



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES E RESVERATROL EM VINHO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE FLUXO TURBULENTO-LC-MS**

TESE DE DOUTORADO

Michele Antoniuk Presta

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES E RESVERATROL EM VINHO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE FLUXO TURBULENTO-LC-MS**

por

Michele Antoniuk Presta

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de
Concentração em Química Analítica da Universidade Federal de Santa Maria
(UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de

DOUTOR EM QUÍMICA

Orientador: Prof. Renato Zanella

Santa Maria, RS, Brasil

2008

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Naturais e Exatas
Programa de Pós-Graduação em Química**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES E RESVERATROL EM VINHO
EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE FLUXO TURBULENTO-LC-MS**

elaborada por

Michele Antoniuk Presta

como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutor em Química**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Prof. Dr. Renato Zanella (Orientador-UFSM)

Prof. Dr. Hubertus Irth (Co-orientador) (Free University Amsterdam, Holanda)

Dr. Johannes Gerardus Krabbe (Isala klinieken, Holanda)

Prof^a. Dr^a. Carla Beatriz Grespan Bottoli (UNICAMP)

Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime (UFSM)

Santa Maria, 10 de março de 2008

*“Se não acreditas no poder da própria vontade,
observa um barco em movimento.
Não é o vento que lhe assegura a direção
e sim o critério do remador.”*

(Chico Xavier)

Aos meus pais **Tania** e **Rodolfo**, que foram desde sempre meus maiores mestres, meus eternos amores e maiores exemplos. Que por acreditar nos meus ideais e me incentivar a alcançá-los, demonstram sua infinita capacidade de me amar

Aos meus queridos irmãos, **Andréia**, **Adriana**, **Gustavo** e **Sara**, meus eternos amigos, por todo o incentivo, apoio e carinho e às minhas queridas sobrinhas **Heloisa**, **Isabela** e **Ana**, meus amores, pela alegre torcida de cada dia

À todos vocês, que em muitos momentos acreditaram mais em mim do que eu mesma, que sustentaram comigo cada minuto de dificuldade, dedico este trabalho e todo o meu amor!

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Renato Zanella, agradeço a oportunidade de participar deste grupo de pesquisa, pela orientação, apoio, incentivo durante os preparativos e a realização do projeto de doutorado. Obrigada pela amizade!

À Prof^a. Dr^a. Martha Bohrer Adaime por todo carinho, amizade, atenção, cada palavra de apoio e incentivo e pela participação e sugestões no exame de qualificação e defesa da tese.

Ao Prof. Dr. Ademir Morel pela participação e valiosas sugestões no exame de qualificação. Obrigada pela atenção.

À Prof^a. Dr^a. Carla Beatriz Grespan Bottoli pela sua participação e pelas valiosas sugestões e questionamentos no exame de qualificação e da defesa de tese, que muito contribuíram para o trabalho. Obrigada pelo carinho e incentivo.

Aos membros da banca examinadora da defesa de tese Prof. Dr. Hubertus Irth e Dr. Johannes Krabbe pela orientação na execução deste trabalho, pelas constantes discussões, sugestões e por ter vindo de tão longe para contribuir para a finalização deste trabalho.

Aos amigos que fiz na Vrije Universiteit Amsterdam (Holanda), especialmente aos Professores Doutores Hubertus Irth, Wilfried Niessen, Henk Lingeman, René Vreuls por me receber no seu grupo de trabalho, me orientando durante a execução deste trabalho. Obrigada pelo carinho, a hospitalidade e exemplo de profissionalismo.

Ao querido amigo e colega Ben Bruyneel, por toda ajuda e parceria. Obrigada por todo o esforço, incentivo, dedicação e palavras de carinho sem os quais não teríamos este trabalho.

As queridas amigas Lygia, Kim e Linda pelo “plantão”, ajudando na correção do trabalho até vésperas da defesa. Obrigada pela amizade, incentivo e por todos os momentos que passamos juntas na VU.

Às minhas amigas Daiane, Diana, Cláudia e Cristine. Cada uma de vocês contribuiu para que este trabalho fosse concretizado. Mesmo distantes, sempre estiveram presentes. Muito obrigada por tudo!! Desejo a todas nós muito sucesso!

Dai, obrigada pelo ombro amigo, por me emprestar a “tia” Bea, por tornar cada obstáculo mais leve e mais divertido! Obrigada pela amizade verdadeira! Clau, obrigada pela preocupação, pela companhia e pelos momentos de descontração. As

amigas Daniele, Juliane e Carine obrigada por estarem presentes na realização deste sonho!! Vocês sempre estarão guardadas no meu coração. Contem sempre comigo!

Aos colegas do LARP, que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho, especialmente à Michele pela troca de informações sobre TFC, Sandra, Juliana e Guilherme pelo, incentivo, sugestões e contribuições para a conclusão deste trabalho. À Márcia e a Sandra Botega por toda ajuda, boa vontade e atenção.

Aos funcionários da UFSM, principalmente ao Ademir e a Valéria, por me receber com tanta simpatia e atenção e com suas palavras de incentivo e coragem. Obrigada pelo carinho. À pró-reitoria de pós-graduação por todo empenho e ajuda na implementação da bolsa desde o início até o final da mesma.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Aos meus pais, Rodolfo e Tania, que me propiciaram a oportunidade de estudar, agradeço por todo apoio, incentivo, compreensão e amor. Aos meus queridos irmãos que sempre torceram por mim, Andréia, Adriana, Gustavo e Sara. Suas palavras, carinho, amor, paciência e ombro amigo ajudaram a consolidar mais um sonho. Vocês tornaram cada obstáculo mais leve com muita alegria e diversão. À vocês, não tenho palavras para descrever toda a minha gratidão e o quanto me orgulho de tê-los como minha família! AMO VOCÊS!

Gu, obrigada pelo lindo *template* que você criou para a minha apresentação!

As minhas queridas sobrinhas Heloisa, Isabela e Ana. Por encherem minha vida de alegria!! pelos momentos divertidos, pelos abraços apertados e beijos carinhosos!! e aos meus cunhados Felipe (meu dentista de plantão) e Luis Carlos pela alegre torcida e pelos momentos de descontração.

Aos queridos Daniel, Solange e Vó Ilse, muito obrigada pelo incentivo desde o início do doutorado. Obrigada por me acolher, apoiar e participar da realização de mais um sonho!

À todos amigos e parentes pela amizade e incentivo. Cada um de vocês sabe o quanto contribuiu para que mais um sonho fosse concretizado.

À Deus, pela oportunidade a mim concedida de viver, aprender e conviver com pessoas tão especiais!

Acknowledgements

A large part of my PhD I did abroad, in the group of Prof. Dr. Hubertus Irth at the Vrije Universiteit Amsterdam, in the department of Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (ACAS). I had the opportunity and pleasure to learn from well known and respected people in the field of analytical chemistry.

Hubertus (Hubi) thank you very much for accepting me in your group and for your supervision, which did not stop at the border.

The same I can say to Dr. Henk Lingeman who had a major part in getting the project on the right track. Without you “Henky” this work was not going to be as good as it is now, and I was not able to learn so many different things in such a short time! This was a great opportunity to my country as well, since this is the first work with this technique. Thank you!!

Prof. Dr. Wilfried Niessen, you helped me a lot in the MS part and I enjoyed every single discussion we had, about science and everything else.

One of the most important persons for this project was Ben Bruyneel. Ben, (Bennnnnyyyy) thank you for all the help you gave me! Without you it would have been extremely difficult to get where I am now in such short time! I think we learned a lot from each other and “that is what friends are for...”

Dr. René Vreuls, thank you for introducing me to the ACAS group and helping me to come to Holland again.

Of course I also need to say thanks to my “roommates”, Kim, Linda, Lygia, Leonor and Ana who were great colleagues and sweet friends, helping me even until the day before my defence. Girls, it was a big pleasure (and still is) having you as friends, colleagues, roommates and party organizers...thank you for all good moments and for supporting me in the bad moments!

Of course I would also like to thank my other colleagues and friends at ACAS who helped me in their own way, Marek (bastardinho!!), Lawrence, Ferry, Filipe, Jon, Ansgar, Niels, Niels, Mark, Jeroen. Guys, thank you for all that you did for me!

A special thanks also to Dik Kamminga, who taught me so many things about GC, Giselé who was always there to help me with all administrative and housing 'challenges'; and of course to the other ACAS members, especially Freek and Nel with whom I learned so many things. Thank you!

I also want to thank Verônica, for taking care of me, being there all the time with sweet words!! Your smile and friendship are unforgettable!

Finally, last but not least, Hans!! You know how much we did together to have this project and work done! All discussions together with Ben, Henk, Wilfried and Hubi...your free time dedicated to help me with this! Thank you for teaching me so many things about science and life! Thank you for everything!!!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei;
Não fosse por elas, eu não teria saído do lugar.
As facilidades nos impedem de caminhar.
Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

(Chico Xavier)

RESUMO

Tese de doutorado

Programa de Pós-Graduação em Química

Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

DETERMINAÇÃO DE FLAVONÓIDES E RESVERATROL EM VINHO EMPREGANDO CROMATOGRAFIA DE FLUXO TURBULENTO-LC-MS

Autora: Michele Antoniuk Presta

Orientador: Prof. Dr. Renato Zanella

Santa Maria, 10 de março de 2008

O vinho é conhecido por suas propriedades bioquímicas benéficas como antioxidante, anticarcinogênico e antiinflamatório. Muitas destas propriedades podem ser atribuídas aos flavonóides e ao resveratrol. No vinho encontra-se uma grande quantidade de interferentes, como proteínas e lipídios, que dificultam a análise de flavonóides. Cromatografia de Fluxo Turbulento (TFC, do inglês *Turbulent Flow Chromatography*) acoplada *on-line* ao LC-MS foi utilizado para analisar flavonóides e resveratrol presentes em diferentes tipos de vinho. O preparo das amostras é baseado na remoção de compostos com alta massa molar de compostos de baixa massa molar utilizando TFC. Após o preparo das amostras a coluna de TFC é colocada *on-line* com o LC-MS e um gradiente é iniciado para realizar a eluição dos compostos retidos nos poros da fase estacionária da coluna de TFC e a separação dos mesmos no sistema LC-MS. O procedimento provou ser rápido, não laborioso, robusto e sensível. A aplicação do método foi realizada com diferentes amostras de vinho tinto, branco e rosé. A precisão interdia e intradia para todos os vinhos e concentrações estudadas foram < 12 % e < 18%, respectivamente. O método provou ser linear para todos os compostos e matrizes estudadas no intervalo de 0,05 a 2 mg L⁻¹ ($r^2 > 0,99$). O resveratrol também mostrou linearidade ($r^2 > 0,99$) quando utilizou-se intervalo de concentração maior (1 a 50 mg L⁻¹). O LOD obtido para os compostos em vinho tinto foi de 0,004 a 0,022 mg L⁻¹, em vinho branco de 0,002 a 0,021 mg L⁻¹ e em vinho rosé de 0,003 a 0,034 mg L⁻¹. A quantificação do resveratrol foi possível utilizando-se curva de adição padrão. O vinho tinto apresentou maiores concentrações de resveratrol (4 mg L⁻¹), quando comparado com os vinhos branco e rosé, que foram cerca de 12 vezes menores. Além disso as diferentes amostras de vinho tinto apresentaram diferentes concentrações de resveratrol. O procedimento desenvolvido pode ser uma poderosa ferramenta no estudo de outros analitos em matrizes complexas, como por exemplo compostos de interesse em alimentos, bebidas e amostras biológicas.

Palavras chave: TFC, LC-MS, flavonóides, resveratrol, vinho

ABSTRACT

Doctoral thesis in Chemistry
Programa de Pós-Graduação em Química
Universidade Federal de Santa Maria, Brazil

DETERMINATION OF FLAVONOIDS AND RESVERATROL IN WINE USING TURBULENT FLOW CHROMATOGRAPHY-LC-MS

Author: Michele Antoniuk Presta

Promoter: Prof. Dr. Renato Zanella

Date and Place: 10 March 2008, Santa Maria

Wine is known for its favorable biochemical properties such as antioxidant, anticarcinogenic and anti-inflammatory properties. Many of these properties can be assigned to flavonoids and resveratrol. Wine is known to contain high amounts of interferences, such as proteins and lipids complicating analysis of flavonoids and other compounds of interest. Turbulent Flow Chromatography (TFC) on-line coupled to Liquid Chromatography Mass Spectrometry (LC-MS) was used to analyze flavonoids present in different types of wines. The TFC sample pretreatment is based on the fast removal of high molecular weight compounds and the removal of low molecular weight polar interferences. After the sample pretreatment, the TFC column is on-line coupled to LC-MS and a gradient is started to elute the trapped compounds and separate these in the LC-MS. The method proved to be fast, non-laborious, robust and sensitive. The feasibility of the method was tested on several red, white and rosé wines. Interday and intraday precision for all wines and concentrations were calculated to be $< 12\%$ and $< 18\%$, respectively. The method proved to be linear for all investigated compounds and matrices in the range of 0.05 to 2 mg L⁻¹ ($r^2 > 0.99$). Moreover resveratrol showed also linearity ($r^2 > 0.99$) in higher range (1 to 50 mg L⁻¹). The LOD for the compounds in red wine ranged from 0.004 to 0.022 mg L⁻¹, in white wine ranged from 0.002 to 0.021 mg L⁻¹ and in rosé wine ranged from 0.003 to 0.034 mg L⁻¹. Quantitation of resveratrol was possible using standard addition procedure, since resveratrol was present in the sample. Red wine showed a higher amount of resveratrol (4 mg L⁻¹), compared to rosé and white wine which was 10-fold lower. Moreover, the different red wines contained also different amounts of resveratrol. The presented method may be an useful tool to study other analytes in difficult matrices, such as compounds of interest in food, drinks and biological samples.

Keywords: TFC, LC-MS, flavonoids, resveratrol, wine

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1. Estratégias para determinação de flavonóides em plantas, fluidos biológicos, bebidas e alimentos (adaptado de RIJKE *et al.*, 2006).....8
- FIGURA 2. Representação dos fluxos laminar (1) e turbulento (2) em uma coluna15 cromatográfica15
- FIGURA 3. Esquema demonstrando que os grandes espaços intersticiais entre as partículas da coluna e a alta velocidade linear da fase móvel criam turbulência dentro da coluna.....17
- FIGURA 4. Ilustração da separação por tamanho dentro de uma coluna de TFC; a) diferença na difusão das moléculas e b) por partição e por diferença de tamanho17
- FIGURA 5. Esquema do método que utiliza duas colunas: (a) amostragem e *clean-up* da coluna; (b) eluição da amostra da coluna de TFC, coluna analítica e MS (adaptado de HERMAN, 2006).....19
- FIGURA 6. a) ESI, os íons já devem estar presentes na solução antes de serem introduzidos no MS; b) APCI, os íons serão formados após a introdução com o auxílio da corona de descarga31
- FIGURA 7. a) esquema do espectrômetro de massas com suas principais partes e b) a ampliação do APCI probe com as principais partes que compõe o mesmo (adaptado do software e manual do equipamento LCQ deca, Thermo Fisher Scientific).....32
- FIGURA 8. Representação gráfica entre os métodos de calibração: adição padrão, superposição de matriz, padronização externa (RIBANI *et al.*, 2004)38
- FIGURA 9. Representação demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ ...39

- FIGURA 10. Cromatograma obtido no estudo do volume de *breakthrough*. **(a)** sinal dos compostos presentes na coluna de TFC (etapa de limpeza), **(b)** troca da válvula comutadora gera uma queda do sinal, **(c)** substância em estudo entra em contato com a coluna de TFC e após 41 min começa a ser eluída e **(d)** cromatograma com o tempo total de análise52
- FIGURA 11. Sistema completo de TFC-LC-MS equipado com 1) sistema ASPEC para introdução da amostra, 2) sistema de HPLC para limpeza e carregamento da amostra pela coluna de TFC, 3) sistema de HPLC para o carregamento das amostras da coluna de TFC para a coluna de fase reversa e 4) MS para a identificação e quantificação dos princípios ativos em estudo53
- FIGURA 12. A) Introdução da amostra no sistema de injeção para o preenchimento da alça de amostragem. 1) amostra, 2) sistema ASPEC, 3) alça de amostragem e 4) resíduo.....54
- FIGURA 13. B) Etapa de transferência da amostra contida na alça de amostragem e limpeza da coluna de TFC. 5) Bomba de HPLC, 3) alça de amostragem, 6) coluna de TFC e 7) resíduo55
- FIGURA 14. C) Eluição dos compostos retidos na coluna de TFC para a coluna analítica. 8) bomba de HPLC, 6) coluna de TFC, 9) coluna de C18 e 10) MS.....56
- FIGURA 15. Cromatograma obtido após injeção de solvente (etanol:água, 1:9, v/v) para verificar se o mesmo apresentava contaminação nos tempos de retenção dos compostos em estudo64
- FIGURA 16. Cromatograma de íon total da amostra de vinho tinto, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 65
- FIGURA 17. Cromatograma de íon total da amostra de vinho branco, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ 66

