunto de dados obtido no processo de infusão, que incluem os íons precursores e os respectivos fragmentos.

Tabela 8. Massa molecular, pKa, tempo de retenção (T.R), íons precursores e produtos (m/z íon precursor $\rightarrow m/z$ produtos) dos analitos.

Analito	Massa Molecular (g mol⁻¹)	pKa	T.R (min)	Precursor [M-H⁺]⁻	Produtos
Ácido caféico	180	3,4; 9,3; 12,7	6,454	179,0	135,0; 107,0; 117,0; 89,0
Ácido <i>p</i>-cumárico	164	4,0; 9,5	6,932	163,1	119,1; 93,1
Ácido ferúlico	194	3,6; 9,9	7,014	193,1	178,0; 134,1; 149,1
Ácido clorogênico	354	3,3; 9,2; 12,5	6,144	353,1	191,1; 85,0
Ácido protocateico	154	4,1; 9,4; 12,8	5,178	153,0	109,0; 108,0
Ácido siríngico	198	3,9; 9,5	6,533	197,1	182,0; 123,0;
(-)-Epicatequina	290	9,0; 9,6; 10,8 12,6;	6,463	289,2	109,1; 123,1; 203,2
Epgalocatequina	458	8,7; 9,5; 10,6 11,2;	6,258	457,0	169,1; 125,1; 179,1
(+)-Catequina	290	9,0; 9,6; 10,8 12,6;	5,999	289,2	109,1; 123,1; 203,1
Kaempferol	286	6,4; 7,8 8,6; 10,6	8,206	285,0	229,1; 93,0
Quercetina	302	6,3; 7,8; 8,6 10,3; 12,8	7,872	301,1	151,1; 121,1; 179,1
Miricetina	318	6,3; 7,7; 8,3 11,0; 12,2;	7,497	317,0	151,1; 137,1

Inicialmente foi realizada uma etapa de infusão dos analitos deste estudo no espectrômetro de massas, onde doze padrões analíticos de compostos fenólicos individuais (ácido protocateico, (+)-catequina, epicatequina, ácido clorogênico, epigallocatequina, ácido caféico, ácido siríngico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, miricetina, quercetina e kaempferol) foram injetados diretamente no sistema do espectrômetro de massas para obtenção de um conjunto de dados relacionando o íon precursor e respectivos produtos de fragmentação para cada composto. Para realizar a coleta do conjunto de dados, a fonte de ionização do espectrômetro de massas foi operada em modo negativo, uma vez que os compostos fenólicos avaliados apresentam valores de pKa entre 3,3 e 12,9 e ao estarem em sua forma iônica são diferenciados pelos ânions formados. Neste estudo, o íon de maior abundância de cada analito foi monitorado na etapa de quantificação, e os demais fragmentos foram monitorados para fins de confirmação qualitativa. Cabe ressaltar que, a realização dessa etapa é indispensável para obter informações sobre os fragmentos que compõem o espectro de massas correspondente de cada analito, seja para análises qualitativas ou quantitativas por cromatografia líquida com detecção por espectrometria de massas. As informações geradas nessa etapa permitem a identificação e quantificação dos compostos de interesse presentes em uma amostra.

3.3.2 Otimização do método

3.3.2.1 Etapa I

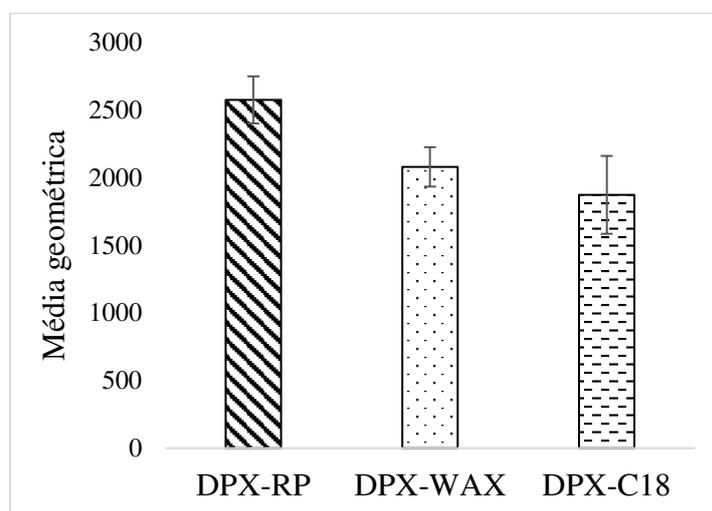
3.3.2.1.1 Fase extratora

O desempenho de extração de doze compostos fenólicos foi avaliado com três fases extratoras comerciais, incluindo DPX-RP, DPX-WAX e DPX-C₁₈. O bom desempenho analítico depende da capacidade da fase de extração de interagir seletivamente com os compostos alvos. Portanto, a escolha das fases foi baseada na composição química de cada fase e nas características estruturais dos compostos de estudo. A DPX-RP é composta por estireno divinil benzeno, sendo indicada para compostos apolares e ligeiramente polares, promovendo interações carbônicas. A DPX-WAX é composta por estireno divinil benzeno com substituintes poliamina que visam promover interações de troca aniônica, além da interação carbônica, essa fase é indicada para compostos ácidos. E a DPX-C₁₈, é indicada para realizar interações carbônicas, preferencialmente para compostos apolares. O estudo foi realizado através de

planejamento univariado realizado em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10). O volume de amostra foi 800 μL em pH 3,3 (pH da amostra). Os ciclos e tempo de extração foram 3 ciclos de 30 s cada. Os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 3 ciclos de 30 s cada com 200 μL de solvente metanol. Essas condições foram pré-fixadas inicialmente, e ao longo do desenvolvimento do método de preparo de amostra foram otimizadas com base na melhor resposta analítica considerando uma frequência analítica apreciável.

Os resultados da otimização da fase extratora foram expressos pela média geométrica das áreas dos picos dos doze analitos. A Figura 7 apresenta o gráfico de barras obtido para otimização da fase de extração. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. De acordo com o gráfico, a DPX-RP apresentou o melhor resultado para extração de compostos fenólicos em vinho. A análise estatística indica que os resultados entre as fases são estatisticamente diferentes ($p < 0,05$). Além disso, o teste de *post hoc* de Tukey indica que a DPX-RP apresenta resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) das fases DPX-WAX e DPX-C₁₈.

Figura 7: Gráfico de barras obtidos na otimização da fase de extração do método para extração de compostos fenólicos em vinho. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de doze compostos fenólicos.



Elaborado pela autora (2024).

Como mencionado anteriormente, a DPX-RP é capaz de realizar interações carbônicas entre fase de extração e compostos alvos. Considerando a presença de anéis aromáticos na estrutura da fase e dos compostos fenólicos, pode se indicar que ocorra

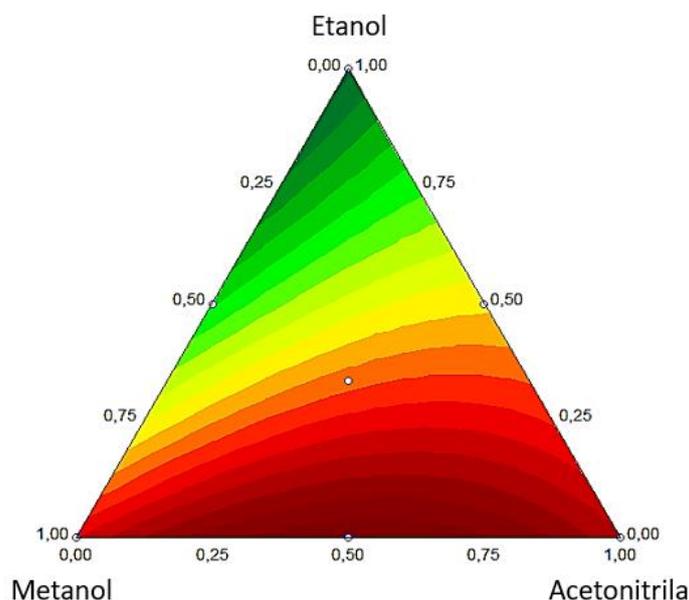
preferencialmente interações do tipo π - π , promovendo a adsorção dos analitos no material sorvente. Ressalta-se que DPX-WAX também é capaz de realizar interações da mesma natureza e interagir adicionalmente via ligações de hidrogênio devido à presença de amina secundária em sua estrutura (CARASEK; MORÉS; MERIB, 2018). Porém, essa diferença não promoveu um aumento na resposta analítica. Portanto, optou-se pela utilização do DPX-RP como fase de extração no desenvolvimento do método de extração de compostos fenólicos em vinho.

3.3.2.1.2 Solvente de dessorção

Os solventes metanol, acetonitrila e etanol foram avaliados como solvente de dessorção dos analitos. A otimização foi realizada por meio de um planejamento *Simplex Lattice*, a matriz decodificada está apresentada na Tabela 3 da seção 3.2 As análises foram realizadas em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10). A fase de extração foi a DPX-RP. O volume de amostra foi 800 μ L em pH 3,3 (pH da amostra). Os ciclos e tempo de extração foram 3 ciclos de 30 s cada. Os ciclos e tempo de dessorção foram 3 ciclos de 30 s cada com 200 μ L de solvente.

O gráfico de contorno (Figura 8) foi obtido através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,9365, e indica uma tendência de resposta máxima na região intermediária entre metanol e acetonitrila.

Figura 8: Gráfico de contorno obtido do planejamento Simplex Lattice na otimização do solvente de extração do método para extração de compostos fenólicos em vinho. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica das áreas dos picos de doze analitos.



Elaborado pela autora (2024).

O metanol é um solvente polar, capaz de interagir com analitos principalmente através de ligações de hidrogênio, enquanto a acetonitrila possui caráter menos polar. De acordo com o gráfico de contorno, uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1, v/v) apresentou maior resposta analítica quando comparada aos solventes puros. A promoção na dessorção dos analitos pode ser atribuída a dois fatores principais: (i) interações via ligações de hidrogênio entre o metanol e os analitos, e (ii) aproximação da polaridade da mistura de solventes com a fase de extração, aumentando a força do solvente, e consequentemente promovendo a dessorção dos analitos. Portanto, de acordo com o resultado, uma mistura de metanol e acetonitrila (1:1, v/v) foi escolhida como solvente de dessorção para o desenvolvimento do método de extração de compostos fenólicos em vinho.

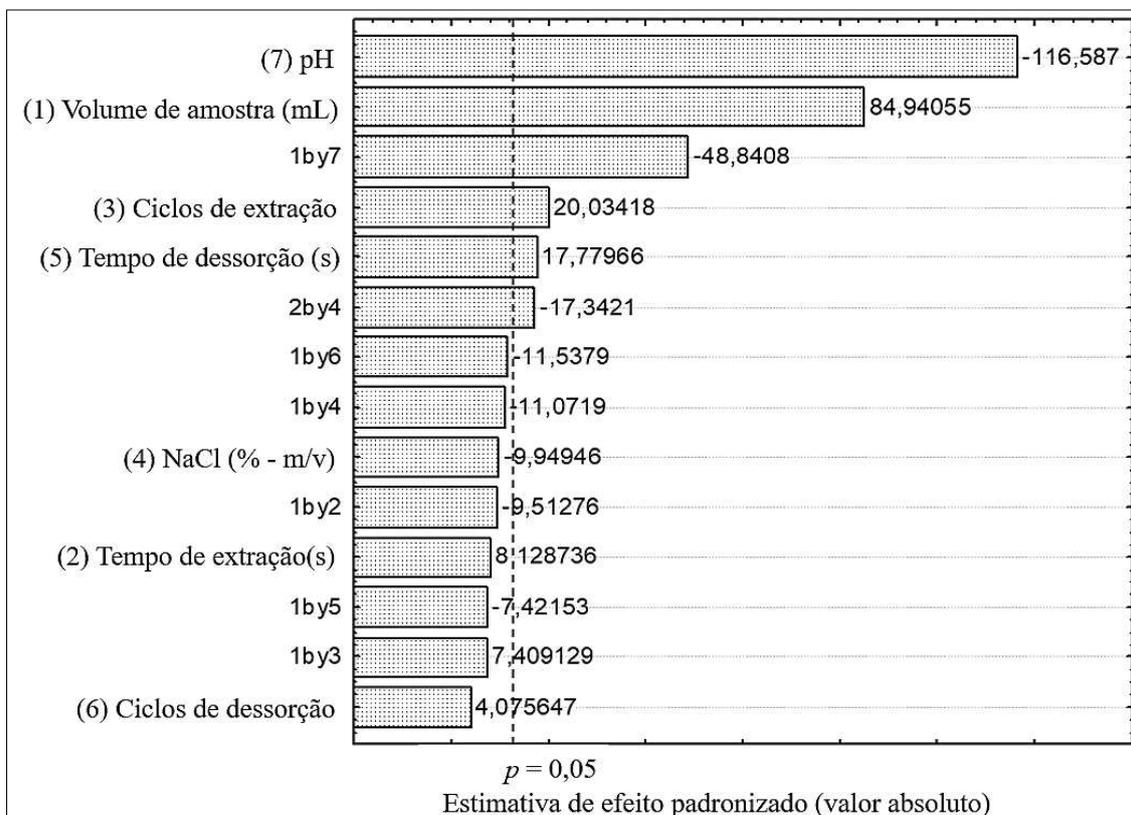
3.3.2.2 *Etapa II*

3.3.2.2.1 Planejamento fatorial fracionário

Os principais parâmetros de extração que podem apresentar influência significativa sobre a eficiência de extração em métodos com DPX foram avaliados através de um planejamento fatorial fracionário, que avaliou sete parâmetros, incluindo volume da amostra, tempo de extração, ciclos de extração, concentração de sal, tempo de dessorção, ciclos de dessorção e pH. Através de planejamentos fatoriais é possível obter boas estimativas quanto à influência significativa dos parâmetros envolvidos na metodologia proposta. O planejamento é definido por matrizes, compostas por diferentes níveis dos parâmetros em estudo e o principal objetivo é selecionar apenas os parâmetros que apresentem alguma influência significativa sobre o método para serem otimizados posteriormente (FERREIRA et al., 2007).

No método de otimização proposto, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionário (2^{7-3}), a matriz decodificada está apresentada na Tabela 4, seção 3.2. A Figura 9 apresenta o gráfico de Pareto obtido. Além dos efeitos principais, neste estudo foram avaliados os comportamentos das variáveis quando combinadas entre si, ou seja, interações de segunda ordem.

Figura 9: Gráfico de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionário 27-3 para avaliação dos parâmetros estatisticamente significativos na extração de compostos fenólicos em vinho.



Elaborado pela autora (2024).

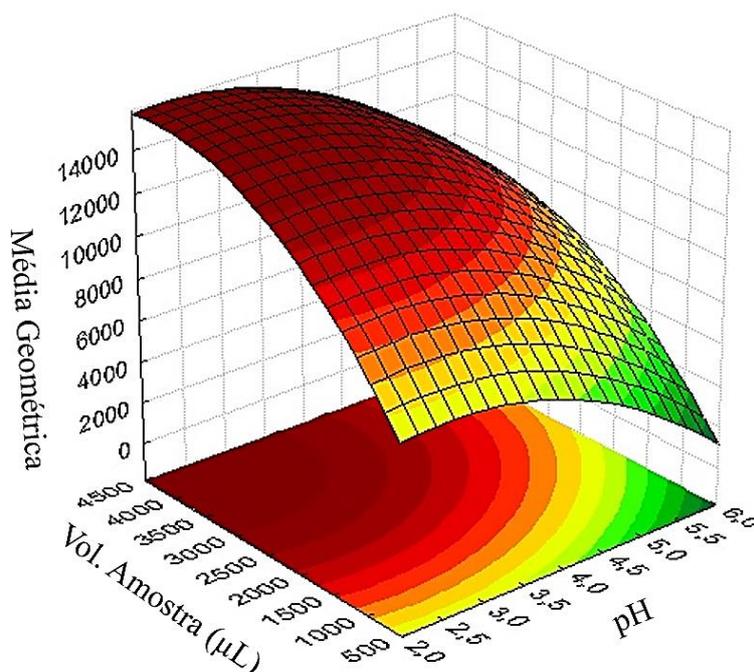
De acordo com os resultados, ao avaliar a influência individual dos parâmetros, a extração dos analitos é favorecida em valores de pH próximos ao nível baixo avaliado (pH 2) e com volumes de amostra próximos ao nível alto avaliado (3200 μ L). Além disso, os ciclos de extração e o tempo de dessorção também foram significativos na extração de compostos fenólicos no vinho. Em relação as interações de segunda ordem, os resultados mostram que o volume de extração combinado com pH apresentou influência significativa na extração dos analitos, bem como o tempo de extração quando combinado com a presença de sal. Portanto, optou-se por otimizar o pH e o volume de amostra através de planejamento *Doehlert*. O tempo de dessorção através de um planejamento univariado e tempo de extração, ciclos de extração e concentração de sal através de um planejamento composto central. Entre todos os parâmetros avaliados, apenas o ciclo de dessorção não apresentou influência significativa na extração de compostos fenólicos em vinho, desse modo optou-se por fixar em 2 ciclos de dessorção.

3.3.2.3 Etapa III

3.3.2.3.1 Volume de amostra e pH

O volume e o pH da amostra foram otimizados usando um planejamento *Doehlert*, a matriz decodificada está apresentada na Tabela 5, seção, 3.2. As análises foram realizadas em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10). A fase de extração foi a DPX-RP. Os ciclos e tempo de extração foram 3 ciclos de 30 s cada. Os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 30 s cada com 200 µL de metanol:acetonitrila (1:1, v/v). A Figura 10 apresenta a superfície de resposta obtida através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,9600.

Figura 10. Superfície de respostas do planejamento *Doehlert* para a otimização do volume e pH da amostra do método de extração de compostos fenólicos em vinho.



Elaborado pela autora (2024).

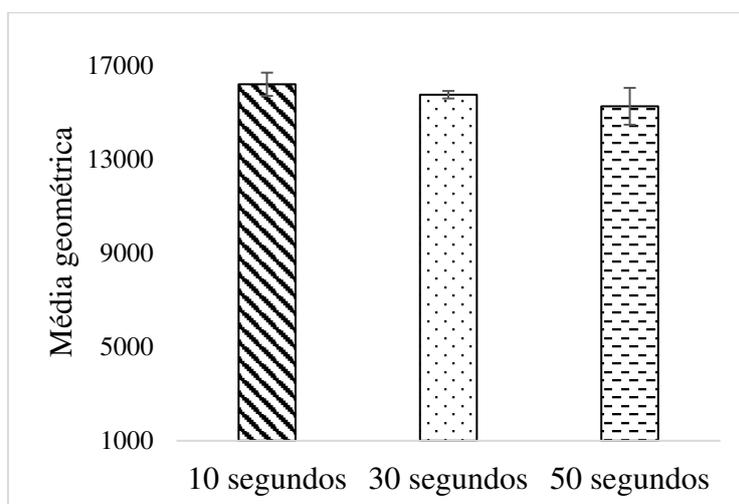
De acordo com a Figura 10, há uma tendência de aumento da resposta analítica na região de maiores volumes de amostra e em pH mais ácido. Ambos os parâmetros têm influência significativa de acordo com a ANOVA. O gráfico indica um aumento na resposta analítica em volumes de amostra superiores a 3000 µL. Para manter um compromisso entre o resultado avaliado e a frequência analítica, optou-se por utilizar um

volume de 3200 μL de amostra, ou seja, quatro alíquotas de 800 μL . Cabe ressaltar que a ponteira de extração suporta um volume máximo de amostra de 800 μL , portanto, para aumentar o volume de amostra durante a extração, é necessário dividir o volume final em alíquotas de até 800 μL . Em relação ao pH, o gráfico indica uma boa resposta entre valores de pH de 2,0 a 3,5, indicando que os analitos são extraídos principalmente em sua forma neutra, uma vez que, o pKa dos analitos varia entre 3,3 e 12,9. Dada a melhor resposta, optou-se por utilizar pH 3,0, sendo este valor, o valor médio de pH dos vinhos.

3.3.2.3.2 Tempo de dessorção

A otimização do tempo de dessorção foi realizada através de um planejamento univariado em três níveis: 10, 30 e 50 s. As análises foram realizadas em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10). A fase de extração foi a DPX-RP. O volume e pH da amostra foi 3200 μL e 3,0, respectivamente. Os ciclos e tempo de extração foram 3 ciclos de 30 s cada. Os ciclos e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 30 s cada com 200 μL de metanol:acetonitrila (1:1, v/v). A Figura 11 apresenta o gráfico de barras obtido. De acordo com a ANOVA, os resultados são estatisticamente iguais ($p > 0,05$). Assim, optou-se por aplicar um tempo de dessorção de 10 s para reduzir o tempo de preparo da amostra. Através destes resultados, é possível indicar que o solvente é o único parâmetro que influencia significativamente na dessorção dos analitos, pois também não fora observada influência significativa dos ciclos e do tempo de dessorção.

Figura 11. Gráfico de barras obtido para otimização do tempo de dessorção do método de extração de compostos fenólicos em vinho.

