



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

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM FOLHAS DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) ASSISTIDA POR
ULTRASSOM E MEMBRANA POROSA SEGUIDO POR DETECÇÃO EM GC/FID**

HELOÍSA GARCIA

**ORIENTADOR: PROF. DR. LUIZ AUGUSTO DOS SANTOS MADUREIRA
COORIENTADORA: MSC. MARINA PEREIRA COELHO**

Florianópolis
2023

Helóisa Garcia

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO PARA EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM FOLHAS DE CHÁ VERDE (*Camellia sinensis*) ASSISTIDA POR
ULTRASSOM E MEMBRANA POROSA SEGUIDO POR DETECÇÃO EM GC/FID**

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Bacharelado em Química do Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharela em Química.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira

Coorientadora: Msc. Marina Pereira Coelho

Florianópolis

2023

Garcia, Heloísa

Desenvolvimento de método para extração de compostos fenólicos em folhas de chá verde (*Camellia sinensis*) assistida por ultrassom e membrana porosa seguido por detecção em GC/FID / Heloísa Garcia ; orientador, Luiz Augusto dos Santos Madureira, coorientador, Marina Pereira Coelho, 2023.

57 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Graduação em Química - Bacharelado, Florianópolis, 2023.

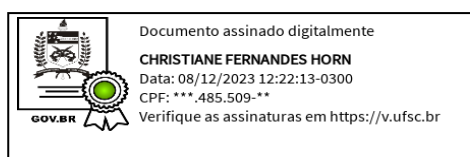
Inclui referências.

1. Química - Bacharelado. 2. Chá verde. 3. Compostos fenólicos. 4. UASE-PMSS. 5. GC/FID. I. Madureira, Luiz Augusto dos Santos. II. Coelho, Marina Pereira. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Química - Bacharelado. IV. Título.

Heloísa Garcia

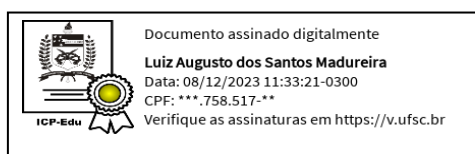
Desenvolvimento de método para extração de compostos fenólicos em folhas de chá verde (*Camellia sinensis*) assistida por ultrassom e membrana porosa seguido por detecção em GC/FID

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de Bacharela em Química e aprovado em sua forma final pelo Curso Bacharelado em Química.

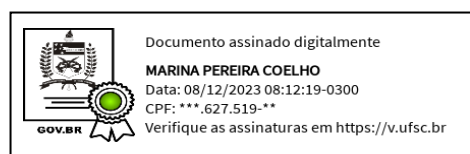


Coordenação do Curso

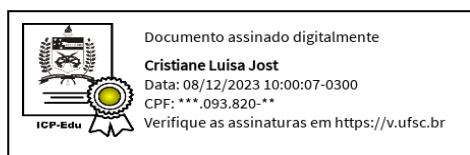
Banca Examinadora



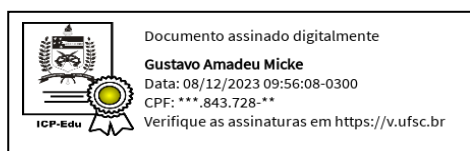
Prof^o. Dr^o. Luiz Augusto dos
Santos Madureira
(Orientador)



Msc. Marina Pereira Coelho
(Coorientadora)



Prof^a. Dr^a. Cristiane Luisa Jost
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof^o. Dr^o. Gustavo Amadeu Micke
Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 28 de novembro de 2023.

*Aos meus avós
Maria Sueli Garcia, Dorival Garcia,
Luci da Silva, Edison Bretzke e
a minha bisavó Bráulia da Silva.*

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Garcia e Luciana, agradeço por todo apoio ao longo da graduação. Sem o incentivo de vocês nada disso teria sido possível. Obrigada por confiarem em mim até mesmo quando eu não confiei. As minhas irmãs, Bruna e Camila, agradeço por me inspirarem e me guiarem por novos caminhos sempre. Agradeço também a minha sobrinha Maria Ísis. Você traz leveza aos meus dias mesmo que ainda não saiba.

Agradeço às amigadas que fiz dentro da UFSC e que se tornaram minha rede de apoio em Florianópolis. Obrigada Mayara e Thomas, pela parceria nos estudos e nas comemorações. Aos meus amigos de longa data, Lucas e Thuini, obrigada por se manterem presentes mesmo com a distância. Agradeço especialmente ao Rodrigo, que me acompanhou de perto durante essa etapa com toda paciência e carinho.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira, agradeço pelos ensinamentos, pelo acolhimento e amizade durante todo o tempo em que estive no LaGOAmb.

A minha coorientadora, Marina Pereira Coelho, muito obrigada por me acompanhar em cada passo deste projeto. Obrigada pela orientação incrível. Você é o tipo de profissional que almejo ser um dia.

As minhas colegas de laboratório Suelly, Marcielli e Carla, agradeço pela presença diária na rotina de laboratório. Todas vocês contribuíram para a concretização deste projeto de alguma forma.

As mulheres incríveis do meu grupo terapêutico, Débora, Letícia, Aline, Andresa, Camila, Jéssica, Larissah, Maria Luiza e Mariana. Obrigada por me ensinarem a levar a vida um passo de cada vez.

A todos os professores da Universidade Federal de Santa Catarina que contribuíram para a minha formação. Ao Laboratório de Geoquímica Orgânica e Química Ambiental pela oportunidade. A CNPq pelo apoio financeiro. A UFSC pelo ensino de qualidade.

RESUMO

O chá verde, proveniente da planta *Camellia sinensis*, destaca-se mundialmente pelo seu elevado consumo, impulsionado por propriedades medicinais atreladas, principalmente, ao rico teor de compostos fenólicos em sua composição. Esses compostos oferecem benefícios à saúde quando consumidos regularmente, e a avaliação do perfil fenólico no chá verde permite relacionar a composição fenólica e os reais benefícios proporcionados pela bebida. No entanto, a matriz complexa do chá verde apresenta um desafio na determinação desses compostos em protocolos analíticos e exige uma etapa de preparo da amostra para adaptá-la à instrumentação analítica. Neste trabalho, o objetivo foi desenvolver um protocolo de extração para compostos fenólicos em folhas de chá verde utilizando a técnica de extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana microporosa de polipropileno (UASE-PMSS) com derivatização em injetor e detecção por GC/FID. Para o procedimento, as dimensões da membrana foram fixadas em 1,5 cm x 1,5 cm. A massa de amostra foi 100 mg e a extração ocorreu pela submersão da membrana em solvente orgânico, com auxílio de ultrassom a frequência de 25 kHz. Os procedimentos de derivatização em estufa e em injetor foram comparados pela adição de 30 µL agente derivatizante BSTFA:TMCS (99:1) à solução estoque contendo os analitos ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina, suspensos em 170 µL de acetona (50 mg L⁻¹). Foram otimizadas as principais variáveis de extração e derivatização por meio de planejamentos multivariados de superfície de resposta. A derivatização em injetor apresentou melhor resposta analítica em comparação com a derivatização em estufa. Através de um planejamento Composto Central, as condições ótimas para derivatização em injetor foram definidas como volume de agente derivatizante a 60 µL, tempo de *splitless* de 2,5 minutos e temperatura do injetor a 250 °C. Por meio de um diagrama de superfície ternária *Simplex Lattice*, o solvente extrator escolhido foi uma mistura de acetona e acetato de etila (3:1 v/v) e, através de um planejamento *Doehlert*, foram fixados 30 minutos como tempo de extração e 1,5 mL como volume de solvente. Na avaliação dos parâmetros analíticos, foram obtidos valores de R maiores ou iguais a 0,9650. Os limites de detecção variaram entre 0,01 mg L⁻¹ e 0,49 mg L⁻¹, enquanto os limites de quantificação variaram entre 0,04 mg L⁻¹ e 1,48 mg L⁻¹. A precisão do método foi avaliada pelo desvio padrão relativo, com os valores de precisão intradia (n=3) entre 1 e 30% e precisão interdia (n=6) entre 5 e 34%. Não foi possível avaliar a recuperação do método e quantificar os analitos em amostras de chá verde. Entretanto, foi possível avaliar a concentração dos compostos ácido protocatecuico, ácido gálico, (-)-epicatequina e (+)-catequina nos extratos obtidos, em concentrações que variaram entre 0,31 mg L⁻¹ e 5,41 mg L⁻¹. Por fim, o caráter sustentável do preparo de amostra proposto foi avaliado por meio da ferramenta AGREEprep. A abordagem de extração proposta é contemplada pelos princípios da Química Analítica Verde, com baixo consumo de amostra e solventes orgânicos, além da alta frequência analítica e simplificação de etapas proporcionadas pela derivatização em injetor. Sendo assim, o método de extração proposto é promissor para determinação de compostos fenólicos em folhas de chá verde.

Palavras-chave: Chá verde; Compostos fenólicos; UASE-PMSS; GC/FID; Derivatização em injetor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura básica para um flavonoide e suas subclasses.

Figura 2 – Estruturas dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico.

Figura 3 – Esquema geral para a reação de transferência de átomo de hidrogênio.

Figura 4 – Mecanismo para a reação de silição entre BSTFA e um álcool primário.

Figura 5 – Reação genérica de derivatização para formação de um derivado siliado.

Figura 6 – Esquema geral para o procedimento de extração de compostos fenólicos em chá verde.

Figura 7 - Cromatograma da separação dos 11 compostos fenólicos de trabalho. 1 - Ácido vanílico; 2 - Ácido protocatecuico; 3 - Ácido sirínico; 4 - Ácido *p*-cumárico; 5 - Ácido gálico; 6 - Ácido ferrúlico; 7 - Ácido cafeico; 8 – (-)-Epicatequina; 9 – (+)-Catequina; 10 – Kaempferol; 11 – Miricetina.

Figura 8 - Cromatograma de comparação obtido para reação de derivatização em estufa (em rosa) e derivatização em injetor (em azul).

Figura 9 - Gráfico de barras obtido pela reação de derivatização de compostos fenólicos em injetor e em estufa.

Figura 10 - Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento Composto Central para as variáveis: (a) volume de derivatizante BSTFA e temperatura, (b) tempo de *splitless* e volume de derivatizante BSTFA, (c) tempo de *splitless* e temperatura.

Figura 11 - Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento Composto Central para as variáveis: (1) temperatura, (2) volume de agente derivatizante, (3) tempo de *splitless*.

Figura 12 - Superfície ternária *Simplex Lattice* obtida para a otimização da escolha do solvente de extração.

Figura 13 - Gráfico de Pareto obtido para os parâmetros estatisticamente significativos no planejamento experimental *Simplex Lattice*.

Figura 14 - Superfície de resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert*.

Figura 15 - Gráfico de Pareto obtido para os parâmetros estatisticamente significativos no planejamento experimental *Doehlert*.

Figura 16 – Pictograma obtido para avaliação da métrica analítica verde do preparo de amostra obtido pela ferramenta AGREEprep.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Principais constituintes encontrados no chá verde e seus respectivos teores.

Tabela 2 – Planejamento Composto Central para otimização dos parâmetros de derivatização em injetor.

Tabela 3 – Planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice* para escolha do solvente de extração.

Tabela 4 – Planejamento *Doehlert* para otimização do volume de solvente e tempo de extração.

Tabela 5 - Solventes escolhidos para otimização e seus respectivos momentos dipolo.

Tabela 6: Faixas lineares de trabalho, equações lineares, coeficientes de correlação, limites de detecção e de quantificação e concentrações de compostos fenólicos em extrato de chá verde para 11 compostos fenólicos.

Tabela 7: Precisão intradia e interdia para amostra comercial de chá verde.

Tabela 8: Aplicação de diferentes métodos na análise e detecção de compostos fenólicos em chá verde.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGREEprep – Métrica Analítica Verde para Preparo de Amostra, do inglês, *Analytical Greenness Metric for Sample Preparation*

ANOVA - Análise de Variância

AOAC - Associação de Químicos Analíticos Oficiais, do inglês *Association of Official Analytical Chemists*

BADGE - Éter diglicidílico do bisfenol A, do inglês *Bisphenol A diglycidyl ether*

BFDGE – Éter diglicidílico do bisfenol F, do inglês *Bisphenol F diglycidyl ether*

BSA - N,O-bis(trimetilsilil)acetamida

BSTFA - N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

DNA - Ácido Desoxirribonucleico, do inglês *Deoxyribonucleic Acid*

DoE – Planejamento de Experimentos, do inglês *Design of Experiments*

DPR – Desvio Padrão Relativo

DSDME - Microextração em Gota Única, do inglês *Directly Suspended Droplet Microextraction*

EGCGE - (-)-Epigallocatequina Galato, do inglês *Epigallocatechin gallate*

ERN - Espécie Reativas de Nitrogênio

ERO - Espécies Reativas de Oxigênio

GA - Ácido Gálico, do inglês *Gallic Acid*

GC/FID - Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama, do inglês *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*

GC/MS - Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa, do inglês *Gas Chromatography Mass Spectrometry*

HAT - Reação de Transferência de Hidrogênio, do inglês *Hydrogen Atom Transfer*

HPA – Hidrocabronetos Policíclicos Aromáticos

HPTLC - Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *High-performance Thin-layer Chromatography*

IPD - Derivatização em Injetor, do inglês *Injection-port Derivatization*

kHz - Quilohertz

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

MHz – Megahertz

PP – Polipropileno

R – Coeficiente de Correlação

RNA - Ácido Ribonucleico, do inglês *Ribonucleic Acid*

RP-HPLC/DAD - Cromatografia Líquida de Fase Reversa com Detecção por Arranjo de Diodo, do inglês *Reversed-phase High-performance Liquid Chromatography with Diode-array Detection*

SC – Santa Catarina

S_N2 - Substituição Nucleofílica Bimolecular

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

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

TMCS – Trimetilclorosilano

UAE - Extração Assistida por Ultrassom, do inglês *Ultrasound-assisted extraction*

UASE-PMSS - Extração com Solvente Assistida por Ultrassom de Amostras Sólidas Empacotadas com Membrana Microporosa de Polipropileno, do inglês *Ultrasound-Assisted Solvent Extraction of Porous Membrane Packed Solid Samples*

μ-SPE - Extração em Fase Microsólida, do inglês *Microsolid Phase Extraction*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 CHÁ VERDE	15
2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS	16
2.3 PREPARO DE AMOSTRA	20
2.3.1 Extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana porosa (UASE-PMSS)	21
2.3.2 Extração assistida por ultrassom	22
2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA.....	23
2.4.1 Derivatização	24
2.5 QUIMIOMETRIA.....	26
2.6 MÉTRICA VERDE PARA AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA	27
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
4 MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 MATERIAIS E REAGENTES.....	30
4.2 INSTRUMENTAÇÃO.....	30
4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
4.3.1 Obtenção da amostra e preparo da membrana.....	31
4.3.2 Preparo da matriz fortificada	31
4.3.3 Delineamento experimental	32
4.3.4 Etapa de derivatização e análise cromatográfica	32
4.4 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO	33
4.4.1 Derivatização em estufa.....	33
4.4.2 Derivatização em injetor	33
4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO	33

4.5.1	Otimização dos parâmetros de derivatização	33
4.5.2	Otimização do solvente de extração	34
4.5.3	Otimização dos parâmetros de extração por UASE-PMSS	35
4.6	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MÉTODO	35
4.7	AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA	37
5.2	COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO	38
5.3	OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO	39
5.3.1	Otimização dos parâmetros de derivatização	39
5.3.2	Otimização do solvente de extração	42
5.3.3	Otimização dos parâmetros de extração	44
5.4	AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MÉTODO	46
5.4.1	Avaliação da métrica verde para preparo de amostra	50
5.5	COMPARAÇÃO COM OUTROS TRABALHOS	52
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS	54

1 INTRODUÇÃO

O chá verde (*Camellia sinensis*) é um dos chás mais consumidos mundialmente. Originário da China, este chá é conhecido por suas propriedades analgésicas, digestivas e antidepressivas, que são atribuídas principalmente ao alto teor de compostos fenólicos em sua composição. Os compostos fenólicos são metabólitos secundários que atuam como antioxidantes em organismos vivos pelo sequestro de radicais livres. Por isso, eles estão associados à prevenção de doenças cardiovasculares, diabetes, infecções e câncer. Além disso, a análise de compostos fenólicos em chá verde permite a avaliação dos efeitos de tempo de colheita, solo, clima, temperatura e fertilizantes na planta *Camellia sinensis*, permitindo a melhora na produção de chá, de forma a se obter cultivares de maior qualidade.