- FIGURA 18. Cromatograma de íon total da amostra de vinho rosé, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$ 67
- FIGURA 19. Cromatograma para vinho tinto no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 4.5)68
- FIGURA 20. Cromatograma para vinho branco no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 4.5)68
- FIGURA 21. Cromatograma para vinho rosé no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 4.5).69
- FIGURA 22. Espectro de massas (MS/MS) da solução padrão de hesperetina (5 mg L^{-1}) para verificação da presença ou não de interferente na amostra no mesmo tempo de retenção e mesma massa molar (intervalo de isolamento de $1,5 m/z$, com energia de fragmentação de 35% ($1,75 \text{ V}$)).....70
- FIGURA 23. Cromatogramas: *Full MS* e *MS/MS* para a massa 301,15, obtidos injetando-se amostra de vinho tinto não fortificada para confirmação da hesperetina na matriz a ser utilizada como branco da amostra.....71
- FIGURA 24. Espectro de massas do pico obtido realizando-se *MS/MS* no intervalo de massa m/z 301. O composto apresenta o tempo retenção de 21,25 min e os fragmentos obtidos podem ser comparados com os fragmentos do padrão de hesperetina (Figura 19)72
- FIGURA 25. Cromatograma de íon total da amostra de vinho tinto fortificado com a solução padrão de hesperetina (100 mg L^{-1} e PI 50 mg L^{-1}); o segundo cromatograma é o obtido para o íon m/z 179 (específico

para a substância desconhecida) e o íon m/z 242,1 (íon específico da hesperetina).....	73
FIGURA 26. Espectro de massas da injeção em fluxo do padrão de <i>trans</i> -resveratrol para a verificação dos fragmentos do mesmo	74
FIGURA 27. Análise de vinho tinto utilizando todo o sistema de análise (TFC-LC-MS) sem adição do padrão resveratrol. Verifica-se o cromatograma de íon total, <i>Full MS</i> e <i>MS/MS</i>	74
FIGURA 28. Espectro de massas (<i>MS/MS</i>) do composto no tempo de retenção 14,07 min para ser comparado com o espectro de massas do padrão de resveratrol (Figura 26).....	76
FIGURA 29. Espectro de massas (<i>MS/MS</i>) do composto no tempo de retenção 16,8 min para comparação com o espectro de massas do padrão de resveratrol (Figura 26)	76
FIGURA 30. Espectro de massas (<i>MS/MS</i>) do composto no tempo de retenção 28,5 min para comparação com o espectro de massas do padrão resveratrol (Figura 26)	77
FIGURA 31. Espectro de massas (<i>MS/MS</i>) do composto no tempo de retenção 35,07 min para comparação com o espectro de massas do padrão resveratrol (Figura 26)	78
FIGURA 32. Cromatograma com a solução de <i>trans</i> -resveratrol e padrão interno (50 mg L^{-1}), preparada e armazenada sem contato com luz UV, injetados na coluna analítica	79
FIGURA 33. Cromatograma com solução de <i>trans</i> -resveratrol e padrão interno (50 mg L^{-1}), preparada e armazenada sem contato com luz UV, injetada na coluna analítica	80

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Exemplos de aplicações dos métodos de extração soxhlet, LLE e SE para análise de flavonóides	10
TABELA 2. Princípios ativos utilizados e respectivas informações: fornecedores, classificação, massa molar e grau de pureza.....	46
TABELA 3. Volumes adicionados (μL) das soluções de trabalho 10 e 100 mg L^{-1} dos princípios ativos e padrão interno (100 mg L^{-1}) em 100 mL de amostra de vinho	47
TABELA 4. Volumes adicionados (μL) da solução de trabalho de concentração 100 mg L^{-1} do princípio ativo resveratrol e padrão interno em 100 mL de amostra de vinho para obter curvas analíticas com altas concentrações	48
TABELA 5. Tabela contendo os gradientes testados para a eluição dos compostos retidos nos poros das partículas C18 da coluna de TFC.....	49
TABELA 6. Dados das amostras reais utilizadas após a validação do procedimento desenvolvido para a avaliação do mesmo	59
TABELA 7. Valores dos volumes de <i>breakthrough</i> calculados utilizando-se o tempo de <i>breakthrough</i> , a vazão de 1 mL min^{-1} e o volume morto, para as diferentes concentrações de princípios ativos e etanol avaliados	62
TABELA 8. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho tinto, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS	81

TABELA 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho branco, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS.....	82
TABELA 10. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho rosé, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS.....	82
TABELA 11. Resultados cromatográficos de LOD e LOQ em $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de vinhos tinto, branco e rosé estudadas.....	83
TABELA 12. Resultados de precisão interdia (em termos de repetitividade, RSD%) para as matrizes de vinho tinto, branco e rosé contendo a mistura dos compostos em estudo e PI. Condições conforme item 5.5.....	84
TABELA 13. Resultados da precisão intradia (em termos de precisão intermediária, RSD%) para as matrizes de vinho tinto, branco e rosé contendo a mistura dos compostos em estudo e padrão interno. Condições conforme item 5.5.....	85
TABELA 14. Resultados encontrados empregando procedimento <i>on-line</i> desenvolvido em 8 amostras de vinho.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
- APCI – Ionização Química a Pressão Atmosférica, do inglês *Atmospheric Pressure chemical Ionization*
- AU – Unidade arbitrária, do inglês *Arbitrary Unity*
- a – Coeficiente angular
- b – Coeficiente linear
- C8 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C8, octilsilano
- C18 – Sílica modificada com hidrocarboneto linear C18, octadecilsilano
- CE-ED – Eletroforese Capilar com Detector Eletroquímico, do inglês *Electrophoresis Capillary - Electrochemical Detector*
- D – diâmetro do tubo
- d.i. – Diâmetro interno da coluna cromatográfica
- dp – Diâmetro médio das partículas
- ϵ – Porosidade externa
- ECD – Detector por Captura de Elétrons, do inglês *Electron-Capture Detector*
- ED – Detector Eletroquímico, do inglês *Electrochemical Detector*
- EE – Etinilestradiol (do inglês *ethinylestradiol*)
- ESI – Ionização por Eletrospray, do inglês *ElectroSpray ionization*
- EtOH – Etanol
- EtOAc – Acetato de Etila
- Et₂O – Éter dietílico
- FAO – *Food and Agriculture Organization of The United Nations*
- FID – Detector por Ionização em Chama, do inglês *Flame Ionization Detector*

FLU – Fluorescência

FM – Fase móvel

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

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography*

ICH – *International Conference on Harmonization*

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normatização e Qualidade Industrial

IS – Padrão interno, do inglês *Internal Standard*

ITD – Detector de Aprisionamento de Íons, do inglês *Ion Trap Detector*

IT-MS – Espectrometria de Massas com Aprisionamento de Íons, do inglês *Ion Trap-Mass Spectrometry*

IUPAC – *International Union of Pure and Applied Chemistry*

LARP – Laboratório de Análises de Resíduos de Pesticidas

LC-DAD – Cromatografia a Líquido com Detecção por Arranjo de Diodos, do inglês *Liquid Chromatography Diode Array Detection*

LC-ED – Cromatografia a Líquido com Detecção Eletroquímica, do inglês *Liquid Chromatography Electrochemical Detection*

LC-ESI(+)-MS – Cromatografia a Líquido com Detecção por Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray no modo positivo, do inglês *Liquid Chromatography Electrospray Ionization (positive mode) Mass Spectrometry*

LC-MS – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography – Mass Spectrometry*

LC-UV – Cromatógrafo a Líquido com Detecção por Ultravioleta

LC-UV-MS – Cromatografia a Líquido com Detecção por Ultravioleta e Espectrometria de Massas, do inglês *Liquid Chromatography Ultraviolet Mass Spectrometry*

LLE – Extração Líquido-Líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*

LOD – Limite de Detecção, do inglês *Limit of Detection*

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *Limit of Quantification*

MeOH – Metanol

MeCN – Acetonitrila

Me₂CO – Acetona

MSPD – Dispersão da Matriz em Fase Sólida, do inglês *Matrix Solid Phase Dispersion*

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

N – Número de medidas

Nº CAS – do inglês *Number of Chemical Abstracts Service*

NI – Modo de ionização negativo, do inglês *Negative Ionization*

PI – Modo de ionização positivo, do inglês *Positive Ionization*

ρ – Densidade do fluido

Q-MS – Analisador de massas quadrupolo, do inglês *Quadrupole Mass Spectrometry*

QTOF – Quadrupolo e tempo de voo (do inglês, *quadrupole - time-of-flight*)

QqQ-MS – Analisador de Massas triplo quadrupolo (do inglês, *triple quadrupole mass spectrometry*)

r^2 – Coeficiente de determinação

Re – Número de Reynolds

Re' – Número de Reynolds para colunas recheadas

RSD – Desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation*

S – Estimativa do desvio padrão absoluto

SE – Extração utilizando Solvente, do inglês *Solvent Extraction*

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

SPME – Microextração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*

SRM – *Single Reaction Monitoring*

TFC – Cromatografia de Fluxo Turbulento, do inglês *Turbulent Flow Chromatography*

TLC – Cromatografia em Camada Delgada, do inglês *Thin Layer Chromatography*

TMS – Trimetilsililéter (do inglês *trimethylsilylether*)

TOF-MS – Analisador de massas por tempo de voo, do inglês *Time-Of-Flight Mass Spectrometry*

TQ – Analisador de Massas triplo quadrupolo (do inglês, *Triple Quadrupole Mass Spectrometry*)

UV – Ultravioleta

μ – Viscosidade do fluido

V – Velocidade do fluido

X_m – Inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada flavonóide, preparadas no extrato da matriz

X_s – Inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada flavonóide, preparadas em metanol (solvente)

X_1 – Média para valores individuais

X_m – Média das medidas em replicatas

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICES.....	102
APÊNDICE A. Tabela contendo o programa utilizado para controlar os eventos para o procedimento desenvolvido (automação do sistema)	103
APÊNDICE B. Foto do sistema utilizado no desenvolvimento deste trabalho e esquema das válvulas 1 e 2 para a visualização das mesmas	104
APÊNDICE C. Foto do sistema ASPEC, utilizado no desenvolvimento deste trabalho contendo: seringa de 10 mL, frasco com 100 mL de amostra, alça de amostragem de 10 mL e válvula 1	105

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Histórico.....	3
2.2 A importância do vinho na economia e na saúde.....	4
2.3 Flavonóides e Resveratrol.....	5
2.3.1 Flavonóides.....	5
2.3.2 Resveratrol.....	6
2.4 Técnicas de preparo de amostras para determinação de flavonóides	7
2.4.1 Extração em fase sólida.....	12
2.4.2 Dispersão da matriz em fase sólida	13
2.4.3 Microextração em fase sólida.....	14
2.4.4 Cromatografia por fluxo turbulento.....	15
2.4.4.1 Princípios básicos da Cromatografia por fluxo turbulento.....	15
2.4.4.2 Método que utiliza uma única coluna cromatográfica	18
2.4.4.3 Método que utiliza duas colunas cromatográficas	18
2.4.4.4 Concentração isocrática dos analitos	19
2.4.4.5 Concentração <i>on-line</i> da amostra.....	20
2.5 Propriedades dos flavonóides, resveratrol e padrões internos em estudo	21
2.5.1 Biochanina A	21
2.5.2 Genisteína.....	22
2.5.3 Daidzeína	23

2.5.4 Hesperetina.....	24
2.5.5 Naringenina.....	24
2.5.6 Resveratrol.....	25
2.5.7 Padrões internos	26
2.5.7.1 Etinilestradiol	26
2.5.7.2 Estradiol.....	27
2.6 Separação e quantificação de flavonóides	28
2.6.1 Cromatografia Gasosa	28
2.6.2 Cromatografia a Líquido.....	29
2.6.2.1 LC-MS.....	30
2.7 Volume de <i>Breakthrough</i>	34
2.8 Efeito Matriz	35
2.9 Validação de métodos.....	35
2.9.1 Curva analítica	36
2.9.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	39
2.9.3 Precisão	40
2.9.4 Exatidão	41
3 OBJETIVOS	43
3.1 Objetivo geral	43
3.2 Objetivos específicos.....	43
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Instrumentação e materiais	44
4.2 Solventes e gases	45
4.3 Princípios ativos selecionados	45
4.4 Seleção do padrão interno.....	46
4.5 Preparo das soluções analíticas	47
4.6 Parâmetros de otimização do sistema LC-MS	48
4.6.1. Gradiente para a eluição e separação dos compostos na coluna de fase reversa.....	48

4.6.2. Avaliação dos modos de ionização e demais condições do espectrômetro de massas	50
4.7 Volume de <i>breakthrough</i> para a coluna de TFC	51
4.8 Etapa de preparo de amostra empregando TFC	53
4.9 Análise dos solventes (“branco dos solventes”)	56
4.10 Avaliação das amostras para o uso como “branco”	54
4.11 Avaliação do Efeito Matriz.....	57
4.12 Validação do procedimento	58
4.12.1 Curva analítica	58
4.12.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	58
4.12.3 Precisão do método	59
4.13 Aplicação do procedimento desenvolvido.....	59
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	60
5.1 Escolha do modo de ionização e demais condições para o Espectrômetro de Massas	60
5.2 Seleção do padrão interno.....	60
5.3 Gradiente otimizado para a eluição e a separação dos compostos na coluna de fase reversa	61
5.4 Avaliação do volume de <i>breakthrough</i> para a coluna de TFC.....	61
5.5 Avaliação da etapa de preparo de amostras empregando TFC.....	62
5.6 Avaliação do branco dos solventes e das amostras para o uso como “branco”	63
5.6.1 Testes para a confirmação da substância presente no tempo de retenção da hesperetina	69
5.6.2 Testes para a confirmação das substâncias presentes nos tempos de retenção do resveratrol.....	73
5.6.2.1 Testes para a verificação dos tempos de retenção do <i>cis</i> e <i>trans</i> -resveratrol.....	78
5.7 Validação do procedimento analítico desenvolvido.....	80
5.7.1 Curva analítica	80
5.7.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação	83
5.7.3 Precisão do método	84

5.8 Aplicação do procedimento desenvolvido.....	86
6 CONCLUSÕES	87
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	89
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	90
APÊNDICES.....	102

1 INTRODUÇÃO

O vinho possui uma longa história que remonta pelo menos há aproximadamente 6000 a.C. (KOPP, 1998). É apreciado em diversas partes do mundo sendo uma bebida alcoólica produzida pela fermentação do sumo da uva. A constituição química das uvas permite que estas fermentem sem que lhes sejam adicionados açúcares, ácidos, enzimas ou outros nutrientes. Na produção do vinho, os compostos presentes na uva são transferidos para o mosto e o vinho.

O consumo do vinho tem crescido nos últimos anos devido a pesquisas científicas que apontam os benefícios desta bebida na saúde humana. Estes estudos demonstram que o vinho auxilia por exemplo, no tratamento de doenças cardiovasculares e no acúmulo de colesterol, tem comprovada ação bactericida e antiviral, retarda o envelhecimento celular. Estas propriedades são atribuídas aos compostos polifenólicos presentes no vinho, destacando-se os flavonóides e resveratrol (FLAMINI, 2003).

Os flavonóides e o resveratrol são polifenóis de baixa massa molar encontrados em diversas plantas. Agem como fitoalexinas protegendo as plantas contra o estresse causado por ataque de pragas, patógenos e radiação UV. São encontrados em várias frutas e vegetais, assim como em alimentos processados (BRONNER & BEECHER, 1995). São responsáveis pelas características sensoriais e de coloração (FANG, 2007a). Tanto a indústria como pesquisadores e consumidores têm demonstrado grande interesse nestes compostos pelo seu potencial na prevenção de doenças cardiovasculares e suas propriedades antioxidantes. Alguns pesquisadores sugerem que o resveratrol é a substância responsável pelo chamado “paradoxo francês” (KOPP, 1998; LANGE, 2006).

Nas duas últimas décadas, vários procedimentos analíticos para a análise e quantificação de compostos polifenólicos em plantas, produtos derivados de plantas e matrizes biológicas têm sido estudados (WU *et al.*, 2004).

Devido ao processamento de plantas e frutas para produção de alimentos e bebidas a concentração de flavonóides e resveratrol presentes podem ser afetados

e/ou perdidos, resultando em menor quantidade nos alimentos processados (FANG, 2007b). Os alimentos possuem outros constituintes como açúcares, proteínas e pigmentos que estão presentes em altas concentrações. Alguns flavonóides que estão originalmente presentes em baixas concentrações nas plantas podem ter sua análise dificultada em virtude da interferência destes compostos. Desta forma faz-se necessário o uso de *clean-up* (ou purificação) e pré-tratamento das amostras bem como uma boa técnica de detecção.

Dependendo da matriz e dos compostos interferentes diferentes tipos de pré-tratamento das amostras pode ser aplicado, como a extração em fase sólida (SVEDSTRÖM, 2006), extração líquido-líquido (TEIXEIRA & COSTA, 2005), a dispersão da matriz em fase sólida (XIAO *et al.*, 2004) e microextração em fase sólida (SATTERFIEL *et al.*, 2001). Em geral estas etapas de preparo das amostras são laboriosas e demoradas. Depois desta etapa, um sistema analítico é necessário para realizar a separação e posterior quantificação das substâncias, podendo ser cromatografia gasosa (DENG & ZITO, 2003), eletroforese capilar (WU *et al.*, 2007) e cromatografia a líquido (EI-SHAFAE & EI-DOMIATY 2001), sendo esta a mais aplicada.

Uma técnica que combina *clean-up* e concentração dos analitos têm sido estudada nos últimos anos. A cromatografia de fluxo turbulento tem sido freqüentemente empregada para *clean-up on-line* de fluidos biológicos (FAIRHURST *et al.*, 2004). O fenômeno responsável pela melhora da eficiência do *clean-up* e a rapidez das análises se dá pelo fluxo turbulento formado pelas altas vazões em combinação com o tamanho das partículas tendo-se um aumento na transferência de massa durante o processo (MULLET, 2007).

Devido às baixas concentrações de flavonóides e resveratrol no vinho e a grande quantidade de interferentes na matriz, este estudo objetivou o desenvolvimento e validação de um procedimento *on-line* de *clean-up* e concentração de cinco flavonóides e resveratrol presentes em vinho tinto, branco e rosé, empregando TFC-LC-MS.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Histórico

A cultura da uva tem um grande valor, não apenas por ter a maior produção mundial de horticultura mas também por trazer conexões históricas com o desenvolvimento da humanidade. O produto principal, vinho (do grego antigo *οἶνος*, do latim *vīnum*), foi considerado pelos povos antigos a bebida dos deuses. Dionysus e Bacchus foram deuses dedicados a esta bebida (THIS *et al.*, 2006)

A história científica do vinho inicia muito antes do que a primeira citação da Bíblia (Gênesis, capítulo IX, versículo 20-29), datando de 7400 e 7000 a.C. tendo como evidência química uma jarra encontrada na região chamada de Fajji Firuz Tepe, onde atualmente é o Iran (THIS *et al.*, 2006).