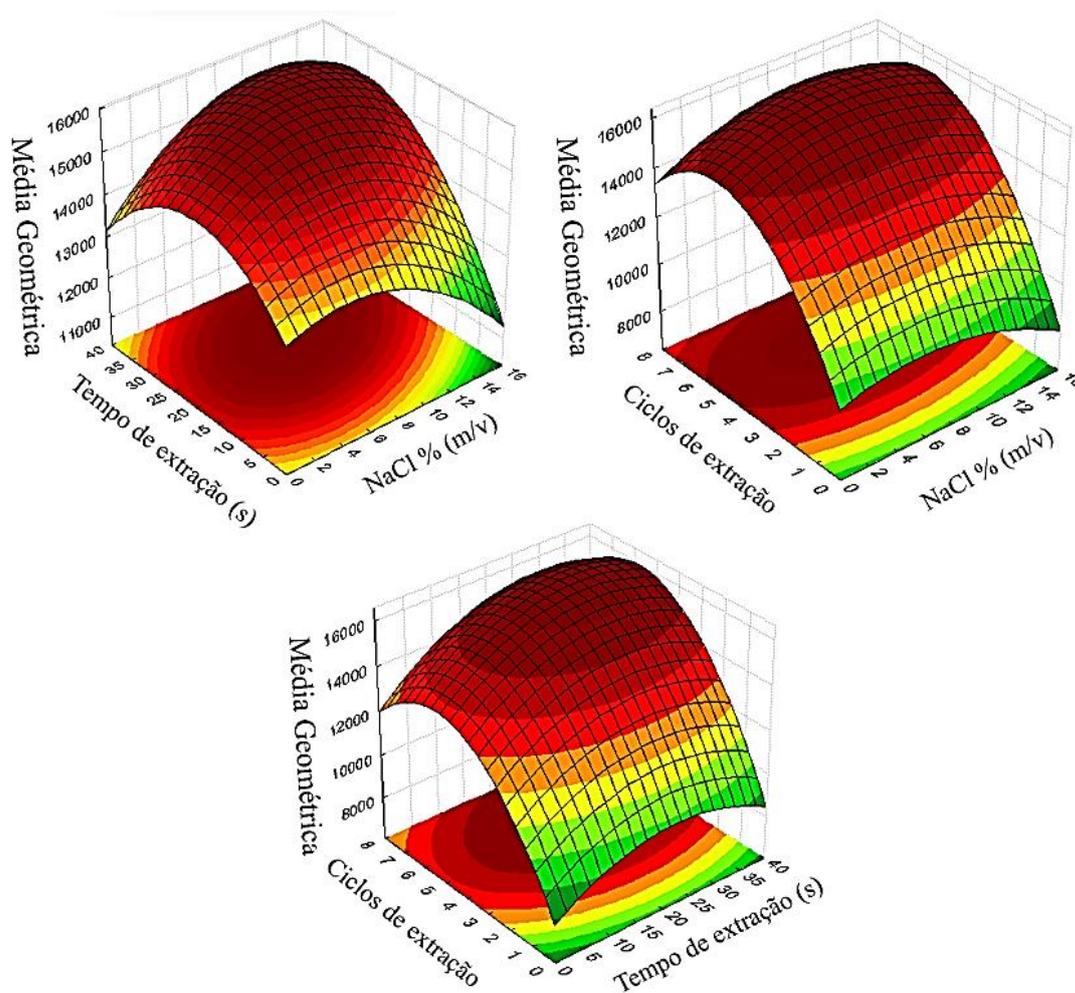


Elaborado pela autora (2024).

3.3.2.3.3 Concentração de sal e tempo e ciclos de extração

O número de ciclos e tempo de extração para cada alíquota de amostra e concentração de sal foram otimizados através de um planejamento do composto central, a matriz decodificada está apresentada na Tabela 6, seção 3.3. As análises foram realizadas em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10). A fase de extração foi a DPX-RP. O volume e pH da amostra em 3200 μL e 3,0, respectivamente. Os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 30 s cada com 200 μL de metanol:acetonitrila (1:1, v/v). A Figura 12 apresenta as superfícies de resposta obtidas através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,8346.

Figura 12. Superfícies de respostas do planejamento Composto Central para otimização da concentração de sal, ciclos de extração e tempo de extração no método de extração de compostos fenólicos em vinho.



Elaborado pela autora (2024).

De acordo com a ANOVA, apenas os ciclos de extração tiveram influência significativa na extração. Portanto, optou-se por não adicionar sal à amostra e definir o tempo de extração em 10 s por ciclo. O curto tempo de extração avaliado corrobora as características da técnica DPX. Ao aspirar a amostra, o ar é aspirado em sequência, promovendo a formação de pequenas bolhas com grande área superficial, que promovem uma mistura dinâmica entre a amostra e a fase de extração, resultando em uma extração rápida e eficiente (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022). Finalmente, considerando a tendência crescente na resposta analítica dos ciclos de extração nas superfícies de resposta Figura 12, optou-se por realizar cinco ciclos em cada alíquota, totalizando 20 ciclos de extração (cinco ciclos multiplicados por quatro alíquotas de amostra).

3.3.2.4 Condições otimizadas do método

Em conclusão das otimizações, as condições estabelecidas de acordo com ensaios de otimização realizados inicialmente foram DPX-RP como fase extratora e 200 µL de metanol:acetonitrila (1:1, v/v) como solvente de dessorção os analitos. O volume do solvente de dessorção não foi otimizado, mas sim pré-fixado em 200 µL, por ser o menor volume de dessorção capaz de cobrir toda a fase extratora no interior da ponteira. Esse volume contribui com a pré-concentração dos analitos e com um menor volume de solvente orgânico necessário. Seguidamente, o planejamento fatorial fracionário indicou que o volume e pH da amostra, tempo de dessorção, concentração de sal na amostra, e ciclos e tempo de extração apresentaram influência estatisticamente significativa no procedimento de extração de compostos fenólicos em vinho. Ao realizar novos estudos, constatou-se que o tempo de dessorção, concentração de sal e tempo de extração não foram estatisticamente significativos. Cabe ressaltar que o planejamento fatorial fracionário indica quais parâmetros afetam positivamente a extração dos analitos e quais regiões de trabalho são mais adequadas, porém, alguns efeitos podem ficar mascarados e resultar em falsos positivos. Portanto, é necessário realizar otimizações em sequência para avaliar a real influência dos parâmetros. Com isso, após o estudo de otimização, os valores determinados foram volume de amostra em 3200 µL com pH em 3,0. Extração em 5 ciclos de 10 s cada para cada alíquota, totalizando 20 ciclos de extração ao todo. E dessorção, 2 ciclos de 10 s cada com 200 µL de solvente. Dessa forma, o tempo necessário para realizar o preparo de amostra foi inferior à 5 min.

3.3.3 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos avaliados por meio da curva analítica estão apresentados na Tabela 9. Os coeficientes de correlação apresentaram valores maiores ou iguais a 0,9877 o que indica boa correlação linear em toda a faixa linear de trabalho para todos os analitos. Os limites de detecção (LOD) variaram de 0,01 a 0,03 mg L⁻¹ e os limites de quantificação (LOQ) variaram de 0,03 a 0,09 mg L⁻¹. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração dividido pela inclinação da curva de calibração, e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD.

Tabela 9. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação de doze compostos fenólicos.

Analito	Faixa linear de trabalho (mg L⁻¹)	Equação linear	R	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)
Ácido protocateico	0,1-5,0	$y=5971,3x + 1741,6$	0,9973	0,02	0,06
(+)-Catequina	0,1-7,5	$y=1190,3x + 2292,5$	0,9961	0,01	0,03
(-)-Epicatequina	0,1-5,0	$y=627,1x + 1475,5$	0,9906	0,02	0,06
Ácido clorogênico	0,1-2,5	$y=20414x + 2324$	0,9953	0,01	0,03
Epigallocatequina	0,1-7,5	$y=20009x + 2222,1$	0,9976	0,01	0,03
Ácido caféico	0,5-7,5	$y=19010x + 22624$	0,9956	0,07	0,24
Ácido siringico	0,1-7,5	$Y=469,3x + 331,3$	0,9995	0,02	0,06
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,5-7,5	$y=10901x + 11288$	0,9947	0,01	0,03
Ácido ferúlico	0,5-7,5	$y=4253x + 1096,9$	0,9990	0,01	0,03
Miricetina	0,1-7,5	$y=9277,1x + 13599$	0,9960	0,03	0,09
Quercetina	0,1-7,5	$y=26884x + 30269$	0,9941	0,03	0,09
Kaempferol	0,1-7,5	$y=1548,5x + 746,2$	0,9877	0,03	0,09

O efeito matriz (EM) é um parâmetro importante a ser avaliado durante o desenvolvimento de novos métodos. Neste estudo, o EM foi calculado considerando os coeficientes angulares das curvas de calibração dos doze compostos fenólicos em soluções de vinho sintético e água ultrapura (1:10) e em soluções de vinho tinto e água ultrapura (1:10). De acordo com a Equação 1, as porcentagens de efeito de matriz são -72% para ácido protocateico, -6% para (+)-catequina, -60% para epicatequina, -29% para ácido clorogênico, -34% para epigallocatequina, -47% para ácido caféico, -57% para ácido siríngico, -42% para ácido *p*-cumárico, -51% para ácido ferúlico, -62% para miricetina, 9% para quercetina e 25% para kaempferol. Os valores de EM variaram de -72% para o ácido protocateico a 9% para a quercetina. Quanto mais distante o percentual estiver de zero (0%), maior será o efeito de matriz, portanto, de acordo com os resultados avaliados, é possível concluir efeito de matriz, por isso, para compensar foi realizada calibração por adição de padrão. Esse resultado pode ser atrelado a baixa concentração dos compostos alvo na amostra e a grande variedade de classes de compostos no vinho, principalmente ácidos orgânicos, minerais e açúcares.

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10), os resultados estão descritos na Tabela 10. A precisão intradia ($n=3$) foi avaliada em três níveis de concentração e a precisão interdia ($n=9$) em um nível de concentração. Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo (DPR %) da resposta analítica da extração realizada em triplicata para cada nível de concentração. A precisão intradia apresentou valores entre 0,4 e 13,1%, e a precisão interdia apresentou valores de 1,7 e 8,5%. A exatidão do método foi estimada usando ensaios de recuperação relativa em três níveis de concentração. Os resultados variaram entre 87 e 114%. Os resultados de precisão e exatidão são considerados satisfatórios segundo as diretrizes da AOAC (AOAC, 2016).

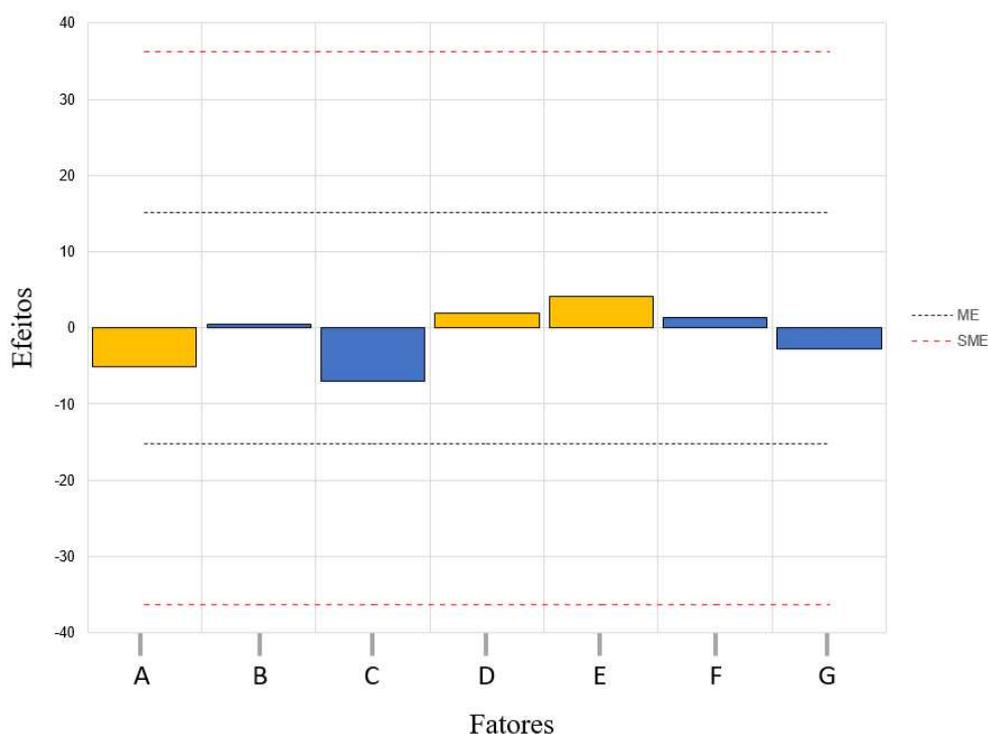
Tabela 10. Precisão intradia e interdia e recuperação relativa obtida em soluções de vinho tinto comercial e água ultrapura (1:10).

Analito	Nível de fortificação (mg L ⁻¹)	Precisão intradia (%)	Precisão interdia (%)	Recuperação relativa (%)
		<i>n</i> =3	<i>n</i> =9	<i>n</i> =3
Ácido protocateico	0,1	3,0	-	102
	1,0	3,9	3,9	95
	5,0	4,2	-	97
(+)-Catequina	0,1	4,7	-	90
	1,0	2,7	3,6	89
	7,5	2,0	-	93
(-)-Epicatequina	0,1	2,1	-	94
	1,0	4,0	3,3	97
	5,0	2,3	-	112
Ácido clorogênico	0,1	3,6	-	97
	1,0	1,9	2,1	98
	2,5	1,8	-	96
Epigallocatequina	0,1	4,1	-	104
	1,0	2,4	2,4	102
	7,5	7,9	-	94
Ácido caféico	0,5	1,1	-	106
	1,0	2,4	1,7	92
	7,5	2,3	-	108
Ácido siríngico	0,1	6,2	-	93
	1,0	5,3	5,7	98
	7,5	3,5	-	90
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,5	0,4	-	101
	1,0	1,0	2,6	93
	7,5	1,1	-	95
Ácido ferúlico	0,5	5,9	-	90
	1,0	3,2	3,2	95
	7,5	1,9	-	91
Miricetina	0,1	13,1	-	90
	1,0	3,3	8,5	93
	7,5	0,6	-	87
Quercetina	0,1	9,8	-	112
	1,0	1,0	4,9	84
	7,5	2,4	-	114
Kaempferol	0,1	7,3	-	103
	1,0	1,9	4,1	95
	7,5	3,1	-	111

3.3.3.1 Robustez

A análise de robustez foi realizada para garantir a qualidade do método desenvolvido, de modo a avaliar a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução. Para isso, o teste de robustez do método foi conduzido por meio de um planejamento fatorial fracionário de acordo com a abordagem de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YODEN, 1972; YODEN; STEINER, 1975). A matriz com as combinações de parâmetros e seus níveis é apresentada na Tabela 7, seção 3.2. Os parâmetros avaliados foram temperatura da coluna, volume de injeção, pH, volume de amostra, ciclos de extração, solvente de dessorção e volume de solvente. A partir dos dados gerados, foi construído um gráfico de Lenth's (Figura 13), onde são mostrados os efeitos das sete variáveis relativas à margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME).

Figura 13. Gráfico de Lenth's para avaliação da robustez do método de extração de compostos fenólicos em vinho. A – Temperatura da coluna (°C), B – Volume de injeção (mL), C – pH, D – Volume de amostra (mL), E – Ciclos de extração, F – Solvente de dessorção, G – Volume de solvente de dessorção.



Elaborado pela autora (2024).

A primeira linha, referente à ME, relaciona a variação dos resultados inerente a avaliação dos parâmetros individualmente. Enquanto a segunda linha, referente a SME, relaciona a variação dos resultados inerente a interação entre os parâmetros. Portanto, respostas que não ultrapassam as linhas indicam que os efeitos dos parâmetros não apresentam efeitos significativos sob a robustez do método. Assim, o método desenvolvido pode ser considerado robusto sob condições otimizadas.

3.3.4 Aplicação do método

O método analítico desenvolvido foi aplicado na determinação de compostos fenólicos em uma amostra de vinho. Todos os analitos do estudo, com exceção do ácido ferúlico foram quantificados na amostra e os valores de concentração estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Aplicação do método proposto para determinação de polifenóis em vinho.

Analito	Concentração (mg L ⁻¹)
Ácido protocateico	2,9 (± 3,2%)
(+)-Catequina	19,2 (±2,9%)
(-)-Epicatequina	23,5 (±3,2%)
Ácido clorogênico	1,1 (±4,5%)
Epigalocatequina	1,0 (±9,9%)
Ácido caféico	11,9 (±1,7%)
Ácido siríngico	7,0 (±1,5%)
Ácido <i>p</i> -cumárico	10,3 (±0,8%)
Ácido ferúlico	<LOQ
Miricetina	14,6 (±2,9%)
Quercetina	11,2 (±1,4%)
Kaempferol	4,8 (±7,4%)

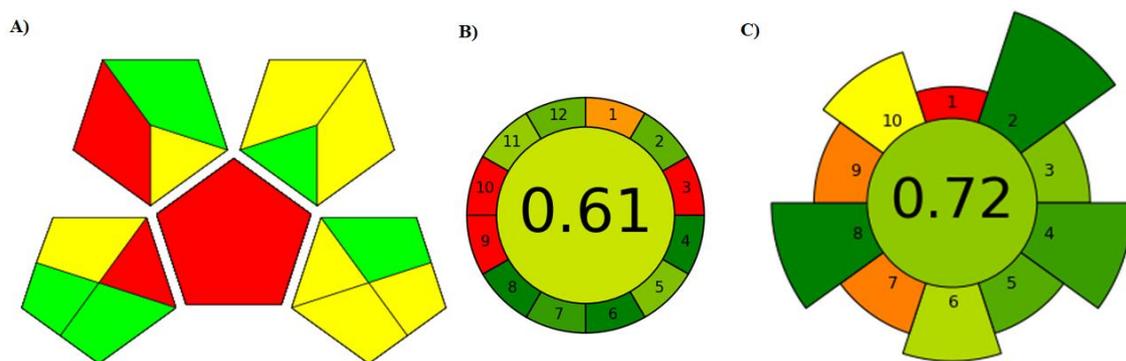
Os compostos majoritários encontrados na amostra foram a miricetina, (-)-epicatequina e (+)-catequina. A miricetina possui uma variedade de atividades biológicas, como capacidade antitumoral em diferentes tipos de câncer (SONG et al., 2021). A (+)-catequina e a (-)-epicatequina são excelentes antioxidantes e são os principais compostos fenólicos responsáveis pelo sabor e adstringência de vinhos (GARRIDO; BORGES, 2013). Cabe ressaltar que diversos fatores podem influenciar a composição fenólica dos

vinhos, como a variedade da uva, condições edafoclimáticas, condições de cultivo e a tecnologia aplicada durante o preparo da bebida (GARRIDO; BORGES, 2013).

3.3.5 Avaliação do caráter verde do método

O uso de métricas para avaliar procedimentos analíticos em termos de ‘verde’ é uma ferramenta útil para definir o caráter verde dos métodos analíticos e identificar pontos positivos inerente a aspectos ecológicos apresentados por uma nova abordagem, bem como pontos a serem melhorados. Nesse sentido, foram aplicada três métricas analíticas, incluindo Green Analytical Procedure Index (GAPI) (PŁOTKA-WASYLKA, 2018) e Analytical Greenness Calculator (AGREE) (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020) para avaliar o procedimento analítico proposto para determinação de compostos fenólicos em vinho. Além disso, a métrica AGREEprep (WOJNOWSKI et al., 2022) foi utilizada para avaliar especialmente as características de preparação da amostra. Em resumo, o GAPI apresenta um pictograma em cores (verde, amarelo e vermelho) e o AGREE e o AGREEprep apresentam adicionalmente uma pontuação final (de 0 a 1). Em ambos, a avaliação é baseada nos 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC) (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Os resultados são apresentados na Figura 14.

Figura 14. Resultado da avaliação verde da metodologia analítica proposta para determinação de compostos fenólicos em amostras de vinho; A: GAPI, B: AGREE e C: AGREEprep.



Elaborado pela autora (2024).

A avaliação do ‘verde’ indica que a metodologia proposta com DPX seguida por LC-MS/MS proporciona um excelente caráter verde, com destaque para a miniaturização da técnica e zero consumo de energia na extração, uma vez que nenhuma instrumentação

é necessária, pois o procedimento DPX requer apenas uma micropipeta para realizar a etapa de extração/dessorção. Além disso, destaca-se a minimização dos volumes de amostra (320 uL) e solvente (200 uL) e da massa da fase de extração (20 mg). Outro fator importante é o tempo necessário para o preparo da amostra, no método proposto são necessários em média 5 minutos para o preparo da amostra, o que reduz o tempo do procedimento analítico e a exposição do analista. Quanto aos pontos críticos, as principais penalidades estão relacionadas ao preparo de amostras *ex situ*, comum à análise de compostos fenólicos em vinho por laboratórios de pesquisa, utilização de acetonitrila e metanol como solvente de dessorção, por outro lado, são utilizados apenas 200 uL de solvente, contribuindo para a redução de resíduos. E por fim, o uso de LC-MS/MS implica um peso negativo na avaliação das métricas, uma vez que a técnica necessita de solventes para compor a fase móvel, e maior consumo de energia inerente ao espectrômetro de massas. Porém, deve-se ressaltar que esta técnica é considerada padrão ouro na determinação de compostos fenólicos.