As folhas de chá verde constituem uma amostra complexa e, por isso, exigem uma etapa de preparo de amostra prévia à análise instrumental, com intuito de pré-concentrar os analitos, remover interferentes e converter os analitos em derivados mais apropriados. Somado a isso, o avanço da Química Verde evidencia a necessidade de técnicas de extração ambientalmente amigáveis, de forma a reduzir o volume de resíduos, simplificar etapas, integrar processos e diminuir o gasto de energia envolvido na etapa de preparo de amostra.

Portanto, o presente trabalho propõe o desenvolvimento de um protocolo de extração de compostos fenólicos em folhas de chá verde através da técnica de extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana microporosa de polipropileno (UASE-PMSS, do inglês *Ultrasound-assisted solvent extraction of porous membrane packed solid samples*), seguido por análise por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC/FID). A análise de compostos fenólicos por GC/FID exige uma etapa prévia de derivatização, com intuito de converter os analitos em derivados mais voláteis e termicamente estáveis. Visando o desenvolvimento de um método simples e com melhor frequência analítica, é proposto realizar a derivatização diretamente no injetor do cromatógrafo gasoso, com intuito de reduzir o tempo de preparo de amostra pela integração de etapas do procedimento.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CHÁ VERDE

O chá é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, principalmente em países asiáticos, onde a China e a Índia se destacam como maiores produtores da planta *Camellia sinensis*. A *C. sinensis* dá origem a diferentes tipos de chá, incluindo o chá preto, chá escuro, chá oolong, chá amarelo, chá branco e chá verde, sendo que a taxa de produção mundial é distribuída como sendo 76-78 % para chá preto, 20-22 % para chá verde e menos de 2 % para oolong. Os tipos de chá diferem entre si pelo processo de beneficiamento pelo qual as folhas da planta são submetidas. O chá preto passa por um processo de fermentação total, e o oolong, fermentação parcial, enquanto o chá verde não é submetido a nenhum processo de fermentação. A produção do chá verde se inicia com aquecimento brando para a degradação da enzima polifenoloxidase, que é responsável pela oxidação de compostos fenólicos, o que acarreta escurecimento das folhas do chá. Após isso, as folhas passam por um processo de laminação, no qual elas são cortadas e secas.^[1] Por conta da degradação da enzima polifenoloxidase, o chá verde apresenta maior teor de compostos fenólicos em comparação com outros chás obtidos pela *C. sinensis*.^[2] O chá verde caracteriza uma matriz complexa com elevado teor de compostos fenólicos totais, que correspondem a cerca de 30 % de sua massa.^[3] A Tabela 1 mostra o teor dos principais componentes encontrados no chá verde.

Tabela 1 – Principais constituintes encontrados no chá verde e seus respectivos teores.

Constituintes	Principais representantes	Teor (%)
Compostos fenólicos	Catequinas	30
	Ácido gálico	
Proteínas	Enzimas	15 – 20
Aminoácidos	Teanina	1 – 4
	Ácido glutâmico	
Carboidratos	Celulose	5 – 7
	Pectina	
Lipídeos	Ácido linoleico	7
	Ácido α -linoleico	
Pigmentos	Clorofila	2
	Carotenoides	

Minerais	Al, Ca Mg, Mn	5
----------	------------------	---

Fonte: adaptado de Cabrera et al, 2006^[1] e Chaudhary et al, 2023^[3].

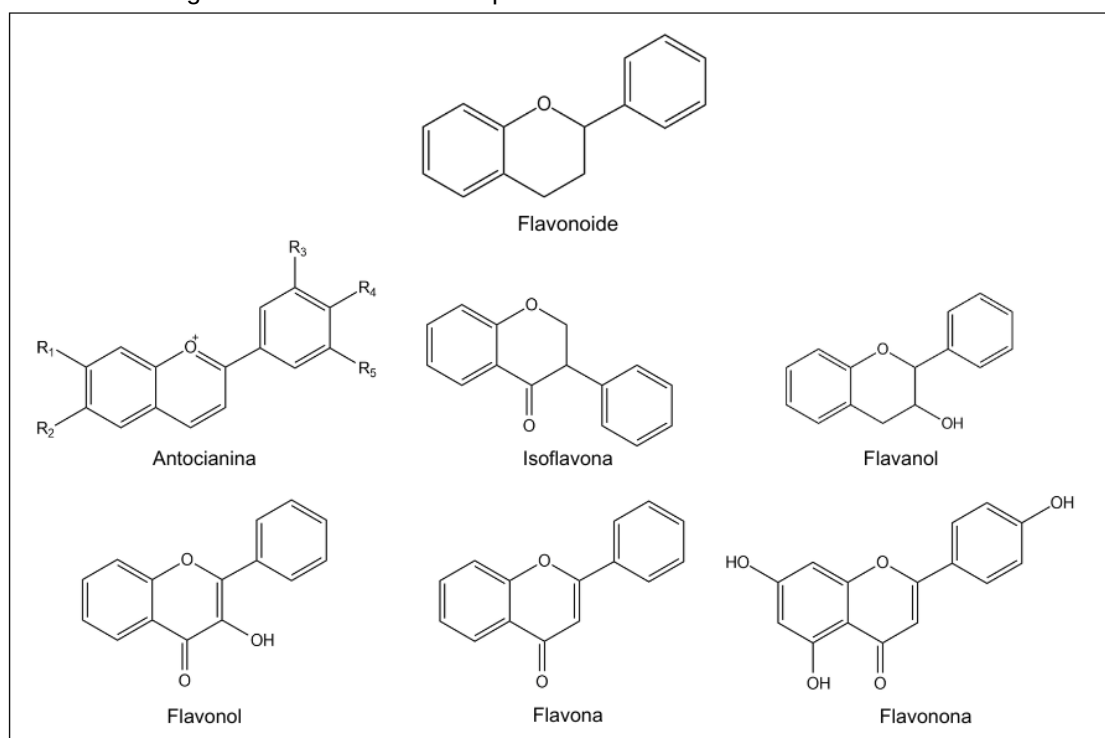
O chá verde é difundido na cultura chinesa pelos seus fins medicinais como dores de cabeça, dores musculares, digestão, depressão e como energizante desde muito cedo. Nos últimos trinta anos, houve a consolidação de estudos científicos correlacionando o chá verde e seus benefícios para a saúde humana. O chá verde é visto como um aliado na prevenção e tratamento de doenças crônicas como câncer, diabetes, infecções e doenças cardiovasculares. Além de evidenciarem melhoria na densidade de ossos, saúde bucal, controle da obesidade e prevenção de pedras nos rins. As principais classes de compostos responsáveis por fazer do chá verde um alimento funcional são as bases xantínicas, como cafeína e teofilina, óleos essenciais e, principalmente, compostos fenólicos. Os compostos fenólicos predominantes em chá verde são os flavonoides e os ácidos fenólicos, sendo a (-)-epigallocatequina galato (EGCG) e o ácido gálico (GA) os seus principais representantes, respectivamente. Compostos fenólicos representam uma classe de substâncias com alta capacidade redutiva, além de apresentarem funções biológicas importantes que justificam a importância do chá verde na dieta humana.^[1]

2.2 COMPOSTOS FENÓLICOS

Moléculas orgânicas produzidas pela atividade celular de organismos vivos são chamadas de metabólitos. Eles podem ser divididos em metabólitos primários e metabólitos secundários. Metabólitos primários consistem em substâncias essenciais para o funcionamento de uma célula, como aminoácidos e carboidratos. Metabólitos secundários são compostos produzidos pelo estímulo externo, com influência de fatores ambientais como clima, solo, luz e umidade. Apesar de dispensáveis para as atividades essenciais de uma célula, eles podem auxiliar na proteção e reprodução de uma espécie através de defesa contra predadores e atração de polinizadores, além de servirem como precursores na síntese de outras moléculas orgânicas. Os metabólitos secundários são divididos de acordo com o processo de biossíntese envolvido em sua produção. São eles: compostos fenólicos, terpenoides, alcalóides e glicosinolatos.^[4]

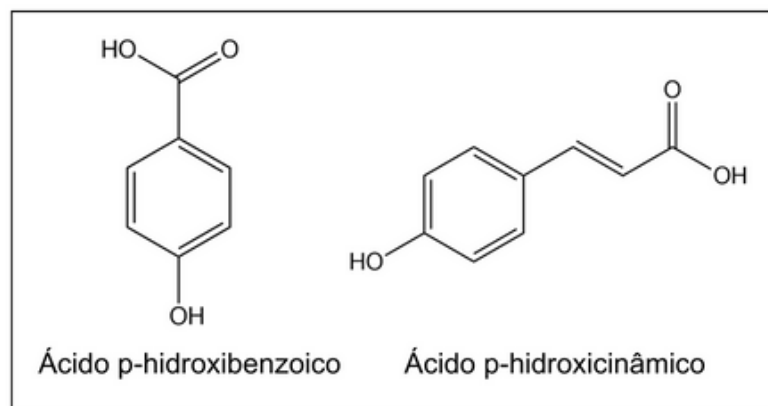
Compostos fenólicos são substâncias que contêm pelo menos um anel benzênico ligado a um grupo hidroxila. Os compostos fenólicos são classificados em flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, lignanas e taninos. O chá verde é composto por flavonoides e ácidos fenólicos. Os flavonoides representam a classe de compostos fenólicos de maior abundância, podendo ser dividida em diferentes subclasses: antocioninas, isoflavonas, flavanóis, flavonóis, flavonas e flavononas. Flavonoides variam entre si de acordo com o número de anéis benzênicos presentes em sua estrutura, bem como os seus substituintes. A Figura 1 mostra a estrutura básica para um flavonoide e suas subclasses. A Figura 2 mostra a estrutura básica para ácidos fenólicos, que podem ser derivados do ácido hidroxibenzoico ou do ácido hidroxicinâmico.^[4,5]

Figura 1 – Estrutura básica para um flavonoide e suas subclasses.



Fonte: elaborado pela autora.

Figura 2 – Estruturas dos ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico.



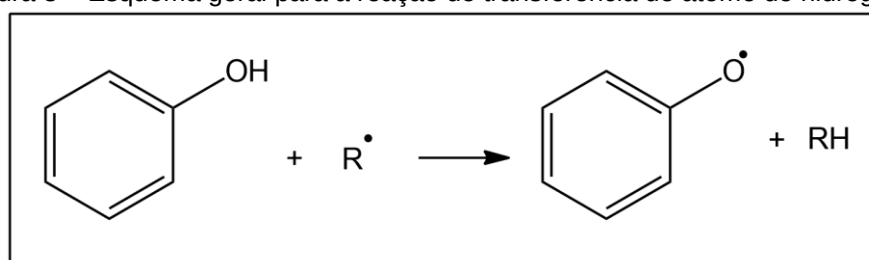
Fonte: elaborado pela autora.

Além de auxiliarem na proteção e reprodução de diversas plantas, os compostos fenólicos possuem propriedades fisiológicas antioxidantes, anti-inflamatórias, antialérgicas, antimicrobianas, vasodilatadoras e antitrombóticas. Essas propriedades estão atreladas principalmente à presença de grupos funcionais com alta capacidade redutiva em suas estruturas.^[4] Nos últimos anos, o interesse científico e industrial em substâncias antioxidantes ganhou destaque por conta da necessidade em combater radicais livres no organismo humano. Radicais livres são espécies moleculares contendo um elétron desemparelhado. Dependendo do átomo central que possui o elétron desemparelhado, os radicais podem ser descritos como radicais centrados em carbono, oxigênio, nitrogênio ou metal. Radicais livres centrados em átomos de oxigênio (EROs) e nitrogênio (ERNs) são naturalmente produzidos em um organismo saudável e fazem parte de processos essenciais como produção de energia, fagocitose, crescimento celular e biossíntese. Entretanto, a sua presença em excesso leva a um desequilíbrio interno, causando danos a biomoléculas como oxidação de lipídeos, quebra de moléculas de DNA, RNA, proteínas e carboidratos, capazes de danificar a membrana celular. O excesso de espécies radiculares no corpo humano pode ocorrer internamente, por disfunções biológicas, ou externamente, através de exposição excessiva à radiação ultravioleta, sedentarismo e consumo de substâncias como álcool e cigarro.^[6] Os danos causados por radicais livres resultam no desenvolvimento ou agravamento de patologias como câncer, artrite, catarata, doenças cardiovasculares, choque hemorrágico, disfunções cognitivas e AIDS.^[7]

Neste sentido, os compostos fenólicos possuem estruturas que propiciam o sequestro de radicais livres de maneira eficiente, através de reações de

transferência de átomo de hidrogênio (*HAT*, do inglês *Hydrogen atom transfer*). A estabilidade do radical fenólico obtido está atrelada à presença de ressonância em sua estrutura, proveniente de anéis aromáticos. Adicionalmente, quanto maior o número de substituintes metoxi e hidroxila no anel benzênico, maior a estabilidade do radical formado. Na Figura 3 está descrito o esquema reacional para a reação de transferência de átomo de hidrogênio.^[8]

Figura 3 – Esquema geral para a reação de transferência de átomo de hidrogênio.