Entre 5400 a 5000 a.C. o vinho se espalhou da região Caucasiana Sul para a Palestina, Síria, Egito e Mesopotâmia (LANGE, 2006). O cultivo de uvas teve início na China e Japão em 3200 a.C. (THIS *et al.*, 2006).

Muitas das principais regiões viticultoras da Europa Ocidental atual foram estabelecidas pelo romanos. A tecnologia de produção do vinho melhorou consideravelmente durante o império romano. Na época já eram conhecidas diferentes qualidades de uvas e de técnicas de cultivo e foram criados os barris para o transporte e armazenamento do mesmo (PHILLIPS, 2000).

Depois da queda do Império Romano a produção de vinho diminuiu. Durante os tempos de crise, a produção de vinho se manteve principalmente devido aos esforços de mosteiros cristãos, que em virtude disto, desenvolveram os melhores parrerais na Europa. No período medieval, o vinho foi considerado importante na dieta diária, em virtude da falta de fontes de água potável. Séculos mais tarde a produção de vinho “deparou-se” com a descoberta de fontes de água, e desta forma o vinho deixou de ser um alimento de primeira necessidade (LANGE, 2006).

A vinificação moderna iniciou com as descobertas de Louis Pasteur no século XIX. A partir de suas descobertas no campo da microbiologia o cientista transformou a ecologia em uma ciência que até hoje é muito estudada (KOPP, 1998).

2.2 A importância do vinho na economia e na saúde

O cultivo da videira e a elaboração de vinhos constituem uma realidade em regiões onde não se imaginava o cultivo dos mesmos. O vinho foi, desde séculos atrás, um enigma por se acreditar que este se tratava de um produto ligado a divindades e só acessível aos poderosos, ou seja, àqueles que estavam “próximos” dos deuses. Com a introdução da uva e do vinho na Europa pelos romanos, o vinho tornou-se um produto embora nobre, comercial (DAVID *et al.*, 2007).

Em 2006 os maiores produtores mundiais de vinho eram: França, Itália, Espanha, Estados Unidos da América, Argentina, China, Austrália, África do Sul, Alemanha, Chile, Portugal, Romênia, Rússia, Hungria e Grécia (FAO, 2008). O Brasil tem investido na produção e desenvolvimento de uvas para a produção de vinhos. A área de vinhedos no Brasil em 2004, segundo IBGE, foi de 70.531 hectares. O Rio Grande do Sul, principal produtor, possui área de 40.351 hectares, ou seja, 57,21% da área total de produção no país (EMBRAPA, 2005).

A produção mundial de vinho vem sendo influenciada pela repercussão de seminários e simpósios científicos nas áreas de medicina, toxicologia de alimentos e saúde humana. Em particular, os efeitos benéficos do consumo moderado de vinho na prevenção de algumas doenças, como por exemplo doenças cardiovasculares, degeneração de células cerebrais causadas pelo envelhecimento e alguns tipos de cânceres, vem sendo discutidos (FLAMINI, 2003).

Como consequência, países produtores de uvas e vinhos aumentam seus esforços para melhorar a qualidade do produto, bem como aumentar a produção. Devido a esta concorrência, pesquisadores e institutos de controle de qualidade se dedicam a desenvolver novos métodos para a verificação da origem do produto, a verificação de adulteração (como por exemplo a adição de açúcares, etanol ou água), a proteção da saúde do consumidor com relação a contaminantes (metais pesados, toxinas e pesticidas) e o estudo do metabolismo e doenças da planta (FLAMINI, 2003).

O efeito do vinho sobre a saúde humana tem sido objeto de numerosos estudos. Estudos na área médica já realizadas ou ainda em desenvolvimento, permitem atribuir ao vinho de boa qualidade, evidentes propriedades de medicina preventiva. O vinho auxilia no tratamento de doenças cardiovasculares e no acúmulo de colesterol, tem comprovada ação bactericida e antiviral, facilita a digestão e retarda o envelhecimento celular, por exemplo.

A descoberta e compreensão do chamado “Paradoxo Francês” foi fundamental para acelerar as pesquisas sobre os benefícios que os componentes do vinho podem trazer à saúde humana. Apesar de terem as mesmas taxas de colesterol que os americanos, a taxa de mortalidade dos franceses em doenças cardiovasculares, correspondem a um terço da mesma taxa observada nos Estados Unidos. Segundo especialistas, a causa desta aparente contradição é muito simples: o hábito francês de desfrutar algumas taças de vinho às refeições (KOPP, 1998; LANGE, 2006).

Os vinhos de forma geral são constituídos de água, álcoois, açúcares, ácidos orgânicos, proteínas e seus produtos de constituição, polifenóis, pigmentos, sais e vitaminas. Cada uma destas classes que compõem o vinho é composta por dezenas ou as vezes, centenas de substâncias químicas. Os compostos polifenólicos em especial flavonóides e resveratrol, tem ocorrência também em chás, frutas e várias plantas medicinais têm sido apontados como os responsáveis por vários benefícios a saúde humana (DAVID *et al.*, 2007).

2.3 Flavonóides e resveratrol

2.3.1 Flavonóides

Flavonóides são um dos maiores grupos de metabólitos secundários em plantas e são bastante importantes por defender e sinalizar compostos na reprodução, patogênese e simbiose destas (MAXWELL & PHILIPS, 1990).

Em plantas, os flavonóides agem como fitoalexinas (substâncias formadas pelo tecido hospedeiro em resposta a um estímulo fisiológico, agente infeccioso ou seus produtos), contra o estresse, como por exemplo causado por elevada radiação UV-B (ZAND *et al.*, 2002; OLSSON *et al.*, 1998; REUBER *et al.*, 1996), infecção por

microorganismos (MIDDLETON & TERAMURA, 1993) ou ataque herbívoro (WANG *et al.*, 1998). Por essa razão, a concentração de flavonóides aumenta em condições de estresse. Possuem propriedades antifúngicas, anti-bacterianas, anti-oxidantes, etc., que aumentam a sobrevivência das plantas (SCHUSTER, 2007). Os flavonóides estão também envolvidos na produção de nódulos em raízes de plantas leguminosas como sistema de fixação de nitrogênio após infecção por bactéria *Rhizobium*. São fontes de pigmentos para coloração de flores e apresentam importante papel na interação com insetos (BIGGS & LANE, 1978). Também afetam a saúde humana e animal por estarem presentes na dieta diária (alimentos) apresentando ação anti-oxidante (RICE-EVANS *et al.*, 1997) ou ação hormonal (MIKSICEK, 1993) e ampla variedade de atividades anti-microbiana e farmacológica.

Estes fenóis mostram vários efeitos biológicos e fisiológicos e podem servir como marcadores quimiotaxonômicos, para a classificação de plantas baseado na presença e concentração de componentes químicos específicos.

Os flavonóides mostram atividades anti-oxidantes que interferem com sistemas produtores de radicais livres e agem como capturadores destes. São usados na prevenção de câncer, arteriosclerose e doenças coronárias.

As melhores fontes de flavonóides na dieta ocidental são cebola, chás e vinho enquanto que no oriente são alimentos à base de soja (NIESSEN, 2006; HERMAN, 2006).

Os flavonóides estão presentes em plantas como agliconas, flavonóides O-glicosídeos, flavonóides C-glicosídeos e/ou flavonóides O,C-glicosídeos. Foram reportados na natureza 1500 diferentes flavonóides agliconas e mais de 6500 flavonóides (NIESSEN, 2006).

2.3.2 Resveratrol

O resveratrol e seus derivados são compostos fenólicos naturais encontrados em várias plantas. A presença destes estilbenos em uvas e seus subprodutos, tem sido alvo de estudo por duas razões principais. Primeiro, estes compostos agem como fitoalexinas nas plantas, sendo sintetizados em resposta a situações de estresse, doenças nas plantas, infecções microbianas ou radiação ultravioleta. Segundo, estudos demonstram que estes compostos são benéficos a

saúde humana devido às suas propriedades anti-inflamatórias, anti-oxidantes, anti-tumoral, efeitos cardio e neuro-protetores. Por ser um composto fenólico, tem demonstrado a modulação do metabolismo de lipídios e inibição da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (DOMÍNGUEZ *et al.*, 2001; KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ *et al.*, 2004; MONTSKO *et al.*, 2007).

O resveratrol existe nas formas isômeras *cis* e *trans*, ambos ocorrendo naturalmente assim como seus respectivos glicosídeos. *In vitro*, a forma *trans* é mais termo e foto-estável enquanto que a forma *cis* é bastante instável, isomerizando facilmente à forma *trans*. Soluções padrões de *trans*-resveratrol também mostram foto-isomerização e quando estas soluções são expostas a luz natural, a proporção dos estereoisômeros muda, uma vez que a quantidade de *cis*-resveratrol aumenta (KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ *et al.*, 2004). A mesma reação acontece quando a substância é exposta a luz ultravioleta. Quanto maior a quantidade de irradiação, maior a concentração de *cis*-resveratrol que será formada. Segundo TRELA & WATERHOUSE (1996), depois de aproximadamente 2 horas, a proporção de *cis*-resveratrol na solução atinge o seu máximo, e segundo KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ *et al.* (2004) o equilíbrio entre *trans* e *cis*-resveratrol foi atingido depois de 5 horas de exposição à luz UV (luz natural).

As técnicas de vinificação, especialmente quando se determina o tempo e temperatura de fermentação, o tempo de contato com a casca, a força do fermento (bactéria) utilizado, o envelhecimento em barril e o uso de processos de clarificação do vinho podem influenciar na quantidade de resveratrol no vinho (GOLDBERG *et al.*, 1995).

2.4 Técnicas de preparo de amostras para determinação de flavonóides

Vários métodos de tratamento de amostras têm sido desenvolvidos para determinação de flavonóides em vários tipos de amostras. Existem três principais tipos de matrizes contendo flavonóides: plantas, alimentos e amostras líquidas como fluidos biológicos e bebidas (Figura 1).

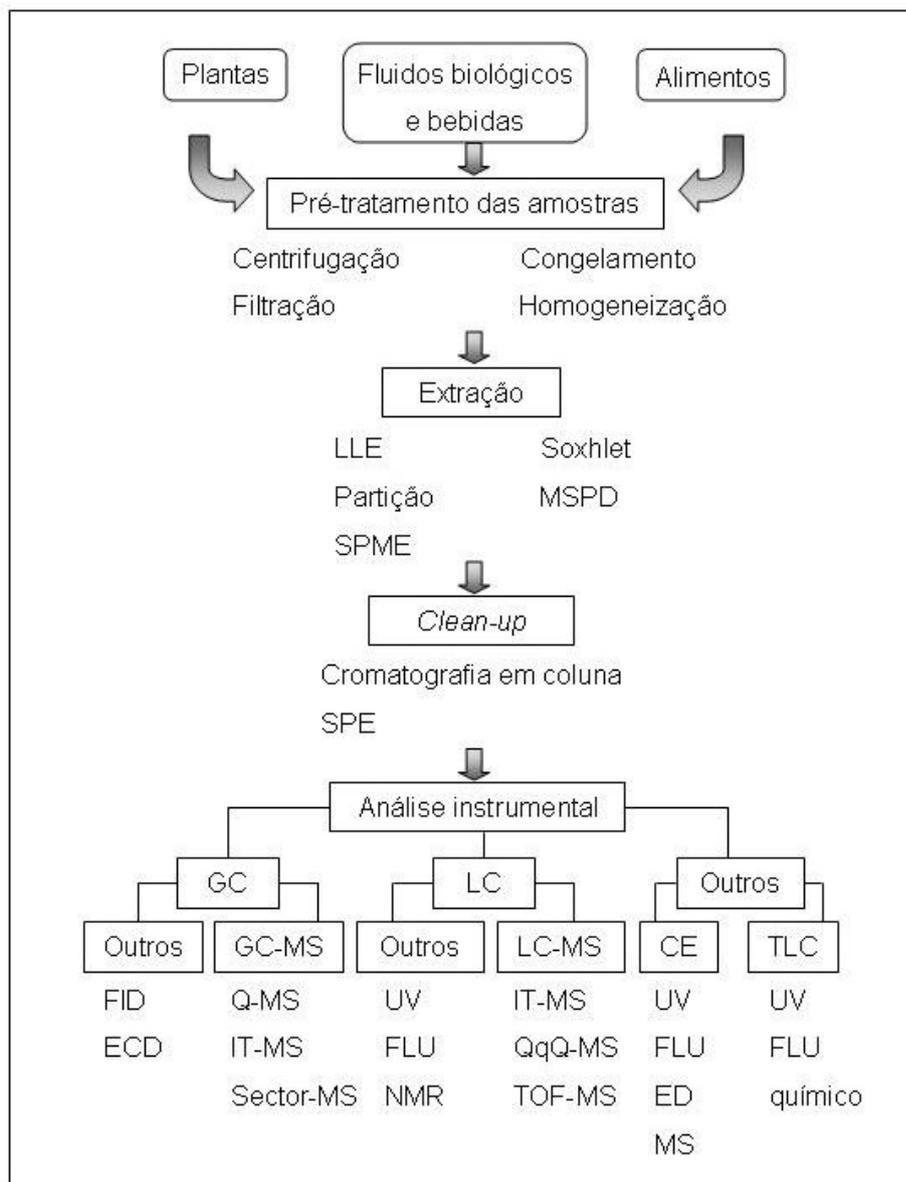


Figura 1. Estratégias para determinação de flavonóides em plantas, fluidos biológicos, bebidas e alimentos (adaptado de RIJKE *et al.*, 2006)

As amostras sólidas são geralmente homogeneizadas e, para tal algumas vezes as amostras são primeiramente congeladas. O próximo passo é o isolamento do analito e para isto extração utilizando solvente (SE, do inglês *solvent extraction*) é ainda uma das técnicas mais utilizadas, principalmente pela facilidade do uso e da vasta aplicabilidade. A extração por soxhlet é usada menos freqüentemente para isolar flavonóides de matrizes sólidas. Para ambos (SE e Soxhlet), na maioria dos casos, metanol e acetonitrila são utilizados como solventes de extração. As amostras líquidas são filtradas e/ou centrifugadas, diretamente injetadas no sistema de separação, ou mais frequentemente os analitos são primeiramente isolados

utilizando extração líquido-líquido (LLE, do inglês *Liquid-Liquid Extraction*) ou extração em fase sólida (SPE, do inglês *Solid Phase Extraction*). O solvente mais utilizado na técnica de LLE é o acetato de etila ou éter dietílico contendo uma pequena quantidade de ácido. Este método é geralmente utilizado para extração de agliconas enquanto que outros métodos extraem agliconas e conjugados. A Tabela 1 apresenta alguns exemplos dos procedimentos citados para a extração de flavonóides (RIJKE *et al.*, 2006).

O preparo de amostra utilizando SPE, dispersão da matriz em fase sólida (MSPD, do inglês *Matrix Solid-Phase Dispersion*) e microextração em fase sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro-Extraction*) merecem maior atenção. Embora SPE não seja uma técnica nova, apenas recentemente foi utilizada na análise de flavonóides (RIJKE *et al.*, 2006).

Além disso, comparadas com métodos de extração tradicionais, as técnicas citadas acima podem ser facilmente automatizadas. Além da alta seletividade, da redução de custos e do tempo de análise, sistemas hifenados também reduzem perdas de amostras e minimizam problemas de contaminação (VISSER *et al.*, 2003).

Diferentes combinações de métodos de extração para o preparo de amostras *on-line* são possíveis, sendo que a combinação SPE-LC é a mais utilizada, devido a sua simplicidade e versatilidade (VISSER *et al.*, 2003).