3.3.6 Comparação com outros métodos da literatura

O método desenvolvido para determinação de compostos fenólicos em vinho foi justaposto a outros métodos encontrados na literatura para o mesmo propósito. A comparação é mostrada na Tabela 12. Cinco metodologias baseadas em extração em fase líquida foram incluídas na avaliação, a saber, extração com solvente assistida por ultrassom de amostras líquidas com membrana porosa (UASE-PMLS) (ROBLES et al., 2019), microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME) (YANG et al., 2017), microextração dispersiva líquido-líquido de pares iônicos baseada na solidificação de uma gota orgânica flutuante (IP-DLLME-SFO) (LI et al., 2016), e dois métodos por extração líquido-líquido (LLE) (MINUTI; PELLEGRINO; TESEI, 2006; PRAZERES et al., 2021). Nestes métodos, o volume do solvente variou entre 590 e 12.000 μL , respectivamente, enquanto no método DPX o volume do solvente foi de 200 μL . A necessidade de realizar a extração em diversas etapas, tornando o processo trabalhoso, é considerada uma desvantagem dos métodos discutidos. No método UASE-PMLS (ROBLES et al., 2019) e nos métodos por LLE (MINUTI; PELLEGRINO; TESEI, 2006; PRAZERES et al., 2021) as análises cromatográficas foram realizadas por cromatografia gasosa (GC). A GC apresenta boa separação dos compostos, no entanto, é necessário realizar uma etapa de derivatização antes da análise cromatográfica. A reação de derivatização é normalmente realizada com reagente N,O-

bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Embora este reagente apresente boa reatividade, seu alto custo de aquisição é uma desvantagem. Além disso, a reação exige longos tempos para converter os analitos em seus produtos derivatizados, o que também é considerado uma desvantagem, pois implica diretamente na redução da frequência analítica. O método LLE descrito por Prazeres et al., 2021 apresenta uma alternativa de derivatização utilizando hexametildissilazano como agente silanizante. O menor custo do reagente e o menor tempo de reação são considerados uma vantagem. Porém, o método avaliou apenas cinco compostos fenólicos, enquanto o método proposto neste estudo avaliou doze compostos fenólicos.

Por último, foram abordadas três metodologias baseadas na extração em fase sólida, a saber, extração em fase sólida (SPE) (SILVA et al., 2011), microextração por sorvente embalado (MEPS) (GONÇALVES et al., 2013), e microextração em fase sólida (SPME) (VINAS et al., 2009). No SPE e MEPS o material sorvente está embalado, enquanto no DPX o material sorvente está livre dentro da ponteira. Esta configuração permite que além da amostra, ar seja aspirado em sequência, promovendo imediatamente um contato dispersivo entre a amostra e a fase de extração, o que torna o processo de extração rápido e eficaz (CARASEK; MORÉS; HUELSMANN, 2022). O método MEPS utiliza baixos volumes de amostra e solvente, o que é considerado uma vantagem. Porém, o método foi dedicado apenas à determinação de ácidos fenólicos, não incluindo flavonoides na análise. O método SPE se destaca pela quantidade de compostos avaliados. Porém, a extração é realizada em diversas etapas, tornando o processo lento e trabalhoso. Por fim, foi comparado um método por SPME. O método possui baixos limites de quantificação, o que é característico da técnica SPME, devido ao seu alto fator de enriquecimento. Para esse método, a avaliação de apenas quatro flavonoides é uma limitação. Dentre os métodos avaliados, é o método que aplica o maior volume de amostra, embora solventes orgânicos não são necessários. Devido à baixa volatilidade dos analitos, a extração por SPME deve ser realizada por imersão direta, o que pode resultar na adsorção irreversível de compostos naturalmente presentes no vinho, como ácidos orgânicos, coloides, sais minerais e açúcares, o que é considerada uma desvantagem (CAI et al., 2009).

Com base na comparação feita com outros métodos, o método de preparo de amostra por DPX para determinação de compostos fenólicos em vinho se destaca pelo baixo volume de amostra (320 μ L), baixo volume de solvente (200 μ L), curto tempo de preparo de amostra (<5 min), rápida extração promovida pela mistura dispersiva entre

amostra e fase de extração, extração em apenas duas etapas (extração e dessorção), facilidade de operação do dispositivo de extração e extração simultânea de ácidos fenólicos e flavonoides.

Tabela 12. Comparação do método DPX e LC-MS/MS com métodos reportados na literatura para determinação de compostos fenólicos em vinho

Técnica	Instrumentação	Compostos fenólicos	Volume de amostra	Volume de solvente	Tempo de preparo de amostra	Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹) ^a	LOD (mg L ⁻¹) ^a	Referência
DPX	LC-MS/MS	Flavonoides e ácidos fenólicos	320 µL	200 µL	<5 min	0,1 a 7,5	0,01 a 0,03	Este trabalho
UASE-PMLS	GC-MS	Flavonoides, ácidos fenólicos, e estilbenos	25 µL	1170 µL	70 min	0,05 a 150	0,016 a 5,9	(ROBLES et al., 2019)
DLLME	HPLC	Flavonoides e ácidos fenólicos.	1000 µL	2000 µL	>5 min	0,05 a 240	0,001 a 0,133	(YANG et al., 2017)
IP-DLLME-SFO	UHPLC	Ácidos fenólicos	1000 µL	590 µL	18 min	0,01 a 15	0,005 a 0,1	(LI et al., 2016)
MEPS	UHPLC	Ácidos fenólicos	250 µL	50 µL	N.M.	0,2 a 40	0,01 a 0,2	(GONÇALVES et al., 2013)
SPE	UHPLC	Flavonoides, ácidos fenólicos e estilbeno.	900 µL	3000 µL	N.M.	0,01 a 80	0,006 a 0,581	(SILVA et al., 2011)

^aOs valores apresentados na tabela compreendem a faixa que inclui todos os valores estabelecidos para todos os analitos. UASE-PMLS; Extração por solvente assistida por ultrassom de amostras líquidas embaladas em membrana porosa; DLLME: Microextração Líquido-Líquido Dispersiva; IP-DLLME-SFO: Microextração dispersiva líquido-líquido de pares iônicos baseada na solidificação de uma gota orgânica flutuante; MEPS: Microextração por Sorvente Compactado; SPE: Extração em Fase Sólida. N.M.: não mencionado; LOD: limite de detecção.

3.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Um novo método para a determinação de doze compostos fenólicos em vinhos, combinando as técnicas DPX e LC-MS/MS foi otimizado principalmente através de abordagens multivariadas para maximizar as informações extraída dos dados. Isso resultou em um processo eficiente para estudar as condições ideais do método DPX. O método desenvolvido oferece excelentes vantagens aos laboratórios analíticos, como rápida execução e eficiência de extração. Destacam-se as breves etapas de preparo de amostra, concluídas em menos de 5 minutos, a simplicidade da operação de bancada e o consumo mínimo de solvente orgânico, apenas 200 μL . Os principais parâmetros de mérito foram avaliados, o método demonstrou linearidade satisfatória com um coeficiente de correlação (R) igual ou superior a 0,9877, baixos limites de quantificação (0,03-0,24 mg L^{-1}), precisões intradia e interdia com variações inferiores a 20% e recuperações variando de 84 a 114%. A aplicabilidade do método foi avaliada em vinho tinto comercial da variedade carménère, de origem chilena. Os compostos majoritários determinados na amostra foram (-)-epicaquina (23,5 mg L^{-1}), (+)-catequina (19,2 mg L^{-1}) e miricetina (14,6 mg L^{-1}). Os resultados confirmam a utilidade deste método na determinação de compostos fenólicos em amostras reais de vinho, proporcionando uma ferramenta eficaz para avaliar a qualidade dos vinhos em termos de composição fenólica. Além disso, o método demonstra um forte compromisso com a química analítica verde, com pontuações favoráveis nas métricas GAPI, AGREE (pontuação 0,61) e AGREEprep (pontuação 0,72), especialmente devido ao curto tempo de extração e ao baixo consumo de amostras e solventes. Portanto, recomenda-se a adoção deste método de extração de compostos fenólicos em vinhos por DPX por laboratórios analíticos, equilibrando resultados precisos, sustentabilidade ambiental e segurança do analista.

CAPÍTULO IV

Determinação de compostos fenólicos em suco de uva por DPX e HPLC/DAD

CAPÍTULO IV – DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS EM SUCO DE UVA POR DPX E HPLC/DAD

4.1 INTRODUÇÃO

O suco de uva é um derivado não fermentado da uva amplamente consumido no mundo que possui características sensoriais únicas em termos de sabor, aroma e cor (GULER, 2023). Além do perfil sensorial, o suco de uva apresenta potenciais benefícios à saúde, em grande parte relacionados à composição rica e natural de compostos fenólicos. Além disso, o suco de uva representa uma opção para aqueles que buscam uma alternativa ao vinho, devido à ausência de álcool, tornando-o uma escolha adequada para diversos consumidores (SABRA; NETTICADAN; WIJEKOON, 2021). Como já relatado em capítulos anteriores, os efeitos benéficos dos compostos fenólicos na saúde, quando consumidos regularmente, estão associados principalmente a ações antioxidantes, anti-inflamatórias e cardioprotetoras (TASHAKKORI; TAĞAÇ; MERDIVAN, 2021).

O perfil fenólico do suco de uva pode ser influenciado por diversos fatores, relacionados à produção da uva, incluindo o sistema de cultivo (convencional ou orgânico), práticas agrícolas, condições ambientais, nível de maturidade e variedade da uva (GRANATO et al., 2016; HAAS et al., 2016). Fatores relacionados à produção de bebidas, incluindo condições de processamento, técnicas, tratamentos térmicos, aplicação de enzimas, e entre outros, também estão envolvidos. Durante a elaboração do suco de uva, fatores de produção podem levar diretamente à transferência dos compostos fenólicos da uva para o suco e, conseqüentemente, afetar a concentração e composição desses compostos no produto (GULER, 2023).

Neste estudo, os compostos fenólicos avaliados foram flavonóis (miricetina, quercetina e kaempferol), flavanóis ((+)-catequina e (-)-epicatequina), ácidos hidroxicinâmicos (ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e ácido ferúlico) e ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido protocateico e ácido vanílico). As principais atividades bioativas desses compostos foram relatadas no capítulo anterior, com exceção para os ácidos gálico e vanílico, ácidos hidroxibenzóicos conhecidos principalmente pelos seus efeitos antioxidante, anti-inflamatório, antimicrobiano, potencial antitumoral e neuroprotetor. Cabe ressaltar, que os efeitos dependem das condições de uso e concentrações (DURAZZO et al., 2019).

A composição fenólica do suco de uva é notavelmente complexa, o que ressalta a importância de métodos eficazes para a extração e análise de compostos fenólicos. Essas

análises são cruciais para avaliar tanto a qualidade do suco de uva quanto os potenciais benefícios à saúde que ele pode oferecer. Frequentemente, as determinações de compostos fenólicos são conduzidas através de técnicas como cromatografia líquida (GOMES et al., 2019; HAAS et al., 2016) e cromatografia gasosa (ROBLES et al., 2019), ambas acopladas a diferentes tipos de detectores. No entanto, ao realizar essas determinações em suco de uva, diversos fatores precisam ser levados em consideração, incluindo a baixa concentração dos analitos desejados e a complexidade da matriz da amostra, rica em açúcares, ácidos orgânicos e minerais. Embora os produtos derivados da uva tenham sido extensivamente estudados nos últimos anos, ainda existem poucos estudos dedicados à resolução de problemas com procedimentos analíticos para determinação de compostos fenólicos em suco de uva (KERSH et al., 2023).

Na literatura, existem trabalhos recorrentes que aplicam a abordagem de diluição seguida por injeção no instrumento analítico (GRANATO et al., 2016; SERAGLIO et al., 2016). Contudo, é importante considerar que a diluição pode impedir a detectabilidade de compostos fenólicos na amostra. Além disso, mesmo com a diluição, uma série de compostos são introduzidos no instrumento analítico, e a presença de compostos com tempos de retenção semelhantes aos dos analitos pode dificultar a identificação dos picos do analito e influenciar negativamente nos parâmetros analíticos do método, principalmente linearidade, precisão e exatidão (MESQUITA et al., 2023). Além dos parâmetros de mérito, é importante considerar os cuidados com a coluna cromatográfica. Uma análise cromatográfica sem preparação prévia da amostra permite que uma série de compostos sejam inseridos na coluna cromatográfica, e alguns deles podem ficar fortemente retidos e acumular-se ao longo da coluna, resultando na deterioração da coluna. Pode haver vários outros problemas, incluindo má formação do pico, perda de resolução, picos divididos, tempos de retenção alterados e aumento da pressão, no caso de análise por cromatografia líquida. Devido a esta prática, é necessária a troca frequente de coluna, aumentando os custos de análise (MICHAEL DONG, 2019).

Diante do exposto, o preparo de amostras é um recurso para enriquecer os analitos, permitindo a detecção de compostos fenólicos mesmo em baixas concentrações, e eliminar interferentes da matriz antes da determinação cromatográfica. A extração líquida-líquida (LLE) e a extração em fase sólida (SPE) são técnicas amplamente utilizadas na preparação de amostras líquidas. No entanto, é conhecido que ambas são técnicas trabalhosas, demandam períodos longos de extração, e, por vezes, requerem quantidades moderadas a elevadas de solventes durante o processo de extração (SAJID;

PLÓTKA-WASYLKA, 2018). Conseqüentemente, o preparo de amostras permanece como um dos principais desafios no desenvolvimento de métodos analíticos para a determinação de compostos fenólicos em suco de uva.

Neste estudo, foi proposto o desenvolvimento de um método de preparo de amostras por extração dispersiva em ponteira (DPX) para a extração de onze compostos fenólicos em sucos de uva, seguido por Cromatografia Líquida com detecção por arranjos de diodos (HPLC/DAD). As condições de extração foram otimizadas utilizando delineamentos univariados e multivariados. O método DPX-HPLC/DAD foi validado e aplicado em três amostras de suco de uva. Neste estudo, foi proposto o desenvolvimento de um método analítico com preparo de amostras utilizando a técnica de extração dispersiva em ponteira (DPX) para a extração de onze compostos fenólicos presentes em sucos de uva, seguido por cromatografia líquida com detecção por arranjos de diodos (HPLC/DAD). As condições de extração foram otimizadas por meio de delineamentos univariados e multivariados. O método DPX-HPLC/DAD foi validado e aplicado a três amostras de suco de uva. Métricas verdes foram aplicadas com o objetivo de fornecer dados relevantes sobre a veridura do método, incluindo GAPI e AGREE. Por fim, o aspecto verde da etapa de preparo de amostra foi avaliado utilizando a ferramenta AGREEprep. Semelhante ao método desenvolvido para a determinação de compostos fenólicos em vinho, este método apresenta vantagens significativas, incluindo um tempo de extração reduzido e um menor consumo de amostras e solventes.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Materiais, reagentes e amostras

As ponteiras de extração com capacidade de 1 mL, incluindo as fases de extração: RP (Reverse Phase, polímero estireno-divinilbenzeno, massa: 20 mg, e tamanho de partícula: 75 μm) e WAX (Weak Anion Exchange, fase de amina secundária com estireno-divinilbenzeno, massa: 20 mg e faixas de tamanho de partícula: 55-65 μm) foram adquiridas da DPX Technologies (Columbia, EUA).

Os padrões de compostos fenólicos (ácido gálico ($\geq 98\%$), ácido protocateico ($\geq 98\%$), (+)-catequina ($\geq 99\%$), ácido clorogênico ($\geq 99\%$), ácido vanílico ($\geq 97\%$), (-)-epicatequina ($\geq 97\%$), ácido ferúlico ($\geq 99\%$), ácido *p*-cumárico ($\geq 98\%$), miricetina ($\geq 98\%$), quercetina ($\geq 95\%$) e kaempferol ($\geq 99\%$)) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). A solução estoque de cada padrão analítico e a solução da mistura de padrões, foram preparadas em solvente metanol e acondicionada ao abrigo da luz em temperatura de refrigeração (4 °C). O cloreto de sódio (grau ACS) utilizado para avaliar o efeito salino foi adquirido da Vetec (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). Os solventes acetona, metanol, etanol, acetonitrila com pureza superior a 99,8% foram adquiridos da Merck (Kenilworth, NJ, EUA). Água ultrapura (UPW) (18,2 $\text{M}\Omega\text{ cm}^{-1}$) foi obtida por meio de um sistema de purificação de água Mega Purity (Billerica, MA, EUA).

Amostras de suco de uva integral obtido de uvas americanas (*Vitis labrusca*), incluindo suco de uva tinta (variedade Bordô), suco de uva tinta orgânica (variedade Bordô e Isabel) e suco de uva branca (variedade Niágara) foram adquiridas comercialmente em supermercados locais. As amostras de suco de uva foram filtradas com um filtro de membrana de PTFE de 0,45 μm anteriormente ao procedimento de extração. O suco de uva tinta de variedade Bordô foi utilizado na etapa de otimização, validação e aplicação do método. Os demais sucos foram avaliados durante a etapa de aplicação do método.

4.2.2 Instrumentação e condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo líquido (1200 Series, Agilent Technologies, Waldbronn, Germany) equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD) de acordo com os métodos descritos por GIUSTI et al., 2017; PADILHA et al., 2017 e YANG et al., 2017a, com modificações. A separação foi realizada em uma coluna C_{18} (150 \times 4,6 mm DI, tamanho de partícula de 4 μm ;

Phenomenex, EUA). A fase móvel foi ajustada para uma vazão de $0,8 \text{ mL min}^{-1}$ e consistiu em (A) 0,1% de ácido fórmico em água e (B) metanol. O programa de gradiente foi realizado da seguinte forma: 20% B de 0 a 5 min, 20 a 80% de B de 5 a 35 min e 80 a 20% B de 35 a 40 min. O volume de injeção foi de $10 \mu\text{L}$ e a temperatura da coluna foi mantida em $30 \text{ }^\circ\text{C}$. O comprimento de onda utilizado para detecção e quantificação foi definido em 280 nm (ácido gálico, ácido protocateico, (+)-catequina, ácido vanílico, (-)-epicatequina e ácido ferúlico), 320 nm (ácido clorogênico e ácido *p*-cumárico) e 360 nm (miricetina, quercetina e kaempferol). A identificação dos tempos de retenção de cada composto foi determinada pela injeção dos padrões individuais. A separação cromatográfica foi avaliada usando uma mistura de padrões (10 mg L^{-1}) contendo onze compostos fenólicos. O software OpenLab® foi usado para processar os resultados cromatográficos.

4.2.3 Delineamento experimental

A extração de onze compostos fenólicos em suco de uva foi realizada através da técnica de extração dispersiva em ponteira (DPX). Inicialmente, uma alíquota de $3200 \mu\text{L}$ de amostra de suco de uva diluída em água ultrapura (1:20) com pH 2,0 foi fracionada em 4 alíquotas de $800 \mu\text{L}$. Uma ponteira DPX com capacidade de 1 mL, contendo 20 mg da fase extratora (DPX-RP) foi utilizada. As etapas do procedimento de preparo de amostra por DPX são descritas abaixo:

- i) Condicionamento: O condicionamento da fase extratora foi realizado com $800 \mu\text{L}$ de água ultrapura.
- ii) Extração: A extração foi realizada com 5 ciclos (aspiração e dispensação) de 10 s em cada alíquota de $800 \mu\text{L}$ de amostra.
- iii) Limpeza: A limpeza da fase extratora foi realizada com $800 \mu\text{L}$ de água ultrapura em 1 ciclo de 10 s.
- iv) Dessorção: A dessorção foi realizada com $200 \mu\text{L}$ de acetonitrila em 2 ciclos de 10 s.

Após o procedimento de preparo de amostra por DPX, o extrato obtido foi armazenado até o momento da análise cromatográfica.

4.2.4 Otimização do método

A otimização do método proposto foi realizada em solução de suco de uva tinta comercial e água ultrapura enriquecida com padrões analíticos de compostos fenólicos (5

mg L⁻¹). Para realizar a otimização, o processo foi dividido em quatro etapas que serão descritas nos tópicos a seguir. Os tratamentos estatísticos foram realizados nos softwares Statsoft Statistica 8.0 (Statsoft, EUA) e Microsoft Excel® 365 (EUA).

4.2.4.1 Etapa I

Inicialmente, o procedimento DPX foi avaliado em suco de uva tinta diluído em três proporções, a saber, 1:1, 1:10 e 1:20 (suco de uva tinta e água ultrapura). Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$), e os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) e *post hoc* de teste de Tukey. Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de onze compostos fenólicos.

4.2.4.2 Etapa II

A fase de extração e o solvente de dessorção foram otimizados. A fase de extração foi otimizada por meio de um projeto univariado, onde foram avaliadas a eficiência de extração de duas fases de extração disponíveis comercialmente, incluindo DPX-RP (fase reversa - polímero estireno-divinilbenzeno) e DPX-WAX (troca aniônica fraca - fase de amina secundária com estireno-divinilbenzeno). Os ensaios foram realizados em triplicata ($n=3$) e os resultados foram avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA). O solvente de dessorção foi otimizado através de planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice*. Os solventes estudados foram metanol, acetonitrila e etanol. A matriz de planejamento está descrita na Tabela 13. Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de onze compostos fenólicos.