Fonte: adaptado de Wojtunik-Kulesza et al, 2020.^[8]

A ação antioxidante de compostos fenólicos está atrelada também à fatores como solubilidade em membranas celulares e potencial quelante para metais de transição. A lipofilicidade de compostos fenólicos é fundamental para que eles sejam absorvidos por membranas celulares, onde a ocorrência de EROs e ERNs é alta. Os compostos fenólicos atuam como controladores de fluidez, impedindo fisicamente a difusão de compostos radicalares e afetando diretamente a cinética de reações envolvendo o estresse oxidativo. Os compostos fenólicos também podem surgir ligados a cadeias de açúcares, diminuindo sua lipofilicidade. Essas espécies não interagem de forma efetiva com a membrana celular, mas podem ficar armazenados em vesículas, garantindo um maior tempo de permanência no organismo e exercendo suas funções antioxidantes. A ação quelante de compostos fenólicos é capaz de remover metais de transição livres no meio fisiológico como Fe^{2+} e Cu^+ , que atuam como catalisadores nas reações de Fenton e Haber-Weiss, geradoras de radicais livres. Além de auxiliarem na prevenção de doenças humanas, os compostos fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas encontradas no chá verde, como adstringência, amargor, doçura, cheiro e cor de infusões de chá. Ademais, compostos fenólicos são usados na prevenção oxidativa nas indústrias de alimentos, cosméticos e fármacos.^[7,9]

Dessa forma, a concentração de compostos fenólicos em chá verde representa um índice de qualidade dessa bebida, sendo de interesse científico e

industrial a detecção e quantificação destes analitos. A avaliação do perfil fenólico no chá verde permite relacionar a composição fenólica e os reais benefícios proporcionados pela bebida, além disso, a análise de compostos fenólicos em chá verde permite a avaliação dos efeitos de tempo de colheita, solo, clima, temperatura e fertilizantes na planta *Camellia sinensis*, permitindo a melhora na produção de chá verde de forma a se obter cultivares de maior qualidade. Entretanto, as folhas de chá verde configuram uma matriz complexa por conta da ampla variedade de componentes em sua constituição. Portanto, a extração de compostos fenólicos em folhas de chá verde demanda uma etapa de preparo de amostra eficiente.^[2,9]

2.3 PREPARO DE AMOSTRA

O preparo de amostra tem como objetivo converter matrizes complexas de forma que seja possível inseri-las em um instrumento analítico. Matrizes alimentícias e biológicas, como o caso das folhas de chá verde, são consideradas complexas pela variedade de substâncias em sua composição. Dessa forma, o preparo de amostra atua na remoção de interferências, pré-concentração de analitos ou conversão de analitos em derivados mais apropriados. Neste contexto, a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) é uma clássica técnica para pré-concentrar de analitos e remover de interferências. A separação de analitos na SPE ocorre pela adsorção, partição ou troca iônica de analitos em dispositivos sólidos, chamados adsorventes.^[10,11]

Por outro lado, o avanço notável da Química Verde ao longo das últimas três décadas tem enfatizado a importância de técnicas de extração ambientalmente amigáveis, que se baseiam na miniaturização das técnicas clássicas, simplificação de etapas e automatização de processos laboratoriais. As chamadas técnicas verdes de extração objetivam a minimização do volume de solvente, a simplificação de etapas e a diminuição no gasto de energia envolvidos em um método analítico.^[12]

Neste sentido, a primeira técnica verde de extração derivada da SPE foi reportada em 1990. A chamada microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid-Phase Microextraction*) desenvolvida por Pawliszyn e Arthur^[13], utiliza como adsorvente uma fibra de sílica quimicamente modificada. Mais tarde, em 2006, foi reportada a extração em fase microsólida (μ -SPE, do inglês *Microsolid Phase Extraction*) por Bansheer et al^[14]. Pela primeira vez, foi reportado o uso de membrana porosa de polipropileno em uma técnica de microextração. Nela, um adsorvente

sólido é embalado em uma membrana porosa de polipropileno, que por sua vez é inserida na solução da amostra, de forma que os analitos são retidos pelo adsorvente. O uso da membrana porosa nesta técnica permite a passagem dos analitos para o adsorvente, enquanto macromoléculas, como gorduras e proteínas, permanecem na solução, resultando em um extrato final com baixa concentração de interferentes.^[15] Após a divulgação da μ -SPE, novas técnicas miniaturizadas de extração com utilização da membrana microporosa foram propostas, como é o caso da extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana porosa.

2.3.1 Extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana porosa (UASE-PMSS)

Em 2019, foi proposta por SAJID et al uma variação da técnica μ -SPE, que consiste na inserção direta da amostra sólida na membrana porosa de polipropileno, sem o uso de adsorventes.^[16] A membrana porosa permite a passagem dos analitos para a fase extratora, enquanto macromoléculas ficam retidas no interior da membrana. A chamada técnica de extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana porosa (*UASE-PMSS*, do inglês *Ultrasound-assisted solvent extraction of porous membrane packed solid samples*) apresenta como vantagens a eliminação do uso de adsorventes, o que torna a técnica mais barata e rápida que sua precursora μ -SPE. A retirada da etapa de dessorção leva a volumes menores de solventes utilizados, simplificando o procedimento de preparo de amostra, além de diminuir a quantidade de resíduos gerados. Na UASE-PMSS, uma pequena quantidade de amostra sólida é inserida na membrana microporosa, que por sua vez é termicamente selada e submersa em solvente adequado. Dessa forma, a UASE-PMSS oferece uma técnica verde de extração onde se obtém um extrato que pode ser diretamente inserido no instrumento analítico, com redução de custos, baixo consumo energético e baixa geração de resíduos.^[15]

Até o momento, a UASE-PMSS foi utilizada no desenvolvimento de métodos analíticos para extração e quantificação de HPAs em solo^[16], pesticidas organoclorados em chá^[15], compostos fenólicos e ácidos fenólicos em vinho^[17], poluentes BADGE e BFDGE em vegetais enlatados^[18] e ftalatos em fraldas descartáveis^[19]. Nos trabalhos citados, foram obtidos bons níveis de recuperação,

precisão e repetibilidade para o método desenvolvido, além de limites de detecção e quantificação satisfatórios.

A extração na UASE-PMSS ocorre com auxílio de ultrassom, de forma a facilitar o transporte de massa da amostra para o solvente de extração através da membrana porosa. Além disso, o uso de banho ultrassônico permite a realização de extrações simultâneas, contribuindo para a frequência analítica do preparo de amostra.^[15]

2.3.2 Extração assistida por ultrassom

A técnica extração assistida por ultrassom (UAE, do inglês *Ultrasound-assisted extraction*) usualmente é acoplada à outras técnicas, de forma a acelerar o procedimento e possibilitar a extração simultânea, como é o caso da técnica UASE-PMSS. A UAE é comumente empregada em metodologias que envolvem a extração de componentes de matrizes biológicas e alimentícias. Isso porque a agitação mecânica causada pelas ondas sonoras é capaz de romper as paredes celulares de tecidos vegetais, facilitando a penetração do solvente na amostra e aumentando a difusão dos analitos.^[20]

A UAE é baseada na geração de ondas acústicas de alta frequência (de 20 kHz a 10 MHz) que são propagadas pelo meio líquido, criando regiões de compressão e rarefação, que acarretam variações bruscas de pressão. Quando isso ocorre, bolhas de cavitação são formadas, e sua área superficial é aumentada durante a rarefação, contribuindo para a difusão gasosa. No ciclo de compressão, as bolhas formadas não conseguem reter a fase de vapor contida nelas. Assim, ocorre um processo de condensação e energia é liberada para o meio. As moléculas condensadas se chocam criando ondas de choque que atingem altas temperatura e pressão locais, atingindo a superfície sólida da amostra e aumentando o transporte de massa. O choque de ondas garante a regularidade no procedimento de extração, aumentando a eficiência da técnica.^[21] Esta técnica apresenta vantagens como simplicidade, baixo custo e emprego de menores volumes de solvente. Além disso, a extração é altamente efetiva mesmo em baixas temperaturas, sendo ideal para extrair substâncias instáveis e termicamente lábeis.^[22,23]

2.4 CROMATOGRAFIA GASOSA

A cromatografia gasosa é uma técnica de análise que permite a separação de analitos em uma amostra, líquida ou gasosa, vaporizada por um gás de arraste, que consiste na fase móvel, através de uma coluna, que corresponde à fase estacionária. Os analitos são identificados de acordo com o seu índice de retenção. A fase móvel é um gás inerte, como nitrogênio, hidrogênio, hélio ou argônio, que arrasta os analitos ao longo de uma coluna sem interagir entre si. O gás responsável pelo transporte dos analitos é chamado de gás de arraste. A coluna de separação é revestida por uma fase estacionária imobilizada que retém os analitos por adsorção ou absorção. Existem dois tipos de colunas: as colunas recheadas e as colunas capilares, sendo que as colunas capilares são mais amplamente utilizadas por conta de sua melhor eficiência. No cromatógrafo a gás, a coluna se localiza em um forno termostaticado, que é submetido a um programa de temperatura. O programa de temperatura deve ser ajustado de acordo com o ponto de ebulição dos analitos a serem analisados e o grau de separação. A inserção da amostra no equipamento ocorre através de um injetor com o uso de uma seringa. O injetor é mantido sob altas temperaturas, e a amostra é levada pelo gás de arraste para que ocorra a sua vaporização. Geralmente, o volume de amostra injetado em um cromatógrafo a gás é de 0,1-2,0 μL . A injeção da amostra pode ocorrer com divisão de fluxo (*split*) ou sem divisão de fluxo (*splitless*). A divisão de fluxo serve para amostras mais concentradas, onde a injeção completa do material pode trazer o desgaste para a coluna de separação. No injetor, a câmara de mistura possui duas entradas: uma para a coluna e outra para o resíduo. Geralmente, é indicado que a divisão de fluxo seja utilizada quando a amostra contém acima de 0,1 % do analito. A injeção sem divisão de fluxo é recomendada para análises a nível de traços de analitos, representando menos de 0,01 % da amostra. Nesse método não existe câmara de mistura, e a amostra segue do injetor direto para a coluna.^[24,25]

Existem vários detectores que podem ser acoplados a um cromatógrafo gasoso. O detector de ionização de chama é um detector não específico onde a resposta é obtida pela queima dos componentes por uma mistura de hidrogênio gasoso e ar. Os átomos de carbono formam radicais $\cdot\text{CH}$, que são convertidos em CHO^+ e elétrons. A produção de íons é proporcional ao número de átomos de carbono introduzidos na chama. Esses íons geram uma corrente elétrica, que é

posteriormente convertida em uma diferença de potencial. Essa diferença de potencial é então amplificada e transformada em sinal digital.^[24,25]

A cromatografia gasosa é amplamente utilizada como técnica para analisar matrizes biológicas complexas, destacando-se pela sua alta resolução e pela facilidade de acoplamento com diversos detectores. A detecção de compostos fenólicos por cromatografia gasosa permite a sua avaliação individual dessas substâncias e requer uma etapa prévia de derivatização.^[26]

2.4.1 Derivatização

Compostos fenólicos contêm grupos funcionais de alta polaridade, como hidroxila e carboxila. As ligações de hidrogênio presentes nesses compostos dificultam a sua análise e detecção por cromatografia gasosa, uma vez que essa técnica requer analitos voláteis e de baixa polaridade. Para avaliar o perfil fenólico individual por cromatografia gasosa, é necessária a conversão dos compostos fenólicos para derivados mais apropriados, através de uma reação de derivatização.^[26] A derivatização é uma etapa do preparo de amostra que tem como objetivo a modificação de grupos funcionais presentes nos analitos, diminuindo a polaridade e aumentando a volatilidade dessas moléculas, o que resulta em uma melhora do limite de detecção e da seletividade.^[27]

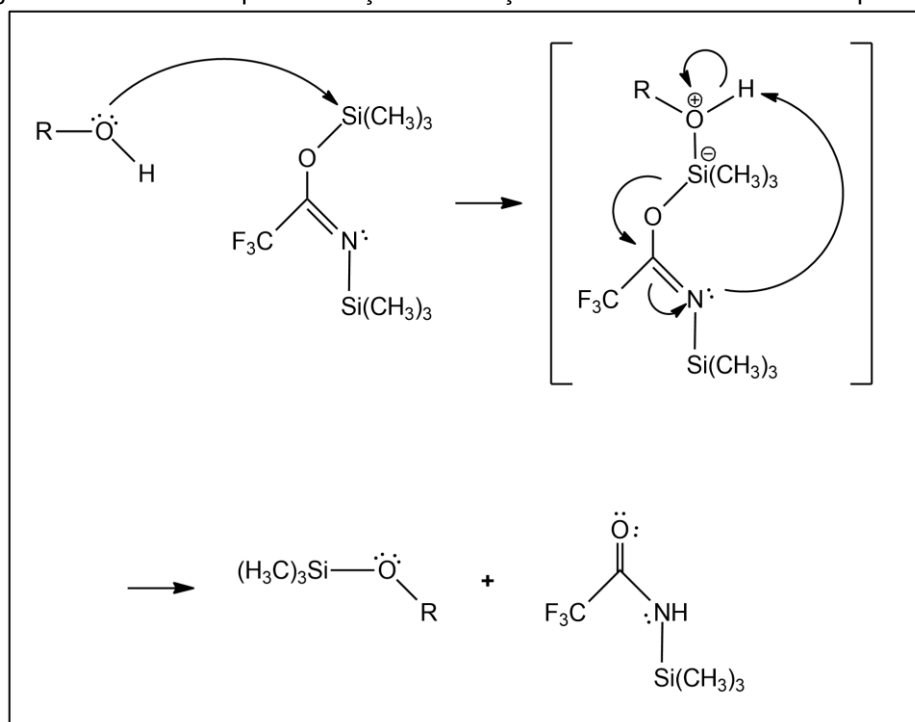
O procedimento tradicional para reações de derivatização, também chamado de derivatização *off-line*, ocorre pela formação dos derivados voláteis anteriormente à injeção no cromatógrafo. A reação ocorre pela adição do reagente derivatizante ao extrato contendo os analitos, sob aquecimento. O período de reação pode variar entre 60 e 90 minutos, de acordo com métodos reportados na literatura.^[28] Por conta do tempo de reação, a derivatização *off-line* apresenta algumas desvantagens como baixa frequência analítica, evaporação de analitos, contaminação da amostra, além da degradação do agente derivatizante e dos derivados formados, uma vez que eles são altamente sensíveis à água residual.^[29]

A derivatização em injetor (IPD, do inglês *Injection-port derivatization*), é uma alternativa ao procedimento tradicional para reações de derivatização. Na derivatização em injetor, os analitos e o agente derivatizante são injetados em conjunto no cromatógrafo a gás e a reação de derivatização ocorre no *liner* de injeção, sob altas temperaturas. Em comparação com a derivatização *off-line*, a derivatização em injetor elimina etapas do preparo de amostra, aumentando a

frequência analítica e automatizando o método. Os parâmetros passíveis de otimização para derivatização em injetor são: volume de agente derivatizante, temperatura do injetor e tempo de *splitless*, que consiste no tempo no qual a amostra injetada permanece no *liner* do injetor antes da purga e do início do programa de temperatura.^[29]

As reações de derivatização mais comumente utilizadas são a acilação, a alquilação e a sililação. Destaca-se a sililação pela sua simplicidade e rapidez, uma vez que ela ocorre em uma etapa e apresenta alto rendimento. A sililação é uma reação de substituição nucleofílica bimolecular (S_N2) onde o sítio nucleofílico do analito ataca o reagente sililante, de caráter eletrofílico, com a substituição do hidrogênio ionizável pelo grupo alquisilil. Os substituintes presentes nos analitos afetam o tipo de produto formado e o rendimento da reação. A estabilidade dos produtos diminui de acordo com o grupo funcional na seguinte ordem: álcoois > fenóis > ácidos carboxílicos > aminas > amidas/hidroxis. Em relação à cadeia carbônica, a estabilidade de carbonos primários é maior que a de carbonos secundários, que por sua vez, é maior que a de carbonos terciários. O mecanismo de reação para a formação do composto sililado está descrito na Figura 4.^[30]

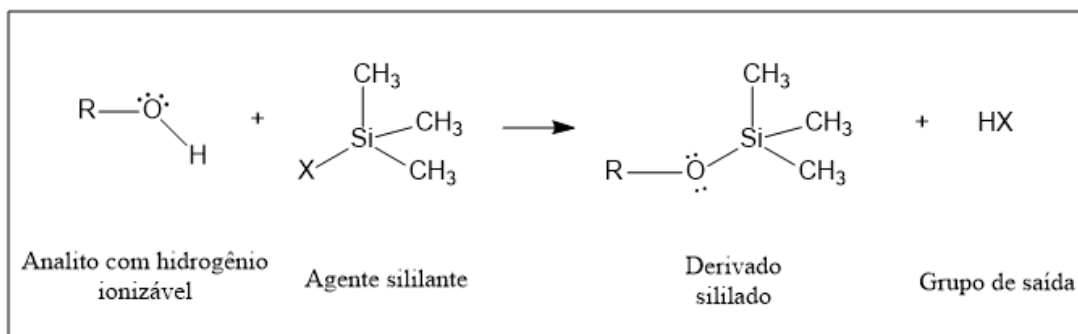
Figura 4 – Mecanismo para a reação de sililação entre BSTFA e um álcool primário.