Tabela 1. Exemplos de aplicações dos métodos de extração soxhlet, LLE e SE para análise de flavonóides

Analitos	Solventes	Amostra	Detalhes	Análise	Referência
Soxhlet					
Vários flavonóides	MeOH	<i>Mentha spicata</i> , <i>Tilia europea</i> , <i>Urtica dioica</i> , <i>Hypericum perforatum</i>	12 h de extração com metanol, evaporado e redissolvido em tampão fosfato:metanol 8:2 (v/v).	GC-MS	FIAMENGOS <i>et al.</i> , 2004
Daidzeína, genisteína	MeOH:H ₂ O (9:1, v/v)	Leite de soja, carne, farinha	1 h de extração utilizando programa de temperatura	LC-ED	KLEJDUS <i>et al.</i> , 2004
LLE	Et ₂ O	Vinho	pH do vinho ajustado a 2; 5 mL de amostra extraída com 5 mL de éter dietílico por 20 min; fase orgânica separada e evaporada, redissolvido em metanol:água (1:1, v/v), filtrada e injetada	LC-UV e FLU	RODRÍGUEZ-DELGADO <i>et al.</i> , 2001
Quercetina, kaempferol, <i>Trans-resveratrol</i>	0,1 mol L ⁻¹ HCl (pH=2)				
Flavanonas	Et ₂ O, 0,1 mol L ⁻¹ HCl (pH=2)	<i>Maclura pomifera</i> Raf., Moraceae	Dissolução do extrato seco em metanol:água (1:1, v/v) melhora a eficiência da separação	LC-DAD	TEIXEIRA & COSTA, 2005

SE

Epicatequina, catequina, rutina, apigenina, luteolina, quercetina	MeOH	Folhas de <i>Ginkgo biloba</i>	Folhas secas sonicadas com 5 mL de metanol por 30 min	CE-ED	CAO <i>et al.</i> , 2002
Isoflavona e flavonol glicosídeo-(di)malonato	MeOH:H ₂ O (1:1, v/v)	<i>Trifolium pratense</i> , <i>Trifolium Dobem</i> , <i>Trifolium repens</i> , <i>Lotus corniculatus</i>	Folhas secas maceradas com metanol:H ₂ O, filtradas e extraídas novamente; extratos combinados	LC-UV-MS e FLU	RIJKE <i>et al.</i> , 2004
Daidzina, glicitina, genistina, daidzeína, gliciteína, genisteína	MeCN:H ₂ O (1:1, v/v)	Alimento a base de soja	Hidrólise evitada para determinação de malonatos e acetatos	LC-MS	GRIFFITH & COLLISON, 2001
Catequina, epicatequina, procianidina, antocianinas, diidrochalconas, flavonols	Me ₂ O:H ₂ O (7:3, v/v)	Maçã	Com extração utilizando a mistura acetona:água obteve-se extratos estáveis pela desnaturação da enzima polifenol oxidase	LC-UV e LC-MS	VRHOVSEK <i>et al.</i> , 2004

Abreviações: MeCN: acetonitrila, EtOAc: acetato de etila, Et₂O: éter dietílico, MeOH: metanol, EtOH: etanol, Me₂CO: acetona

;

2.4.1 Extração em fase sólida

Sorventes à base de sílica ligados a grupos alquil e copolímeros são amplamente utilizados na extração e enriquecimento de analitos presentes em amostras aquosas e extratos de amostras em análise ambiental, farmacêutica e biomédica. O uso na análise de flavonóides é relativamente novo. Na maioria dos casos, a fase estacionária utilizada é C18 (octadecil) e as amostras e solventes envolvidos na análise devem ser ligeiramente acidificados, para prevenir a ionização dos flavonóides o que pode reduzir a retenção na fase estacionária. Pode ser mostrado, como exemplo, a purificação de extratos metanólicos de azeitonas desenvolvido por VINHA *et al.* (2004). Após a extração com solvente o extrato foi evaporado, redissolvido em água contendo ácido clorídrico (pH 2) e percolado no cartucho de C18. Após esta etapa, foi utilizado hexano para remover lipídios presentes na amostra (etapa de limpeza) e metanol para extrair os flavonóides. A identificação de onze compostos fenólicos, incluindo flavonóide-(di)glicosídeos em 29 diferentes tipos de azeitonas foi realizada utilizando LC-ESI(+)-MS (Cromatógrafo a Líquido com Espectrômetro de Massas utilizando *electrospray* no modo de ionização negativo, do inglês *Liquid Chromatography Electrospray Ionization Positive mode Mass Spectrometry*).

KLEJDUS *et al.* (2001) analisaram flavonóides em extrato de *Trifolium pratense* (trevo vermelho, do inglês *red clover*). O extrato metanólico foi extraído utilizando SPE e as frações foram coletadas e transferidas para um segundo cartucho de SPE. Foram testados, o pH e a composição da fase móvel e três diferentes sorventes. As condições ótimas de extração foram obtidas utilizando cartuchos de C18, a utilização da mistura metanol:água (35:65, v/v) contendo 2% de ácido acético para limpeza do cartucho e eluindo com a mistura metanol:água (contendo 2% de hidróxido de amônio), sendo que a proporção de metanol foi sendo aumentada de 0 a 90% durante a eluição. Em uma segunda etapa, para completar a extração dos analitos, o mesmo cartucho foi novamente eluído com a mistura metanol:água (8:2, v/v) e 2% e hidróxido de amônio. Para a identificação de 49 flavonóides foi utilizado LC-ESI(+)-MS.

2.4.2 Dispersão da Matriz em Fase Sólida

A dispersão da matriz em fase sólida (MSPD) permite a extração de analitos de amostras homogêneas dispersas em um suporte sólido, usualmente sílica ligada a grupos C18 ou C8. Desta forma, a extração e limpeza da amostra acontecem simultaneamente com, geralmente, boas recuperações e precisão. MSPD é freqüentemente utilizada para determinação de pesticidas em frutas, vegetais, bebidas e alimentos (FERNÁNDEZ *et al.*, 2000; KRISTENSON *et al.*, 2001; TADEO & SCHANCES-BRUNETE, 2003), mas a aplicação na determinação de flavonóides foi reportada recentemente (XIAO *et al.*, 2004; RIJKE *et al.*, 2004).

XIAO *et al.* (2004) compararam MSPD, soxhlet e ultra-som como métodos de extração da isoflavona aglicona e de glicosídeos em *Radix astragali* (raiz seca da planta *Astragalus membranaceus*) que é amplamente utilizada na medicina chinesa. Para MSPD foi utilizado como fase sólida C18 e a eluição foi realizada com a mistura metanol:água (9:1, v/v). Para as agliconas, a MSPD mostrou melhor eficiência como método de extração (83% de recuperação de formononetina), mas para os glicosídeos, o soxhlet apresentou os melhores resultados. Entretanto, a extração com soxhlet utiliza maior volume de solvente e maior tempo de análise. A extração com ultra-som não apresentou bons resultados.

TEIXEIRA & COSTA (2005) estudaram flavonóides e xantonas em raízes da árvore *Maclura pomifera*. SE, MSPD utilizando C18 e areia do mar foram utilizados na extração. Para SE, 150 mg de raiz seca foram imersos em diclorometano ou metanol:água (9:1, v/v). Para MSPD, 150 mg de raiz foram misturados com 600 mg de sorvente C18 ou areia do mar e 2 mL de hexano, recheados em um cartucho e eluídos com diclorometano ou com metanol:água (9:1, v/v). Os melhores resultados foram obtidos utilizando MSPD com areia do mar, seguido de MSPD com C18 e por último SE. É importante ressaltar que os autores não fornecem informações sobre a areia do mar, mas espera-se ter propriedades adsorventes por apresentarem melhores resultados que quando utilizado C18.

2.4.3 Microextração em Fase Sólida

A fase estacionária na microextração em fase sólida (SPME) é constituída de uma fibra de sílica recoberta com poliacrilato ou polidimetilsiloxano (PDMS) ou polidivinilbenzeno como fase estacionária. É utilizada para a extração direta de amostras líquidas ou gasosas ou na forma de *headspace* quando a fibra é exposta acima da amostra líquida. Assim como para SPE, o procedimento pode afetar consideravelmente o enriquecimento do analito em análise. A SPME é uma técnica direta e o consumo de solvente é menor que em SPE. Por outro lado, por se tratar de um método onde ocorre equilíbrio entre o analito e a fibra, as recuperações podem ser baixas e o tempo de extração podem chegar a 60 min. A SPME é geralmente combinada com análise por cromatografia a gás para compostos orgânicos voláteis ou semi-voláteis de matrizes ambientais, biológicas e alimentos (KATAOKA *et al.*, 2000). A SPME também tem sido acoplada diretamente ao cromatógrafo a líquido para análises de compostos não-voláteis ou polares (RIJKE *et al.*, 2006).

SATTERFIEL *et al.* (2001) utilizaram SPME para extração de genisteína e daidzeína de urina humana combinado com análise por LC-ESI(+)-MS. A fibra que apresentou melhores resultados foi a recoberta com carbowax moldada com poli(divinilbenzeno). A extração utilizando esta fibra foi de 5 min em pH 4,0 e sob temperatura de 35 °C. Os valores de LOD foram de 25 e 3 ng mL⁻¹ para daidzeína e genisteína, respectivamente. Concentrações de 16 µg L⁻¹ foram detectadas em urina 3 h após consumo de 35 g de proteína de soja para ambos analitos.

Para melhorar a robustez do procedimento utilizando SPME, MITANI *et al.* (2004) utilizaram uma coluna tubular aberta de sílica fundida ao invés de uma fibra (método convencional). Os autores determinaram daidzeína e genisteína em alimentos a base de soja utilizando método *on-line in-tube* (em tubo) SPME-LC-DAD-UV. O uso de análise *in-tube* permite a automação e usualmente apresenta melhor performance que métodos manuais. As recuperações dos analitos de alimentos fortificados e extraídos foram acima de 97%. Comparando os resultados com o estudo anterior (SATTERFIEL *et al.*, 2001), os LODs apresentam valores 50 vezes mais baixo, apresentando menor detectabilidade (0,5 ng mL⁻¹).

2.4.4 Cromatografia de Fluxo Turbulento

2.4.4.1 Princípios básicos da Cromatografia de Fluxo Turbulento

Osbourne Reynolds foi o primeiro a descrever o fluxo de um líquido através de um tubo no final do século 19. Em fluxo laminar (tipicamente utilizado em HPLC) as partículas de um fluido se movem em linha reta percorrendo caminhos paralelos. A fricção na superfície do tubo faz com que o fluido, próximo as paredes do tubo, tenha menor vazão se comparado com o centro do mesmo. O resultado é uma distribuição parabólica determinada pela viscosidade do fluido. No fluxo turbulento, as partículas do fluido se movem em todas as direções. Neste caso, a distribuição da velocidade é mais uniforme pelo tubo. A Figura 2 ilustra as diferentes dinâmicas de fluxo entre o fluxo laminar e turbulento (HERMAN, 2006).

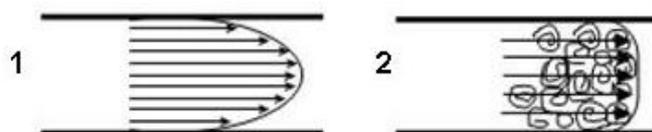


Figura 2. Representação dos fluxos laminar (1) e turbulento (2) em uma coluna cromatográfica

O número de Reynolds (Re) é uma constante adimensional que determina o tipo de fluxo presente no tubo:

$$Re = \frac{VD\rho}{\mu} \quad (1)$$

onde:

- V é a velocidade do fluido;
- D o diâmetro do tubo;
- ρ a densidade do fluido;
- μ a viscosidade do fluido.

Fluxo laminar existe quando o número de Re é menor que 2000 e fluxo turbulento quando Re é maior que 2000.

Como as colunas cromatográficas são recheadas com partículas, não é possível medir o diâmetro de todos os caminhos do fluido. O diâmetro médio das

partículas (d_p) pode ser determinado e os espaços entre as partículas é proporcional a média de tamanho das partículas. O número de Re para colunas recheadas Re' é determinado por:

$$Re' = \frac{Vd_p\rho}{\mu\varepsilon} \quad (2)$$

onde ε é a porosidade externa.

De acordo com a equação 2, a turbulência ocorre mais prontamente em colunas recheadas com partículas grandes do que as recheadas com partículas de tamanho menor.

Colunas recheadas com partículas grandes mantém uma maior quantidade de fase móvel se comparadas com as colunas recheadas com partículas de tamanho pequeno. Isto ocorre porque os espaços entre as partículas são proporcionais à média de tamanho das partículas. Desta forma, as condições de fluxo turbulento são mais fáceis de se obter em colunas recheadas com partículas grandes (Figura 3) (HERMAN, 2006).

STERNENBERG & POULSON, em 1963, foram os primeiros a descrever a cromatografia de fluxo turbulento (TFC). Apesar do entendimento teórico desta técnica datar dos anos 1960, somente no final dos anos de 1990, o uso prático para TFC foi explorado. Os pesquisadores Quin e Takarewski foram os primeiros a aplicá-la no processamento rápido de pequenas moléculas em matrizes compostas por moléculas grandes. Quinn postulou que diferente dos sistemas tradicionais de HPLC com vazão laminar, onde a interação entre a fase estacionária e os analitos ocorre por difusão controlada, na vazão turbulenta a transferência de massa é o principal mecanismo de separação (HERMAN, 2006).

Uma vez que a difusibilidade de uma molécula é inversamente proporcional a sua massa molar, pequenas moléculas tem alta difusibilidade e entram nos poros de uma coluna sob condições de fluxo turbulento. Moléculas grandes como proteínas, tem baixa difusibilidade e não tem tempo de entrar nos poros sob condições de fluxo turbulento. Como resultados, moléculas grandes são expulsas pelo fluxo turbulento enquanto as moléculas pequenas entram dentro dos poros da fase estacionária (DU *et al.*, 2005; FAIRHURST *et al.*, 2004; MULLET, 2007; HERMAN, 2006; XU *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2005).

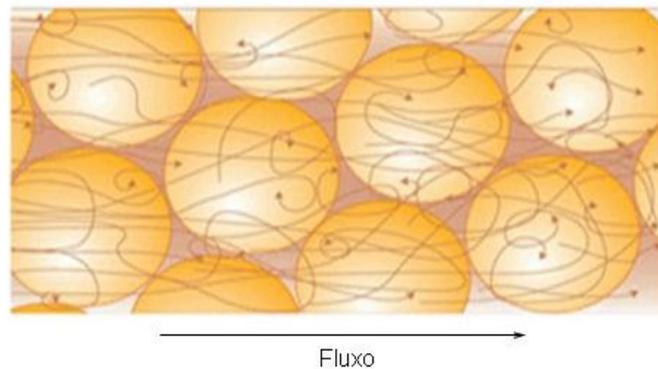


Figura 3. Esquema demonstrando que os grandes espaços intersticiais entre as partículas da coluna e a alta velocidade linear da fase móvel criam turbulência dentro da coluna

A vazão turbulenta também carrega os componentes menos retidos na fase estacionária, como sais e açúcares. Os analitos de interesse são eluídos após o *clean-up* inicial. A primeira separação analítica é por tamanho e a segunda, é por partição entre a fase móvel e a fase estacionária. Porém, somente as moléculas que difundem dentro dos poros da fase estacionária interagem com esta. Este processo bidimensional faz da TFC um método muito eficiente para limpeza de matrizes biológicas (Figura 4) (MULLET, 2007; HERMAN, 2006).

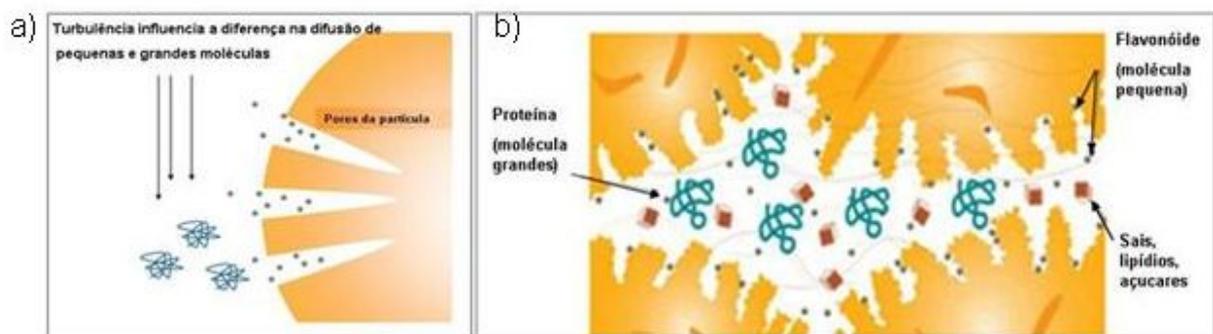


Figura 4. Ilustração da separação por tamanho dentro de uma coluna de TFC; a) diferença na difusão das moléculas e b) por partição e por diferença de tamanho

Esta separação rápida de pequenas e grandes moléculas por TFC, facilita a extração de uma grande quantidade de analitos, tais como medicamentos e seus metabólitos em várias amostras biológicas, como plasma, bile e urina (Figura 4) (FAIRHURST *et al.*, 2004).

2.4.4.2 Método que utiliza uma coluna cromatográfica

Estes métodos utilizam apenas uma coluna de fluxo turbulento para a limpeza da amostra e para a separação cromatográfica. As amostras são injetadas no sistema de fluxo turbulento a altas vazões (3 a 5 mL min⁻¹) de fase móvel 100% aquosa. As moléculas grandes são excluídas dos poros da fase estacionária e descartadas para resíduo, enquanto as moléculas pequenas difundem para dentro dos poros da fase estacionária e são retidas. Uma vez que os analitos de interesse (moléculas pequenas) são separados das moléculas grandes da amostra, eles são eluídos com uma fase móvel orgânica. Tipicamente, uma válvula direcional é usada de modo que o passo da eluição da amostra ocorra com uma vazão no sentido inverso (*backflush*) do que foi usado para limpeza da amostra.

Apesar da simplicidade e rapidez do método, as altas vazões de fase móvel, necessárias para alcançar as condições de turbulência, são incompatíveis com a capacidade do espectrômetro de massas, detector muito usado neste tipo de técnica. Portanto, a vazão de fase móvel em HPLC deve ser dividida para tornar-se compatível com o sistema de detecção. Geralmente, esta divisão reduz a sensibilidade do sistema e produz grandes quantidades de resíduos de fase móvel. Além disto, fases estacionárias utilizadas em colunas de fluxo turbulento, possuem menor valor de pratos teóricos que colunas recheadas com materiais utilizados em colunas tradicionais, uma vez que as colunas de TFC possuem maior tamanho de partículas. Como resultado têm-se um alargamento do pico cromatográfico, o que pode ser considerada uma desvantagem deste método (HERMAN, 2006).

Neste método a separação ocorre durante a limpeza da amostra. Pequenas moléculas são separadas da matriz biológica e eluídas em uma única parcela sem o uso de adicional coluna analítica (HERMAN, 2005; MULLET, 2007; HERMAN, 2006).

2.4.4.3 Método que utiliza duas colunas cromatográficas

A maioria dos exemplos de TFC emprega o uso de uma segunda coluna cromatográfica comumente utilizada em HPLC tradicional. A coluna analítica pode

ser usada com vazões compatíveis com o MS e também para promover a separação cromatográfica com picos mais definidos (Figura 5).