Tabela 13. Matriz de planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice* para escolha do solvente de dessorção do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva.

Experimento/Solvente	Metanol	Acetonitrila	Etanol
1	1,00	0,00	0,00
2	0,00	1,00	0,00
3	0,00	0,00	1,00
4	0,50	0,50	0,00
5	0,50	0,00	0,50
6	0,00	0,50	0,50
7	0,33	0,33	0,33
8	0,33	0,33	0,33
9	0,33	0,33	0,33

4.2.4.3 Etapa III

Um planejamento fatorial fracionário (FFD) 2^{7-3} foi realizado para selecionar as variáveis que afetam significativamente o processo de extração de compostos fenólicos em suco de uva por DPX. As variáveis e seus respectivos níveis foram: volume de amostra (0,8 e 3,2 mL), tempo de extração (10 e 40 s), ciclos de extração (2 e 6), adição de sal (0 e 20 % (m/v) de NaCl), tempo de dessorção (10 e 40 s), ciclos de dessorção (2 e 6) e pH (2 e 6). A matriz de planejamento está descrita na Tabela 14. Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de onze compostos fenólicos.

Tabela 14. Matriz de planejamento fatorial 2^{7-3} do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Volume de amostra (mL), B - Tempo de extração (s), C – Ciclos de extração, D – Concentração de sal (% [m/v] de NaCl), E – Tempo de dessorção (s), F – Ciclos de dessorção e G – pH.

Experimento/Parâmetro	A	B	C	D	E	F	G
1	0,8	10,0	2,0	0,0	10,0	2,0	2,0
2	3,2	10,0	2,0	0,0	40,0	2,0	6,0
3	0,8	40,0	2,0	0,0	40,0	4,0	2,0
4	3,2	40,0	2,0	0,0	10,0	4,0	6,0
5	0,8	10,0	4,0	0,0	40,0	4,0	6,0
6	3,2	10,0	4,0	0,0	10,0	4,0	2,0
7	0,8	40,0	4,0	0,0	10,0	2,0	6,0
8	3,2	40,0	4,0	0,0	40,0	2,0	2,0
9	0,8	10,0	2,0	20,0	10,0	4,0	6,0
10	3,2	10,0	2,0	20,0	40,0	4,0	2,0
11	0,8	40,0	2,0	20,0	40,0	2,0	6,0
12	3,2	40,0	2,0	20,0	10,0	2,0	2,0
13	0,8	10,0	4,0	20,0	40,0	2,0	2,0
14	3,2	10,0	4,0	20,0	10,0	2,0	6,0
15	0,8	40,0	4,0	20,0	10,0	4,0	2,0
16	3,2	40,0	4,0	20,0	40,0	4,0	6,0

4.2.4.4 Etapa IV

Após a etapa 3 realizada como etapa de triagem, os parâmetros que influenciaram significativamente a extração, incluindo pH, volume da amostra e ciclos de extração foram otimizados por meio de um projeto composto central (Tabela 15). Os resultados foram expressos como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos de onze compostos fenólicos.

Tabela 15. Matriz do projeto composto central para otimização do volume de amostra, pH, e ciclos de extração do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva.

Experimento/ Parâmetros	Volume de amostra (mL)	pH	Ciclos de extração
1	1,6	2,0	2,0
2	1,6	2,0	6,0
3	1,6	6,0	2,0
4	1,6	6,0	6,0
5	4,8	2,0	2,0
6	4,8	2,0	6,0
7	4,8	6,0	2,0
8	4,8	6,0	6,0
9	0,5	4,0	4,0
10	5,9	4,0	4,0
11	3,2	0,6	4,0
12	3,2	7,4	4,0
13	3,2	4,0	1,0
14	3,2	4,0	7,0
15	3,2	4,0	4,0
16	3,2	4,0	4,0
17	3,2	4,0	4,0

4.2.5 Parâmetros analíticos de mérito

As figuras analíticas de mérito foram obtidas através de curvas de calibração externa em água ultrapura. As soluções de calibração foram preparadas adicionando padrões analíticos de onze compostos fenólicos (ácido gálico, ácido protocateico, (+)-catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, (-)-epicatequina, ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico, miricetina, quercetina e kaempferol) a água ultrapura em concentrações entre 0,1 e 10 mg L⁻¹. A extração dos analitos foi realizada em triplicata ($n=3$), usando condições otimizadas seguidas de análise por HPLC/DAD para identificação e quantificação dos analitos. Os resultados foram avaliados individualmente, para cada analito, sendo avaliada a área do pico cromatográfico correspondente.

Os parâmetros avaliados na etapa de avaliação do desempenho do método foram: coeficiente de correlação linear (R), limite de quantificação (LOQ), limite de detecção (LOD), exatidão, precisões intradia e interdia e efeito de matriz. O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração dividido pela inclinação da curva de calibração, e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD. A exatidão do método foi estimada usando ensaios de recuperação relativa em três níveis de concentração. A precisão foi calculada com base no desvio padrão relativo dos testes intradia e interdia, e os valores foram considerados aceitáveis quando inferiores a 20% (AOAC, 2016). A precisão foi avaliada em três níveis de concentração.

A avaliação do efeito de matriz (EM) foi realizada através da construção de curva de calibração com soluções de suco de uva e água ultrapura (1:20) enriquecidos com padrões analíticos de onze compostos fenólicos em concentrações entre 0,1 e 10 mg L⁻¹. O efeito da matriz foi avaliado comparando os coeficientes angulares (*s*) das curvas de calibração com a matriz correspondente e as curvas de calibração em água ultrapura utilizando a Equação 1, de acordo com método descrito por (AGUIAR JÚNIOR; SANTOS; FARIA, 2020).

$$\%EM = \left(\frac{s_{matriz}}{s_{\acute{a}gua}} - 1 \right) \times 100 \quad (1)$$

4.2.5.1 Robustez

A análise de robustez foi realizada para garantir a qualidade do método desenvolvido, de modo a avaliar a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução. Para isso, o teste de robustez do método foi conduzido por meio de um planejamento fatorial fracionário de acordo com a Abordagem de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YODEN, 1972; YODEN; STEINER, 1975). A matriz com as combinações de parâmetros e seus níveis é apresentada na Tabela 16. Os parâmetros avaliados foram diluição da amostra, pH da amostra, volume da amostra, ciclos de extração e volume do solvente de desorção inerentes ao preparo da amostra, e porcentagem de ácido fórmico na fase móvel e temperatura da coluna inerentes ao método cromatográfico. O teste foi realizado em dois níveis proximais aos níveis estabelecidos de cada parâmetro, com valores variando em níveis ligeiramente inferiores e superiores ao valor estabelecido.

Tabela 16. Matriz de planejamento para avaliação da robustez do método por DPX para extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Diluição da amostra, B – pH, C – Volume da amostra (mL), D – Ciclos de extração, E – Volume de solvente (μL), F – Ácido fórmico (%) e G – Temperatura da coluna ($^{\circ}\text{C}$).

Experimento/ Parâmetro	A	B	C	D	E	F	G
1	1:18	1,5	3,18	21	220	0,08	28
2	1:22	1,5	3,18	19	180	0,08	32
3	1:18	2,5	3,18	19	220	0,12	32
4	1:22	2,5	3,18	21	180	0,12	28
5	1:18	1,5	3,22	21	180	0,12	32
6	1:22	1,5	3,22	19	220	0,12	28
7	1:18	2,5	3,22	19	180	0,08	28
8	1:22	2,5	3,22	21	220	0,08	32

4.2.6 Limpeza e reuso do material sorvente

Com o objetivo de reutilizar as ponteiras em extrações subsequentes, foi realizado um estudo de limpeza e reuso do material sorvente. O estudo de limpeza foi conduzido a partir de ponteiras previamente aplicadas na extração de compostos fenólicos em suco de uva. Após completar o processo de extração por DPX a ponteira foi limpa seguindo o seguinte procedimento de limpeza: 1 ciclo de limpeza com 200 μL de acetonitrila (solvente de dessorção) e 1 ciclo de limpeza com 1000 μL de metanol. A alíquota de 200 μL de acetonitrila foi avaliada por HPLC/DAD. Para garantir a limpeza eficiente do material sorvente, foi realizado um estudo onde repetiu-se cinco vezes o procedimento de limpeza, coletando a alíquota de acetonitrila para análise por HPLC/DAD. A eficiência da limpeza foi avaliada através da ausência de sinal cromatográfico para todos os analitos.

Para o estudo de reuso do material sorvente, inicialmente, uma ponteira nova foi utilizada para realizar a primeira extração do estudo. Ao fim de cada extração, o material sorvente foi limpo de acordo com os resultados estabelecidos na etapa de avaliação da limpeza do material sorvente. Em sequência, novas extrações foram realizadas até que 5 extrações fossem concluídas em uma única ponteira. Por fim, os extratos obtidos foram submetidos a análise instrumental por HPLC/DAD e a eficiência de extração do material sorvente foi considerada aceitável com variações menores que

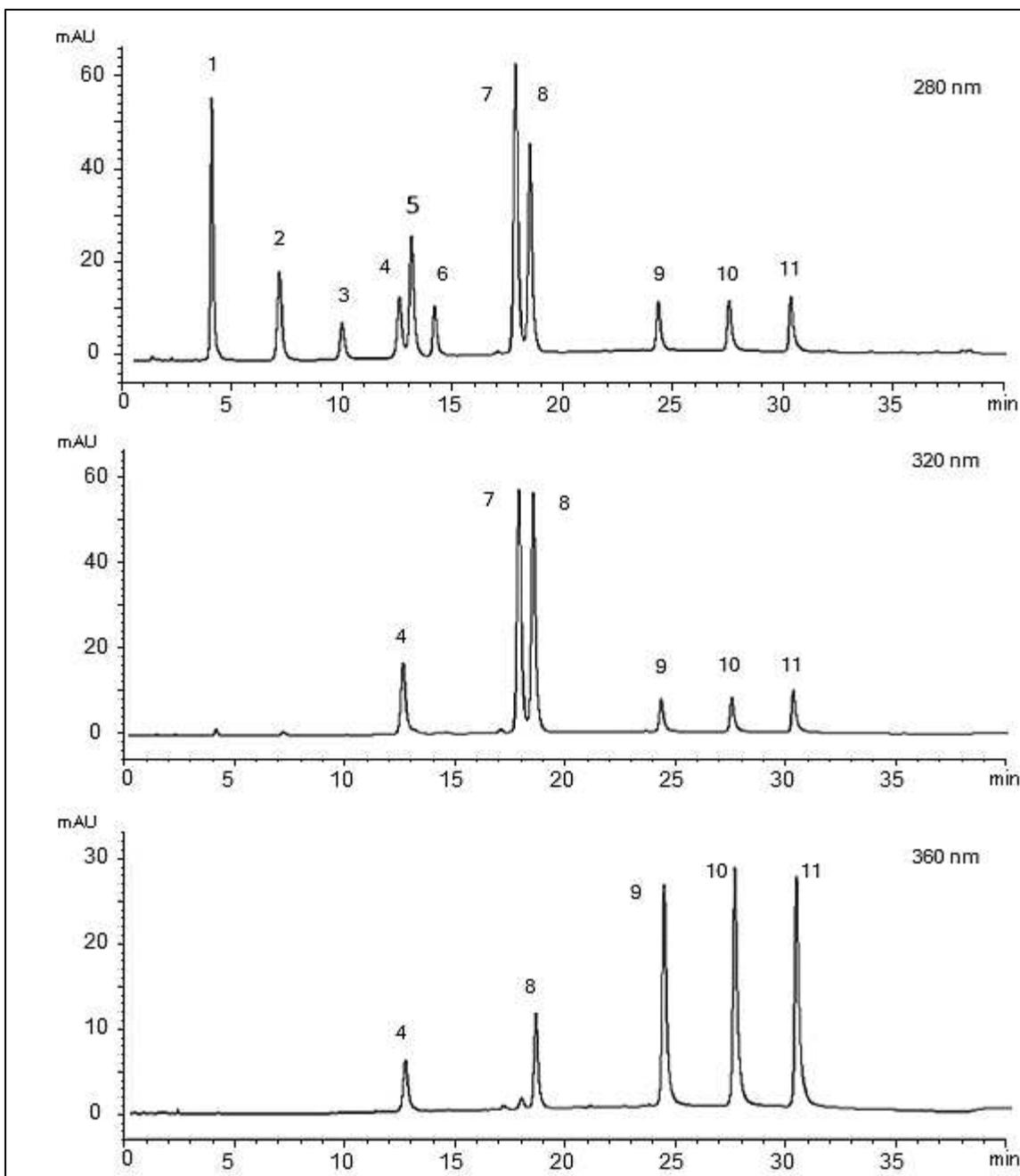
20% para a média geométrica dos analitos quando comparados a resposta obtida na primeira extração aplicando uma ponteira nova. O estudo foi realizado em triplicata.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.3.1 Análise cromatográfica

Um método cromatográfico baseado nos métodos descritos por GIUSTI et al., 2017; PADILHA et al., 2017 e YANG et al., 2017a foi incluído com modificações em um cromatógrafo líquido equipado com detecção de arranjo de diodos (DAD). A separação cromatográfica dos analitos foi avaliada utilizando uma solução contendo os onze analitos de trabalho na concentração de 10 mg L⁻¹. As condições instrumentais estão descritas na seção 4.2 item 4.2.2. A Figura 15 apresenta os cromatogramas obtidos nas faixas monitoradas, incluindo 280, 320 e 360 nm. A condição de separação foi desenvolvida com modificações, variando o gradiente de eluição, temperatura da coluna e vazão da fase móvel.

Figura 15. Cromatogramas de onze compostos fenólicos por HPLC/DAD. 1) Ácido gálico (4,37 min); 2) Ácido protocateico (7,78 min); 3) (+)-Catequina (10,75 min); 4) Ácido clorogênico (13,07 min); 5) Ácido vanílico (13,74 min); 6) (-)-Epicaquina (14,73 min); 7) Ácido ferúlico (18,38 min); 8) Ácido *p*-cumárico (18,98 min); 9) Miricetina (24,69 min); 10) Quercetina (27,96 min) e 11) Kaempferol (30,74 min).



Elaborado pela autora (2024).

A utilização de um detector menos seletivo que MS/MS resultou em um método de separação mais longo. No entanto, cabe destacar que a detecção por arranjo de diodos proporciona um dispositivo mais economicamente acessível, especialmente para laboratórios com orçamentos restritos. Além disso, essa abordagem se destaca pela simplicidade operacional e pelos custos reduzidos de manutenção. Ao analisar os cromatogramas apresentados na Figura 15, é possível afirmar que a separação foi satisfatória. Portanto, optou-se pelo método HPLC/DAD no desenvolvimento do procedimento de preparo de amostras para a determinação de compostos fenólicos em sucos, utilizando DPX como sistema de extração.

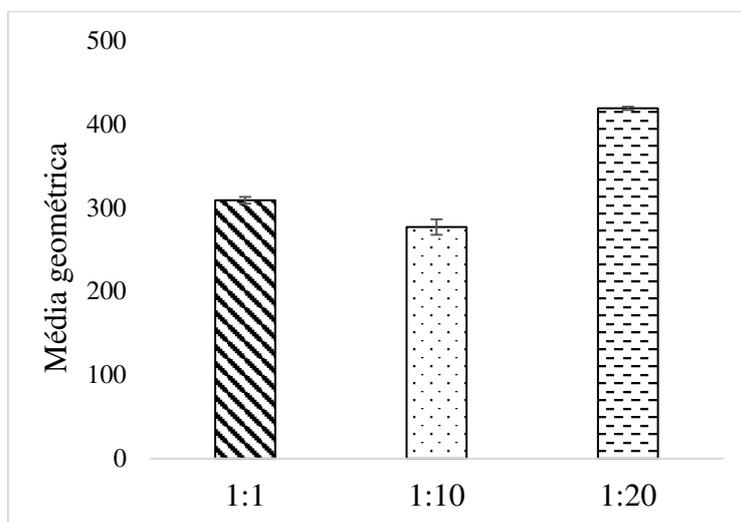
4.3.2 Otimização do método

4.3.2.1 Etapa I

4.3.2.1.1 Diluição da amostra

O suco de uva possui uma composição heterogênea caracterizada pela variedade de classes de compostos orgânicos e inorgânicos (KERSH et al., 2023) que podem influenciar a eficiência de extração dos compostos alvos. Portanto, o procedimento DPX foi inicialmente avaliado em amostras de suco de uva diluídas em três proporções, incluindo 1:1, 1:10 e 1:20 (suco de uva e água ultrapura). O estudo foi realizado através de planejamento univariado realizado em soluções de suco de uva comercial e água ultrapura em diferentes diluições. A DPX-RP foi utilizada como fase de extração. O volume de amostra foi 800 µL em pH 3,0. Os ciclos e tempo de extração foram 5 ciclos de 10 s cada. 1 ciclo de limpeza de 10 s com 800 µL de água ultrapura. E os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 10 s cada com 200 µL de solvente metanol. Essas condições foram pré-fixadas inicialmente, e ao longo do desenvolvimento do método de preparo de amostra foram otimizadas com base na melhor resposta analítica considerando uma frequência analítica apreciável. A Figura 16 mostra o gráfico de barras obtido.

Figura 16. Gráfico de barras obtido na otimização da diluição da amostra para o método de extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze compostos fenólicos.



Elaborado pela autora (2024).

Os resultados da otimização da diluição foram expressos pela média geométrica das áreas dos picos dos onze analitos. A análise estatística foi realizada por análise de variância (ANOVA) e teste *post hoc* de Tukey. De acordo com os resultados, a maior eficiência de extração foi alcançada com a amostra diluída em 20 vezes com resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) das demais condições, conforme análise de variância (ANOVA). Além disso, o teste *post hoc* de Tukey indica que a diluição 1:20 apresenta resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) das diluições 1:1 e 1:10. O resultado obtido pode ser atribuído a maior disponibilidade dos analitos para serem extraídos em maior diluição, uma vez que a concentração de compostos majoritários como ácidos orgânico e açúcares são reduzidos. Portanto, a diluição de 20 vezes foi selecionada como condição para o desenvolvimento do método.

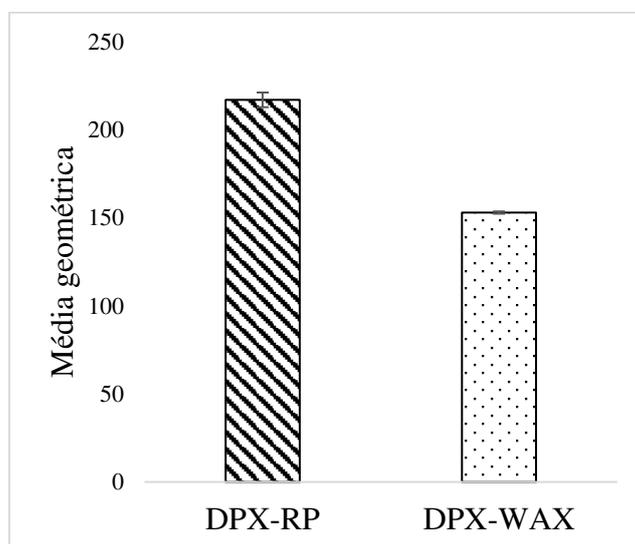
4.3.2.2 Etapa II

4.3.2.2.1 Fase extratora

O desempenho de extração de onze compostos fenólicos foi avaliado com duas fases extratoras comerciais, incluindo DPX-RP e DPX-WAX. No estudo de desenvolvimento de método de extração de compostos fenólicos em suco de uva não fora

considerado a fase DPX-C₁₈, de acordo com os resultados apresentados e discutidos no desenvolvimento do método de extração de compostos fenólicos para vinho, capítulo 3, seção 3.3, subseção 3.3.2, item 3.3.2.1. O estudo foi realizado através de planejamento univariado realizado em soluções de suco de uva comercial e água ultrapura (1:20). O volume de amostra foi 800 µL em pH 3,0. Os ciclos e tempo de extração foram 5 ciclos de 10 s cada. 1 ciclo de limpeza de 10 s com 800 µL de água ultrapura. E os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 10 s cada com 200 µL de solvente metanol. A Figura 17 apresenta o gráfico de barras obtido para otimização da fase de extração.

Figura 17. Gráfico de barras obtido na otimização da fase de extração do método para extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze compostos fenólicos.



Elaborado pela autora (2024).