Fonte: adaptado de Orata, 2012.^[30]

Entre os reagentes sililantes mais frequentemente utilizados estão o N,O-bis(trimetilsilil)acetamida (BSA), o N,O-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e o trimetilclorosilano (TMCS).^[29] Os compostos silanizantes reagem com álcoois e ácidos formando éteres e ésteres trimetilsilil, respectivamente. Esses derivados são voláteis, termicamente estáveis e podem ser submetidos a diferentes programas de temperatura em cromatografia gasosa. É comumente reportado na literatura o uso do reagente BSTFA contendo 1 % de TMCS, que atua como catalisador de reações de derivatização com grupos funcionais estericamente impedidos. A Figura 5 mostra a reação genérica de derivatização, onde o hidrogênio ionizável de uma molécula orgânica é substituído pelo grupo trimetilsilil de um agente sililante.^[30]

Figura 5 – Reação genérica de derivatização para formação de um derivado sililado.



Fonte: adaptado de Orata, 2012.^[30]

2.5 QUIMIOMETRIA

A quimiometria é uma área de estudo que combina análise estatística e ciência da computação para facilitar o tratamento de dados químicos e auxiliar no planejamento de experimentos, como otimizações multivariadas de parâmetros envolvidos em um protocolo analítico. O planejamento de experimentos (DoE, do inglês *Design of experiments*) é uma técnica quimiométrica que permite a avaliação da relação entre variáveis de um experimento, como temperatura, concentração ou tempo, e a influência dessas variáveis sobre uma resposta analítica. Através do planejamento de experimentos, é possível prever o comportamento das respostas analíticas e otimizar um método através de superfícies de resposta, de forma a determinar as condições ótimas para uma melhor resposta analítica. Nessa técnica, as variáveis são estabelecidas com níveis de mínimo e máximo, que limitam o domínio experimental. Os dados obtidos pelo instrumento analítico geram superfícies de resposta, que se baseiam no ajuste de valores por uma equação

polinomial e são aplicadas para casos onde as variáveis de um método influenciam na resposta analítica. As variáveis são avaliadas simultaneamente, permitindo que seja considerada a influência dos parâmetros entre si. Existem diferentes designs experimentais que podem gerar superfícies de resposta, como o planejamento composto central e o planejamento *Doehlert*, que podem ser aplicados para duas ou mais variáveis^[31], e o diagrama ternário de misturas *Simplex Lattice*, que é ideal para analisar a resposta analítica entre uma mistura de dois ou mais solventes.^[32]

Na cromatografia gasosa, o planejamento de experimentos pode ser usado para procedimentos de preparo de amostra e otimização de parâmetros de análise. Dessa forma, a quimiometria auxilia na diminuição de tempo de análise e quantidade de reagentes, pois os limites pré-estabelecidos para as variáveis simplificam os procedimentos de otimização de um método.^[33]

2.6 MÉTRICA VERDE PARA AVALIAÇÃO DO PREPARO DE AMOSTRA

Com o surgimento da Química Verde e o estabelecimento de princípios que corroboram para práticas de laboratório mais sustentáveis, notou-se que os princípios da Química Verde não contemplavam a realidade da Química Analítica e do preparo de amostra. Nesse contexto, Gałuszka et al introduziu os 12 princípios da Química Analítica Verde em 2013^[34], com o intuito de atender as demandas e especificidades da área. Contudo, o primeiro princípio da Química Analítica Verde consiste em evitar o preparo de amostra e optar por técnicas analíticas que permitem a inserção direta de amostras em instrumentos de análise. Entretanto, as especificidades de matrizes complexas não permitem a exclusão do preparo de amostra. Nesse contexto, López-Lorente et al^[35] introduziram, em 2022, os 10 princípios de preparo de amostra verde. Os 10 princípios de preparo de amostra verde levam em consideração a necessidade da limpeza da amostra para posterior análise, visando eliminação de substâncias tóxicas, redução de reagentes e de resíduos, baixo consumo energético e aumento da segurança do operador.

Dessa forma, surgiram ferramentas métricas com o intuito de mensurar o caráter sustentável de um método analítico, como é o caso da AGREEprep (do inglês, *Analytical greenness metric for sample preparation*). A ferramenta AGREEprep possui enfoque nas etapas do preparo de amostra e como elas atendem à Química Analítica Verde. A ferramenta leva em consideração os 10

princípios do Preparo de Amostra Verde e pontua o preparo de amostra de acordo com o impacto ambiental entre 0 (maior impacto) e 1 (menor impacto).^[36]

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver um protocolo de extração para compostos fenólicos presentes em folhas de chá verde através da técnica de extração com solvente assistida por ultrassom de amostras sólidas empacotadas com membrana porosa (UASE-PMSS) e derivatização em injetor, seguida por detecção e quantificação por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC/FID).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a capacidade de extração dos compostos fenólicos ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina através da técnica UASE-PMSS.
- b) Otimizar a variável solvente de extração através de um planejamento *Simplex Lattice*;
- c) Otimizar as variáveis tempo de extração e volume de solvente através de um planejamento *Doehlert*;
- d) Otimizar as principais variáveis de derivatização em injetor para compostos fenólicos, incluindo temperatura do injetor, volume de agente derivatizante e tempo de *splitless*, através de um planejamento Composto Central;
- e) Avaliar o método através de parâmetros analíticos, incluindo faixa linear de trabalho, limites de detecção e de quantificação e precisão;
- f) Avaliar a técnica de preparo de amostra através da ferramenta de métrica verde AGREEprep.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 MATERIAIS E REAGENTES

Os padrões analíticos (ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina), assim como o agente derivatizante N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida:trimetilclorosilano (BSTFA:TMCS 99:1) foram adquiridos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Acetona, acetato de etila e acetonitrila, todos de grau HPLC, foram obtidos pela TEDIA (Rio de Janeiro, RJ, Brasil). As folhas de membrana plana de polipropileno (Tipo PP 1E (R/P), tamanho de poro de 0,1 μm e espessura de 100 μm) foram adquiridas da Membrana (Wuppertal, Alemanha). A solução estoque de padrões analíticos (50 mg L⁻¹) foi preparada em metanol, e armazenada a 4° C com abrigo de luz.

4.2 INSTRUMENTAÇÃO

O método de separação está de acordo com descrito por Zanetti et al^[37], 2022. As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo a gás, modelo GC-2014, acoplado ao detector de ionização em chama (GC/FID) (Shimadzu, Quioto, Japão), com uma coluna capilar, de modelo DB-5ms (30,0 m x 0,250 mm x 0,25 μm), de natureza não polar, composta de 5% fenil-arileno e 95% dimetilpolisiloxano, (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA). Gás hidrogênio (99,999 % de pureza) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL min⁻¹. A injeção das soluções foi realizada com o uso de uma microseringa Hamilton com capacidade de 10,0 μL (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), em modo *splitless* (2,5 min). O volume de injeção foi de 1,0 μL . As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 °C e 300 °C, respectivamente. O programa de temperatura foi iniciado em 60 °C durante 2 min. Foi aplicada uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ até atingir 180 °C e, logo após, a taxa de aquecimento foi reduzida para 6 °C min⁻¹ até a marca de 280 °C. A temperatura foi mantida constante por 2 min e, com a taxa de 6 °C min⁻¹, a temperatura foi elevada até atingir 300 °C, onde foi mantida constante por 15 min. A identificação dos compostos foi realizada de acordo com os seus respectivos tempos de retenção, através da injeção individual de cada derivado trimetilsiloxano do respectivo composto fenólico.

Um moinho doméstico modelo PMC01 (Philco, China) e uma peneira granulométrica Granutest (ABNT: 12, Abertura: 1,68 mm, Tyler: 10) (Telastem

Peneiras para Análises Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foram utilizados para preparar as amostras de folhas de chá. Um agitador magnético modelo DI-03 (DIST, Florianópolis, SC, Brasil) foi usado para a fortificação da amostra. Uma seladora manual GT778 (Lorben, São Paulo, SP, Brasil) foi empregada para a selagem das membranas microporosas de polipropileno. O banho ultrassônico modelo USC 1450 (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil), com frequência de 25 kHz, foi utilizado para a extração dos compostos fenólicos. Um agitador de tubos modelo AP56 (Phoenix, Araraquara, SP, Brasil) foi usado para a homogeneização das soluções injetadas no cromatógrafo.

4.3 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.3.1 Obtenção da amostra e preparo da membrana

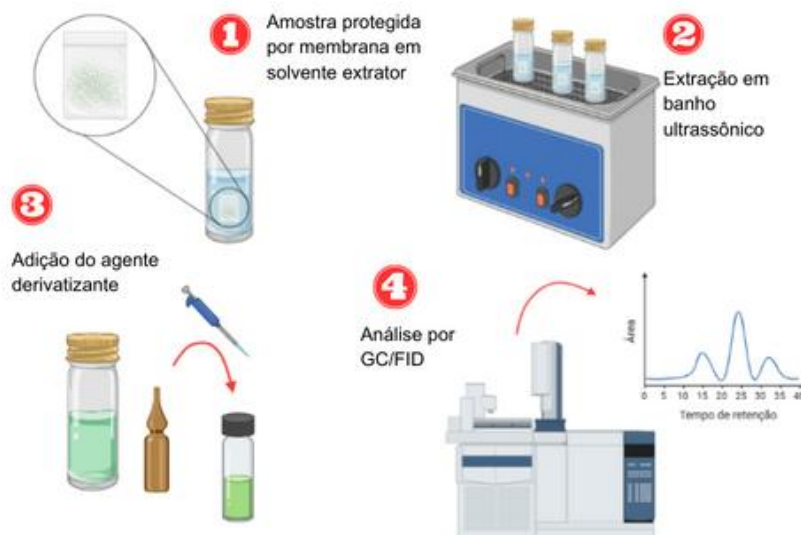
Cerca de 100 g de folhas de chá verde foram obtidos em comércio local na região de Florianópolis, SC. As folhas de chá foram trituradas e peneiradas com auxílio de peneira granulométrica. A amostra foi mantida em frasco âmbar, com abrigo de luz e armazenamento em freezer a 4 °C. As membranas microporosas de polipropileno foram seladas com auxílio de seladora manual. As dimensões das membranas foram fixadas em 1,5 x 1,5 cm.

4.3.2 Preparo da matriz fortificada

Para a fortificação das folhas de chá verde, foi utilizada uma solução estoque de padrões analíticos (ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido siríngico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina) de forma a obter uma concentração de 40 mg L⁻¹. A amostra foi coberta por acetona e mantida sob agitação magnética durante duas horas. A secagem da amostra foi realizada em capela e temperatura ambiente, até a evaporação total do solvente.

4.3.3 Delineamento experimental

Figura 6 – Esquema geral para o procedimento de extração de compostos fenólicos em chá verde.



Fonte: elaborado pela autora.

As membranas contendo 100 mg de amostra foram transferidas para frascos de vidro, e 1,5 mL de uma mistura de acetona e acetato de etila (3:1 v/v) foram adicionados, como mostra o primeiro momento na Figura 6 acima. Na segunda etapa, os frascos foram mantidos em banho ultrassônico durante 30 min. Ao final da extração, a membrana foi removida com auxílio de pinça e o extrato foi armazenado.

4.3.4 Etapa de derivatização e análise cromatográfica

A análise de compostos fenólicos individuais foi realizada por cromatografia gasosa com detecção por ionização em chama (GC/FID). Anteriormente a análise, 140 µL de extrato foram separados do volume total de extrato (1,5 mL) e 60 µL de agente derivatizante BSTFA:TMCS 1% foram adicionados ao extrato, de acordo com a terceira etapa da Figura 6. As amostras foram agitadas com auxílio de agitador de tubos durante 30 segundos para sua homogeneização. Logo após, 1 µL de amostra foi inserido na porta do injetor do GC/FID, para derivatização em condições otimizadas e análise cromatográfica, representada pelo último momento da Figura 6.

4.4 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO

4.4.1 Derivatização em estufa

Para o procedimento de derivatização em estufa, foi realizado o procedimento descrito por Robles et al, 2019^[17]. Foram adicionados 200 μL da solução padrão a 50 mg L^{-1} em metanol a um vial de 2,0 mL. A solução foi seca sob fluxo de nitrogênio e foram adicionados 30 μL do agente derivatizante ao frasco de vidro. A amostra foi homogeneizada com auxílio de vórtex durante 30 segundos e lavada à estufa durante 30 min a 35 °C. Logo após, foram adicionados 170 μL de acetona à solução, que foi deixada em estufa por mais 15 min a 35 °C. Finalmente, uma alíquota de 1 μL foi injetada no cromatógrafo.

4.4.2 Derivatização em injetor

Para a derivatização em injetor, foram adicionados 200 μL da solução padrão a 50 mg L^{-1} em metanol a um vial de 2,0 mL. Após o procedimento de secagem, foram adicionados 170 μL de acetona e 30 μL do agente derivatizante ao frasco contendo os analitos. A solução foi agitada em vórtex durante 30 segundos e uma alíquota de 1 μL foi injetada no cromatógrafo, com a temperatura do injetor fixada em 280 °C.