Este procedimento requer uma válvula e uma bomba adicional para controlar a separação final por HPLC. A amostra é injetada na coluna de fluxo turbulento sob altas vazões de fase móvel. Com isso, os analitos de interesse ficam retidos na coluna, enquanto as macromoléculas são descartadas como resíduos. Em seguida, os analitos retidos são eluídos para dentro da coluna analítica. As características da coluna determinam a forma do pico e a separação dos analitos. Os cromatogramas são baseados nos parâmetros convencionais de HPLC. A amostra é concentrada no início da coluna analítica até que as condições da fase móvel se tornem adequadas o suficiente para eluí-los. Após a eluição dos analitos desejados, a coluna de extração é lavada com um solvente adequado para remover os componentes da amostra. Solventes apropriados são bombeados através da coluna de extração e da coluna analítica para preparar o sistema para a próxima injeção. Deve-se tomar cuidado para permitir uma limpeza completa e um equilíbrio com a fase móvel aquosa antes de injetar a amostra para prevenir a precipitação de proteínas dentro do sistema (FAIRHURST *et al.*, 2004; HERMAN 2005; ZHOU *et al.*, 2005).

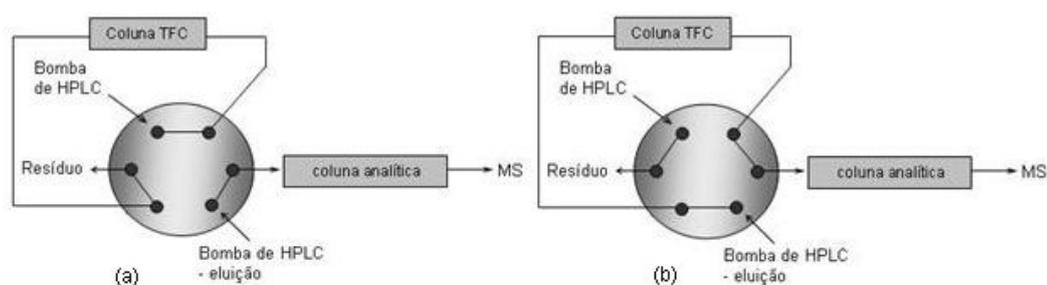


Figura 5. Esquema do método que utiliza duas colunas: (a) amostragem e *clean-up* da coluna; (b) eluição da amostra da coluna de TFC, coluna analítica e MS (adaptado de HERMAN, 2006)

2.4.4.4 Concentração isocrática dos analitos

A concentração isocrática é uma técnica muito efetiva para melhorar o formato do pico observado na maioria dos métodos que utilizam *clean-up on-line* de

amostras. A concentração isocrática introduz um segundo fluxo de fase móvel que entra em contato e se mistura com o fluxo eluente da coluna de fluxo turbulento antes de se atingir a coluna analítica. Normalmente, o segundo fluxo de fase móvel é 100% aquoso. O resultado é que a força da fase móvel eluída da coluna de fluxo turbulento, a qual carrega os analitos extraídos, é diminuída antes de alcançar a coluna analítica. Os analitos são concentrados em uma estreita faixa no início da coluna de HPLC, mesmo quando as colunas têm propriedades de retenção similares. A vantagem deste procedimento é que a coluna analítica pode ser escolhida baseada na separação cromatográfica desejada, independente da coluna de fluxo turbulento. Os tempos de análise da amostra pelo método de concentração isocrática são reduzidos pelo aperfeiçoamento na configuração da válvula conectada à coluna de fluxo turbulento que é preenchida com o eluente antes da injeção de uma amostra.

Uma vez que a concentração isocrática foi usada para melhorar a forma do pico, tornou-se evidente que esta concentração tem outra vantagem, o aumento do tempo de vida da coluna de extração utilizando fluxo turbulento. O maior tempo de vida das colunas é devido ao fato que a forma do pico eluído da coluna de extração torna-se irrelevante para o que é observado no detector. Portanto, se as formas dos picos eluídos da coluna de extração começarem a deformar-se, é ainda possível o uso da mesma coluna (HERMAN, 2005; HERMAN, 2006; ZHOU *et al.*, 2005).

2.4.4.5 Concentração *on-line* da amostra

A concentração isocrática da amostra pode também ser usada para concentrar os analitos *on-line*. Os analitos de várias injeções podem ser extraídos, limpos e transferidos para a coluna analítica de HPLC antes de realizar a eluição por gradiente. Os analitos serão retidos na coluna analítica porque a coluna é somente exposta a uma fase móvel aquosa durante o *clean-up* e a eluição dos analitos da coluna de extração. A etapa de eluição por gradiente dos analitos retidos na coluna analítica é realizada uma vez que o número apropriado de injeções tenha ocorrido. Este método é bastante útil para a identificação de níveis baixos de concentração dos metabólitos.

O método geral para a limpeza e a concentração dos analitos *on-line* é o mesmo que foi utilizado na concentração isocrática, porém o *clean-up* da amostra e a transferência dos analitos podem ser repetidos quantas vezes forem necessárias para concentrar a amostra. Uma vez que a concentração é finalizada, faz-se a eluição dos analitos da coluna analítica utilizando uma fase móvel adequada. A resposta, no detector, do analito que foi concentrado é muito maior que a resposta do analito proveniente de uma única injeção (HERMAN, 2005; HERMAN, 2006).

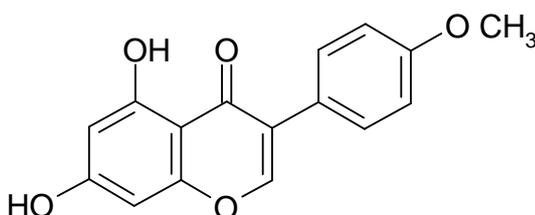
2.5 Propriedade dos flavonóides e resveratrol em estudo

Foram selecionados, no presente trabalho, 5 flavonóides e *trans*-resveratrol. Estes compostos fenólicos podem estar presentes em uma variedade de alimentos naturais (frutas, cereais e derivados) .

A seguir, estão descritas as principais características físico-químicas e outras informações sobre os princípios ativos selecionados para o presente estudo.

2.5.1 Biochanina A

Biochanina A é uma isoflavona encontrada em trevo vermelho (*trifolium pratense*). É uma substância que melhora a ação dos receptores de estrogênio e pode ter eficácia anti-câncer de mama. Reduz a resistência arterial, melhora a microcirculação e pode ter potencial aplicação no tratamento de doenças degenerativas incluindo a doença de Parkinson (CHEN *et al.*, 2007).



Sinônimo: 5,7-dihidroxi-4'-metoxi isoflavona Genisteína 4'-metil éter

Nome em inglês: Biochanin A

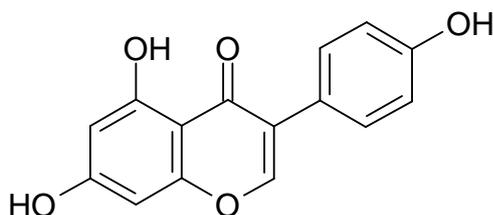
Número no CAS: 491-80-5

Fórmula molecular: C₁₆H₁₂O₅

Massa molar: 284,26 g mol⁻¹

Isoflavonas como genisteína e daidzeína são encontradas em diferentes plantas, soja e produtos a base de soja como por exemplo tofu e proteína vegetal. Além de agirem como antioxidantes, muitas isoflavonas têm demonstrado interação com receptores de estrogênio em animais e seres humanos, causando efeitos similares aos causados pelo hormônio estrogênio. Cabe ressaltar que as isoflavonas da soja também possuem efeito não hormonal.

2.5.2 Genisteína



Sinônimo: 4',5,7-trihidroxiisoflavona 5,7-dihidroxi-3-(4-hidroxifenil)-4H-1-benzopiran-4-1

5,7-Dihidroxi-3-(4-hidroxyfenil)-4H-1-benzopirana-4-1

4',5,7-Trihidroxiisoflavona

Nome em inglês: Genistein

Número no CAS: 446-72-0

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀O₅

Massa molar: 270,24 g mol⁻¹

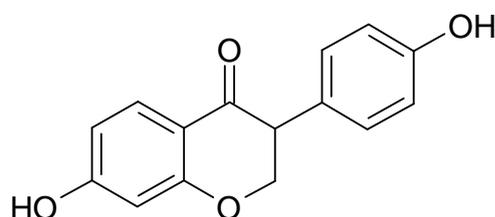
A genisteína age contra o câncer de diversas maneiras, algumas similares as drogas químicas. Por exemplo, cientistas acreditam que certas enzimas no corpo convertem células normais em células cancerosas. Alguns grupos de drogas para o

combate do câncer simplesmente inibem estas enzimas. Em células cancerosas, genisteínas têm demonstrado agir da mesma forma (McCLAIN *et al.*, 2007).

Esta substância age também contra cânceres que dependem de hormônios para crescer, tais como câncer de próstata e de mamas. As genisteínas interferem com estes hormônios, inibindo o desenvolvimento de células cancerosas e de tumores. Algumas pesquisas têm indicado que genisteínas interferem no processo pelo qual os tumores recebem nutrientes e oxigênio. Pesquisadores da Universidade de Minnesota, nos Estados Unidos, juntaram genisteínas a anticorpos e injetaram em gatos com leucemia. Todos estes gatos sobreviveram, enquanto que os gatos do grupo que não recebeu genisteína morreram dentro de três meses (SCHUSTER, 2007).

2.5.3 Daidzeína

A daidzeína, embora menos estudada do que a genisteína, também tem sido associado à prevenção de cânceres (CONSTANTINO *et al.*, 2005).



Sinônimo: 4',7-dihidroxi-iso-flavona

7-hidroxi-3-(4-hidroxi-fenil)-4H-1-benzo-pirano-4-1

7-hidroxi-3-(4-hidroxi-fenil)-cromona

Nome em inglês: Daidzein

Número no CAS: 486-66-8

Fórmula molecular: C₁₅H₁₀O₄

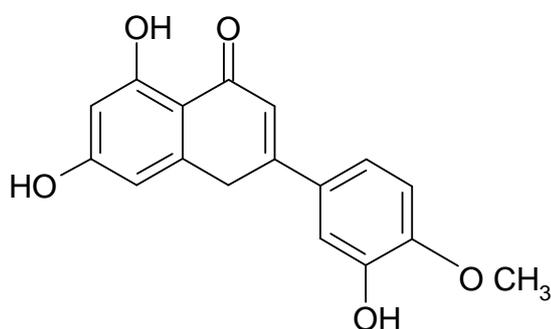
Massa molar: 254,24 g mol⁻¹

Evidências de estudos epidemiológicos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que, o consumo de frutas cítricas protege contra doenças cardiovasculares e

câncer. Destacam-se os flavonóides presentes em frutas cítricas hesperetina e naringenina (VANAMALA *et al.*, 2006).

2.5.4 Hesperetina

É um bioflavonóide encontrado principalmente em frutas cítricas (SEITZ & WINGARD, 1978; JUSTESEN *et al.*, 1998).



Sinônimo: 3',5,7-Trihidroxi-4-metoxiflavonona

Nome em inglês: Hesperetin

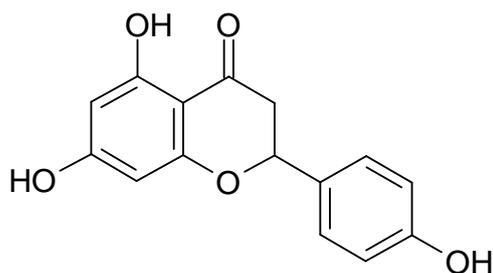
Número no CAS: 69097-99-0

Fórmula molecular: C₁₆H₁₄O₆

Massa molar: 302,27 g mol⁻¹

2.5.5 Naringenina

Pertencente ao grupo das flavononas, possui efeito bioativo para seres humanos como: anti-oxidante, captador de radicais livres, anti-inflamatório, promovedor do metabolismo de carboidrato e controlador do sistema imunológico (RIBEIRO *et al.*, 2008).



Sinônimo: (±)-2,3-dihidro-5,7-dihidroxi-2-(4-hidroxifenil)-4*H*-1-benzopirano-4-1
(±)-Naringenina 4',5,7-Trihidroxiflavonona

Nome em inglês: Naringenin

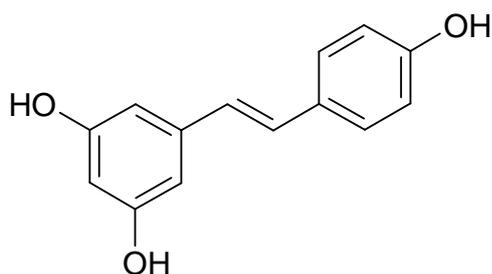
Número no CAS: 67604-48-2

Fórmula molecular: C₁₅H₁₂O₅

Massa molar: 272,25 g mol⁻¹

2.5.6 Resveratrol

Resveratrol e seus derivados são compostos fenólicos naturais encontrados em muitas famílias de plantas. Uvas e produtos derivados de uvas, como o vinho, são os alimentos que possuem estes compostos em maiores proporções (DURÁN-MERÁS *et al.*, 2008).



Sinônimo: 3,5,4'-trihidroxiestilbeno

Número no CAS: 501-36-0

Fórmula molecular: C₁₄H₁₂O₃

Massa molar: 228,25 g mol⁻¹

A presença de estilbenos em uvas e seus produtos derivados tem sido alvo de estudo por alguns anos. Diferentes estudos demonstram que estas substâncias trazem benefícios à saúde humana, uma vez que parecem ser parcialmente responsáveis pela baixa mortalidade por doenças cardiovasculares observadas em populações que costumeiramente bebem vinho com moderação. Além das propriedades anti-oxidantes, recentemente foi publicado que estes compostos possuem certa atividade química preventiva contra o câncer, como um modulador de receptores de estrogênio (DOMINGUÉZ *et al.*, 2001).

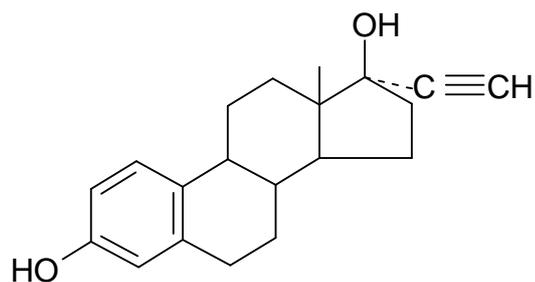
2.5.7 Propriedades do padrões internos utilizados

O padrão interno (PI) é definido pela EPA (2001) como um composto puro que é adicionado à amostra, ou ao extrato da amostra, em quantidade conhecida. Seu comportamento químico e físico deve ser semelhante ao do analito na amostra nativa. É usado com o propósito de calibração, quantificação dos analitos, ou para o acompanhamento das condições do sistema cromatográfico.

Os flavonóides e resveratrol tem suas fórmulas estruturais parecidas com a dos estrogênios. Alguns são conhecidos como fitoestrógenos por atuarem como hormônios fracos, sendo utilizados no tratamento de por exemplo, menopausa e climatério. Foram estudados dois estrógenos para uso como padrão interno: etinilestradiol e estradiol.

2.5.7.1 Etinilestradiol

Etinilestradiol ou etinil estradiol (EE) é um derivado sintético do estradiol (hormônio feminino). É oralmente bioativo e é atualmente encontrado na maioria das formulações de contraceptivos orais.



Sinônimo: 17 α -Etinilestradiol-1,3,5(10)-estratrieno-3,17 β -diol 19-Nor-1,3,5(10)

17 α -pregnatrien-20ine-3,17-diol

Nome em inglês: ethinylestradiol ou 17 α -ethinylestradiol

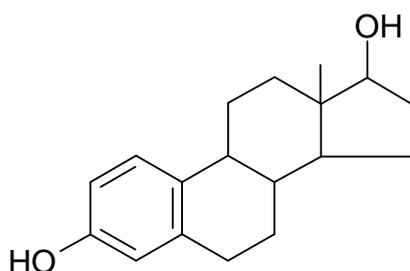
Número no CAS: 57-63-6

Fórmula molecular: C₂₀H₂₄O₂

Massa molar: 296,40 g mol⁻¹

2.5.7.2 Estradiol

É um hormônio sexual, chamado de hormônio feminino mas que está presente também nos homens.



Sinônimo: 1,3,5-Estradieno-3,17 β diol

17 β -Estradiol

3,17 β -Dihidroxi-1,3,5(10)-estradieno

Dihidrofoliculina

Número no CAS: 50-28-2

Fórmula molecular: C₁₈H₂₄O₂

Massa molar: 272,32 mg L⁻¹

2.6 Separação e quantificação de flavonóides

2.6.1 Cromatografia a Gás

A cromatografia a gás começou a ser usada na análise de flavonóides no início de 1960. NARASIMHACHARI & RUDLOFF (1962), derivatizaram e separaram flavonóides em escala semi-preparativa usando a coluna SE-30 com subsequente detecção por condutividade térmica. Frações foram coletadas para espectroscopia de IR e UV-vis. Após a introdução da técnica LC, análise de flavonóides utilizando GC se tornou menos freqüente.

Métodos utilizando GC proporcionam baixos níveis de detecção, mas são intensivamente laboriosos em virtude da necessidade de derivatização – na maioria dos casos direcionado à formação de derivados de trimetilsililéter (TMS, do inglês *trimethylsilylether*) para aumentar a volatilidade dos flavonóides e melhorar a estabilidade térmica. Deve se ressaltar que para flavonóides com mais de um substituinte hidroxila, metilação pode formar vários derivados o que torna a quantificação difícil. As condições de separação não mudaram muito desde 1960, embora hoje colunas capilares de sílica fundida são utilizadas ao invés de colunas de vidro recheadas.

Artigos recentes utilizando GC são publicados nas áreas biológica e nutricional, focalizando a atividade antioxidante, metabolismo e taxonomia. Tipicamente os flavonóides são hidrolisados e convertidos em seus derivados TMS, injetados em colunas apolares DB-5 ou DB-1 em modo *split* ou *splitless* e separados utilizando programa de temperatura linear de 30 à 90 min até o máximo de 300 °C. Os agentes derivatizantes mais comuns são N-O-bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida (BSTFA, do inglês *N-O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide*) e N-(tert.-butildimetilsilil)-N-metiltrifluoroacetamida (TBDMS, do inglês *N-(tert.-butyldimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamine*) e como detector o EI-MS (do inglês *Electron Impact Mass Spectrometry*) no modo de monitoramento de íons SIM (do inglês *selected ion monitoring*).