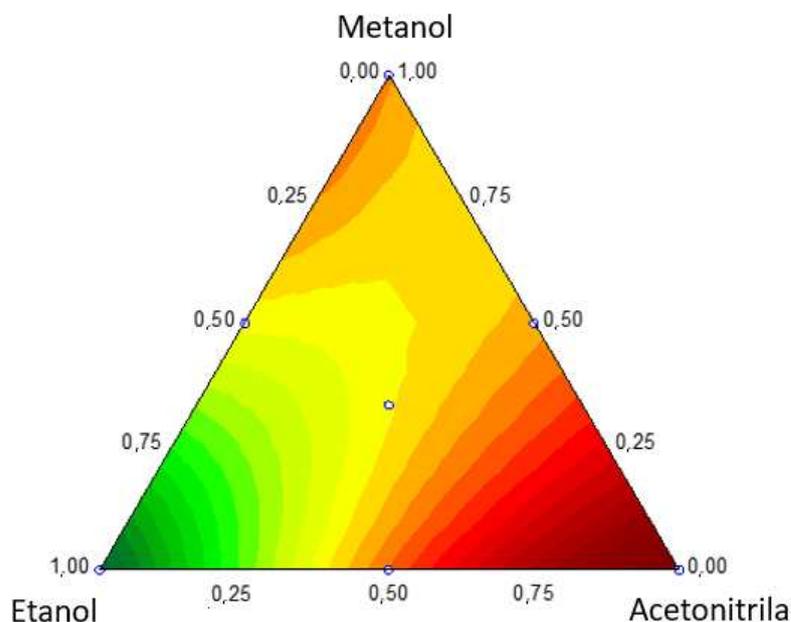
Os resultados da otimização da fase extratora foram expressos pela média geométrica das áreas dos picos dos onze analitos. Os resultados indicam que a maior eficiência de extração foi alcançada com o DPX-RP com resultados estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste *t de Student*. O desempenho na extração de analitos está ligado à capacidade da fase de extração interagir seletivamente com os compostos alvo. Em ambas as fases de extração avaliadas, os analitos podem interagir através de interações π - π . Além disso, DPX-WAX pode interagir através de ligações de hidrogênio. Porém, a diferença entre as fases não promoveu aumento na eficiência de extração. Portanto, a DPX-RP foi escolhida como fase de extração para o

desenvolvimento do método de extração para determinação de compostos fenólicos em suco de uva.

4.3.2.2.2 Solvente de dessorção

Os solventes metanol, acetonitrila e etanol foram avaliados como solvente de dessorção dos analitos. A otimização foi realizada por meio de um planejamento *Simplex Lattice*, a matriz decodificada está apresentada na Tabela 13, seção 4.2 As análises foram realizadas em soluções de suco de uva comercial e água ultrapura (1:20). O volume de amostra foi 800 μL em pH 3,0. Os ciclos e tempo de extração foram 5 ciclos de 10 s cada. 1 ciclo de limpeza de 10 s com 800 μL de água ultrapura. E os ciclos, tempo e solvente de dessorção foram 2 ciclos de 10 s cada com 200 μL de solvente. A Figura 18 apresenta o resultado obtido.

Figura 18. Gráfico de contorno obtido do planejamento *Simplex Lattice* na otimização do solvente de extração do método para extração de compostos fenólicos em suco de uva. Os resultados estão expressos por meio da média geométrica da área dos picos de onze analitos.



Elaborado pela autora (2024).

O gráfico de contorno (Figura 18) foi obtido através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,9757, e indica uma tendência de resposta máxima aplicando

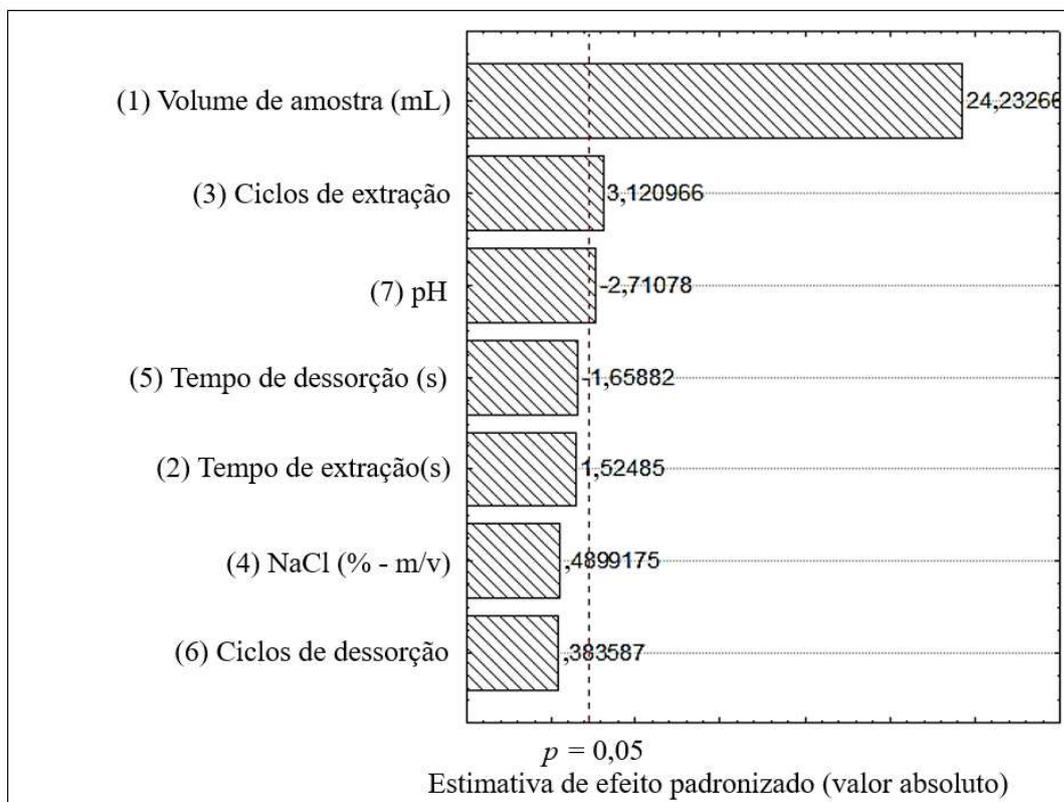
acetonitrila em maior proporção. Dada a melhor resposta, o acetonitrila foi escolhida como solvente de dessorção. Nesta etapa, o solvente deve ser capaz de quebrar a interação analito/fase de extração. Os resultados observados podem ser atribuídos ao caráter menos polar do acetonitrila em comparação ao metanol e ao etanol. Esta característica corrobora a polaridade da fase de extração. Isto significa que ao usar acetonitrila, a polaridade do solvente e da fase de extração são similares e, portanto, a força do solvente acetonitrila é maior do que outros solventes.

4.3.2.3 Etapa III

4.3.2.3.1 Planejamento fatorial fracionário

Os principais parâmetros de extração que podem apresentar influência estatística significativa sobre a eficiência de extração em métodos com DPX foram avaliados através de um planejamento fatorial fracionário, que avaliou sete parâmetros, incluindo volume da amostra, tempo de extração, ciclos de extração, concentração de sal, tempo de dessorção, ciclos de dessorção e pH. Como mencionado no capítulo anterior, através de planejamentos fatoriais é possível obter boas estimativas quanto à influência significativa dos parâmetros envolvidos na metodologia proposta, além de avaliar qual a faixa de trabalho mais adequada para os parâmetros. O principal objetivo dessa etapa é selecionar apenas os parâmetros que apresentem alguma influência significativa sobre o método para serem otimizados posteriormente. No método de otimização proposto, inicialmente foi realizado um planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} , a matriz decodificada está apresentada na Tabela 14, seção 4.2. A Figura 19 apresenta o gráfico de Pareto obtido com os efeitos principais.

Figura 19: Gráfico de Pareto obtido através do planejamento fatorial fracionário 2^{7-3} para avaliação dos parâmetros estatisticamente significativos na extração de compostos fenólicos em suco de uva.



Elaborado pela autora (2024).

De acordo com os resultados, ao avaliar a influência individual dos parâmetros, o volume de amostra, pH da amostra e ciclos de extração têm influência significativa na extração dos analitos. Há uma tendência de aumento da resposta analítica utilizando volumes de amostra próximos ao nível alto avaliado (3200 μL) e pH da amostra próximo ao nível baixo avaliado (pH 2). Esses resultados orientaram a próxima otimização, onde optou-se por otimizar esses três parâmetros através de um planejamento composto central. Os demais parâmetros não tiveram influência significativa na extração de compostos fenólicos, por isso foram estabelecidas condições compromisso considerando a tendência de resposta apresentada no gráfico de pareto. O tempo e os ciclos de dessorção foram fixados em 2 ciclos de 10 s, e o tempo de extração foi fixado em 10 s. O resultado para o tempo de extração corrobora a proposta de extração rápida apresentada pela técnica DPX. Ressalta-se que durante a aspiração da amostra, o ar é aspirado em sequência, e como resultado, formam-se pequenas bolhas com grande área superficial, e estas promovem

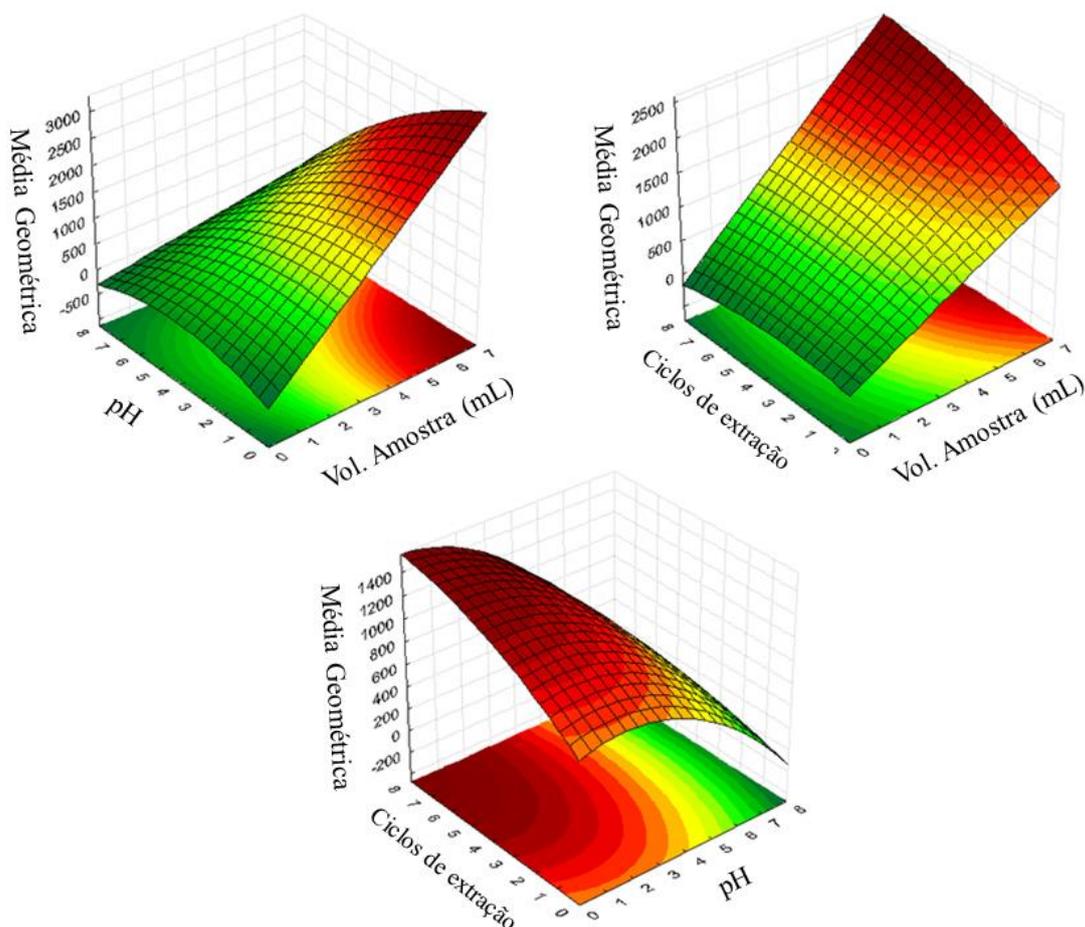
uma mistura dispersiva entre a amostra e a fase de extração, resultando em um curto tempo de extração (TURAZZI et al., 2019).

4.3.2.4 *Etapa IV*

4.3.2.4.1 Volume de amostra, ciclos de extração e pH

O volume de amostra, ciclos de extração e pH da amostra foram otimizados através de um planejamento do composto central, a matriz decodificada está apresentada na Tabela 15, seção 4.2. As análises foram realizadas em soluções de suco de uva comercial e água ultrapura (1:20). O tempo de extração foi de 10 s por ciclo. 1 ciclo de limpeza de 10 s com 800 μ L de água ultrapura. Os ciclos, tempo e solvente de desorção foram 2 ciclos de 10 s cada com 200 μ L de solvente metanol. A Figura 20 apresenta as superfícies de resposta obtidas através de um modelo matemático quadrático com R^2 de 0,9679. De acordo com a ANOVA, todos os parâmetros tiveram influência significativa na extração. Os gráficos de contorno indicam que o volume da amostra e o número de ciclos de extração apresentaram uma tendência crescente na resposta analítica em direção aos níveis máximos avaliados (Volume: 4800 μ L e ciclos de extração: 6). Além da resposta observada, é importante considerar a frequência analítica do método desenvolvido, por isso optou-se por utilizar um volume de 3200 μ L da amostra, ou seja, 4 alíquotas de 800 μ L, e realizar 5 ciclos de extração em cada alíquota, totalizando 20 ciclos de extração (5 ciclos multiplicados por 4 alíquotas de amostra). Em relação ao pH, os resultados apresentados indicam tendência de aumento da resposta analítica em valores próximos ao menor nível avaliado (pH 2). Portanto, pH 2 foi selecionado como condição de extração. Este resultado indica que os analitos são preferencialmente extraídos na sua forma neutra, principalmente, uma vez que todos os analitos possuem pKa superior a 3,3.

Figura 20. Superfícies de respostas do planejamento Composto Central para otimização do volume de amostra, ciclos de extração e pH no método de extração de compostos fenólicos em suco de uva.



Elaborado pela autora (2024).

4.3.2.5 Condições otimizadas do método

Em conclusão das otimizações, as condições estabelecidas de acordo com ensaios de otimização realizados inicialmente foram DPX-RP como fase extratora e 200 μ L de acetonitrila como solvente de dessorção dos analitos. O volume do solvente de dessorção não foi otimizado, mas sim pré-fixado em 200 μ L, por ser o menor volume de dessorção capaz de cobrir toda a fase extratora no interior da ponteira. Esse volume contribui com a pré-concentração dos analitos e com um menor volume de solvente orgânico necessário. Seguidamente, o planejamento fatorial fracionário indicou que o volume de amostra, ciclos de extração e pH da amostra apresentaram influência estatisticamente significativa

no procedimento de extração de compostos fenólicos em suco de uva, os demais parâmetros avaliados foram fixados em condições compromisso. Com isso, após o estudo de otimização, os valores determinados foram volume de amostra em 3200 μL com pH em 2,0. Extração em 5 ciclos de 10 s cada para cada alíquota, totalizando 20 ciclos de extração ao todo. E dessorção, 2 ciclos de 10 s cada com 200 μL de solvente. Dessa forma, o tempo necessário para realizar o preparo de amostra foi inferior à 5 min.

4.3.3 Parâmetros analíticos

Os parâmetros analíticos avaliados por meio da curva analítica estão apresentados na Tabela 17 Os coeficientes de correlação apresentaram valores maiores ou iguais a 0,9809 o que indica boa correlação linear em toda a faixa linear de trabalho para todos os analitos. Os limites de detecção (LOD) variaram de 0,01 a 0,09 mg L^{-1} e os limites de quantificação (LOQ) variaram de 0,03 a 0,30 mg L^{-1} . O LOD foi calculado usando 3 vezes o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração dividido pela inclinação da curva de calibração, e o LOQ foi calculado como 3,3 vezes o LOD.

Tabela 17. Faixa linear de trabalho, equação linear, coeficiente de correlação, limite de detecção e limite de quantificação de onze compostos fenólicos.

Analito	Faixa linear de trabalho (mg L⁻¹)	Equação linear	R	LOD (mg L⁻¹)	LOQ (mg L⁻¹)
Ácido gálico	0,25-7,5	$y=48,7x - 1,1$	0,9981	0,09	0,30
Ácido protocateico	0,25-7,5	$y=210,8x - 32,8$	0,9982	0,09	0,30
(+)-Catequina	0,25-7,5	$y=163,9x - 48,9$	0,9954	0,09	0,30
Ácido clorogênico	0,25-7,5	$y=389,8x - 205$	0,9935	0,01	0,03
Ácido vanílico	0,25-7,5	$y=525,8x - 178,2$	0,9928	0,01	0,03
(-)-Epicatequina	0,25-7,5	$y=202,9x - 70,3$	0,9809	0,09	0,30
Ácido ferúlico	0,10-10,0	$y=1623,1x - 172,3$	0,9978	0,02	0,06
Ácido <i>p</i>-cumárico	0,10-10,0	$y=1593,8x - 81,5$	0,9956	0,03	0,10
Miricetina	0,10-10,0	$y=671,1x - 80,1$	0,9971	0,01	0,03
Quercetina	0,10-10,0	$y=1593,8x - 81,5$	0,9955	0,01	0,03
Kaempferol	0,10-10,0	$Y=547x - 61,2$	0,9993	0,02	0,06

O efeito matriz (EM) foi calculado considerando os coeficientes angulares das curvas de calibração dos onze compostos fenólicos em soluções de suco de uva e água ultrapura (1:20) e em soluções aquosas. De acordo com a Equação 1, as porcentagens de efeito de matriz são -4,4% para ácido gálico, -11,6% para ácido protocateico, -15,4% para (+)-catequina, 13,0% para ácido clorogênico, -18,3% para ácido vanílico, 14,7% para (-)-epicatequina, 2,2% para ácido ferúlico, 0,9% para ácido *p*-cumárico, 1,6% para miricetina, -5,4% para quercetina e 9,7% para kaempferol. Os valores de EM variaram de -18,3% para ácido vanílico a 14,7% para (-)-epicatequina. Quanto mais distante o percentual estiver de zero (0%), maior será o efeito de matriz, sendo aceitável uma variação de até 20%, portanto, de acordo com os resultados avaliados, é possível concluir que não há efeito de matriz, por isso, foram preparadas curvas analíticas em soluções aquosas. Apesar da complexidade da amostra, esse resultado pode ser atrelado ao fator de diluição empregado, diminuindo assim o efeito de compostos interferentes.

Os ensaios de precisão e exatidão foram realizados em soluções de suco de uva e água ultrapura (1:20), os resultados estão descritos na Tabela 18. A precisão intradia ($n=3$) e a precisão interdial ($n=9$) foram avaliadas em três níveis de concentração. Os resultados foram expressos pelo desvio padrão relativo (DPR %) da resposta analítica da extração realizada em triplicata para cada nível de concentração. A precisão intradia apresentou valores entre 0,2 e 17,5%, e a precisão interdial apresentou valores de 0,7 e 19,6%. A exatidão do método foi estimada usando ensaios de recuperação relativa em três níveis de concentração. Os resultados variaram entre 81 e 120%. Os resultados de precisão e exatidão são considerados satisfatórios segundo as diretrizes da AOAC (AOAC, 2016).

Tabela 18. Precisão intradia e interdia e recuperação relativa obtida em soluções de suco de uva e água ultrapura (1:20).