4.5 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO

4.5.1 Otimização dos parâmetros de derivatização

Para determinação das condições ótimas de derivatização em injetor foi utilizado um planejamento de composto central, e os parâmetros avaliados foram: temperatura do injetor, tempo de *splitless* e volume de agente derivatizante. As variáveis utilizadas no planejamento estão descritas na Tabela 2. Em um vial de 2,0 mL, foram adicionados 100 μL da solução estoque de compostos fenólicos (50 mg L^{-1}) e o solvente foi seco em fluxo de gás nitrogênio. Os analitos foram ressuspensos em acetona e o agente derivatizante foi adicionado. A amostra foi homogeneizada com auxílio de vórtex durante 30 segundos e uma alíquota de 1,0 μL foi injetada em cromatógrafo a gás.

Tabela 2: Planejamento Composto Central para otimização dos parâmetros de derivatização em injetor.

Experimento	Temperatura do injetor (°C)	Tempo de <i>splitless</i> (min)	Volume de agente derivatizante (µL)
1	265	1,0	20
2	265	2,0	20
3	265	1,0	60
4	265	2,0	60
5	295	1,0	20
6	295	2,0	20
7	295	1,0	60
8	295	2,0	60
9	255	1,5	40
10	305	1,5	40
11	280	1,5	6,0
12	280	1,5	74
13	280	0,7	40
14	280	2,3	40
15	280	1,5	40
16	280	1,5	40
17	280	1,5	40

Fonte: elaborado pela autora.

4.5.2 Otimização do solvente de extração

A escolha do solvente de extração foi determinada a partir de um planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice*. Os seguintes solventes orgânicos foram avaliados: acetato de etila, acetona e acetonitrila. As variáveis utilizadas no planejamento estão descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice* para escolha do solvente de extração.

Experimento	Acetato de etila	Acetona	Acetonitrila
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

Fonte: elaborado pela autora.

4.5.3 Otimização dos parâmetros de extração por UASE-PMSS

A otimização dos parâmetros de extração volume de solvente e tempo de extração foi realizada através de um planejamento *Doehlert*. As variáveis utilizadas no planejamento estão descritas na Tabela 4.

Tabela 4: Planejamento *Doehlert* para otimização do volume de solvente e tempo de extração.

Experimento	Volume de solvente (uL)	Tempo de extração (min)
1	3000	15
2	1280	30
3	4720	30
4	1280	60
5	4720	60
6	3000	75
7	3000	45
8	3000	45
9	3000	45

Fonte: elaborado pela autora.

4.6 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MÉTODO

As curvas de calibração foram construídas a partir de adição de padrão. As soluções de calibração foram preparadas adicionando padrões aos extratos obtidos, em uma faixa de concentração de 0,5 a 10,0 mg L⁻¹. A extração dos analitos foi realizada em triplicata (n=3), utilizando condições otimizadas, seguida pela derivatização em injetor e análise por GC/FID para identificação e quantificação dos analitos. Os parâmetros avaliados foram faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação (R), limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão intradia e interdia.

O LOD foi calculado como sendo 3,3 vezes o desvio padrão da menor concentração da curva de calibração dividido pelo coeficiente angular da equação da reta obtida pela curva de calibração, como mostra a Equação 1, e o LOQ foi calculado como 10 vezes o desvio padrão pelo coeficiente angular (Equação 2)^[38]. A precisão intradia foi calculada com base no desvio padrão relativo (DPR) das áreas dos analitos em três níveis de concentração. A precisão interdia foi calculada pelo

DPR em um nível de concentração. Os valores foram estabelecidos como aceitáveis quando inferiores a 20 %, de acordo com a AOAC.^[39]

$$LOD = \frac{3,3 s}{a} \quad \text{Equação 1}$$

$$LOQ = \frac{10 s}{a} \quad \text{Equação 2}$$

A análise do caráter sustentável da técnica de extração foi avaliada através do software AGREEprep, desenvolvido em Python versão 3.8 (Python Software Foundation, EUA).

4.7 AVALIAÇÃO ESTATÍSTICA

Foram feitas análises multivariadas através do software Statistica versão 13.3 (StatSoft Inc., EUA). Os tratamentos estatísticos foram feitos por meio de análises de superfície de resposta e análises de variância (ANOVA). Os resultados foram expressos como média geométrica $\pm$ desvio padrão.

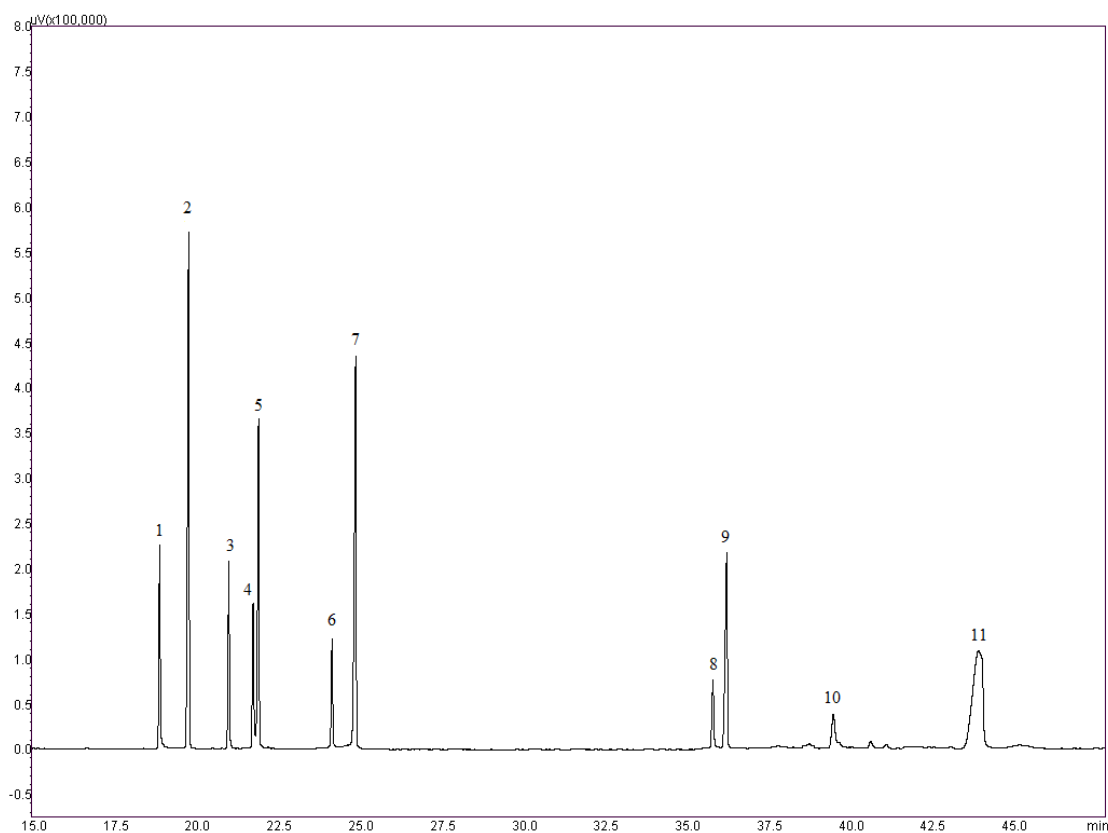
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 SEPARAÇÃO CROMATOGRÁFICA

Para avaliar a separação cromatográfica dos analitos em estudo, foi realizada a injeção de 1 μL de solução padrão contendo os compostos fenólicos ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido sirínigico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina na concentração de 25 mg L⁻¹, preparada em acetona. A injeção foi realizada em modo *splitless*, com tempo de 2,5 minutos e temperatura do injetor a 250 °C.

Através do cromatograma obtido, observa-se que a separação cromatográfica ocorreu com boa resolução. Os analitos foram identificados através do tempo de retenção e estão representados por números na Figura 7. Através de uma separação eficiente dos analitos, foi possível dar início ao desenvolvimento do método analítico.

Figura 7: Cromatograma da separação dos 11 compostos fenólicos de trabalho. 1 - Ácido vanílico; 2 - Ácido protocatecuico; 3 - Ácido sirínigico; 4 - Ácido *p*-cumárico; 5 - Ácido gálico; 6 - Ácido ferrúlico; 7 - Ácido cafeico; 8 - (-)-Epicatequina; 9 - (+)-Catequina; 10 - Kaempferol; 11 - Miricetina.

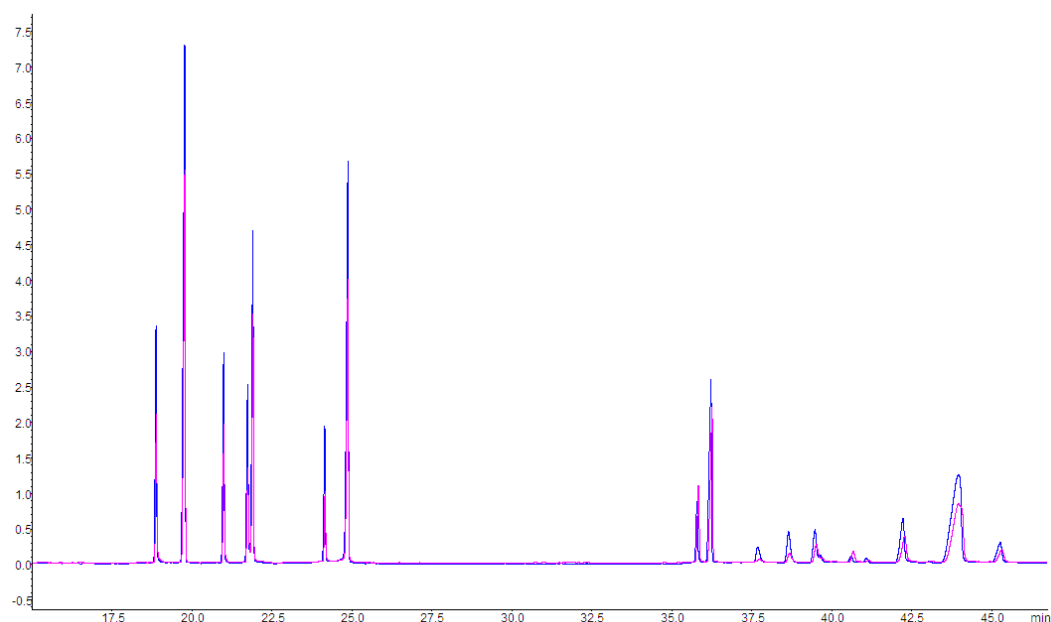


Fonte: elaborado pela autora.

5.2 COMPARAÇÃO ENTRE PROCEDIMENTOS DE DERIVATIZAÇÃO

Foi realizada a comparação entre os métodos de derivatização convencional, em estufa, e derivatização proposta, em injetor. Para avaliar a eficiência dos dois procedimentos, foi utilizada a solução estoque contendo os analitos a 50 mg L^{-1} . Os experimentos foram realizados em duplicata e o resultado foi expresso como a média geométrica das áreas obtidas em cada análise. Na Figura 8 se encontram os cromatogramas obtidos para os dois procedimentos. A resposta analítica para derivatização em injetor foi mais eficiente em comparação com a derivatização em estufa, resultando em uma melhor resposta analítica.

Figura 8: Cromatograma de comparação obtido para reação de derivatização em estufa (em rosa) e derivatização em injetor (em azul).

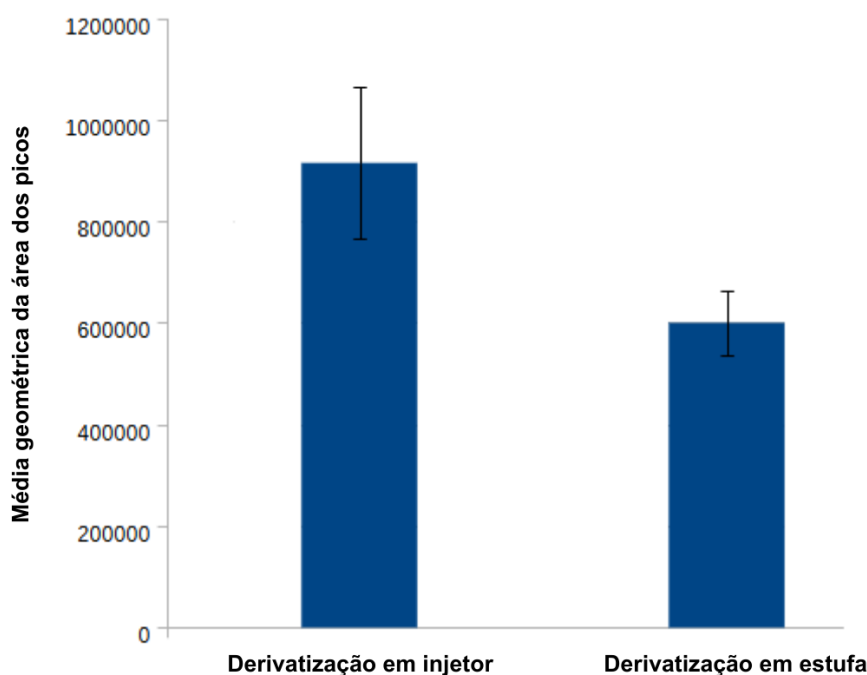


Fonte: elaborado pela autora.

Agentes derivatizantes são sensíveis à umidade e sua exposição ao ar atmosférico acarreta degradação do reagente e dos derivados formados. Sendo assim, a melhoria da resposta analítica para a derivatização em injetor pode ser justificada pela diminuição do tempo de exposição do agente derivatizante entre o preparo de amostra e a análise em si. No procedimento realizado em estufa, o agente derivatizante permanece reagindo com a amostra por 45 minutos, aumentando o risco de degradação. Além disso, a temperatura na reação em injetor foi oito vezes maior do que na reação em estufa, o que aumenta a velocidade de

reação com o aumento da energia cinética dos reagentes.^[40] Na Figura 9 estão expressos, em forma de gráficos de barra, os resultados obtidos através da média geométrica das áreas dos picos dos analitos.

Figura 9: Gráfico de barras obtido pela reação de derivatização de compostos fenólicos em injetor e em estufa (n = 2).



Fonte: elaborado pela autora.

Por fim, a derivatização em injetor diminuiu etapas no preparo de amostra e aumentou a frequência analítica do método proposto.