DENG & ZITO (2003), desenvolveram e validaram metodologia para determinação de 7 analitos incluindo terpenos e flavonóides, em extrato de fito farmacêuticos a base de *Ginkgo biloba* L.. As amostras foram hidrolisadas, sonicadas por 15 min e aquecidas à 85 °C por 1 hora. Acetato de etila foi usado

como solvente de extração (em vórtex por 1 min), após foi sonificado por 5 min e centrifugado por 10 min. Após a derivatização das amostras utilizando DMF e BSTFA, as amostras foram injetadas em GC-MS para quantificação. Os LODs encontrados para o método desenvolvido foram de 0,5 a 2,5 mg L⁻¹.

LIGGINS *et al.* (2000) analisaram daidzeína e genisteína em frutas e castanhas. Um volume de 10 mL da mistura metanol:água (4:1, v/v) foi adicionado às amostras. As mesmas foram sonicadas por 15 min e permaneceram durante uma noite em solução. Após vários processos como filtração, lavagem dos extratos, ajuste de pH, incubação durante uma noite, partição com acetato de etila, os extratos foram derivatizados com TBDMS e 3 µL de amostra foram injetados em GC-MS. As concentrações de daidzeína e genisteína encontradas foram de 1 a 2,25 µg kg⁻¹ de peso úmido de amostra.

2.6.2 Cromatografia a Líquido

A Cromatografia a Líquido (LC, do inglês *Liquid Chromatography*) tem sido sem dúvida, o método de identificação e quantificação mais utilizado para análise de flavonóides. Comparando com análise por GC-MS, cromatografia a líquido exige poucos passos de preparo de amostras, tem menos custos e permite a identificação de uma maior variedade de analitos.

É geralmente realizada em fase reversa, utilizando colunas de C18 ou C8. Eluição por gradiente é geralmente realizada com sistemas binários (utilizando dois solventes), por exemplo, água contendo tampão acetato ou formato e metanol ou acetonitrila como modificador orgânico. Diferentes detectores podem ser utilizados, dentre eles, ultravioleta e espectrométrico de massas são os mais utilizados sendo que detector de fluorescência é ocasionalmente empregado.

EI-SHAFAE & EI-DOMIATY (2001) utilizaram HPLC-UV para determinação de diosmina e hesperidina em folhas de *Barosma betulina* (planta com propriedades diuréticas e anti-sépticas). A extração foi realizada utilizando 1 g de folhas em pó, 4 x 25 mL de metanol contendo 10% dimetilsulfoxida e refluxo por 15 min (por extração). Um volume de 1 mL dos extratos combinados foi filtrado, diluído à 10 mL com metanol e 10 µL foram injetados no sistema cromatográfico. Como eluente foi utilizado metanol:água (60:40, v/v). As concentrações utilizadas nas curvas de

calibração foram de 5 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para diosmina e 2,5 a 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para hesperidina e os valores de recuperação encontrados foram de 99,3 e 99,6% para diosmina e hesperidina, respectivamente.

2.6.2.1 LC-MS

Nos últimos 30 anos, a combinação da cromatografia a líquido e a espectrometria de massas (LC-MS) tem sido uma das mais importantes ferramentas instrumentais em várias áreas de aplicação, incluindo bioquímica, biotecnologia, caracterização de produtos naturais e resíduos de pesticidas e drogas veterinárias em relação a segurança alimentar (NIESSEN, 2006).

A LC-MS apresenta um importante papel na realização de análises, identificação, derreplicação e caracterização estrutural de flavonóides. Tem sido o método mais utilizado para análise e caracterização de flavonóides uma vez que a cromatografia a gás exige derivatização dos flavonóides em estudo (NIESSEN, 2006). A espectrometria de massas de flavonóides agliconas e glicosídeos foi revisada por CUYCKENS e CLAEYS (2004).

No caso do LC-MS existem diferentes métodos para introduzir o eluato da coluna no espectrômetro de massas, sendo que os íons já podem estar presentes na solução ou serem formados no processo de transferência (KUSTER *et al.*, 2006). Quanto aos espectrômetros de massas também existem diferentes tipos e que operam em diferentes modos.

As moléculas da amostra são analisadas através de dois modos de ionização: *electrospray* (ESI, do inglês *ElectroSpray Ionization*) ou ionização química por pressão atmosférica (APCI, do inglês *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*). Ambos ESI e APCI são freqüentemente utilizados (Figura 6). Alguns autores preferem ESI, outros preferem APCI, da mesma forma, ambos modo de íon positivo e negativo são utilizados, apesar de geralmente a maior sensibilidade ser obtida em modo de íon negativo. De acordo com vários estudos, ambos ESI e APCI no modo negativo proporcionam os melhores resultados. Entretanto, o modo positivo não deve ser negligenciado uma vez que informações complementares neste modo podem ser obtidas, para a identificação de compostos desconhecidos (NIESSEN, 2006).

A **Ionização por Electrospray (ESI)** é uma técnica apropriada para determinação da massa molar e da estrutura. É preferencialmente aplicada para a análise de moléculas iônicas grandes ou íons pequenos com uma única carga, podendo ser usada no modo positivo ou negativo.

Esta técnica gera, em solução, íons dos analitos antes que eles cheguem ao Espectrômetro de Massas (KUSTER *et al.*, 2006; HERMAN, 2006). O eluato é pulverizado (nebulizado) dentro de uma câmara que está sob pressão atmosférica, na presença de um forte campo eletrostático e de um gás aquecido. O aquecimento causa a evaporação do solvente e das moléculas do analito. O gás aquecido promove aglomeração do solvente dentro da gota para evaporação. Com a diminuição da gota, ocorre à concentração da carga, e o processo acima descrito se repete. Os íons são transportados ao analisador de massas através de uma série de estágios de vácuo e elementos iônicos que focam o caminho. Algumas reações da fase gasosa, a maioria de transferência de prótons e troca iônica, também podem ocorrer no intervalo de tempo em que os íons são ejetados de dentro das gotas até alcançarem o analisador de massas (Figura 6a) (FERNANDEZ-ALBA, 2005; HERMAN, 2006).

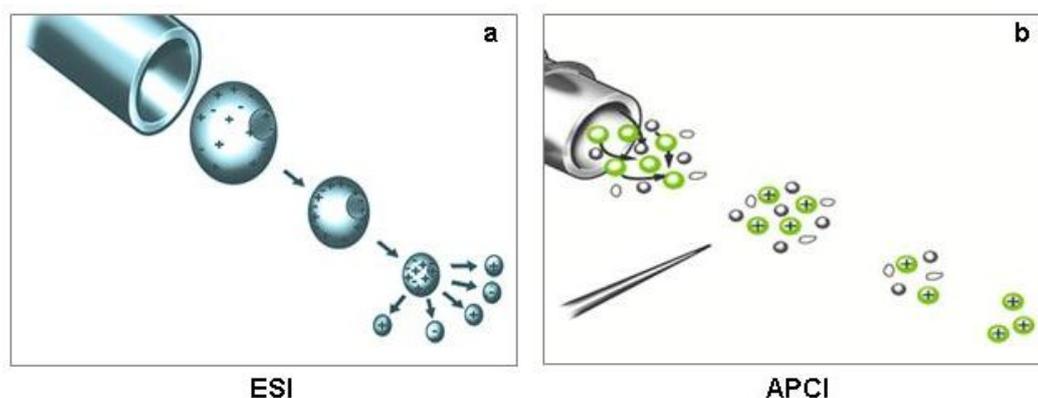


Figura 6. a) ESI, os íons já devem estar presentes na solução antes de serem introduzidos no MS; b) APCI, os íons serão formados após a introdução com o auxílio da corona de descarga

A **Ionização Química sob Pressão Atmosférica (APCI)** é uma técnica apropriada para determinação de massas molares menores do que 2000 unidades e da estrutura. É aplicada para análise de moléculas iônicas, polares e apolares, podendo ser usada no modo positivo e negativo.

No modo APCI, o eluato do LC é vaporizado através de um vaporizador aquecido (normalmente de 250 a 400 °C), sob pressão atmosférica. O aquecimento vaporiza o líquido, e as moléculas do solvente na fase gasosa são ionizadas por uma descarga de elétrons (Figura 6b) a partir de uma agulha condutora chamada de corona de descarga. Então, os íons do solvente transferem cargas para as moléculas do analito através de reações químicas (ionização química) (FERNANDEZ-ALBA, 2005; HERMAN, 2006). Os íons do analito passam através de um capilar de vidro dielétrico e de um orifício de amostragem para dentro do analisador de massas, como ESI e foto ionização sob pressão atmosférica (APPI, do inglês *Atmospheric Pressure Photoionization*). A APCI é aplicada a uma larga faixa de moléculas polares e apolares. Devido a isso, e devido ao fato de altas temperaturas estarem envolvidas, a APCI é menos utilizada do que o *electrospray* para a análise de biomoléculas grandes que podem ser termicamente instáveis. APCI é usada com cromatografia em fase normal mais freqüentemente do que o *electrospray*, porque os analitos são usualmente apolares (Figura 7) (HERMAN, 2006).

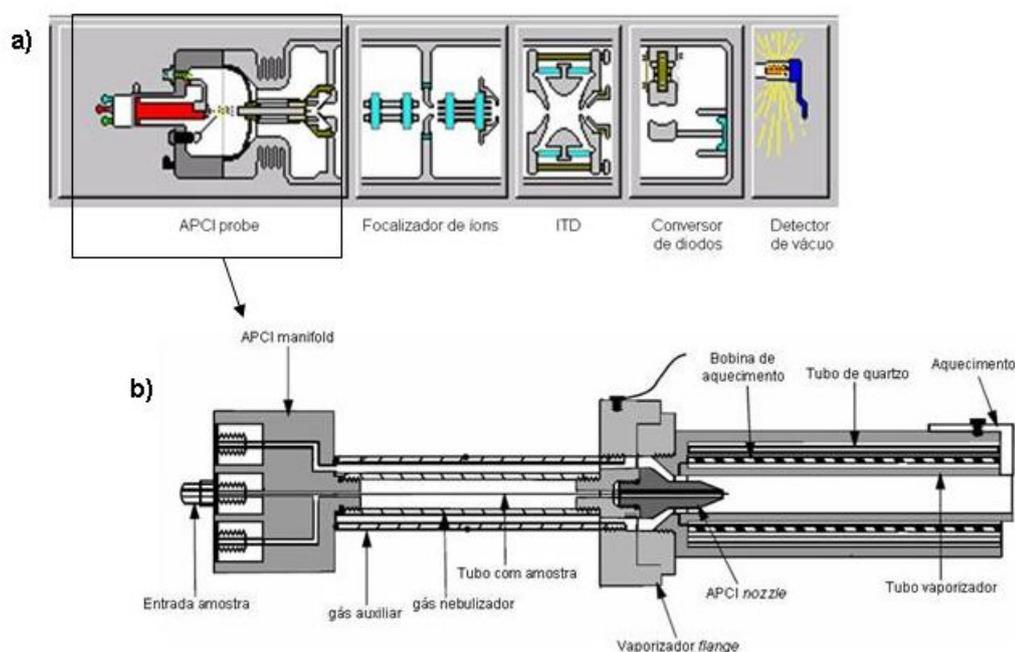


Figura 7. a) esquema do espectrômetro de massas com suas principais partes e b) a ampliação do APCI probe com as principais partes que compõe o mesmo (adaptado do software e manual do equipamento LCQ deca, Thermo Fisher Scientific)

O desenvolvimento de analisadores, quadrupolo, triplo quadrupolo, quadrupolo-ion trap, entre outros são de grande importância, pois a detectabilidade alcançada pelo método vai depender do analisador utilizado.

A configuração de LC-MS/MS mais frequentemente usada na análise de princípios ativos polares apresenta o sistema de LC aliado a um analisador com triplo quadrupolo que opera no modo SRM (SRM, do inglês *Single Reaction Monitoring*) por meio de interfaces de API. O SRM permite alta detectabilidade requerida para análises quantitativas. Os analisadores *ion trap*, TOF ganharam em popularidade, especialmente na identificação de metabólitos. A seleção do analisador é determinada pela detectabilidade e seletividade e o objetivo geral do trabalho. Assim, para determinação de analitos de interesse, analisadores triplo quadrupolo são uma boa opção, considerando que para compostos desconhecidos, é mais indicado usar o analisador Q-TOF.

Os **analisadores Triplo Quadrupolo (TQ)** consistem de dois analisadores quadrupolo que tem entre eles uma cela de colisão. As vantagens principais de empregar um Triplo Quadrupolo estão na alta detectabilidade e seletividade. Um TQ pode operar em modos diferentes que são *scan* do íon filho, *scan* do íon-precursor, perda neutra, além do modo SRM. SRM é sem nenhuma dúvida o mais conveniente e o modo mais usado de operação para contaminantes pois oferece uma alta detectabilidade e seletividade (LAGANA *et al.*, 2002; HERMAN, 2006). Os limites de detecção do instrumento geralmente estão na ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ ou ng L^{-1} e geralmente percorre aproximadamente três ordens de grandeza.

Os **analisadores Quadrupolo Trap (Q-Trap)** são instrumentos com analisadores *ion trap* consistem de três eletrodos, em três configurações dimensionais que produzem um campo quadrupolar dentro do analisador. O desenvolvimento destes analisadores, de modo que os eletrodos funcionem de modo linear, torna este tipo de analisador com uma capacidade maior de escanear íons filho (MARCH, 2000).

O espectro de massas de flavonóides obtidos com quadrupolo e *ion trap* são similares, mesmo que abundâncias relativas de fragmentos e adutos apresentem diferenças. Além disto, a comparação direta do espectro obtido com estes dois instrumentos é permitido. A principal vantagem do *ion trap* é a

possibilidade de realizar experimentos MS^n , que permitem a confirmação de fragmentos de íons (RIJKE *et al.*, 2003).

Os **analísadores Quadrupolo-TOF** oferecem vantagens como uma medida de massa precisa e completa informação do espectro de massas do composto (HOGENBOOM *et al.*, 2001). Essas características fazem do Q-TOF um instrumento ideal para compostos desconhecidos (REEMTSMA, 2003). O uso do TOF precedido por um quadrupolo (Q-TOF) pode dar informação mais específica sobre a estrutura de um composto (HERNANDEZ *et al.*, 2005). Assim, apesar do alto potencial reconhecido desta técnica, ainda não apresenta detectabilidade e linearidade satisfatória, além do um alto preço comercial, o que restringe suas aplicações.

Nas últimas duas décadas, com o desenvolvimento do API, as aplicações de LC-MS aumentaram progressivamente e permitiram monitorar uma faixa mais ampla de compostos polares. A LC-MS foi aplicada durante anos, mas hoje é reconhecida a necessidade por usar LC-MS/MS para alcançar a detectabilidade e, especialmente, a seletividade necessária para análises ambientais e evitar falsos positivos. Para este propósito, são indicados ESI e APCI (a seleção da fonte depende do composto) e analisadores diferentes, Triplo quadrupolo, Q-Trap. Os analisadores Triplo quadrupolo são amplamente usados para fins de quantificação; já os analisadores Q-Trap receberam pequena aplicação nos últimos anos.

2.7 Volume de *Breakthrough*

O volume *breakthrough*, é o que ocorre quando os compostos não são fortemente retidos pelo sorvente ou quando a capacidade do sorvente é excedida. Com relação à capacidade do sorvente é difícil de ocorrer sobrecarga da fase estacionária, quando se determina analitos em baixas concentrações, como da ordem de $\mu\text{g L}^{-1}$ (BARCELÓ & HENNION, 1997). Para um dado sorvente do tipo fase reversa, o volume de *breakthrough* é função da hidrofobicidade do soluto e a massa de sorvente usada (SIMPSON & WELLS, 2000; MITRA, 2003).

ASPERGER *et al.* (2002) determinaram o volume de *breakthrough* injetando 10 μL da mistura de pesticidas na coluna de TFC com diferentes composições de fase móvel (metanol:água). O logaritmo do volume de *breakthrough*

medido foi plotado versus a porcentagem de eluente A (metanol com 3% de água). Partindo dos gráficos lineares obtidos, os valores de volume de *breakthrough* válidos para o eluente B (água com 3% de metanol) foram extrapolados. Os autores verificaram que para as diferentes colunas de TFC testadas, os volumes que podem ser utilizados com a matriz água variam de 10 a 50 mL.

2.8 Efeito Matriz

Um possível problema em análise quantitativa utilizando LC-MS é a ocorrência de efeito matriz. Este efeito pode ser uma supressão ou aumento da resposta do analito devido a coeluição de constituintes da matriz. Uma das formas de se verificar se têm-se efeito matriz é comparando-se a resposta do analito versus a injeção de soluções padrões e amostras fortificadas após a extração. Apesar do efeito matriz parecer mais importante em ESI-MS, este pode ocorrer também em APCI-MS. BARNES *et al.* (1995) verificaram um aumento de resposta devido a constituintes na análise de diflubenzuron e clofentezina em sucos de frutas, utilizando LC-APCI-MS. SANGSTER *et al.* (2004) verificaram supressão iônica por efeito matriz em bioanálise quantitativa de drogas e três metabólitos em plasma de ratos.

Entre as diversas maneiras utilizadas para compensar o efeito matriz podemos citar: 1) uso do método da adição padrão; 2) uso de padrão interno deuterado; 3) preparo das soluções analíticas no extrato da matriz (do inglês, *matrix matched standards*); 4) uso de analitos protetores, entre outras alternativas (TOMÁŠ *et al.*, 2005).