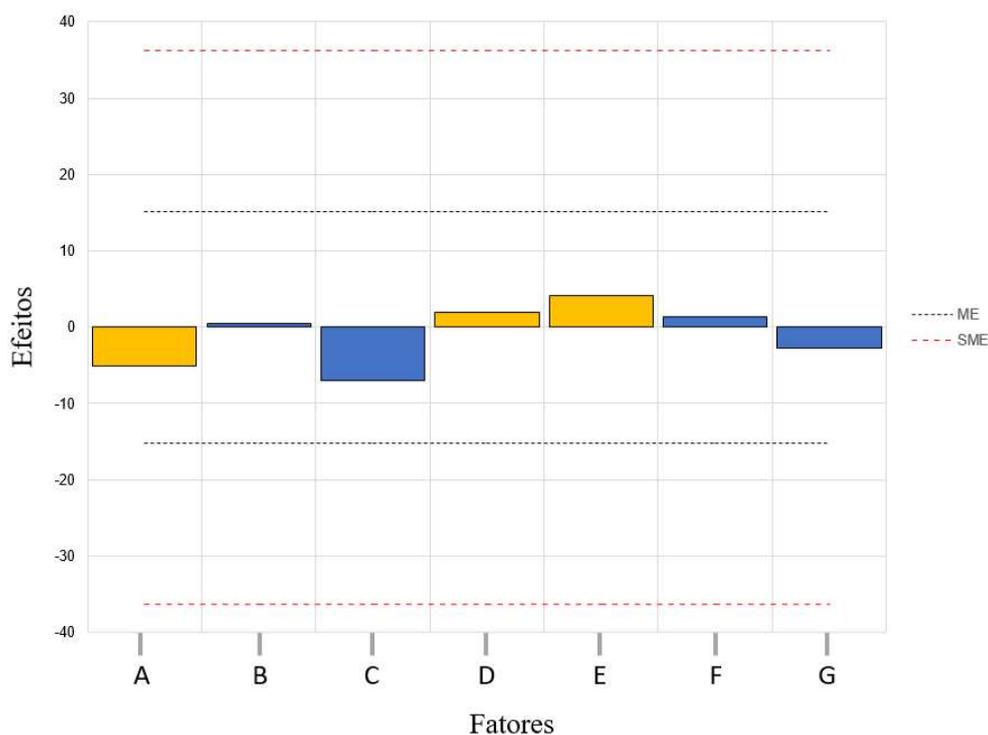
Analito	Nível de fortificação (mg L⁻¹)	Precisão intradia (%) n=3	Precisão interdia (%) n=9	Recuperação relativa (%) n=3
Ácido gálico	0,5	7,0	19,0	88
	2,5	17,5	11,1	106
	7,5	6,9	8,8	111
Ácido protocateico	0,5	7,4	17,1	120
	2,5	10,9	11,0	81
	7,5	6,0	13,3	92
(+)-Catequina	0,5	12,1	11,7	108
	2,5	15,6	3,4	98
	7,5	7,6	9,7	81
Ácido clorogênico	0,5	2,8	8,6	94
	2,5	9,2	15,5	112
	7,5	3,4	3,5	86
Ácido vanílico	0,5	1,3	0,7	95
	2,5	7,7	10,1	80
	7,5	6,5	19,6	81
(-)-Epicatequina	0,5	3,6	3,4	118
	2,5	11,5	0,7	92
	7,5	7,1	18,3	86
Ácido ferúlico	0,5	0,4	6,0	116
	2,5	5,1	8,8	84
	7,5	5,2	9,8	90
Ácido p-cumárico	0,5	0,3	19,9	99
	2,5	4,2	2,6	81
	7,5	5,1	12,0	87
Miricetina	0,5	0,2	5,5	114
	2,5	3,5	9,5	94
	7,5	4,4	9,8	84
Quercetina	0,5	0,2	4,0	119
	2,5	3,0	7,9	97
	7,5	0,7	14,1	93
Kaempferol	0,5	1,5	3,9	114
	2,5	1,4	9,0	98
	7,5	0,3	11,8	102

4.3.3.1 Robustez

A análise de robustez foi realizada para garantir a qualidade do método desenvolvido, de modo a avaliar a capacidade do método em não ser afetado por pequenas variações nos parâmetros de execução. Para isso, o teste de robustez do método foi

conduzido por meio de um planejamento fatorial fracionário de acordo com a abordagem de Youden (KARAGEORGOU; SAMANIDOU, 2014; YOU DEN, 1972; YOU DEN; STEINER, 1975). A matriz com as combinações de parâmetros e seus níveis é apresentada na Tabela 16, seção 4.2 Os parâmetros avaliados foram diluição da amostra, pH, volume da amostra, ciclos de extração, volume do solvente de dessorção, porcentagem de ácido fórmico na fase móvel e temperatura da coluna. A partir dos dados gerados, foi construído um gráfico de Lenth's (Figura 21), onde são mostrados os efeitos das sete variáveis relativas à margem de erro (ME) e margem de erro simultânea (SME).

Figura 21. Gráfico de Lenth's para avaliação da robustez do método de extração de compostos fenólicos em suco de uva. A – Diluição da amostra, B – pH, C – Volume da amostra (mL), D – Ciclos de extração, E – Volume de solvente (μ L), F – Ácido fórmico (%) e G – Temperatura da coluna ($^{\circ}$ C).



Elaborado pela autora (2024).

A primeira linha, referente à ME, relaciona a variação dos resultados inerente a avaliação dos parâmetros individualmente. Enquanto a segunda linha, referente a SME, relaciona a variação dos resultados inerente a interação entre os parâmetros. Portanto, respostas que não ultrapassam as linhas indicam que os efeitos dos parâmetros não apresentam efeitos significativos sob a robustez do método. Diante do exposto, o método desenvolvido pode ser considerado robusto sob condições otimizadas.

4.3.4 Aplicação do método

O método analítico desenvolvido foi aplicado na determinação de compostos fenólicos em três amostras de suco de uva, incluindo suco de uva tinto (variedade Bordô), suco de uva tinto orgânico (variedade Bordô e Isabel) e suco de uva branco (variedade Niágara). Os resultados estão apresentados na Tabela 19.

Tabela 19. Aplicação do método proposto para determinação de compostos fenólicos em suco de uva.

Analito	Suco de uva tinto (mg L ⁻¹)	Suco de uva tinto orgânico (mg L ⁻¹)	Suco de uva branco (mg L ⁻¹)
Ácido gálico	69,62 (± 2,9%)	96,08 (± 8,5%)	58,73 (± 17,9%)
Ácido protocateico	<LOD	<LOD	<LOD
(+)-Catequina	17,05 (± 7,0%)	<LOD	13,50 (± 12,4%)
Ácido clorogênico	70,84 (± 8,8%)	120,70 (± 4,4%)	34,71 (± 0,7%)
Ácido vanílico	11,92 (± 18,5%)	23,86 (± 19,0%)	<LOD
(-)-Epicatequina	34,38 (± 12,7%)	42,42 (± 0,6%)	<LOD
Ácido ferúlico	9,13 (± 13,9%)	16,28 (± 13,8%)	<LOD
Ácido <i>p</i> -cumárico	<LOD	4,44 (± 13,5%)	<LOD
Miricetina	5,12 (± 6,9%)	5,58 (± 1,1%)	<LOD
Quercetina	3,86 (± 12,1%)	1,72 (± 16,8%)	1,88 (± 19,0%)
Kaempferol	<LOD	<LOD	<LOQ

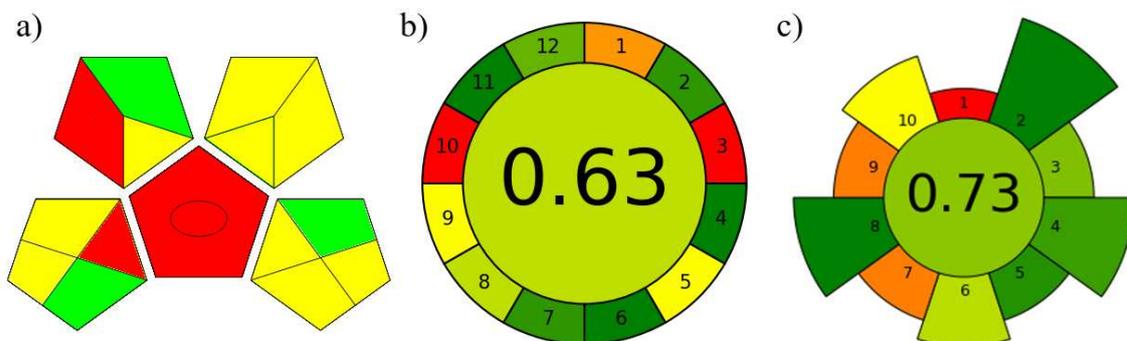
O suco de uva é uma fonte natural de compostos fenólicos para a dieta humana, e esses compostos desempenham papel fundamental na qualidade dos sucos, principalmente na cor, aroma, adstringência e sabor. As concentrações dessas substâncias biologicamente ativas no suco de uva são determinadas por diversos fatores, como a variedade da uva, as condições climáticas, as técnicas de cultivo e o processo de produção (GULER, 2023). Os compostos fenólicos presentes na uva atuam como antioxidantes naturais e apresentam importante contribuição na alimentação, principalmente na prevenção de inúmeras doenças crônicas. De acordo com os resultados, o suco de uva tinto orgânico apresentou maiores concentrações para todas as classes de compostos fenólicos avaliados, com exceção da quercetina, onde a concentração no suco de uva tinto convencional foi 44% maior em comparação ao suco de uva tinto orgânico. O ácido clorogênico (70,84-120,70 mg L⁻¹) e o ácido gálico (69,62-96,08 mg L⁻¹) foram os principais compostos fenólicos em ambos os sucos de uva tinto. Ressaltamos que a

concentração de ácido gálico e ácido clorogênico foi 38 e 70% maior no suco de uva tinto orgânico, respectivamente, em comparação ao suco de uva tinto convencional. O ácido clorogênico está associado a alguns benefícios à saúde, principalmente à prevenção de doenças cardiovasculares e a diabetes tipo 2. Em relação ao ácido gálico, vários efeitos benéficos à saúde são conhecidos, incluindo propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias (KUMAR; GOEL, 2019; RASHMI; NEGI, 2020). O suco de uva branca apresentou as menores concentrações para todos os compostos fenólicos avaliados, sendo que apenas três compostos fenólicos foram quantificados na amostra (Ácido gálico > Ácido clorogênico > (+)-Catequina > Quercetina). Vale ressaltar que o ácido gálico ($58,73 \text{ mg L}^{-1}$) e o ácido clorogênico ($34,71 \text{ mg L}^{-1}$) também foram os compostos majoritários do suco de uva branca. O ácido protocatecuico, o ácido vanílico, a (-)-epicatequina, o ácido ferúlico, o ácido *p*-cumárico, o kaempferol e a miricetina estão abaixo dos limites de quantificação do método para a amostra de suco de uva branca.

4.3.5 Avaliação do caráter verde do método

O caráter verde do método proposto para determinação de polifenóis em suco de uva foi avaliado por três métricas analíticas, incluindo Green Analytical Procedure Index (GAPI) (PŁOTKA-WASYLKA, 2018) e Analytical Greenness Calculator (AGREE) (PENA-PEREIRA; WOJNOWSKI; TOBISZEWSKI, 2020). Além disso, a métrica AGREEprep (WOJNOWSKI et al., 2022) foi utilizada para avaliar especialmente as características de preparação da amostra. O uso de métricas é uma ferramenta útil para definir o caráter verde dos métodos analíticos e identificar pontos positivos inerente a aspectos ecológicos apresentados por uma nova abordagem, bem como pontos a serem melhorados. Em resumo, o GAPI apresenta um pictograma em cores (verde, amarelo e vermelho) e o AGREE e o AGRREprep apresentam adicionalmente uma pontuação final (de 0 a 1). Em ambos, a avaliação é baseada nos 12 princípios da Química Analítica Verde (GAC) (GAŁUSZKA; MIGASZEWSKI; NAMIEŚNIK, 2013). Os resultados são apresentados na Figura 22.

Figura 22. Resultado da avaliação verde da metodologia analítica proposta para determinação de compostos fenólicos em amostras de suco de uva; A: GAPI, B: AGREE e C: AGREEprep.



Elaborado pela autora (2024).

A avaliação do ‘verde’ indica que a metodologia proposta com DPX seguida de HPLC/DAD proporciona um excelente caráter verde, com destaque para a miniaturização da técnica e zero consumo de energia na extração, uma vez que nenhuma instrumentação é necessária, pois o procedimento DPX requer apenas uma micropipeta para realizar a etapa de extração/dessorção. Além disso, destaca-se a minimização dos volumes de amostra (160 uL) e solvente (200 uL) e da massa da fase de extração (20 mg). Outro fator importante é o tempo necessário para o preparo da amostra: no método proposto são necessários em média 5 minutos para o preparo da amostra, o que reduz o tempo do procedimento analítico e a exposição do analista. Quanto aos pontos críticos, as principais penalidades estão relacionadas ao preparo de amostras ex situ, comum à análise de compostos fenólicos em suco de uva por laboratórios de pesquisa, utilização de acetonitrila como solvente de dessorção, porém, são utilizados apenas 200 uL de solvente, contribuindo para a redução de resíduos, sendo esse um ponto positivo de acordo com as métricas. E por fim, o uso de HPLC implica um peso negativo na avaliação uma vez que a técnica necessita de solventes para compor a fase móvel. Porém, deve-se ressaltar que esta técnica é amplamente utilizada para análise de compostos fenólicos, pois para a aplicação da cromatografia gasosa é necessária a inclusão de uma etapa de derivatização, o que não é recomendado pelas diretrizes para química analítica verde.

4.3.6 Comparação com outros métodos da literatura

O método desenvolvido foi justaposto a outros métodos baseados em extração em fase sólida encontrados na literatura para determinação de compostos fenólicos em suco de uva. A comparação é mostrada na Tabela 20. ARESTA et al., 2018 propuseram um método por SPME e HPLC/DAD para análise de *trans*-resveratrol, utilizando 500 µL de amostra, sem necessidade de solvente. O tempo de preparo da amostra foi de 105 min, de forma que o rendimento de preparo da amostra foi de 0,57 amostras preparadas por hora, enquanto o método proposto neste estudo apresenta um rendimento de em média 15 amostras preparadas por hora. Além disso, apenas um analito é avaliado por esse método analítico. TASHAKKORI; TAĞAÇ; MERDIVAN, 2021 desenvolveram dois métodos baseados em SPME, o primeiro utilizando HPLC/DAD e o segundo GC-MS para análise de 16 compostos fenólicos, ambos os métodos utilizaram 5 mL de amostra. O método SPME/HPLC/DAD necessitou de 500 µL de solvente para a dessorção dos analitos, e o método SPME/GC-MS não utilizou solvente, mas foi necessário realizar uma etapa de derivatização com o reagente de derivatização N,O-bis (trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). Este reagente é amplamente utilizado devido à sua alta reatividade, mas seu alto custo de aquisição é uma desvantagem. Os tempos de preparação das amostras foram de 55 min para SPME/HPLC/DAD e 65 min para SPME/GC-MS, e os rendimentos de preparação das amostras foram de 1,09 e 0,92 amostras preparadas por hora, respectivamente. Em relação aos limites de detecção, ambos os métodos discutidos apresentaram limites inferiores ao método proposto pelo DPX, característico da técnica SPME, que apresenta alto fator de enriquecimento, considerado uma vantagem. Por outro lado, deve-se considerar a possibilidade de adsorção irreversível de compostos naturalmente presentes no suco de uva, como ácidos orgânicos, minerais e açúcares (CAI et al., 2009), o que seria considerado uma desvantagem.

Com base na comparação feita com outros métodos, o método de preparo de amostra por DPX para determinação de compostos fenólicos em suco de uva se destaca por apresentar extração rápida e eficaz, devido à característica única da técnica em formar uma mistura dispersiva entre a amostra e a fase de extração, promovendo rápida adsorção dos analitos. Essa vantagem contribui para a alto rendimento de preparo de amostra por hora. Além disso, o método destaca-se pelo baixo volume de amostra (160 µL), baixo volume de solvente (200 µL), curto tempo de preparo de amostra (<5 min), facilidade de

operação do dispositivo de extração e extração simultânea de ácidos fenólicos e flavonoides. Por fim, o uso de HPLC/DAD dispensa o uso de reagente derivatizante.

Tabela 20. Comparação do método DPX e HPLC/DAD com métodos reportados na literatura para determinação de compostos fenólicos em suco de uva.

Técnica	Analitos	Volume de amostra	Volume de solvente	Tempo de preparo de amostra	Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹) ^a	LOD (mg L ⁻¹) ^a	Referência
DPX HPLC/DAD	Flavonoides e ácidos fenólicos	160 µL	200 µL	<5 min	0,1 a 10	0,01 a 0,09	Este trabalho
SPME HPLC/DAD	Flavonoides, ácidos fenólicos e estilbeno.	5000 µL	500 µL	55 min	0,005 a 1	0,0025	(TASHAKKORI; TAĞAÇ; MERDIVAN, 2021)
SPME GC-MS	Flavonoides, ácidos fenólicos e estilbeno	5000 µL	-	65 min	0,00002 a 1	0,00001 a 0,00005	(TASHAKKORI; TAĞAÇ; MERDIVAN, 2021)
SPME HPLC/DAD	Estilbeno	500 µL	-	105 min	0,0013 a 0,5	0,0013	(ARESTA et al., 2018)

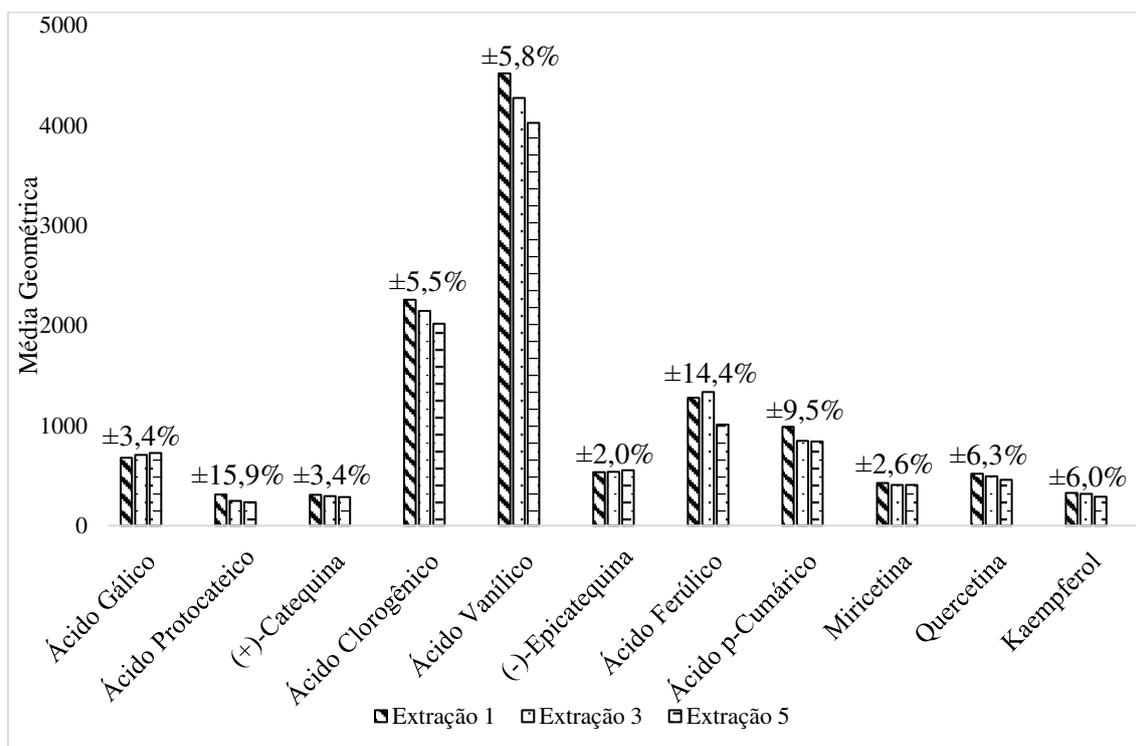
^aOs valores apresentados na tabela compreendem a faixa que inclui todos os valores estabelecidos para todos os analitos. DPX: Extração em ponteiros dispersivas; SPME: Microextração em fase sólida. HPLC/DAD: Cromatografia líquida de alta eficiência/Deteção por arranjo de diodos; GC-MS: Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa e LOD: limite de deteção.

4.3.7 Limpeza e reuso do material sorvente

Com o propósito de viabilizar o reuso das ponteiras, foi realizado um estudo de limpeza e reutilização do material sorvente em novas extrações. O estudo de limpeza foi conduzido usando ponteiras previamente empregadas na extração de compostos fenólicos em suco de uva. Para assegurar a eficácia na limpeza do material sorvente, foi avaliado o efeito de cinco repetições do procedimento de limpeza, coletando alíquotas de acetonitrila (solvente de dessorção) para análise por HPLC/DAD. Na primeira alíquota de limpeza, observou-se uma redução significativa, de pelo menos 54%, nos sinais cromatográficos de todos os analitos. Nos experimentos subsequentes, não foram detectados sinais para nenhum dos analitos. Contudo, para garantir que ocorra a remoção completa dos analitos remanescentes, optou-se por estabelecer um procedimento de limpeza composto por dois ciclos de lavagem.

Para investigar a reuso do material sorvente, uma ponteira nova foi utilizada para realizar a primeira extração do estudo (Extração 1). Após cada extração, a limpeza do material sorvente foi conduzida de acordo com os critérios estabelecidos na fase de avaliação da limpeza do sorvente. O estudo avaliou cinco extrações subsequentes, cujos resultados estão representados na Figura 23.

Figura 23: Gráfico de barras obtido no estudo de reuso da ponteira.



Elaborado pela autora (2024).

Foram avaliados como resultado, o desvio padrão relativo das extrações 1, 3 e 5, com resultados entre 2,0% e 15,9%, indicando que as ponteiras DPX aplicadas nessa metodologia analítica podem ser reutilizadas em pelo menos cinco extrações, de acordo com o desvio padrão dos resultados inferiores a 20%, valor utilizado como critério. Os resultados apresentados nesse estudo corroboram com os conceitos de preparo de amostra verde, onde é preferível optar por materiais reutilizáveis, no entanto, cabe destacar, que ao optar pelo reuso da ponteira, é acrescido um volume de 2,4 mL de solventes que devem ser contabilizados como resíduos.