5.3 OTIMIZAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO

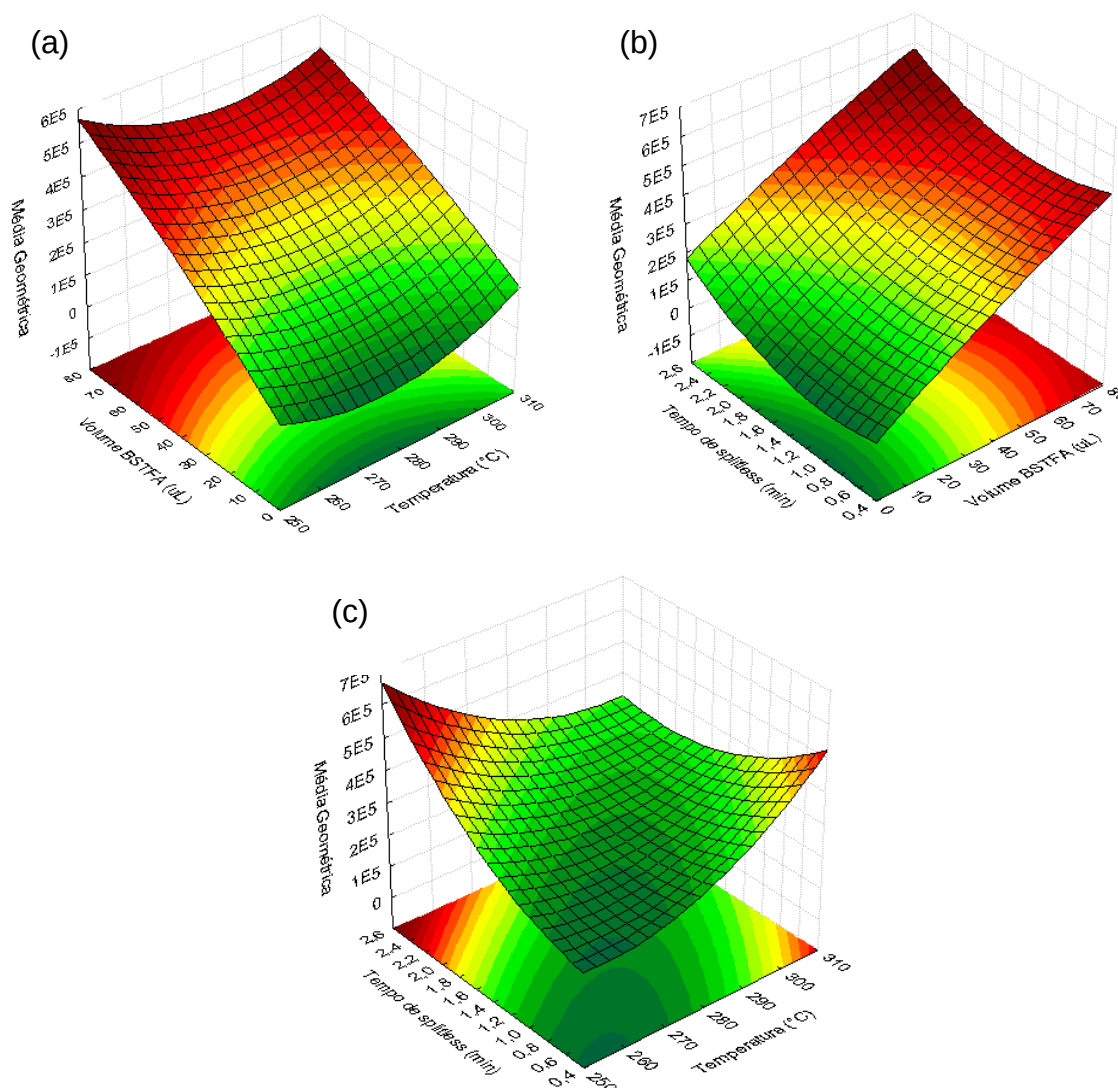
5.3.1 Otimização dos parâmetros de derivatização

Após a comprovação da eficiência da derivatização em injetor, foram otimizadas as principais variáveis do procedimento: volume de agente derivatizante, tempo de *splitless* e temperatura do injetor. A otimização foi realizada a partir de um planejamento Composto Central, onde os experimentos foram conduzidos de acordo com a Tabela 2, tópico 4.5.1.

A partir da média geométrica da área dos picos dos analitos, foram geradas as superfícies de resposta presentes na Figura 10. O coeficiente de correlação para

a função quadrática obtida foi de 0,9676, indicando um bom ajuste dos parâmetros ao modelo matemático aplicado.

Figura 10: Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento Composto Central para as variáveis: (a) volume de derivatizante BSTFA e temperatura, (b) tempo de *splitless* e volume de derivatizante BSTFA, (c) tempo de *splitless* e temperatura.



Fonte: elaborado pela autora.

As regiões das superfícies em vermelho indicam os valores de melhor resposta analítica. O aumento da resposta analítica para maiores volumes de BSTFA:TMCS (99:1) pode ser observado nas Figuras 10(a) e 10(b). A quantidade significativa de analitos em solução exige uma alta concentração de agente derivatizante. O volume de agente derivatizante BSTFA:TMCS foi fixado em

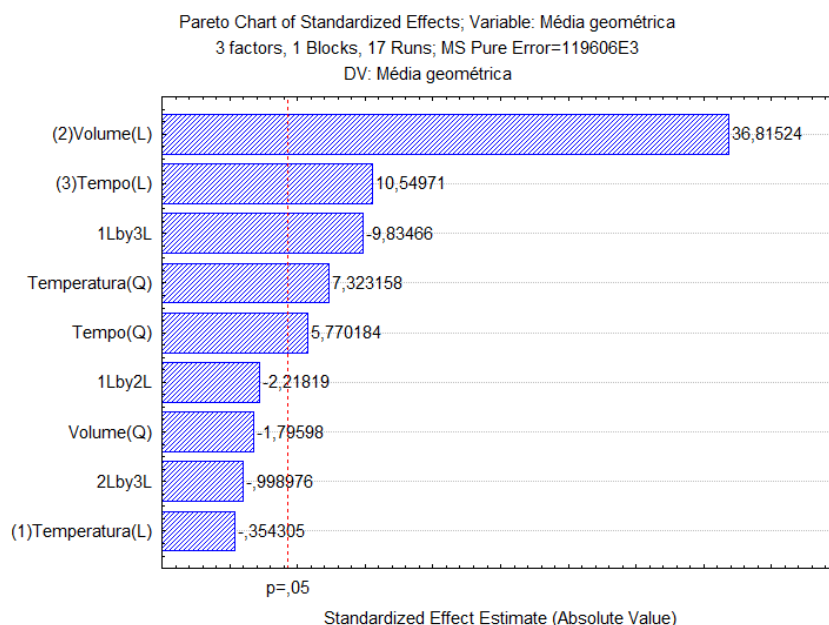
60 μL , já que, de acordo com as superfícies de respostas acima, melhores respostas analíticas foram obtidas a partir dessa faixa e o método visa a minimização do gasto de reagentes.

Quando avaliada a temperatura com o volume de agente derivatizante observou-se que o intervalo de temperatura estudado não influenciou na melhoria da resposta analítica, como mostra a Figura 10(a). Isso ocorre porque os parâmetros de temperatura e volume de agente derivatizante não são significativos quando combinados entre si, como mostra o gráfico de Pareto na Figura 11. Nesse gráfico, as variáveis significativas para a melhora do sinal analítico ultrapassam o valor de efeito mínimo, indicado pela linha tracejada.

Ao avaliar o tempo de *splitless* com a temperatura, notou-se a melhora da resposta com o aumento do volume de agente derivatizante, sendo pouco significativa a variação no intervalo de tempo de *splitless*. Isso mostra o volume de agente derivatizante é a variável de maior representação para a otimização em injetor, como pode ser confirmado pelo Gráfico de Pareto abaixo, onde a variável volume possui maior valor de significância.

Pela Figura 10(c), observa-se um aumento da resposta analítica para menores valores de temperatura e maiores intervalos de tempo de *splitless*. As condições inversas, ou seja, maior temperatura de injetor e menor tempo de *splitless*, também resultam na melhora da resposta analítica. Isso pode ser explicado pela relação entre expor os analitos por um tempo prolongado a altas temperaturas ou um tempo curto em temperatura mais branda. Na primeira situação, poderia ocorrer a degradação dos analitos por falta de estabilidade térmica. Já na segunda, a derivatização seria prejudicada pelo pouco tempo de exposição entre os analitos e o derivatizante, sem energia térmica alta o suficiente para acelerar a reação.

Figura 11: Gráfico de Pareto gerado a partir do planejamento Composto Central para as variáveis: (1) temperatura, (2) volume de agente derivatizante, (3) tempo de *splitless*.



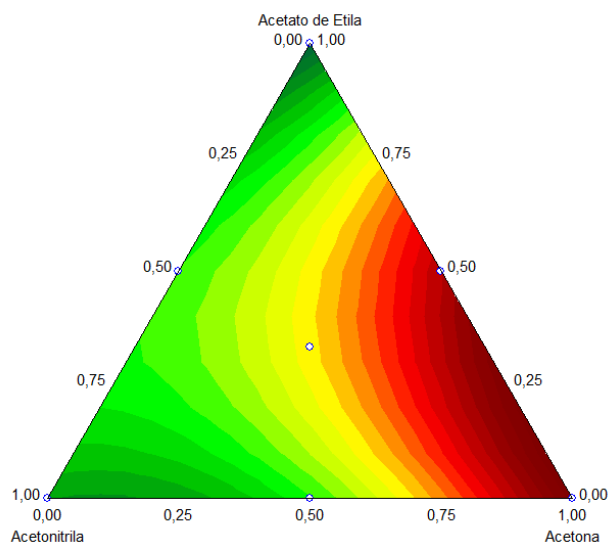
Fonte: elaborado pela autora.

5.3.2 Otimização do solvente de extração

A escolha de um solvente adequado para extração é de extrema importância para garantir uma migração eficiente das substâncias de interesse presentes na amostra para a fase líquida. Para a escolha do melhor solvente de extração dos compostos fenólicos, foi realizado um planejamento de misturas de superfície ternária *Simplex Lattice*, e os solventes escolhidos foram acetonitrila, acetato de etila e acetona. Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Tabela 3, tópico 4.5.2.

A superfície ternária foi gerada a partir da média geométrica das áreas dos picos dos analitos. O coeficiente de correlação para a função quadrática foi de 0,9894, demonstrando um bom ajuste dos dados ao modelo matemático aplicado. A Figura 12 mostra a superfície de resposta obtida a partir deste planejamento.

Figura 12: Superfície ternária *Simplex Lattice* obtida para a otimização da escolha do solvente de extração.



Fonte: elaborado pela autora.

A partir do diagrama ternário, observou-se a melhora da resposta analítica para maiores frações de acetona, com o acetato de etila contribuindo parcialmente para a eficiência da extração. Assim, determinou-se que a melhor condição para a fase extratora é uma mistura de acetona e acetato de etila (3:1 v/v).

A melhora da resposta observada pela mistura de solventes pode ser explicada pela estrutura química dos analitos: flavonóides e ácidos fenólicos. Essas classes de substâncias são compostas por cadeias hidrocarbônicas podendo conter diferentes números dos grupos ionizáveis hidroxila e carboxila. Ou seja, apesar de possuírem grupos polares e serem capazes de formar ligações de hidrogênio, são substâncias de baixa polaridade e possuem maior afinidade com solventes orgânicos. Estão presentes na Tabela 5 os solventes utilizados no planejamento *Simplex Lattice* e seus momentos dipolo, sendo que momentos dipolo maiores configuram solventes mais polares.

Tabela 5: Solventes escolhidos para otimização e seus respectivos momentos dipolo.

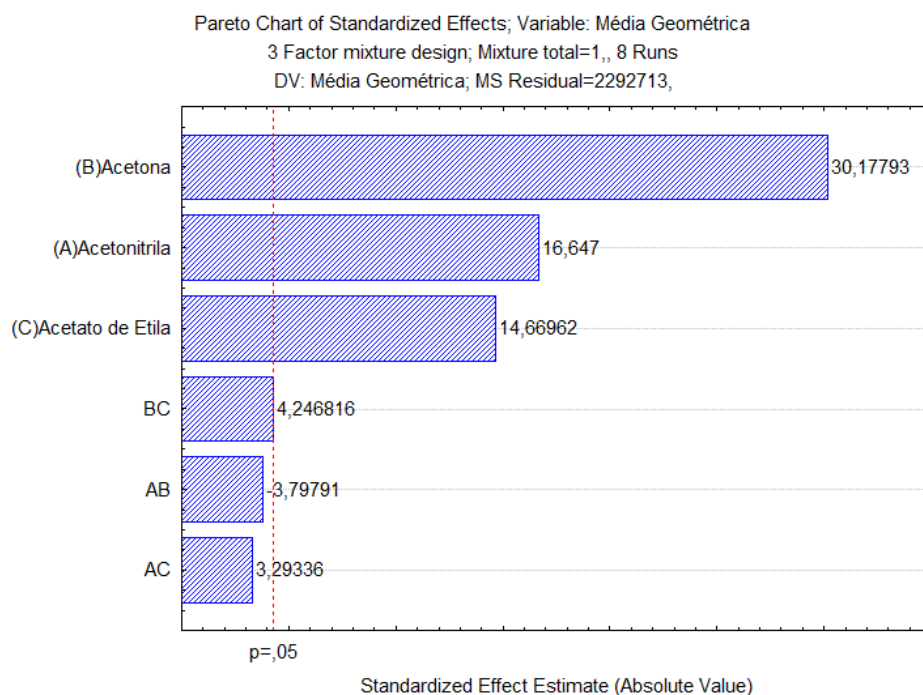
Solvente	Momento dipolo (D)
Acetato de etila	1,81
Acetona	2,88
Acetonitrila	3,92

Fonte: adaptado de Chang, 2011^[41] e Woodall et al, 2007.^[42]

Conclui-se então que a extração para compostos fenólicos ocorre com maior eficiência em solventes menos polares, sendo a acetonitrila muito polar para interagir com as cadeias hidrocarbônicas dos analitos. Além disso, é necessário levar em consideração o efeito do solvente sobre a membrana, de natureza apolar. A melhora da resposta analítica pela adição de uma fração do solvente menos polar, acetato de etila, pode ser explicada pela afinidade desse solvente com a membrana de polipropileno.

Ademais, a Figura 13 abaixo mostra o Gráfico de Pareto obtido a partir do planejamento experimental, onde é possível observar a maior influência de acetona sobre a otimização.

Figura 13: Gráfico de Pareto obtido para os parâmetros estatisticamente significativos no planejamento experimental *Simplex Lattice*.



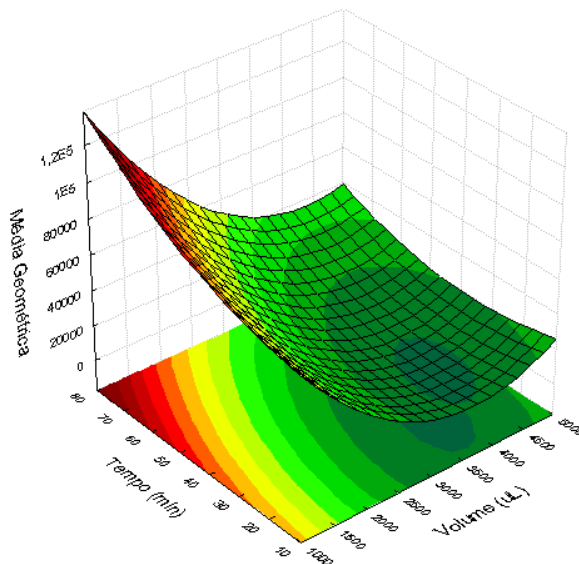
Fonte: elaborado pela autora.