2.9 Validação de métodos analíticos

A validação de um procedimento analítico consiste na avaliação da capacidade do processo analítico em produzir resultados confiáveis e adequados com à qualidade pretendida, sendo compatíveis com a precisão e exatidão, consideradas, na prática, como satisfatórias. A variabilidade associada a um método analítico deve levar em consideração todas as incertezas do processo analítico,

incluindo àquelas atribuídas aos equipamentos, padrões, calibrações, analista e ambiente, ou seja, se um método existente for modificado, ou um método totalmente novo for desenvolvido, deve-se assegurar de que as características de desempenho do método atendam aos requisitos para as operações analíticas pretendidas (INMETRO, 2003; ZANELLA *et al.*, 2000).

Do ponto de vista prático, pode-se dizer que um método, após ser selecionado e desenvolvido, deve ser submetido ao processo de avaliação que estime sua eficiência e mérito. Um método será considerado validado se suas características estiverem em conformidade com os pré-requisitos exigidos por literaturas de referência na área. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (FEINBERG & RAGUÉNÉS, 1999).

Os parâmetros analíticos geralmente envolvidos no procedimento de validação de métodos de separação são: curva analítica e linearidade, limite de detecção e limite de quantificação, exatidão e precisão (INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004; ZANELLA *et al.*, 2000).

2.9.1 Curva analítica

A linearidade de um método analítico pode ser definida como sendo a facilidade deste método em gerar resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de concentração (INMETRO, 2003).

Na prática, a linearidade é determinada através das chamadas curvas analíticas, que são gráficos de calibração que relacionam a resposta do equipamento em função das diferentes concentrações do analito (LANÇAS, 2004).

A variável independente (eixo horizontal ou x) relaciona-se às várias concentrações preparadas do padrão analítico da substância de interesse, e a variável dependente (eixo vertical ou y) relaciona o sinal analítico obtido para cada concentração do padrão. Essa relação produz uma equação de regressão linear $y = ax + b$, que relaciona as duas variáveis x e y. Essa equação é válida para um intervalo determinado de concentração do analito, independente da técnica

instrumental utilizada. O coeficiente angular **a**, expressa a inclinação do gráfico em relação aos eixos, enquanto que o coeficiente linear **b** expressa a interseção do gráfico com os eixos (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

O número mínimo de pontos geralmente aceito nos gráficos de calibração varia entre 5 e 6 pontos, ou mais do que 6 (INMETRO; 2003). Essas concentrações devem ser escolhidas de forma a cobrir uma faixa de 50 a 150% do valor que se espera encontrar na amostra de estudo (LANÇAS, 2004), ou seja, a concentração mais esperada da amostra deve, sempre que possível, se situar no centro da faixa de trabalho (INMETRO, 2003).

Também é possível calcular o coeficiente de correlação **r** ou o coeficiente de determinação **r²**, que pode ser utilizado para estimar a qualidade da curva analítica uma vez que demonstra uma menor variação dos dados obtidos quanto mais próximo de 1 (RIBANI *et al.*, 2004). Valores de **r** e **r²** iguais ou superiores a 0,99 e 0,90, são recomendados, respectivamente, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2003a) e pelo Instituto Nacional de Metrologia (INMETRO, 2003) enquanto que valores de **r²** iguais ou maiores que 0,999 são descritos por PIMENTEL & NETO (1996).

A faixa linear de um método de ensaio é o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com a precisão, exatidão e linearidade exigidas, sob as condições específicas do ensaio. A faixa linear é definida como sendo a faixa de concentração na qual a sensibilidade pode ser considerada constante e é normalmente expressa nas mesmas unidades do resultado obtido pelo método analítico (INMETRO, 2003).

Existem vários métodos para construir uma função de calibração (RIBANI, *et al.* 2004):

Na **Padronização Externa**, a massa de analito é determinada diretamente por interpolação do gráfico de calibração ou através da equação que descreve o comportamento do sinal analítico em função dos padrões que o geraram. Este método é sensível a erros de preparo das soluções e de injeção (LANÇAS, 2004; RIBANI, 2004).

A **Padronização Interna** consiste na preparação das soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, as quais se adicionam a mesma quantidade conhecida de um composto chamado padrão interno. A curva analítica é obtida relacionando a razão dos sinais (analito / padrão interno) com a

concentração do analito. Este método é bastante útil, pois independe de pequenas mudanças em variáveis experimentais como, por exemplo, o volume injetado em cromatografia gasosa (RIBANI *et al.*, 2004).

A **Superposição de Matriz** consiste na adição do padrão da substância em diversas concentrações em uma matriz similar à da amostra, isenta da substância, e construção do gráfico de calibração relacionando as áreas obtidas com as concentrações dos padrões. Este método pode estar associado a padronização externa ou interna. O objetivo é compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferentes nas etapas de pré-concentração, extração, separação e detecção (RIBANI *et al.*, 2004).

Na **Adição Padrão** adicionam-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada a quantidades conhecidas da amostra, antes do seu preparo. Constrói-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada à mostra com as respectivas áreas obtidas. A extrapolação da reta define, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada (RIBANI *et al.*, 2004).

Na a Figura 8, pode-se observar a relação entre os métodos. De forma geral, pode-se dizer que o método de padronização externa é realizado quando nenhum erro sistemático proveniente da matriz é suspeito, enquanto o método de superposição de matriz compensa o efeito matriz e o método de adição padrão corrige o efeito da matriz e as mudanças da resposta do instrumento (RIBANI *et al.*, 2004).

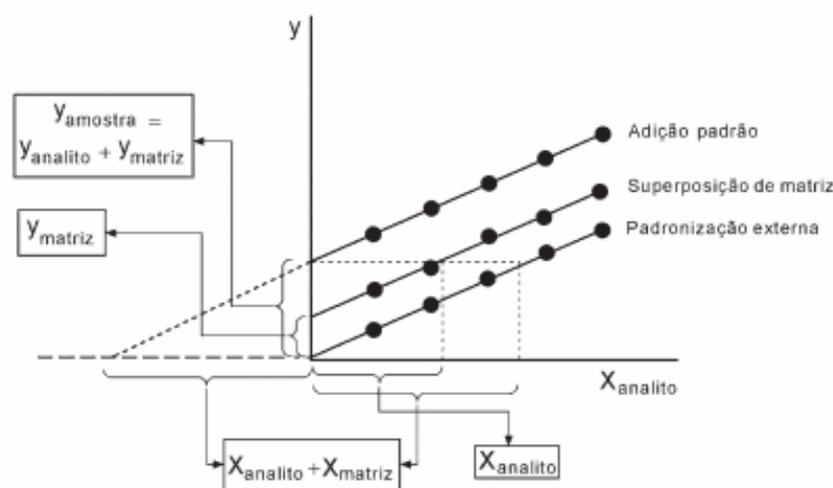


Figura 8. Representação gráfica entre os métodos de calibração: adição padrão, superposição de matriz, padronização externa (RIBANI *et al.*, 2004)

2.9.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Quando são realizadas medidas em amostras com baixos níveis do analito, como por exemplo análise de traços, é importante saber qual o menor valor de concentração do analito que pode ser detectado ou quantificado pelo método (INMETRO, 2003).

O Limite de Detecção (LOD) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser detectada, porém não necessariamente quantificada como um valor exato. O Limite de Quantificação (LOQ) corresponde à menor quantidade de um analito que pode ser quantificada com exatidão e com uma finalidade determinada (RIBANI *et al.*, 2007).

Há várias maneiras de se calcular a estimativa do valor do LOD, como através do método visual, método da relação sinal/ruído e aquele baseado em parâmetros da curva analítica (RIBANI *et al.*, 2007). A Figura 9 demonstra de forma representativa como podem ser obtidos o LOD, o LOQ e o ruído da linha base. Para determinar o LOD considera-se a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi três vezes maior, em relação ao ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse. Para determinar o LOQ considera-se a concentração cujo sinal cromatográfico obtido foi dez vezes maior, em relação ao sinal do ruído da linha base, no tempo de retenção dos picos de interesse.

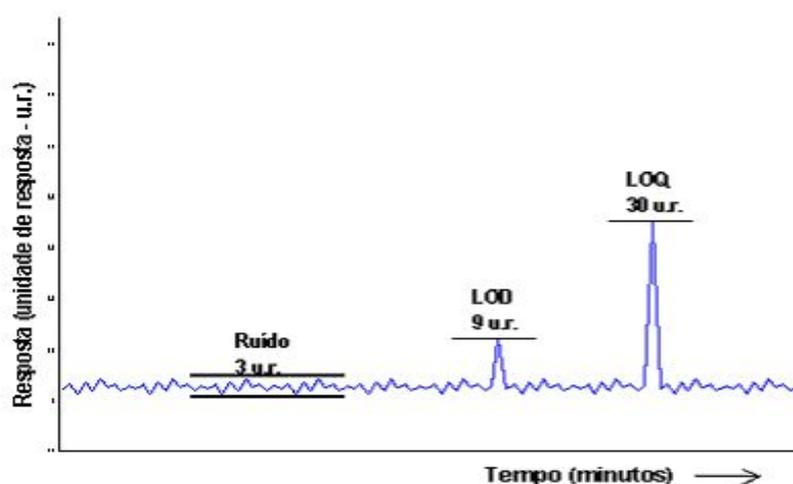


Figura 9. Representação demonstrando o ruído da linha base, o LOD e o LOQ

2.9.3 Precisão

É o termo geral utilizado para avaliar a dispersão dos resultados de ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou soluções analíticas de referência, analisadas em condições definidas (INMETRO, 2003).

A precisão é expressa como a porcentagem do coeficiente de variação ou desvio padrão relativo (RSD, do inglês *Relative Standard Deviation*) de uma série de medidas, e pode ser calculada através da Equação 3:

$$RSD = \frac{s}{X_m} 100 \quad (3)$$

onde:

s = estimativa do desvio padrão absoluto = $\{\sum(x_i - x_m)^2 / N - 1\}^{1/2}$;

x_i = valores individuais; x_m = média das medidas em replicatas;

N = número de medidas.

Para métodos empregados em determinações ao nível de traços, valores de RSD de até 20% são aceitáveis (SANCO, 2007).

A precisão pode ser determinada em termos de repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade (RIBANI *et al.*, 2004).

A **Repetitividade** (interdia ou *interday*) é o grau de concordância entre os resultados de medições sucessivas de um mesmo método, efetuadas sob as mesmas condições de medição, ou seja, mesmo procedimento, mesmo analista, mesmo instrumento, mesmo local, repetições em um curto intervalo de tempo. A repetitividade envolve várias medições da mesma amostra, em diferentes preparações é, também denominada precisão intra-ensaio, e pode ser expressa através da estimativa RSD (RIBANI *et al.*, 2004).

A **Precisão intermediária** (intradia ou *intraday*) refere-se à precisão avaliada sobre a mesma amostra, utilizando o mesmo método, no mesmo laboratório ou em laboratórios diferentes, mas definindo exatamente quais as condições a variar (uma ou mais), tais como: diferentes analistas, diferentes equipamentos, diferentes tempos. Esta medida de precisão é reconhecida como a mais representativa da

variabilidade dos resultados em um laboratório e, como tal, mais aconselhável de usar. O objetivo da validação da precisão intermediária é verificar que no mesmo laboratório o método fornecerá os mesmos resultados (INMETRO, 2003).

A **Reprodutibilidade** indica o grau de concordância dos resultados de testes obtidos para análise de uma mesma amostra usando o mesmo método, porém em diferentes laboratórios, por diferentes operadores ou empregando diferentes equipamentos (INMETRO, 2003).

2.9.4 Exatidão

É uma medida da concordância existente entre os dados obtidos em uma determinada medida e um valor de referência assumido como sendo o verdadeiro (RIBANI *et al.*, 2004). É geralmente, determinada por intermédio do uso de uma amostra certificada cuja concentração do analito de interesse é conhecida (LANÇAS, 2004).

Na indisponibilidade de material de referência certificado, a exatidão pode ser avaliada através dos ensaios de fortificação e recuperação onde é realizada a adição de uma quantidade conhecida de um padrão certificado do analito de interesse à matriz, após a etapa de extração e análise instrumental, a resposta é comparada com aquela dada pela análise do padrão de referência, dissolvido em um solvente puro (LANÇAS, 2004). A exatidão geralmente expressa em percentual, podendo esta ser calculada através da Equação 4:

$$R\% = \frac{C_1 - C_2}{C_3} 100 \quad (4)$$

Onde:

C_1 = Concentração determinada na amostra fortificada;

C_2 = Concentração determinada na amostra não fortificada;

C_3 = Concentração usada para fortificação.

A exatidão representa a existência de erros sistemáticos, que provocam desvios ou tendências nos resultados. Erros sistemáticos típicos na exatidão de

resultados analíticos provêm de equipamentos não calibrados ou aferidos; interferentes na amostra; baixa recuperação na extração; medidas volumétricas incorretas; seringas contaminadas, etc. (LANÇAS, 2004).

Para alguns métodos o cálculo da recuperação não é possível de ser realizado por que a determinação da recuperação é idêntica ao procedimento de calibração. A inabilidade de se determinar a recuperação de um método não significa que o mesmo não pode ser validado. Assim sendo, a precisão e exatidão do método irão se referir aos demais dados de calibração: valores de linearidade, precisão (RSD%) em termos repetitividade e de precisão intermediária, LOD e LOQ (HILL & REYNOLDS, 1999).

3 OBJETIVOS

Os objetivos do presente trabalho foram:

3.1 Objetivo geral

- ✓ Desenvolver um procedimento *on-line* para a determinação de flavonóides e resveratrol nos vinhos tinto, branco e rosé.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Empregar a Cromatografia de Fluxo Turbulento para o *clean-up* das amostras;
- ✓ Utilizar a Cromatografia a Líquido para a separação dos compostos;
- ✓ Utilizar a Espectrometria de Massas para a identificação e quantificação dos compostos;
- ✓ Avaliar o procedimento desenvolvido aplicando o mesmo em diferentes amostras de vinho.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido em várias etapas onde inicialmente fez-se a seleção dos flavonóides e resveratrol que podem estar presentes em vinho; otimização do método de *clean-up on-line*, considerando-se o volume de *breakthrough* e gradiente a ser utilizado para eluição dos compostos; otimização das condições no espectrômetro de massas; validação do método para análise dos compostos selecionados e a aplicação do método proposto.

4.1 Instrumentação e materiais

- ✓ Sistema LC-MS/MS: Espectrômetro de Massas LCQ deca
 - Detector de trapeamento de íons (*ion trap*) Thermo Fisher Scientific com interfaces ESI e APCI (Califórnia, USA);
 - Sistema de aquisição de dados através do software Xcalibur™ revisão 1.2, Thermo Fisher Scientific (Califórnia, USA);
- ✓ Sistema de HPLC LC-2010A *HT* (para a realização do gradiente) equipado com:
 - Bombas para HPLC LC-2010A *HT*, Shimadzu (Kyoto, Japan);
 - Sistema de aquisição de dados através do software Shimadzu CLASS-VP, version 6.12 SP5;
- ✓ Sistema de HPLC LC-10AD (para obter a vazão de 4 mL min⁻¹ sob a coluna de TFC) equipado com:
 - Bombas para HPLC LC-10AD *VP* Shimadzu (New Jersey, USA)
 - Sistema de desgaseificação (do inglês, *degasser*) DGU-14A Shimadzu (New Jersey, USA);
 - Injetor automático SIL-10AD *VP* Shimadzu (New Jersey, USA);
- ✓ Coluna cromatográfica de fase reversa Symmetry® C18 (100 x 2,1 mm, 3,5 µm) (Waters, USA);
- ✓ Coluna TurboFlow® (50 x 1,0 mm, 50 µm, 60 Å) (Thermo Scientific, USA);

- ✓ Sistema ASPEC (Automated Sample Preparation with Extraction Columns) (Gilson, França) contendo:
 - Injetor automático;
 - Diluidor com seringa de 10 mL, modelo 401;
 - Controlador, modelo 201 – 202 (Gilson, França);
- ✓ Válvula comutadora MUST – *Multiport Stream Switch*, (Spark, Holanda)
- ✓ Sistema de purificação de água Milli-Q[®], Sistema Acadêmico Gradient A10, equipado com cartucho Quantum[™] ultrapuro e filtro millipak 40, 0,22 µm, (MilliPore[®] Corporation, USA);
- ✓ Balança analítica de precisão, com 4 e/ou 5 casas decimais METTLER AE240 (Mettler-Toledo, USA);
- ✓ Micropipetadores automáticos de várias capacidades (P1000, P200, P100 e P20), (Gilson, França);
- ✓ Filtros de ponteira descartáveis Whatman[®] FP 30/0,2 CA-S, 0,2 µm, acetato de celulose, estéril, não pirogênico (Whatman[®], Inglaterra);
- ✓ Frascos de vidro de 100 mL (Schott Duran[®], Alemanha).

4.2 Solventes e gases

- ✓ Etanol e metanol grau HPLC (Biosolve BV, Holanda);
- ✓ Acetona grau HPLC (Sigma-Aldrich, USA);
- ✓ Água purificada em sistema Milli-Q[®] (MilliPore[®] Corporation, USA);
- ✓ Gás de colisão para LC-MS: Hélio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda);
- ✓ Gás nebulizador para LC-MS: Nitrogênio 99,999% de pureza (Praxair, Holanda);

4.3 Princípios ativos selecionados

Os flavonóides selecionados para o estudo juntamente com o resveratrol e os hormônios 17 α -etinilestradiol e β -estradiol (para serem utilizados como padrão

interno), estão listados na Tabela 2, juntamente com seus fornecedores, classificação, massa molar e grau de pureza.