4.4 CONCLUSÃO PARCIAL

Foi desenvolvido um novo método utilizando as técnicas DPX e HPLC/DAD para a análise de onze compostos fenólicos, abrangendo ácidos fenólicos e flavonoides, em amostras de suco de uva. O processo de extração e dessorção foi otimizado de forma eficaz principalmente por meio de abordagens multivariadas, resultando na redução do número de experimentos necessários e permitindo a avaliação da influência estatística significativa dos parâmetros de extração. As principais vantagens do método desenvolvido incluem a simplicidade na preparação da amostra, com um curto tempo de extração, menos de 5 minutos, e um baixo consumo de solvente orgânico, apenas 200 μL . Os parâmetros analíticos de mérito foram avaliados, os resultados demonstraram linearidade satisfatória com um coeficiente de correlação (R) igual ou superior a 0,9809, baixos limites de quantificação (0,03-0,30 mg L^{-1}), precisões abaixo de 20% e recuperações variando de 81 a 120%. Além disso, o método otimizado e validado não apresentou efeito de matriz. A aplicação prática desse método foi avaliada em três amostras de suco de uva comercial: suco de uva tinto, suco de uva tinto orgânico e suco de uva branco. Os principais compostos identificados nas amostras foram o ácido clorogênico (70,84-120,70 mg L^{-1}) e o ácido gálico (69,62-96,08 mg L^{-1}). Notavelmente, o suco de uva tinto elaborado com uvas orgânicas demonstrou uma maior abundância de compostos fenólicos em comparação com os outros sucos. Esses resultados destacam a capacidade do método em determinar compostos fenólicos em amostras reais de suco de uva, tornando-o uma ferramenta útil para a avaliação da qualidade dos sucos com base na sua composição fenólica. Além disso, é relevante ressaltar que existem poucos estudos dedicados ao desenvolvimento de métodos para a análise de compostos fenólicos em sucos de uva, tornando este método inovador no que diz respeito ao preparo de amostras para avaliação da composição fenólica em sucos de uva. Também é importante destacar que o método se alinha com os princípios da química analítica verde, como evidenciado pelas métricas GAPI, AGREE (pontuação 0,63) e AGREEprep (pontuação 0,73). Portanto, os resultados apresentados validam a notoriedade do método por DPX e HPLC/DAD para a determinação de compostos fenólicos em amostras de suco de uva, reforçando sua utilidade na avaliação da qualidade desses produtos com base em sua composição fenólica.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os métodos desenvolvidos neste estudo demonstraram resultados satisfatórios, equiparáveis ou superiores às metodologias existentes na literatura. O uso de ferramentas quimiométricas foi fundamental para identificar fatores críticos na etapa de extração. Ambos os métodos permitiram a extração de compostos fenólicos com um volume mínimo de amostra e solvente orgânico, utilizando apenas 200 μ L de solvente por amostra. Além disso, os métodos desenvolvidos destacaram-se pela frequência analítica, com um tempo de preparo da amostra de menos de cinco minutos. Esses métodos também foram avaliados quanto à linearidade, limites de quantificação e detecção, precisão e recuperação, apresentando valores adequados de acordo com os critérios da AOAC.

O efeito de matriz foi abordado, e, embora não tenha sido possível eliminar completamente o efeito da matriz na determinação de compostos fenólicos em vinho, obteve-se sucesso ao fazê-lo em sucos de uva. Métricas que avaliam o verde dos métodos analíticos, como GAPI e AGREE, confirmaram que os métodos propostos estão alinhados com os princípios da química analítica verde. A métrica AGREEprep permitiu avaliar especificamente o verde do preparo de amostra. A aplicabilidade dos métodos foi demonstrada por meio da análise de amostras de vinho e sucos de uva.

Os resultados apresentados nesta tese enfatizam que os métodos desenvolvidos representam excelentes alternativas para a determinação de compostos fenólicos em vinhos e sucos de uva, consolidando sua utilidade na avaliação da qualidade desses produtos com base em sua composição fenólica. Com o tempo de preparo de amostra reduzido, é viável processar aproximadamente doze amostras por hora, garantindo uma frequência analítica notável. Além disso, os estudos de limpeza e reuso indicaram a possibilidade de reutilizar as ponteiras na análise de sucos de uva, com principal apelo para a redução de custos do material de extração. É importante ressaltar que a adoção da técnica DPX para o preparo de amostra permitiu avaliar diversas classes de compostos fenólicos em um único método.

Como perspectivas futuras, sugerimos a automação do preparo de amostra por DPX e a implementação dessas metodologias em laboratórios de análise de rotina, bem como a expansão do uso da DPX para análise de compostos fenólicos em outras bebidas, como espumantes, cervejas, sucos, infusões de chás e kombuchas. Essas iniciativas contribuirão para uma análise mais eficiente e sustentável dos compostos bioativos em

diversas matrizes alimentares, alinhadas com os avanços tecnológicos em métodos analíticos e o compromisso com o meio ambiente e saúde do analista.

REFERÊNCIAS

AGUIAR JÚNIOR, Carlos Augusto Santos; SANTOS, Allyson Leandro Rodrigues Dos; FARIA, Anizio Marcio De. Disposable pipette extraction using a selective sorbent for carbendazim residues in orange juice. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 309, n. October 2019, p. 125756, 2020. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125756. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125756>.

ALARA, Oluwaseun Ruth; ABDURAHMAN, Nour Hamid; UKAEGBU, Chinonso Ishamel. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, [S. l.], v. 4, n. February, p. 200–214, 2021. DOI: 10.1016/j.crfs.2021.03.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.crfs.2021.03.011>.

ANASTAS, Paul T. Green Chemistry and the role of analytical methodology development. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 29, n. 3, p. 167–175, 1999. DOI: 10.1080/10408349891199356.

ANTICONA, Mayra; LOPEZ-MALO, Daniel; FRIGOLA, Ana; JOSE, Maria; BLESÁ, Jesus. Comprehensive analysis of polyphenols from hybrid Mandarin peels by SPE and HPLC-UV. **LWT**, [S. l.], v. 165, n. July, p. 113770, 2022. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113770. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113770>.

AOAC. **Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements**. [s.l: s.n.].

ARESTA, Antonella; COTUGNO, Pietro; MASSARI, Federica; ZAMBONIN, Carlo. Determination of Trans-resveratrol in Wines , Spirits , and Grape Juices Using Solid-Phase Micro Extraction Coupled to Liquid Chromatography with UV Diode-Array Detection. **Food Analytical Methods**, [S. l.], p. 426–431, 2018. DOI: 10.1007/s12161-017-1013-0.

BADERSCHNEIDER, B.; WINTERHALTER, P. Isolation and characterization of novel benzoates, cinnamates, flavonoids, and lignans from Riesling wine and screening for antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, [S. l.], v. 49, n. 6, p. 2788–2798, 2001. DOI: 10.1021/jf010396d.

BAUTISTA-ORTÍN, A. B.; MARTÍNEZ-CUTILLAS, A.; ROS-GARCÍA, J. M.;

LÓPEZ-ROCA, J. M.; GÓMEZ-PLAZA, E. Improving colour extraction and stability in red wines: The use of maceration enzymes and enological tannins. **International Journal of Food Science and Technology**, [S. l.], v. 40, n. 8, p. 867–878, 2005. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2005.01014.x.

BORDIN, Dayanne; ALVES, Marcela; DE CAMPOS, Eduardo; MARTINIS, Bruno. Disposable pipette tips extraction: Fundamentals, applications and state of the art. **Journal of Separation Science**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 1168–1172, 2016. DOI: 10.1002/jssc.201500932.

CAI, Lingshuang; KOZIEL, Jacek A.; DHARMADHIKARI, Murli; (HANS) VAN LEEUWEN, J. Rapid determination of trans-resveratrol in red wine by solid-phase microextraction with on-fiber derivatization and multidimensional gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1216, n. 2, p. 281–287, 2009. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.11.050.

CAPRARULO, V.; GIROMINI, C.; ROSSI, L. Animal The international journal of animal bioscience Review : Chestnut and quebracho tannins in pig nutrition : the effects on performance and intestinal health. **Animal**, [S. l.], v. 15, n. 1, p. 100064, 2021. DOI: 10.1016/j.animal.2020.100064. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.animal.2020.100064>.

CARASEK, Eduardo; MORÉS, Lucas; HUELSMANN, Ricardo Dagnoni. Disposable pipette extraction: A critical review of concepts, applications, and directions. **Analytica Chimica Acta**, [S. l.], v. 1192, 2022. DOI: 10.1016/j.aca.2021.339383.

CARASEK, Eduardo; MORÉS, Lucas; MERIB, Josias. Trends in Environmental Analytical Chemistry Basic principles , recent trends and future directions of microextraction techniques for the analysis of aqueous environmental samples. **Biochemical Pharmacology**, [S. l.], v. 19, p. e00060, 2018. DOI: 10.1016/j.teac.2018.e00060.

CASADO, Natalia; MORANTE-ZARCERO, Sonia; PÉREZ-QUINTANILLA, Damián; CÂMARA, José S. Trends in Food Science & Technology Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols : Micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.],

v. 98, n. July 2018, p. 167–180, 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2018.06.020. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.06.020>.

CHAVES, Andréa R.; MOURA, Bruno H. F.; CARIS, Juciene A.; RABELO, Denilson; EUGÊNIA, Maria; QUEIROZ, C. The development of a new disposable pipette extraction phase based on polyaniline composites for the determination of levels of antidepressants in plasma samples. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1399, p. 1–7, 2015. DOI: 10.1016/j.chroma.2015.04.027. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2015.04.027>.

CORAZZA, Gabriela; MERIB, Josias; MAGOSSO, Hérica A.; BITTENCOURT, Otávio R.; CARASEK, Eduardo. A hybrid material as a sorbent phase for the disposable pipette extraction technique enhances efficiency in the determination of phenolic endocrine-disrupting compounds. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1513, p. 42–50, 2017. DOI: 10.1016/j.chroma.2017.07.050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2017.07.050>.

DE ARAÚJO, Fábio Fernandes; DE PAULO FARIAS, David; NERI-NUMA, Iramaia Angélica; PASTORE, Gláucia Maria. Polyphenols and their applications: An approach in food chemistry and innovation potential. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 338, n. July 2020, p. 127535, 2021. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.127535. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127535>.

DE CARVALHO, José Tarcísio Giffoni et al. The immunoregulatory function of polyphenols: implications in cancer immunity. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 85, p. 108428, 2020. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2020.108428. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2020.108428>.

DECROIX, Lieselot; DIAS, Danusa; ROMAIN, Soares; ELSA, Meeusen. Cocoa Flavanol Supplementation and Exercise : A Systematic Review. **Sports Medicine**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 867–892, 2018. DOI: 10.1007/s40279-017-0849-1. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s40279-017-0849-1>.

DESEO, Myrna A.; ELKINS, Aaron; ROCHFORD, Simone; KITCHEN, Barry. Antioxidant activity and polyphenol composition of sugarcane molasses extract. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 314, n. June 2019, p. 126180, 2020. DOI:

10.1016/j.foodchem.2020.126180. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126180>.

DURAZZO, Alessandra; CAIAZZO, Elisabetta; LUCARINI, Massimo; CICALA, Carla; IZZO, Angelo A.; NOVELLINO, Ettore; SANTINI, Antonello. Polyphenols: A concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, [S. l.], n. May, p. 2221–2243, 2019. DOI: 10.1002/ptr.6419.

DWYER, Kyle; HOSSEINIAN, Farah; ROD, Michel. The Market Potential of Grape Waste Alternatives. **Journal of Food Research**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 91, 2014. DOI: 10.5539/jfr.v3n2p91.

ESPITIA-LÓPEZ, J.; ESCALONA-BUENDÍA, H. B.; LUNA, H.; VERDE-CALVO, J. R. Multivariate study of the evolution of phenolic composition and sensory profile on mouth of Mexican red Merlot wine aged in barrels vs wood chips. **CYTA - Journal of Food**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 26–31, 2015. DOI: 10.1080/19476337.2014.907826. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/19476337.2014.907826>.

FABJANOWICZ, Magdalena; PŁOTKA-WASYLKA, Justyna; NAMIEŚNIK, Jacek. Detection, identification and determination of resveratrol in wine. Problems and challenges. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 103, p. 21–33, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2018.03.006.

FERREIRA, Sergio Luis Costa et al. Statistical designs and response surface techniques for the optimization of chromatographic systems. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1158, n. 1–2, p. 2–14, 2007. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.03.051.

GALUSZKA, Agnieszka; MIGASZEWSKI, Zdzisław; NAMIEŚNIK, Jacek. The 12 principles of green analytical chemistry and the SIGNIFICANCE mnemonic of green analytical practices. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 50, p. 78–84, 2013. DOI: 10.1016/j.trac.2013.04.010.

GARRIDO, Jorge; BORGES, Fernanda. Wine and grape polyphenols — A chemical perspective. **FRIN**, [S. l.], v. 54, n. 2, p. 1844–1858, 2013. DOI: 10.1016/j.foodres.2013.08.002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.08.002>.

GIUSTI, Federica; CAPRIOLI, Giovanni; RICCIUTELLI, Massimo; VITTORI, Sauro; SAGRATINI, Gianni. Determination of fourteen polyphenols in pulses by high performance liquid chromatography-diode array detection (HPLC-DAD) and correlation study with antioxidant activity and colour. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 221, p. 689–697, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2016.11.118. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.118>.

GOMES, Trilícia Margarida; TOALDO, Isabela Maia; HAAS, Isabel Cristina da Silva; BURIN, Vívian Maria; CALIARI, Vinicius; LUNA, Aderval S.; DE GOIS, Jefferson Santos; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. Differential contribution of grape peel, pulp, and seed to bioaccessibility of micronutrients and major polyphenolic compounds of red and white grapes through simulated human digestion. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 52, n. August 2018, p. 699–708, 2019. DOI: 10.1016/j.jff.2018.11.051.

GONÇALVES, João; SILVA, Catarina L.; CASTILHO, Paula C.; CÂMARA, José S. An attractive , sensitive and high-throughput strategy based on microextraction by packed sorbent followed by UHPLC-PDA analysis for quanti fi cation of hydroxybenzoic and hydroxycinnamic acids in wines. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 106, p. 129–138, 2013. DOI: 10.1016/j.microc.2012.05.037. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2012.05.037>.

GRANATO, Daniel; DE MAGALHÃES CARRAPEIRO, Mariana; FOGLIANO, Vincenzo; VAN RUTH, Saskia M. Effects of geographical origin, varietal and farming system on the chemical composition and functional properties of purple grape juices: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 52, p. 31–48, 2016. DOI: 10.1016/j.tifs.2016.03.013.

GREYLING, Arno; BRUNO, Rosa M.; DRAIJER, Richard; MULDER, Theo; THIJSEN, Dick H. J.; TADDEI, Stefano; VIRDIS, Agostino; GHIADONI, Lorenzo. Effects of wine and grape polyphenols on blood pressure, endothelial function and sympathetic nervous system activity in treated hypertensive subjects. **Journal of Functional Foods**, [S. l.], v. 27, p. 448–460, 2016. DOI: 10.1016/j.jff.2016.10.003. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.10.003>.

GUERRERO, Raúl F.; ALIAÑO-GONZÁLEZ, María José; PUERTAS, Belén; RICHARD, Tristan; CANTOS-VILLAR, Emma. Comparative analysis of stilbene

concentration in grapevine shoots of thirteen *Vitis* during a three-year study. **Industrial Crops & Products**, [S. l.], v. 156, n. May, p. 112852, 2020. DOI: 10.1016/j.indcrop.2020.112852. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112852>.

GULER, Ali. Effects of different maceration techniques on the colour, polyphenols and antioxidant capacity of grape juice. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 404, n. PA, p. 134603, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2022.134603. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.134603>.

HAAS, Isabel Cristina da Silva; TOALDO, Isabela Maia; DE GOIS, Jefferson Santos; BORGES, Daniel L. G.; PETKOWICZ, Carmen Lúcia de Oliveira; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. Phytochemicals, Monosaccharides and Elemental Composition of the Non-Pomace Constituent of Organic and Conventional Grape Juices (*Vitis labrusca* L.): Effect of Drying on the Bioactive Content. **Plant Foods for Human Nutrition**, [S. l.], v. 71, n. 4, p. 422–428, 2016. DOI: 10.1007/s11130-016-0579-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s11130-016-0579-9>.

HAAS, Isabel; JÔNATAS, Diorge; TOALDO, Isabela; FEDRIGO, Toaldo; INÊS, Márcia; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. PharmaNutrition Evaluation of antiproliferative and anti-inflammatory effects of non-pomace sediment of red grape juices (*Vitis labrusca* L.) in healthy and cancer cells after in vitro gastrointestinal simulation. **PharmaNutrition**, [S. l.], v. 13, n. March, p. 100204, 2020. DOI: 10.1016/j.phanu.2020.100204. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.phanu.2020.100204>.

HAAS, Isabel; TOALDO, Isabela Maia; GOMES, Trilícia Margarida; LUNA, Aderval S.; DE GOIS, Jefferson Santos; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. Polyphenolic profile, macro- and microelements in bioaccessible fractions of grape juice sediment using in vitro gastrointestinal simulation. **Food Bioscience**, [S. l.], v. 27, n. May 2018, p. 66–74, 2019. DOI: 10.1016/j.fbio.2018.11.002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2018.11.002>.

HELENO, Sandrina A.; MARTINS, Anabela; JOÃO, Maria; QUEIROZ, R. P.; FERREIRA, Isabel C. F. R. Bioactivity of phenolic acids: Metabolites versus parent compounds: A review. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 173, p. 501–513, 2015. DOI:

10.1016/j.foodchem.2014.10.057. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.10.057>.

HELM, Laura; MACDONALD, Ian A. Impact of beverage intake on metabolic and cardiovascular health. **Nutrition Reviews**, [S. l.], v. 73, p. 120–129, 2015. DOI: 10.1093/nutrit/nuv049.

IBRAHIM, Azreen; YASER, Abu Zahrim; LAMAMING, Junidah. Synthesising tannin-based coagulants for water and wastewater application: A review. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 9, n. 1, p. 105007, 2021. DOI: 10.1016/j.jece.2020.105007. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.105007>.

JEFFERY, D. W.; PARKER, M.; SMITH, P. A. Flavonol composition of Australian red and white wines determined by high-performance liquid chromatography. **Australian Journal of Grape and Wine Research**, [S. l.], v. 14, n. 3, p. 153–161, 2008. DOI: 10.1111/j.1755-0238.2008.00017.x.

KALLITHRAKA, S.; SALACHA, M. I.; TZOUROU, I. Changes in phenolic composition and antioxidant activity of white wine during bottle storage: Accelerated browning test versus bottle storage. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 113, n. 2, p. 500–505, 2009. DOI: 10.1016/j.foodchem.2008.07.083. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.07.083>.

KARAGEORGOU, Eftichia; SAMANIDOU, Victoria. Youden test application in robustness assays during method validation. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1353, p. 131–139, 2014. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.01.050. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2014.01.050>.

KERSH, Dina M. E.; HAMMAD, Ghada; DONIA, Marwa S.; FARAG, Mohamed A. A Comprehensive Review on Grape Juice Beverage in Context to Its Processing and Composition with Future Perspectives to Maximize Its Value. **Food and Bioprocess Technology**, [S. l.], v. 16, n. 1, p. 1–23, 2023. DOI: 10.1007/s11947-022-02858-5. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11947-022-02858-5>.

KRAWCZYK, Hanna. The stilbene derivatives, nucleosides, and nucleosides modified by stilbene derivatives. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 90, n. April, p. 103073, 2019. DOI: 10.1016/j.bioorg.2019.103073. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103073>.

KUMAR, Atanu; ISLAM, Nazrul; FARUK, Omar; DUNGANI, Rudi. Review on tannins : Extraction processes , applications and possibilities. **South African Journal of Botany**, [S. l.], v. 135, p. 58–70, 2020. DOI: 10.1016/j.sajb.2020.08.008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2020.08.008>.

KUMAR, Naresh; GOEL, Nidhi. Phenolic acids : Natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, [S. l.], v. 24, p. e00370, 2019. DOI: 10.1016/j.btre.2019.e00370. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00370>.

LANG, Huhu; YANG, Ruinan; DOU, Xinjing; WANG, Dandan; ZHANG, Liangxiao; LI, Ji; LI, Peiwu. Simultaneous determination of 19 phenolic compounds in oilseeds using magnetic solid phase extraction and LC-MS/MS. **LWT**, [S. l.], v. 107, n. January, p. 221–227, 2019. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.03.018.

LI, Jing; JIA, Shaodong; YOON, Sang; LEE, Seul; KWON, Sung; LEE, Jeongmi. Ion-pair dispersive liquid – liquid microextraction solidification of floating organic droplets method for the rapid and sensitive detection of phenolic acids in wine samples using liquid chromatography combined with a core – shell particle column. **Journal of Food Composition and Analysis**, [S. l.], v. 45, p. 73–79, 2016. DOI: 10.1016/j.jfca.2015.09.016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfca.2015.09.016>.

LI, Junjie; ZHAO, Rui; MIAO, Peiran; XU, Fengfeng; CHEN, Jiahao; JIANG, Xiaoying; HUI, Zi; WANG, Liwei; BAI, Renren. Discovery of anti-inflammatory natural flavonoids: Diverse scaffolds and promising leads for drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, [S. l.], v. 260, n. June, p. 115791, 2023. DOI: 10.1016/j.ejmech.2023.115791. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2023.115791>.

LIMA, Marcos; DUTRA, Maria; TOALDO, Isabela Maia; CORRÊA, Luiz Claudio; PEREIRA, Giuliano Elias; DE OLIVEIRA, Débora; BORDIGNON-LUIZ, Marilde; NINOW, Jorge Luiz. Phenolic compounds, organic acids and antioxidant activity of grape juices produced in industrial scale by different processes of maceration. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 188, p. 384–392, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.04.014. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.04.014>.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, [S. l.], v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010. DOI: 10.4103/0973-7847.70902.

LÓPEZ-LORENTE, Ángela I.; PENA-PEREIRA, Francisco; PEDERSEN-BJERGAARD, Stig; ZUIN, Vânia G.; OZKAN, Sibel A.; PSILLAKIS, Eleftheria. The ten principles of green sample preparation. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 148, 2022. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116530.