5.3.3 Otimização dos parâmetros de extração

A otimização dos parâmetros de extração foi realizada através de um planejamento *Doehlert*, onde as variáveis estudadas foram tempo de extração e volume de solvente de extração. Os experimentos foram conduzidos de acordo com a Tabela 4, tópico 4.5.3. A superfície de resposta foi gerada a partir da média geométrica da área dos analitos em estudo. O coeficiente de correlação para a

função quadrática obtida foi de 0,9978, mostrando que os parâmetros se ajustaram bem ao modelo matemático aplicado. A Figura 14 mostra a superfície de resposta gerada a partir do planejamento *Doehlert*.

Figura 14: Superfície de resposta obtida a partir do planejamento *Doehlert*.

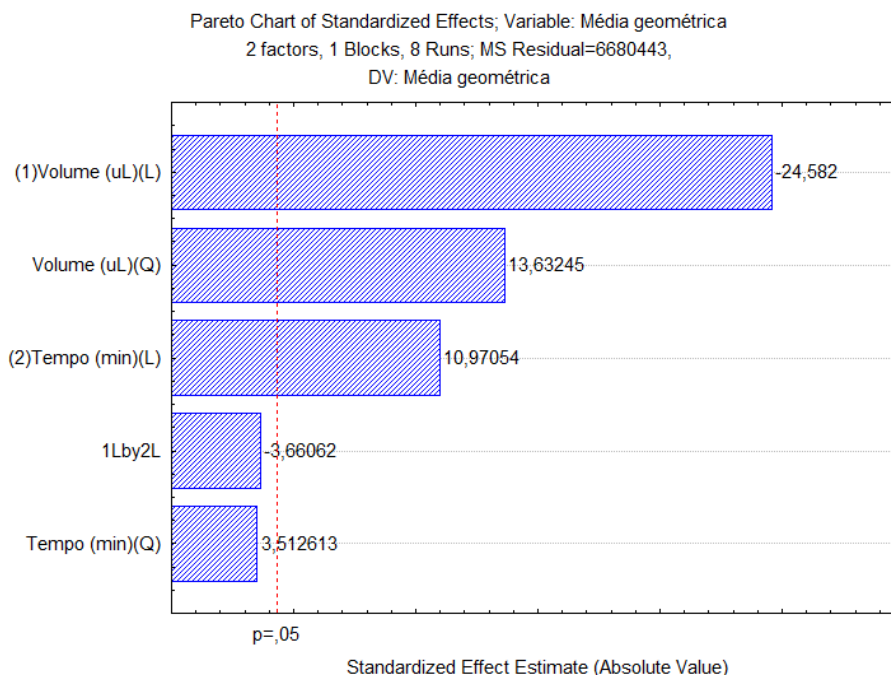


Fonte: elaborado pela autora.

A partir do gráfico obtido, observou-se melhora da resposta analítica para menores volumes de solvente e tempos mais longos de extração. Um volume menor de solvente utilizado na extração permite maior pré-concentração dos analitos, que é um dos principais objetivos dentro do preparo de amostra. Sendo assim, o volume de solvente foi fixado em 1,5 mL, já que deve ser levado em consideração o recobrimento total da membrana microporosa pelo solvente extrator.

O tempo maior de extração favoreceu a resposta analítica porque permite o contato prolongado entre a amostra e o solvente extrator, o que permite a migração de maiores quantidades das moléculas em estudo. Entretanto, tempos muito longos prejudicam a frequência analítica do método. Dessa forma, o tempo de extração foi fixado em 30 minutos, onde já é possível observar uma boa resposta analítica. O Gráfico de Pareto para o planejamento *Doehlert* se encontra na Figura 15 abaixo, onde é perceptível a maior influência da variação de volume em relação à resposta analítica.

Figura 15: Gráfico de Pareto obtido para os parâmetros estatisticamente significativos no planejamento experimental *Doehlert*.



Fonte: elaborado pela autora.

5.4 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO MÉTODO

Os parâmetros analíticos foram avaliados sob as condições experimentais de extração e derivatização otimizadas. Para a extração, utilizou-se uma mistura de acetona:acetato de etila (3:1 v/v) a um volume de 1,5 mL. A extração foi realizada em banho ultrassônico durante 30 minutos. Para a derivatização dos analitos, optou-se por realizar a reação em injetor, com 60,0 μL do agente derivatizante BSTFA:TMCS, temperatura do injetor a 250 $^{\circ}\text{C}$ e tempo de *splitless* de 2,5 minutos. Inicialmente, foram construídas curvas de calibração por adição de padrão. A amostra de chá verde foi fortificada com a solução estoque contendo os compostos fenólicos ácido vanílico, ácido protocatecuico, ácido sirínico, ácido *p*-cumárico, ácido gálico, ácido ferrúlico, ácido cafeico, (-)-epicatequina, (+)-catequina, kaempferol e miricetina em diferentes níveis de concentração. Os parâmetros analíticos avaliados se encontram na Tabela 6. Os coeficientes de correlação variaram entre 0,9650 e 0,9983, o que indica um bom ajuste linear em toda a faixa de trabalho. Os limites de detecção variaram entre 0,01 mg L^{-1} para o ácido protocatecuico e 0,49 mg L^{-1} para o ácido cafeico. Já os limites de quantificação variaram entre 0,04 mg L^{-1} para o ácido protocatecuico e 1,48 mg L^{-1} para o ácido cafeico.

Tabela 6: Faixas lineares de trabalho, equações lineares, coeficientes de correlação, limites de detecção e de quantificação e concentrações de compostos fenólicos em extrato de chá verde para 11 compostos fenólicos.

Analito	Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)	R	Equação linear	Concentração de compostos fenólicos em extrato (mg L ⁻¹)
Ácido vanílico	0,5 – 10,0	0,43	1,31	0,9859	y = 19098x - 21181	< LOD
Ácido protocatecuico	0,5 – 10,0	0,01	0,04	0,9960	y = 56660x - 17510	0,31 (± 9,7 %)
Ácido siríngico	0,5 – 10,0	0,12	0,35	0,9798	y = 19500x - 17632	< LOD
Ácido <i>p</i> -cumárico	0,5 – 10,0	0,26	0,79	0,9893	y = 15533x - 44592	< LOD
Ácido gálico	0,5 – 10,0	0,04	0,11	0,9958	y = 26581x + 58147	2,19 (± 12,2 %)
Ácido ferrúlico	0,5 – 10,0	0,21	0,62	0,9857	y = 11466x - 17819	< LOD
Ácido cafeico	0,5 – 10,0	0,49	1,48	0,9928	y = 45960x - 41416	< LOD
(-)-Epicatequina	0,5 – 10,0	0,31	0,95	0,9764	y = 3800x + 20543	5,41 (± 8,6 %)
(+)-Catequina	0,5 – 10,0	0,06	0,19	0,9839	y = 13032x + 11650	0,89 (± 2,0 %)
Kaempferol	0,5 – 10,0	0,22	0,67	0,9983	y = 28554x + 37831	< LOD
Miricetina	0,5 – 10,0	0,34	1,02	0,9650	y = 30709x - 11009	< LOD

Fonte: elaborado pela autora.

Foram calculadas as concentrações dos compostos fenólicos nos extratos de chá verde por meio da extrapolação das curvas de calibração. Somente quatro dos onze analitos foram identificados: ácido protocatecuico (0,31 mg L⁻¹), ácido gálico (2,19 mg L⁻¹), (-)-epicatequina (5,41 mg L⁻¹) e (+)-catequina (0,89 mg L⁻¹). Não foi possível quantificar a concentração desses analitos na amostra sólida do chá verde uma vez que, para isso, seria necessária a avaliação prévia da recuperação do método analítico, a qual não foi desenvolvida como será abordado a seguir. Entretanto, a quantificação de analitos no extrato orgânico obtido pela UASE-PMSS

pressupõe a existência desses analitos em quantidades significativas nas folhas de chá verde.

De acordo com a literatura, os flavonoides majoritariamente encontrados em chá verde fazem parte da subclasse de flavanois, onde estão classificadas a (-)-epicatequina e a (+)-catequina, sendo a epicatequina uma das principais responsáveis pelo teor fenólico em chá verde.^[1] Como pode ser visto na Tabela 6, a (-)-epicatequina foi o analito com maior concentração em extrato, a 5,41 mg L⁻¹. A (+)-catequina apresentou uma concentração significativa de 0,89 mg L⁻¹. As catequinas possuem alta capacidade de sequestro de radicais livres e estão associadas às propriedades antioxidantes, antimutagênicas e quimiopreventivas presentes em chá verde. O ácido gálico, quantificado em 2,19 mg L⁻¹ no extrato orgânico, é classificado juntamente com as catequinas como uma das substâncias com maior efeitos benéficos encontrados em chá verde graças a sua habilidade de sequestrar radicais livres.^[8] Já o ácido protocatecuico, com concentração de 0,31 mg L⁻¹ no extrato, é conhecido por induzir o crescimento de proteínas responsáveis por combater o estresse oxidativo no organismo.^[43] Os demais analitos de trabalho apresentaram concentrações abaixo do limite de detecção.

Tabela 7: Precisões intradia e interdia para amostra comercial de chá verde.

Analito	Fortificação (mg L ⁻¹)	Precisão intradia (%) n = 3	Precisão interdia (%) n = 6
Ácido vanílico	1,50	29	-
	4,50	13	-
	7,50	9	21
Ácido protocatecuico	1,50	6	-
	4,50	3	-
	7,50	6	6
Ácido siríngico	1,50	21	-
	4,50	18	-
	7,50	4	5
Ácido <i>p</i> -cumárico	3,00	21	-
	4,50	14	-
	7,50	8	9
Ácido gálico	1,50	30	-
	4,50	1	-

	7,50	6	6
	1,50	21	-
Ácido ferrúlico	4,50	16	-
	7,50	3	5
	1,50	16	-
Ácido cafeico	4,50	5	-
	7,50	5	6
	1,50	1	-
(-)-Epicatequina	4,50	1	-
	7,50	9	35
	1,50	16	-
(+)-Catequina	4,50	1	-
	7,50	2	34
	1,50	23	-
Kaempferol	4,50	10	-
	7,50	9	11
	3,00	6	-
Miricetina	4,50	12	-
	7,50	1	31

Fonte: elaborado pela autora.

O desempenho do método analítico também foi avaliado por meio de ensaios de precisão intra e interdiários. Os resultados foram expressos por meio do desvio padrão relativo (DPR %) da resposta analítica. De acordo com a AOAC, são considerados aceitáveis valores de DPR iguais ou menores que 20 %. A precisão intradia foi realizada em três níveis de concentração, enquanto a precisão interdia foi avaliada em um nível de concentração. Os dados obtidos pelos ensaios de precisão encontram-se na Tabela 7.

Tanto na precisão intradia quanto interdia, observou-se valores de desvio padrão relativo acima do recomendado para alguns analitos. O alto desvio pode estar relacionado com etapas do preparo de amostra, como a reação de derivatização, onde a presença de água residual é capaz de degradar o agente derivatizante e seus derivados formados. Além disso, o efeito de matriz pode ter influenciado os ensaios de precisão.^[44]

Foi proposta a avaliação da exatidão do método analítico através de ensaios de recuperação. Na primeira tentativa, os valores de recuperação ficaram muito abaixo dos limites aceitáveis de acordo com os parâmetros estabelecidos pela

AOAC. Primeiramente, foi cogitado o sangramento da coluna cromatográfica por conta de seu tempo de uso, o que poderia causar incertezas nos resultados obtidos. Dificuldades encontradas na fortificação dos analitos na etapa experimental também influenciaram na não realização do ensaio de recuperação. Em uma segunda tentativa, o equipamento apresentou problemas na estabilização do programa de temperatura, o que impossibilitou a obtenção dos resultados de recuperação. Por conta das dificuldades encontradas ao longo da avaliação dos parâmetros analíticos, não foi possível avaliar se os valores fora dos limites de aceitação estavam relacionados com o equipamento ou com o método analítico em si.

Em relação ao método, especula-se a existência de efeitos de matriz na amostra de chá verde, que poderiam ser a causa de interferência na quantificação dos analitos, podendo causar a supressão ou enriquecimento do sinal analítico, não só nos ensaios de recuperação, mas também na avaliação da precisão. O efeito de matriz é comumente reportado em amostras biológicas devido a sua composição complexa, sendo dependente da natureza da amostra e das características físico-químicas dos analitos de estudo, como polaridade, peso molecular, estabilidade térmica e volatilidade. A presença de co-extrativos, como óleos essenciais por exemplo, pode ter acarretado efeito de matriz pronunciado na análise do extrato de chá verde. A membrana microporosa é capaz de reter macromoléculas, mas interferências causadas por moléculas de baixa massa molar podem ter causado a supressão do sinal analítico. Além disso, condições cromatográficas também podem influenciar no efeito de matriz, com destaque para o injetor, onde a injeção a quente pode causar uma competição entre os analitos e co-extrativos pelos sítios adsorventes do *liner* do injetor.^[44]

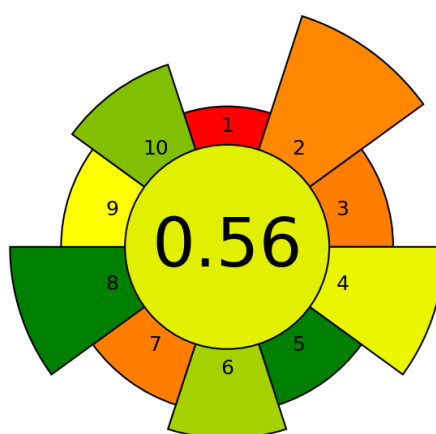
Devido aos contratempos encontrados ao longo do projeto, não foi possível avaliar a exatidão do método. Dessa forma, propõe-se a continuidade deste trabalho, com a realização de novos ensaios de recuperação em outro equipamento cromatográfico.

5.4.1 Avaliação da métrica verde para preparo de amostra

O caráter ambientalmente amigável do preparo de amostra realizado neste trabalho foi avaliado através da ferramenta métrica AGREEprep. A ferramenta leva em consideração os 10 princípios da Preparo de Amostra Verde^[35] e pontua o preparo de amostra de acordo com o impacto ambiental entre 0 (maior impacto) e 1

(menor impacto). O resultado é expresso através de um pictograma, onde a cor verde indica maior adequação à Química Analítica Verde e a cor vermelha, baixa adequação. As áreas das barras estão relacionadas com a maior ou menor influência de cada etapa dentro de um método analítico.^[36] A Figura 16 mostra o pictograma obtido através da ferramenta AGREEprep para o preparo de amostra através da técnica UASE-PMSS com derivatização em injetor.

Figura 16 – Pictograma obtido para avaliação da métrica analítica verde do preparo de amostra obtido pela ferramenta AGREEprep.



Fonte: elaborado pela autora.

A pontuação obtida para o preparo de amostra desenvolvida pela extração UASE-PMSS com derivatização em injetor foi de 0,56. Algumas limitações da técnica de preparo de amostra estão relacionados com o local do preparo de amostra, conduzido de forma *ex situ* neste trabalho, à falta de uma porcentagem significativa de materiais com capacidade de serem reutilizados, uma vez que a membrana porosa deve ser descartada após a extração, e, por fim, o uso de cromatografia gasosa e derivatização para análise dos analitos. Entretanto, cabe ressaltar que o preparo de amostra *ex situ* é característico de análise de compostos fenólicos em chá, além de que as membranas utilizadas possuem dimensões de somente 1,5 cm x 1,5 cm e, ainda, a derivatização contribuiu para integração do procedimento pela diminuição de etapas envolvidas no preparo de amostra, pontuando positivamente para o método.