MAFRA, Gabriela; SPUDEIT, Daniel; BROGNOLI, Rafael; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. Expanding the applicability of cork as extraction phase for disposable pipette extraction in multiresidue analysis of pharmaceuticals in urine samples. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1102–1103, n. August, p. 159–166, 2018. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.10.021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2018.10.021>.

MALEKI, Soheila J.; CRESPO, Jesus F.; CABANILLAS, Beatriz. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 299, n. March, 2019. DOI: 10.1016/j.foodchem.2019.125124.

MESQUITA, Leonardo M.; CONTIERI, Letícia S.; SANCHES, Vitor L.; KAMIKAWACHI, Renan; SOSA, Filipe H. B.; VILEGAS, Wagner; ROSTAGNO, Maurício A. Fast and green universal method to analyze and quantify anthocyanins in natural products by UPLC-PDA. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 428, n. July, p. 136814, 2023. DOI: 10.1016/j.foodchem.2023.136814. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.136814>.

MICHAEL DONG. **HPLC/UHPLC maintenance and troubleshooting**. 2. ed. [s.l: s.n.]. DOI: 10.1002/9781119313786.ch8.

MINUTI, Lucio; PELLEGRINO, Roberto Maria; TESEI, Ilaria. Simple extraction method and gas chromatography-mass spectrometry in the selective ion monitoring mode for the determination of phenols in wine. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1114, n. 2, p. 263–268, 2006. DOI: 10.1016/j.chroma.2006.02.068.

MITHUL ARAVIND, S.; WICHENCHOT, Santad; TSAO, Rong; RAMAKRISHNAN, S.; CHAKKARAVARTHI, S. Role of dietary polyphenols on gut microbiota, their metabolites and health benefits. **Food Research International**, [S. l.], v. 142, n. October 2020, p. 110189, 2021. DOI: 10.1016/j.foodres.2021.110189. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110189>.

NASH, Victoria; RANADHEERA, C. Senaka; GEORGOUSOPOULOU, Ekavi N.; MELLOR, Duane D.; PANAGIOTAKOS, Demosthenes B.; MCKUNE, Andrew J.; KELLETT, Jane; NAUMOVSKI, Nenad. The effects of grape and red wine polyphenols on gut microbiota – A systematic review. **Food Research International**, [S. l.], v. 113, n. July, p. 277–287, 2018. DOI: 10.1016/j.foodres.2018.07.019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.07.019>.

NATIVIDADE, Mariana Mirelle Pereira; CORRÊA, Luiz Claudio; SOUZA, Scheilla Vitorino Carvalho De; PEREIRA, Giuliano Elias; LIMA, Luiz Carlos de Oliveira. Simultaneous analysis of 25 phenolic compounds in grape juice for HPLC: Method validation and characterization of São Francisco Valley samples. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 110, p. 665–674, 2013. DOI: 10.1016/j.microc.2013.08.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.microc.2013.08.010>.

OENNING, Anderson Luiz; MERIB, Josias; CARASEK, Eduardo. An effective and high-throughput analytical methodology for pesticide screening in human urine by disposable pipette extraction and gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1092, n. May, p. 459–465, 2018. DOI: 10.1016/j.jchromb.2018.06.047.

OLIVEIRA, Igor Gustavo; MARCHIONI, Camila; QUEIROZ, Maria Eugênia. Determination of anandamide in cerebrospinal fluid samples by disposable pipette extraction and ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, [S. l.], v. 1130–1131, n. May, p. 121809, 2019. DOI: 10.1016/j.jchromb.2019.121809.

PADILHA, Carla Valéria da Silva; MISKINIS, Gabriela Aquino; DE SOUZA, Marcelo Eduardo Alves Olinda; PEREIRA, Giuliano Elias; DE OLIVEIRA, Débora; BORDIGNON-LUIZ, Marilde Terezinha; LIMA, Marcos dos Santos. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-

HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 228, p. 106–115, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.01.137.

PEIXOTO, Carla M.; DIAS, Maria Inês; ALVES, Maria José; CALHELHA, Ricardo C.; BARROS, Lillian; PINHO, Simão P.; FERREIRA, Isabel C. F. R. Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 253, n. January, p. 132–138, 2018. DOI: 10.1016/j.foodchem.2018.01.163. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.01.163>.

PENA-PEREIRA, Francisco; WOJNOWSKI, Wojciech; TOBISZEWSKI, Marek. AGREE - Analytical GREENness Metric Approach and Software. **Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 92, n. 14, p. 10076–10082, 2020. DOI: 10.1021/acs.analchem.0c01887.

PINTO, Mônia; QUEIROZ, Maria Eugênia. Extração em ponteiros descartáveis: fundamentos teóricos e aplicações. **Scientia Chromatographica**, [S. l.], v. 7, n. 2, p. 101–108, 2015.

PŁOTKA-WASYLKA, J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, [S. l.], v. 181, n. January, p. 204–209, 2018. DOI: 10.1016/j.talanta.2018.01.013.

PŁOTKA-WASYLKA, Justyna; WOJNOWSKI, Wojciech. Complementary green analytical procedure index (ComplexGAPI) and software. **Green Chemistry**, [S. l.], v. 23, p. 8657–8665, 2021. DOI: 10.1039/d1gc02318g.

PRAZERES, Emanuele S.; MARYELLEN, B.; BARRETO, Amanda De A.; COUTINHO, Janclei P.; MELO, C. O.; JESUS, Raildo M. De; IVON, P. L.; GALV, Erik. Use of hexamethyldisilazane as a silanizing agent in microwave-assisted derivatization for determining phenolic compounds in wine by gas chromatography. [S. l.], v. 161, n. October 2020, 2021. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105785.

RASHMI, Havalli Bommegowda; NEGI, Pradeep Singh. Phenolic acids from vegetables: A review on processing stability and health benefits. **Food Research International**, [S. l.], v. 136, n. April, p. 109298, 2020. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109298. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109298>.

REHMAN, Muneeb U.; WALI, Adil Farooq; AHMAD, Anas; SHAKEEL, Sheeba; RASOOL, Saiema; RASHID, Shazada Mudasar; MADKHALI, Hassan; GANAIE, Majid Ahmad; KHAN, Rehan. Neuroprotective Strategies for Neurological Disorders by Natural Products: An update. **Current Neuropharmacology**, [S. l.], v. 17, p. 247–267, 2019. DOI: 10.2174/1570159X16666180911124605.

ROBLES, Alicia; FABJANOWICZ, Magdalena; PLOTKA-WASYLKA, Justyna; KONIECZKA, Piotr. Organic Acids and Polyphenols Determination in Polish Wines by Ultrasound-Assisted Solvent. **Molecules**, [S. l.], v. 24, p. 1–20, 2019.

RUTKOWSKA, Małgorzata; PLOTKA-WASYLKA, Justyna; SAJID, Muhammad; ANDRUCH, Vasil. Liquid–phase microextraction: A review of reviews. **Microchemical Journal**, [S. l.], v. 149, n. June, 2019. DOI: 10.1016/j.microc.2019.103989.

SABRA, Ali; NETTICADAN, Thomas; WIJEKOON, Champa. Grape bioactive molecules, and the potential health benefits in reducing the risk of heart diseases. **Food Chemistry: X**, [S. l.], v. 12, p. 100149, 2021. DOI: 10.1016/j.fochx.2021.100149. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2021.100149>.

SAJID, Muhammad; PLOTKA-WASYLKA, Justyna. Combined extraction and microextraction techniques: Recent trends and future perspectives. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 103, p. 74–86, 2018. DOI: 10.1016/j.trac.2018.03.013.

SAMMANI, Mohamad Subhi; CLAVIJO, Sabrina. Recent , advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. **Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 138, p. 116220, 2021. DOI: 10.1016/j.trac.2021.116220.

SANDU, Nicoleta; CHILOM, Claudia G.; POPESCU, Aurel I. Structural and molecular aspects of flavonoids as ligands for serum transferrin. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, [S. l.], p. 119600, 2021. DOI: 10.1016/j.saa.2021.119600. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.saa.2021.119600>.

SEIFRIED, Harold E.; PILCH, Susan M. Antioxidants in Health and Disease. **Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease, Third Edition**, [S. l.], p. 319–339, 2012. DOI: 10.1016/B978-0-12-391884-0.00018-4.

SERAGLIO, Siluana Katia Tischer; VALESE, Andressa Camargo; DAGUER, Heitor; BERGAMO, Greici; AZEVEDO, Mônia Stremel; GONZAGA, Luciano Valdemiro; FETT, Roseane; COSTA, Ana Carolina Oliveira. Development and validation of a LC-ESI-MS/MS method for the determination of phenolic compounds in honeydew honeys with the diluted-and-shoot approach. **Food Research International**, [S. l.], v. 87, p. 60–67, 2016. DOI: 10.1016/j.foodres.2016.06.019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.019>.

SILVA, Catarina L.; PEREIRA, Jorge; WOUTER, Van G.; GIRÓ, Carme; CÂMARA, José S. A fast method using a new hydrophilic – lipophilic balanced sorbent in combination with ultra-high performance liquid chromatography for quantification of significant bioactive metabolites in wines. **Talanta**, [S. l.], v. 86, p. 82–90, 2011. DOI: 10.1016/j.talanta.2011.08.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2011.08.007>.

SINGH, Manisha; THRIMAWITHANA, Thilini; SHUKLA, Ravi; ADHIKARI, Benu. Managing Obesity through Natural Polyphenols : A Review. **Future Foods**, [S. l.], p. 100002, 2020. DOI: 10.1016/j.fufo.2020.100002. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fufo.2020.100002>.

SOLEYMANI, Samaneh; HABTEMARIAM, Solomon; RAHIMI, Roja; MOHAMMAD, Seyed. Trends in Food Science & Technology The what and who of dietary lignans in human health : Special focus on prooxidant and antioxidant effects. **Trends in Food Science & Technology**, [S. l.], v. 106, n. December 2019, p. 382–390, 2020. DOI: 10.1016/j.tifs.2020.10.015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2020.10.015>.

SONG, Xiaominting et al. Biomedicine & Pharmacotherapy Myricetin : A review of the most recent research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, [S. l.], v. 134, p. 111017, 2021. DOI: 10.1016/j.biopha.2020.111017. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111017>.

SOUZA-SILVA, Érica A.; GIONFRIDDO, Emanuela; PAWLISZYN, Janusz. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. **Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 71, p. 236–248, 2015. DOI: 10.1016/j.trac.2015.04.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.04.018>.

SZABÓ, Éva; MAROSVÖLGYI, Tamás; SZILÁGYI, Gábor; KÖRÖSI, László; SCHMIDT, János; CSEPREGI, Kristóf; MÁRK, László; BÓNA, Ágnes. Correlations between total antioxidant capacity, polyphenol and fatty acid content of native grape seed and pomace of four different grape varieties in Hungary. **Antioxidants**, [S. l.], v. 10, n. 7, 2021. DOI: 10.3390/antiox10071101.

TASHAKKORI, Paniz; TAĞAÇ, Aylin Altınışık; MERDIVAN, Melek. Fabrication of montmorillonite/ionic liquid composite coated solid-phase microextraction fibers for determination of phenolic compounds in fruit juices by gas chromatography and liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1635, 2021. DOI: 10.1016/j.chroma.2020.461741.

TOALDO, Isabela; FOGOLARI, Odinei; PIMENTEL, Gabriela; DE GOIS, Jefferson; BORGES, Daniel; CALIARI, Vinícius; BORDIGNON-LUIZ, Marilde. Food Science and Technology Effect of grape seeds on the polyphenol bioactive content and elemental composition by ICP-MS of grape juices from *Vitis labrusca* L. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 53, n. 1, p. 1–8, 2013. DOI: 10.1016/j.lwt.2013.02.028. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.02.028>.

TOALDO, Isabela Maia; CRUZ, Fernanda Alves; ALVES, Tatiana De Lima; DE GOIS, Jefferson Santos; BORGES, Daniel L. G.; CUNHA, Heloisa Pamplona; DA SILVA, Edson Luiz; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T. Bioactive potential of *Vitis labrusca* L. grape juices from the Southern Region of Brazil: Phenolic and elemental composition and effect on lipid peroxidation in healthy subjects. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 173, p. 527–535, 2015. DOI: 10.1016/j.foodchem.2014.09.171. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.171>.

TOALDO, Isabela Maia; VAN CAMP, John; GONZALES, Gerard Bryan; KAMILOGLU, Senem; BORDIGNON-LUIZ, Marilde T.; SMAGGHE, Guy; RAES, Kathleen; CAPANOGLU, Esra; GROOTAERT, Charlotte. Resveratrol improves TNF- α -induced endothelial dysfunction in a coculture model of a Caco-2 with an endothelial cell line. **Journal of Nutritional Biochemistry**, [S. l.], v. 36, p. 21–30, 2016. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2016.07.007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2016.07.007>.

TURAZZI, Francielle Crocetta; MORÉS, Lucas; CARASEK, Eduardo; MERIB, Josias;

DE OLIVEIRA BARRA, Guilherme Mariz. A rapid and environmentally friendly analytical method based on conductive polymer as extraction phase for disposable pipette extraction for the determination of hormones and polycyclic aromatic hydrocarbons in river water samples using high-performance I. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, [S. l.], v. 7, n. 3, p. 103156, 2019. DOI: 10.1016/j.jece.2019.103156. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jece.2019.103156>.

VINAS, Pilar; CAMPILLO, Natalia; MARTÍNEZ-CASTILLO, Nelson; HERNÁNDEZ-CÓRDOBA, Manuel. Solid-phase microextraction on-fiber derivatization for the analysis of some polyphenols in wine and grapes using gas chromatography – mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, [S. l.], v. 1216, p. 1279–1284, 2009. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.12.058.

WANG, Tian-yang; LI, Qing; BI, Kai-shun. Bioactive flavonoids in medicinal plants : Structure , activity and biological fate. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, [S. l.], v. 13, n. 1, p. 12–23, 2018. DOI: 10.1016/j.ajps.2017.08.004. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.08.004>.

WOJNOWSKI, Wojciech; TOBISZEWSKI, Marek; PENA-PEREIRA, Francisco; PSILLAKIS, Eleftheria. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, [S. l.], v. 149, p. 116553, 2022. DOI: 10.1016/j.trac.2022.116553. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2022.116553>.

WOJTUNIK-KULESZA, Karolina; ONISZCZUK, Anna; ONISZCZUK, Tomasz; COMBRZYŃSKI, Maciej; NOWAKOWSKA, Dominika; MATWIJCZUK, Arkadiusz. Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. **Nutrients**, [S. l.], v. 12, n. 5, 2020. DOI: 10.3390/nu12051401.

YAMAGATA, Kazuo. Polyphenols Regulate Endothelial Functions and Reduce the Risk of Cardiovascular Disease. **Current Pharmaceutical Design**, [S. l.], v. 25, p. 2443–2458, 2019. DOI: 10.2174/1381612825666190722100504.

YANG, Dezhi; LI, Xiaolan; MENG, Dongling; WANG, Meng; YANG, Yaling. Supramolecular solvents combined with layered double hydroxide- coated magnetic

nanoparticles for extraction of bisphenols and 4-tert- octylphenol from fruit juices. **Food Chemistry**, [S. l.], v. 237, p. 870–876, 2017. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.06.063. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.063>.

YAO, Xuechen; XIA, Nongyu; MENG, Xiao; DUAN, Changqing. A One-Step Polyphenol Removal Approach for Detection of Multiple Phytohormones from Grape Berry. [S. l.], 2022.

YOU DEN, W. J. Statistical Technique for Collaborative Tests. **Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**, [S. l.], 1972.

YOU DEN, W. J.; STEINER, E. H. Statistical manual of the Association of Official Analytical Chemists. **Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**, [S. l.], p. 33–36, 1975.

ZHANG, Liu; JIA, Yan-zhe; LI, Bin; PENG, Cai-yun; YANG, Yu-pei; WANG, Wei; LIU, Chang-xiao. A review of lignans from genus Kadsura and their spectrum characteristics Abstract: **Chinese Herbal Medicines**, [S. l.], 2021. DOI: 10.1016/j.chmed.2021.01.005. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chmed.2021.01.005>.

ZHOU, Di et al. Stilbenes from the tubers of Bletilla striata with potential anti-neuroinflammatory activity. **Bioorganic Chemistry**, [S. l.], v. 97, n. February, p. 103715, 2020. DOI: 10.1016/j.bioorg.2020.103715. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2020.103715>.

APÊNDICE

Produção científica realizada no período do Doutorado (2019 – 2024):

ELGUY, Lucas Guilherme; TREVISAN, Adriana Carla; **COELHO, Marina**; OLIVEIRA, Yeferson; MADUREIRA, Luiz Augusto. Manejo de biomassa e compostos majoritários de óleos essenciais de espécies do Bioma Pampa. **REVISTA FITOS (ALANAC)**, v. 15, p. 333-345, 2021.

PEREIRA-COELHO, Marina; MORÉS, Lucas; ELIAS CURI, Welman; BASCUNAN AZZOLIN FRESCURA, Vera Lucia; MADUREIRA, Luiz Augusto. Development of hollow fiber-membrane microporous liquid-liquid extraction (HF-MMLLE) procedure based on palladium nanoparticles for determination of PAH in leached extracts. **MICROCHEMICAL JOURNAL**, v. 169, p. 106562, 2021.

PEREIRA-COELHO, Marina; HAAS, Isabel Cristina; KATRIN, Cássia; DOGNINI, Jocinei; AMBONI, Renata; VITALI, Luciano; MADUREIRA, Luiz Augusto. A green analytical method for the determination of polyphenols in wine by dispersive pipette extraction and LC-MS/MS. **FOOD CHEMISTRY**, v. 405, p. 134860, 2022.

TREVIÑO, María José; **PEREIRA-COELHO, Marina**; LÓPEZ, Andrea; ZARAZÚA, Sergio; MADUREIRA, Luiz Augusto; MAJCHRZAK, Tomasz; PLOTKA-WASYLKA, Justyna. How pesticides affect neonates? - Exposure, health implications and determination of metabolites. **SCIENCE OF THE TOTAL ENVIRONMENT**, v. 856, p. 158859, 2022.

ROCHA ZANETTI, Meri Beatriz; HAAS, Isabel Cristina; **PEREIRA-COELHO, Marina**; MARAN, Bruna; CANELLA, Maria Helena; MADUREIRA, Luiz Augusto; PRUDÊNCIO, Elane; AMBONI, Renata; KAZAMA, Daniele Cristina; FELTES, Maria Mauela. Valorization of biowastes from sustainable viticulture with bioactive potential: application in functional yogurt. **JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY**, v. 59, p. 1-13, 2022.

FABJANOWICZ, Magdalena; RÓZANSKA, Anna; ABDELWAHAB, Nada; **PEREIRA-COELHO, Marina**; HAAS, Isabel Cristina; MADUREIRA, Luiz Augusto; PLOTKA-WASYLKA, Justyna. An analytical approach to determine the health benefits and health risks of consuming berry juices. **FOOD CHEMISTRY**, v. 1, p. 137219, 2023.

FREITAS, Bheatriz; HAAS, Isabel Cristina; **PEREIRA-COELHO, Marina**; ALMEIDA, Adrielle; ALMEIDA, Júlia; EGEA, Mariana; SILVA, Fabiano; PETKOWICZ, Carmen Lucia; FRANCISCO, Alicia; MADUREIRA, Luiz Augusto; FREIRE, Carlise; AMBONI, Renata. Cerrado cashew (*Anacardium othonianum* Rizz) apple pomace: chemical characterization and optimization of enzyme-assisted extraction of phenolic compounds. **CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS (ONLINE)**, v. 43, p. 1-9, 2023.

PEREIRA-COELHO, Marina; HAAS, Isabel Cristina; VITALI, Luciano; DOS SANTOS MADUREIRA, Luiz Augusto. Dispersive Pipette Extraction and HPLC-DAD for the Determination of Polyphenols in Grape Juice. **Food Analytical Methods**, v. 1, p. 1, 2023.

MARAFON, Karine; **PEREIRA-COELHO, MARINA**; HAAS, Isabel Cristina; WANDERLEY, Bruna; SANTOS DE GOIS, Jefferson; VITALI, Luciano; LUNA, Aderval; HELENA MACHADO CANELLA, Maria; HERNÁNDEZ, Eduard; AMBONI, Renata; SCHWINDEN PRUDENCIO, Elane. An opportunity for acerola pulp (*Malpighia emarginata* DC) valorization evaluating its performance during the block cryoconcentration by physicochemical, bioactive compounds, HPLC-ESI-MS/MS, and multi-elemental profile analysis. **FOOD RESEARCH INTERNATIONAL**, v. 1, p. 113793, 2023

FERREIRA, Ana Letícia; WANDERLEY, Bruna; HAAS, Isabel Cristina; BILUCA, Fabíola; DE OLIVEIRA COSTA, Ana Carolina; HOFF, Rodrigo; **PEREIRA-COELHO, Marina** DOS SANTOS MADUREIRA, Luiz Augusto; DE SENA AQUINO, Ana Carolina; AMBONI, Renata; FRITZEN-FREIRE, Carlise. Low-alcohol wine made from uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): Influence of ultrasound-assisted enzymatic pre-treatment on its bioactive properties. **MICROCHEMICAL JOURNAL**, v. 198, p. 110177, 2024.