Os destaques do preparo de amostra de acordo com o AGREEprep estão relacionados com a baixa quantidade de amostra, apenas 100 mg de amostra são necessários, baixo volume de solventes e resíduos gerados no procedimento. A frequência analítica da extração também pontuou de forma significativa, uma vez que, em banho ultrassônico, é possível realizar 18 extrações dentro do período de 1 hora.

5.5 COMPARAÇÃO COM OUTROS TRABALHOS

A técnica de extração UASE-PMSS traz como proposta um método de extração ambientalmente amigável para extração em fase sólida, com redução na quantidade de reagentes utilizadas e eliminação de etapa de dessorção, comum entre técnicas de extração em fase sólida.

Na Tabela 8 abaixo, consta uma comparação entre métodos utilizados para extração de compostos fenólicos em folhas de chá verde reportados nos últimos anos. Observa-se que os limites de detecção obtidos neste trabalho são próximos quando comparados com os das outras técnicas de extração, em faixas lineares em mesma ordem de grandeza.

Tabela 8: Aplicação de diferentes métodos na análise e detecção de compostos fenólicos em chá verde.

Método	Faixa linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	Referência
UASE-PMSS e GC/FID	0,5 – 10,0	0,01 – 0,50	Este trabalho
UAE e HPTLC	1,0 – 5,0	0,61 – 0,96	ASHRAF et al, 2023. ^[45]
μ-SPE e HPLC/DAD	2,0 – 200,0	0,09 – 0,23	YUAN et al, 2023. ^[46]
RP-HPLC/DAD	0,3 – 5,0	0,07 – 0,12	AZEVEDO et al, 2019. ^[47]

Fonte: elaborado pela autora.

Legenda: UASE-PMSS (Extração com Solvente Assistida por Ultrassom de Amostras Sólidas Empacotadas com Membrana Microporosa de Polipropileno); GC/FID (Cromatografia Gasosa com Detector por Ionização em Chama); UAE (Extração Assistida por Ultrassom); HPTLC (Cromatografia em Camada Delgada); μ-SPE (Extração em Fase Microsólida); HPLC/DAD (Cromatografia Líquida com Detecção por Arranjo de Diodo); RP-HPLC/DAD (Cromatografia Líquida de Fase Reversa com Detecção por Arranjo de Diodo).

6 CONCLUSÃO

O protocolo de extração desenvolvido através da técnica UASE-PMSS com derivatização em injetor apresentou resultados satisfatórios para extração e detecção de onze compostos fenólicos em folhas de chá verde. A membrana de polipropileno traz uma nova abordagem de extração em fase sólida através de uma técnica miniaturizada e sem o emprego de adsorventes. A UASE-PMSS apresenta como vantagens a redução no volume de solventes orgânicos e de amostra, de acordo com os princípios do Preparo Verde de Amostra. Além disso, a extração em banho ultrassônico contribui significativamente para a frequência analítica. Comparada com outras técnicas verdes de extração em fase sólida, a UASE-PMSS dispensa o uso de adsorventes, eliminando as etapas de adsorção e dessorção. Além disso, a derivatização em injetor permitiu a análise de compostos fenólicos por GC/FID de forma eficiente, com integração de etapas, aumento na frequência analítica do método e melhora de resposta analítica.

Por meio da otimização multivariada dos parâmetros de extração e derivatização, foi possível compreender o nível de influência das variáveis na resposta analítica e obter as condições ótimas para realização do procedimento. As curvas de calibração construídas para os 11 compostos fenólicos apresentaram boa linearidade e correlação, com os valores de R igual ou maior que 0,9650. Os limites de detecção variaram entre 0,01 mg L⁻¹ e 0,49 mg L⁻¹ e os limites de quantificação variaram entre 0,04 mg L⁻¹ e 1,48 mg L⁻¹. Por meio da ferramenta AGREEp^{rep}, o caráter ambientalmente amigável do preparo de amostra foi avaliado com nota 0,56.

As precisões intradia e interdia ficaram dentro da faixa aceitável pela AOAC para grande parte dos analitos. Contratempos envolvendo o cromatógrafo a gás utilizado neste trabalho impossibilitaram a realização do ensaio de recuperação, já que não foi possível concluir a causa da supressão do sinal analítico. Portanto, é proposta a continuação do desenvolvimento do método por novo ensaio de recuperação em diferente equipamento analítico.

Ademais, o desenvolvimento parcial do método analítico permitiu a avaliação da técnica UASE-PMSS e derivatização em injetor como nova abordagem de extração para compostos fenólicos em folhas de chá verde, através do preparo de amostra baseado nos princípios da Química Analítica Verde.

7 REFERÊNCIAS

1. CABRERA, C.; ARTACHO, R.; GIMÉNEZ, R. Beneficial Effects of Green Tea - A Review. **Journal of the American College of Nutrition**. v. 25, p. 79–99, 2006.
2. NISHIYAMA, M. F.; COSTA, M. A. F.; COSTA, A. M. et al. Chá verde brasileiro (*Camellia sinensis* var *assamica*): efeitos do tempo de infusão, acondicionamento da erva e forma de preparo sobre a eficiência de extração dos bioativos e sobre a estabilidade da bebida. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 30, p. 191-196, 2010.
3. CHAUDHARY, P.; MITRA, D.; MOHAPATRA, P. K. D. et al. *Camellia sinensis*: Insights on its molecular mechanisms of action towards nutraceutical, anticancer potential and other therapeutic applications. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 16, p. 1-24, 2023.
4. SILVA, A.; SILVA, V.; IGREJAS, G. et al. Phenolic compounds classification and their distribution in winemaking by-products. **European Food Research and Technology**. v. 249. p. 207-239, 2023.
5. TRUZZI, F.; TIBALDI, C.; ZHANG, Y. et al. An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (Bcs). **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 1-23, 2021.
6. LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**. v. 4, p. 118–26, 2010.
7. BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, p. 113-123, 2006.
8. WOJTUNIK-KULESZA, K.; ONISZCZUK, A.; ONISZCZUK, T. et al. Influence of in vitro digestion on composition, bioaccessibility and antioxidant activity of food polyphenols—a non-systematic review. **Nutrients**. v. 12, p. 1-28, 2020.
9. HE, G.; HOU, X.; HAN, M. et al. Discrimination and polyphenol compositions of green teas with seasonal variations based on UPLC-QTOF/MS combined with chemometrics. **Journal of Food Composition and Analysis**. v. 105, p. 1-7, 2022.
10. KOINA, I. M.; SARIGIANNIS, Y.; HAPESHI, E. Green Extraction Techniques for the Determination of Active Ingredients in Tea: Current State, Challenges, and Future Perspectives. **Separations**. v. 10, p. 1-25, 2023.

11. JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**. v. 2, p. 13-25, 2010.
12. PŁOTKA-WASYLKA, J.; SZCZEPAŃSKA, N.; DE LA GUARDIA, M. et al. Miniaturized solid-phase extraction techniques. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**. v. 73, p. 19-38, 2015.
13. ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**. v. 62 p. 2145-2148, 1990.
14. BASHEER, C.; ALNEDHARY, A. A.; RAO, B. S. M. et al. Development and application of porous membrane-protected carbon nanotube micro-solid-phase extraction combined with gas chromatography/mass spectrometry. **Analytical Chemistry**. v. 78, p. 2853-2858, 2006.
15. SAJID, M.; ALHOOSHANI, K. Ultrasound-assisted solvent extraction of organochlorine pesticides from porous membrane packed tea samples followed by GC–MS analysis. **Microchemical Journal**. v. 152, p. 1-8, 2020.
16. SAJID, M.; WOŹNIAK, M. K.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Ultrasound-assisted solvent extraction of porous membrane packed solid samples: A new approach for extraction of target analytes from solid samples. **Microchemical Journal**. v. 144, p. 117-123, 2019.
17. ROBLES, A. D.; FABJANOWICZ, M.; PLOTKA-WASYLKA, J. et al. Organic acids and polyphenols determination in polish wines by ultrasound-assisted solvent extraction of porous membrane-packed liquid samples. **Molecules**. v. 24, p. 1-20, 2019.
18. SZCZEPAŃSKA, N.; KUBICA, P.; PŁOTKA-WASYLKA, J. et al. Ultrasound assisted solvent extraction of porous membrane-packed samples followed by liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determination of BADGE, BFDGE and their derivatives in packed vegetables. **Science of the Total Environment**. v. 708, p. 1-10, 2020.
19. RÓŻAŃSKA, A.; BUNKOED, O.; PŁOTKA-WASYLKA, J. Development of a new green analytical methodology for the determination of phthalates in single-use babies diapers using ultrasound-assisted extraction and polypropylene porous membrane. **Microchemical Journal**. v. 193, p. 1-9, 2023.

20. ŞAHİN, S.; PEKEL, A. G.; TOPRAKÇI, İ. Sonication-assisted extraction of Hibiscus sabdariffa for the polyphenols recovery: application of a specially designed deep eutectic solvent. **Biomass Conversion and Biorefinery**. v. 12, p. 4959-4969, 2022.
21. POOLE, C. F. Sample preparation for planar chromatography. **Journal of Separation Science**. v. 2300071, p. 1-22, 2023.
22. PICÓ, Y. Ultrasound-assisted extraction for food and environmental samples. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**. v. 43, p. 84-99, 2013.
23. BOMMAKANTI, V.; PUTHENPARAMBIL-AJIKUMAR, A.; SIVI, C. M. et al. An Overview of Herbal Nutraceuticals, Their Extraction, Formulation, Therapeutic Effects and Potential Toxicity. **Separations**. v. 10, p. 1-28, 2023.
24. SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, J. F. **Fundamentos de Química Analítica**. 8th ed. São Paulo: Cengage Learning; 2009.
25. HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 8th ed. Rio de Janeiro: GEN; 2012.
26. FARAJZADEH, M. A.; NOURI, N.; KHORRAM, P. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trac - Trends in Analytical Chemistry**. v. 55, p. 14-23, 2014.
27. FERREIRA-FRIAS, C.; GRAMACHO, S. A.; PINEIRO, M. Cromatografia gasosa-espectrometria de massas e derivatização assistida por micro-ondas na identificação de isômeros de glicose: uma prática para o ensino avançado em análise e caracterização de compostos orgânicos gas chromatography-mass spectrometry and microwave-assisted derivatization for identification of glucose isomers: experience for post-graduate teaching of analysis and characterization of organic compounds. **Química Nova**, v. 37, p. 176-180, 2014.
28. DE ABREU-MOTA, M. A.; BARBOZA, C. A. M.; BÍCEGO, M. C. et al. Sedimentary biomarkers along a contamination gradient in a human-impacted sub-estuary in Southern Brazil: A multi-parameter approach based on spatial and seasonal variability. **Chemosphere**. v. 103, p. 156-163, 2014.
29. FOGUET-ROMERO, E.; SAMARRA, I.; GUIRRO, M. et al. Optimization of a GC-MS Injection-Port Derivatization Methodology to Enhance Metabolomics Analysis Throughput in Biological Samples. **Journal of Proteome Research**. v. 21, p. 2555-2565, 2022.

30. ORATA, F. Derivatization Reactions and Reagents for Gas Chromatography Analysis. In: Advanced Gas Chromatography. **Progress in Agricultural, Biomedical and Industrial Applications**. Intech. p. 83-100, 2012.
31. BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E.; OLIVEIRA, E. P. et al. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**. v. 76, p. 965-977, 2008.
32. SQUEO, G.; DE-ANGELIS, D.; LEARDI, R. et al. Background, applications and issues of the experimental designs for mixture in the food sector. **Foods**. V. 10, p. 1-30, 2021.
33. ZAPPI, A.; MARASSI, V.; GIORDANI, S. et al. Extracting Information and Enhancing the Quality of Separation Data: A Review on Chemometrics-Assisted Analysis of Volatile, Soluble and Colloidal Samples. **Chemosensors**. v. 11, p. 1-33, 2023.
34. GAŁUSZKA, A.; MIGASZEWSKI, Z.; NAMIEŚNIK, J. The 12 principles of Green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**. v. 50, p. 78-84, 2013.
35. LÓPEZ-LORENTE, A. I.; PENA-PEREIRA, F.; PEDERSEN-BJERGAARD, S. et al. The ten principles of Green sample preparation. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**. v. 148, p. 1-10, 2022.
36. WOJNOWSKI, K.; TOBISZEWSKI, M.; PENA-PEREIRA, F. et al. AGREEprep – Analytical greenness metric for sample preparation. **TrAC – Trends in Analytical Chemistry**. v. 149, p. 1-9, 2022.
37. ZANETTI, M. B. R.; HAAS, I. C. S.; PEREIRA-COELHO, M. et al. Valorization of biowastes from sustainable viticulture with bioactive potential: application in functional yogurt. **Journal of Food Science and Technology**. v. 59, p. 4673-4684, 2022.
38. RIBANI, M.; BEATRIZ, C.; BOTTOLI, G. et al. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**. v. 27, p. 771-780, 2004.
39. AOAC. Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**: Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. AOAC International: Mayland, 2016.
40. PUSCH, J. M. E. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de marcadores químicos de contaminação fecal em amostras de**

- sedimento**. 2016. 88 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016
41. CHANG, D. P. Y. Microwave Regeneration of Volatile Organic Compound (VOC) Adsorbents. **Journal of the Air & Waste Management Association**. v. 48, p. 1-13, 1998.
42. WOODALL, J.; AGÚNDEZ, M.; MARKWICK-KEMPER, A. J. et al. The UMIST database for astrochemistry 2006. **Astronomy & Astrophysics**. v. 466, p. 1197–204, 2007.
43. VARÍ, R.; D'Archivio, M.; FILESÍ, C. et al. Protocatechuic acid induces antioxidant/detoxifying enzyme expression through JNK-mediated Nrf2 activation in murine macrophages. **Journal of Nutritional Biochemistry**. v. 22, p. 409-417, 2011.
44. PINHO, G. P. Efeito de matriz na quantificação de agrotóxicos por cromatografia gasosa. **Química Nova**. v. 32, p. 987-995, 2009.
45. ASHRAF, G. J.; DAS, P.; SAHU, R. et al. Impact of ultrasound-assisted extraction of polyphenols and caffeine from green tea leaves using high-performance thin-layer chromatography. **Biomedical Chromatography**. v. 37, p. 1-10, 2023.
46. YUAN, M.; ZHONG, C.; ROW, K. H. et al. Hydrophilic molecularly imprinted chitosan microspheres based on deep eutectic solvents for micro-solid phase extraction of catechin. **Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies**. v. 46, p. 48-55, 2023.
47. AZEVEDO, R. S. A.; TEIXEIRA, B. S.; SAUTHIER, M. C. S. et al. Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food Chemistry**. v. 273, p. 39-44, 2019.