Tabela 2. Princípios ativos utilizados e respectivas informações: fornecedores, classificação, massa molar e grau de pureza

Princípios ativos	Fornecedores	Classificação	Massa molar (g mol ⁻¹)	Grau de pureza (%)
Biochanina A	Sigma-Aldrich	Isoflavona	284,26	99,0
Daidzeína	Sigma-Aldrich	Isoflavona	254,24	98,0
Genisteína	Sigma-Aldrich	Isoflavona	270,24	98,0
Hesperetina	Sigma-Aldrich	Flavonona	302,27	95,0
Naringenina	Carl Roth GMBH	Flavonona	272,25	97,0
Resveratrol	Sigma-Aldrich	Estilbeno	228,25	97,0
β-estradiol*	Sigma-Aldrich	Estrogênio	272,39	97,0
17 α-Etinilestradiol*	Sigma-Aldrich	Estrogênio	296,40	97,0

* princípios estudados para serem utilizados como padrão interno

4.4 Seleção do Padrão Interno

Padrão interno é definido como um composto ou elemento puro adicionado à amostra, onde o comportamento físico e químico deve ser representativo da substância de interesse (LANÇAS, 2004).

Para a seleção do padrão interno, selecionou-se dois estrogênios cujas estruturas são similares aos dos compostos em estudo e por não estarem presentes nas matrizes. Para a escolha considerou-se o tempo de retenção e a sensibilidade do sinal.

4.5 Preparo das soluções analíticas

As soluções analíticas estoque foram preparadas individualmente através da dissolução dos respectivos padrões analíticos apresentados na Tabela 2 nas concentrações de 1000 mg L^{-1} em metanol. Estas foram armazenadas em frascos de vidro âmbar e estocadas a temperatura de $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir destas soluções estoque, pipetou-se 1 mL de cada solução, preparando-se 10 mL de cada solução nas concentrações de 100 mg L^{-1} e desta solução mediu-se 1 mL , preparando-se 10 mL na concentração de 10 mg L^{-1} . As duas soluções (10 e 100 mg L^{-1}) foram chamadas de soluções de trabalho.

As soluções de trabalho foram utilizadas para os ensaios de fortificação, e também para preparar as soluções analíticas, através da sua diluição, nas concentrações de 1 mg L^{-1} (para a otimização do LC-MS) e $5, 10, 25, 50, 75, 100$ e $200 \text{ } \mu\text{g L}^{-1}$ para a confecção das curvas analíticas de cada composto (Tabela 3).

Todas as soluções analíticas foram armazenadas a $-4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo que, antes de serem utilizadas, foram deixadas em bancada para atingir temperatura ambiente.

Tabela 3. Volumes adicionados (μL) das soluções de trabalho 10 e 100 mg L^{-1} dos princípios ativos e padrão interno (100 mg L^{-1}) em 100 mL de amostra de vinho

Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volumes adicionados (μL) das soluções de trabalho (mg L^{-1})		
	Princípios ativos		Padrão interno
	10	100	100
branco	-	-	50
5	50		50
10	100		50
25	250		50
50		50	50
75		75	50
100		100	50
200		200	50

Para o resveratrol foram necessárias concentrações mais altas para as curvas analíticas, na matriz vinho tinto. A Tabela 4 apresenta as soluções de trabalho que foram utilizadas para os ensaios de fortificação, e também para preparar as soluções analíticas, através da sua diluição, nas concentrações de 100, 250, 500, 750, 1000, 2500 e 5000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

Tabela 4. Volumes adicionados (μL) da solução de trabalho de concentração 100 mg L^{-1} do princípio ativo resveratrol e padrão interno em 100 mL de amostra de vinho para obter curvas analíticas com altas concentrações

Concentrações ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Volumes adicionados (μL) da solução de trabalho (mg L^{-1})	
	Resveratrol	Padrão interno
	10	100
branco	-	500
100	100	500
250	250	500
500	500	500
750	750	500
1000	1000	500
2500	2500	500
5000	5000	500

4.6 Parâmetros de otimização do sistema LC-MS

4.6.1 Gradiente para a eluição e separação dos compostos na coluna de fase reversa

Para que houvesse uma eficiente eluição dos compostos em estudo, e para evitar efeito memória na coluna de TFC, testou-se diferentes gradientes (Tabela 5).

O gradiente 1 foi realizado para verificar os tempos de retenção dos princípios ativos em estudo (utilizando-se metanol:água como fase móvel) bem como verificar a separação dos mesmos. Para este teste foram injetados 10 μL no sistema HPLC de com coluna de fase reversa C18, com a vazão de 0,2 mL min^{-1} .

O gradiente 1 apresentou boa separação dos compostos, no entanto o tempo de corrida de 80 minutos pode ser reduzido. Dessa forma foi utilizado o gradiente 2, onde todo o sistema (incluindo sistema ASPEC e coluna de TFC) foi utilizado. No entanto, em amostras de vinho tinto foi verificado aumento de ruído da linha base formado por vários compostos de baixa massa molar presentes neste vinho, implicando em baixa detectabilidade do sinal cromatográfico uma vez que muitos interferentes eluem na mesma faixa de tempo de retenção dos compostos estudados.

Visando eliminar alguns dos interferentes, realizou-se o gradiente 3. Para tal utilizou-se 45% de metanol em modo isocrático por 5 minutos. Posteriormente, gradiente de 30 minutos até 100% metanol para eluir os compostos de interesse, seguido de tempo de re-equilíbrio. Usando este procedimento, reduziu-se parte dos interferentes.

Para melhorar o tempo total de análise realizou-se o gradiente 4, com gradiente de 20 min ao invés de 30 min (de 45 a 100% de metanol). A separação utilizando estas condições mostrou-se satisfatória, com uma menor quantidade de interferentes da matriz, apresentando corridas mais curtas.

Tabela 5. Tabela contendo os gradientes testados para a eluição dos compostos retidos nos poros das partículas C18 da coluna de TFC

	Tempo (min)	Metanol (%)
Gradiente 1	0	5
	60	100
	65	100
	70	5
	80	5
Gradiente 2	0	5
	30,0	100
	35,0	100
	35,5	5
	45,0	5
Gradiente 3	0	5
	1	45
	6	45
	36	100
	41	100

	42	5
	47	5
	0	5
	1	45
Gradiente 4	6	45
	26	100
	31	100
	32	5
	37	5

4.6.2 Avaliação dos modos de ionização e demais condições do espectrômetro de massas

Para a otimização do espectrômetro de massas, espectros no ESI e APCI foram obtidos, nos modos de íon positivo (PI) e íon negativo (NI) no intervalo de massas de 50-600 m/z . Para os testes com ESI foi realizada a infusão direta de uma solução de daidzeína e genisteína de concentração 13,5 mg L⁻¹, preparadas em metanol:água (1:1, v/v). Para a infusão, uma seringa de 10 mL contendo a solução com o composto a ser avaliado, foi utilizado. Ao iniciar a medida, o êmbolo da seringa foi empurrado de maneira a proporcionar uma vazão de 15 $\mu\text{L min}^{-1}$, sendo que a solução foi introduzida no MS por meio de um capilar. Os sinais para os testes utilizando ESI PI e NI não foram satisfatórios, uma vez que os sinais se mostraram muito baixos.

Para os testes com APCI realizou-se injeções de 10 μL (utilizando-se para tal bomba de HPLC) de soluções de daidzeína e genisteína de concentração de 13,5 mg L⁻¹ preparadas em metanol:água (1:1, v/v). Utilizou-se como vazão de fase móvel 0,2 mL min⁻¹, que foi direcionada para o espectrômetro de massas sem divisão. Utilizando-se APCI NI os sinais foram melhores que para ESI. Assim sendo, os parâmetros para este método foram otimizados.

Otimizou-se a temperatura do capilar, variando-se as temperaturas de 165 a 325 °C enquanto que os compostos foram introduzidos no espectrômetro de massas como citado anteriormente.

Para a otimização da temperatura de vaporização, realizou-se injeções como descrito anteriormente variando-se as temperaturas de 300 a 450 °C. Foram também avaliados e otimizados a corona de descarga e “*tube lens*”.

4.7 Volume de *Breakthrough* para a coluna de TFC

A coluna para TFC foi otimizada realizando-se o estudo do volume de *breakthrough*. Estes testes tiveram como objetivo verificar o volume que pode ser injetado no sistema TFC-LC de forma a não comprometer as análises perdendo analitos no momento da transferência da alça de amostragem para a coluna de TFC.

Utilizou-se os princípios ativos resveratrol, daidzeína, genisteína e o padrão interno por serem estes compostos mais polares e por serem de diferentes classes. Para a realização dos testes utilizou-se bomba de HPLC, coluna de TFC e espectrômetro de massas.

Preparou-se 1 litro de solução analítica contendo 2,5 mg L⁻¹ dos compostos selecionados. Como o vinho possui em torno de 13% de teor alcoólico em sua composição, 2,5, 5 e 10% de etanol e 100% de água ultra-pura foram testados como solventes para o preparo das soluções para os testes. O objetivo foi avaliar a retenção dos flavonóides na coluna de TFC com ou sem presença de modificador orgânico (etanol), simulando assim a matriz que será estudada posteriormente.

Utilizou-se para este teste duas válvulas comutadoras. Primeiramente limpou-se a coluna de TFC (para garantir que não tivesse compostos interferentes após cada teste). Após alguns minutos trocou-se as posições das válvulas de forma que a coluna de TFC não recebesse fase móvel. Depois disso, a solução de um dos compostos a ser verificado começou a ser percolada à vazão de 1 mL min⁻¹ (continuamente) até que a intensidade do sinal para o mesmo obtido no MS, permaneceu estável. Neste momento, trocou-se a posição da válvula (decaimento no sinal inicial) de forma que a solução do princípio ativo iniciou a percolar na coluna de TFC. Como os compostos estavam retendo na coluna, não obtinha-se nenhum sinal (Figura 10, à partir de 8 min). Depois de um determinado tempo o composto começou a eluir da coluna, e a linha de base começou a subir (Figura 10, a partir de 40,9 min). O tempo em que a linha de base aumentou (teve sinal) novamente foi

considerado o tempo de *breakthrough* e utilizando-se a vazão e o volume “morto”, o volume de *breakthrough* pode ser calculado. Após verificar o tempo em que os compostos eluíram da coluna (determinou-se um tempo de 60 min de análise), trocou-se a posição da válvula e 100% metanol foi utilizado para retirar os compostos da coluna (Figura 10, após 70 min, verifica-se o sinal do resveratrol).

Para avaliar a capacidade da coluna de TFC e para ter certeza de que a mesma não estava sendo saturada, realizou-se os mesmos testes realizados anteriormente com soluções na concentração de $25 \mu\text{g L}^{-1}$.

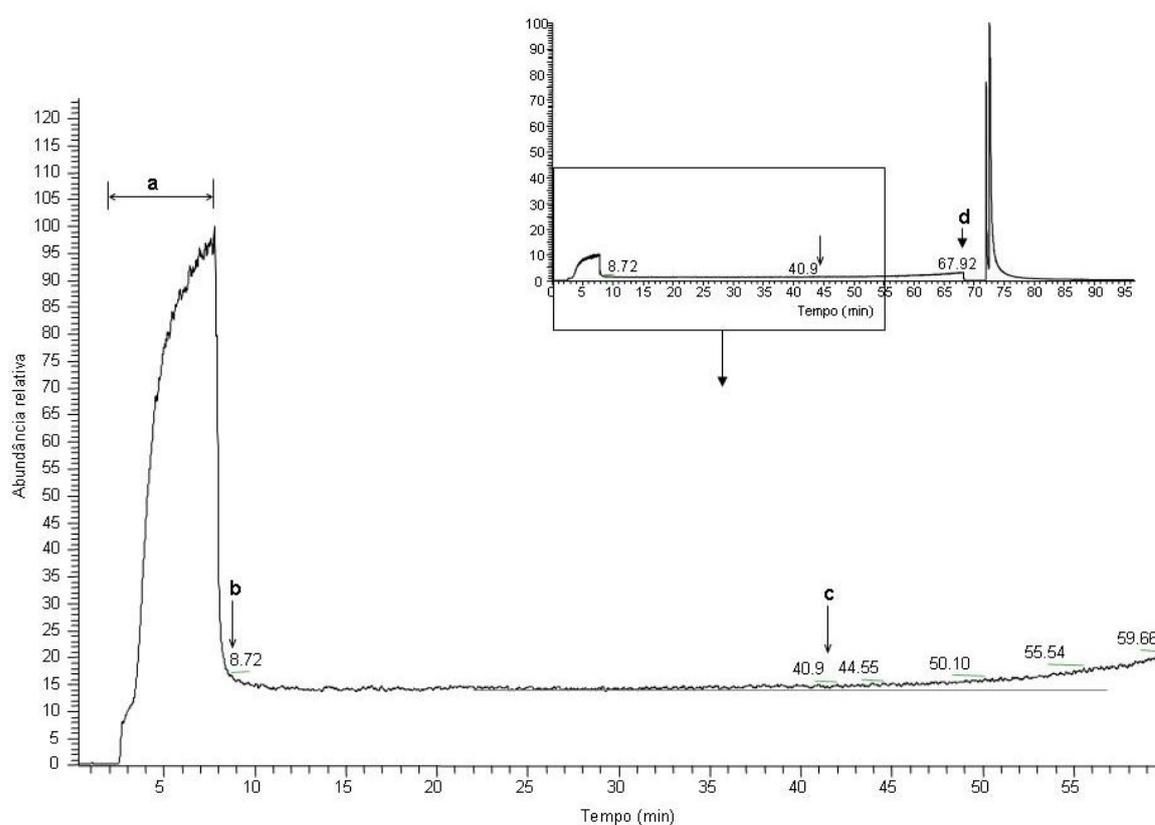


Figura 10. Cromatograma obtido no estudo do volume de *breakthrough*. **(a)** sinal dos compostos presentes na coluna de TFC (etapa de limpeza), **(b)** troca da válvula comutadora gera uma queda do sinal, **(c)** substância em estudo entra em contato com a coluna de TFC e após 41 min começa a ser eluída e **(d)** cromatograma com o tempo total de análise

4.8 Etapa de preparo de amostra empregando TFC

Para a etapa de preparo de amostra foram testadas as diluições 1:3 e 1:9 (v/v) em virtude da complexidade da matriz (FLAMINI, 2003). As diluições foram feitas com água de milli-Q, antes de realizar as etapas de fortificação.

Para o sistema *on-line* utilizando TFC-LC-MS fez-se necessário um pré-tratamento da amostra. Este procedimento visou eliminar interferentes sólidos que pudessem estar presentes nas amostras de vinho.

Como pré-tratamento, as amostras foram diluídas e filtradas manualmente utilizando seringas de 100 mL e filtros de ponteira descartáveis com porosidade de 0,2 µm. Foram testadas diluições 1:3 e 1:9, vinho:água Milli-Q (v/v).

Após o pré-tratamento, 100 mL de amostra foram colocados em frasco de vidro onde foram fortificados com os seis princípios ativos e padrão interno em estudo (Tabela 3).

As amostras fortificadas foram colocadas no sistema ASPEC (Figura 11, 1) (Apêndice C) onde o procedimento *on-line* teve início.

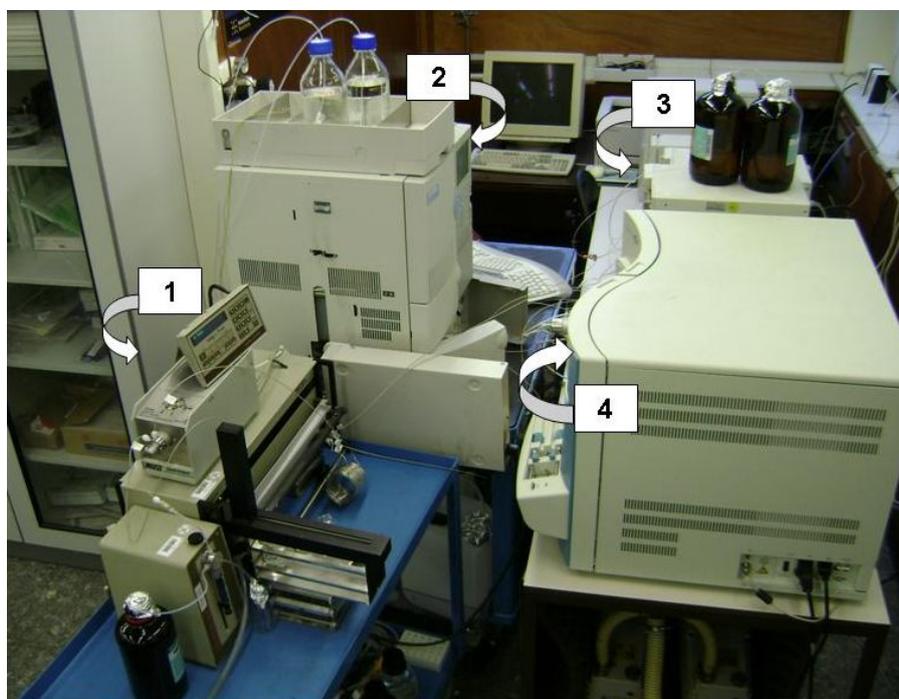


Figura 11. Sistema completo de TFC-LC-MS equipado com 1) sistema ASPEC para introdução da amostra, 2) sistema de HPLC para limpeza e carregamento da amostra pela coluna de TFC, 3) sistema de HPLC para o carregamento das amostras da coluna de TFC para a coluna de fase reversa e 4) MS para a identificação e quantificação dos princípios ativos em estudo

O esquema das válvulas e demais instrumentação utilizados no método *on-line* desenvolvido estão demonstrados nas Figuras 12, 13 e 14. No Apêndice A verifica-se as etapas do programa utilizado para controlar a automação do sistema, que é dividida em 4 etapas: introdução da amostra e preenchimento da alça de injeção (A), transferência dos compostos e limpeza da coluna de TFC (B), transferência dos compostos trapeados na coluna de TFC para a coluna de fase reversa (C) e transferência dos princípios ativos em estudo para o sistema de detecção para a identificação e quantificação.

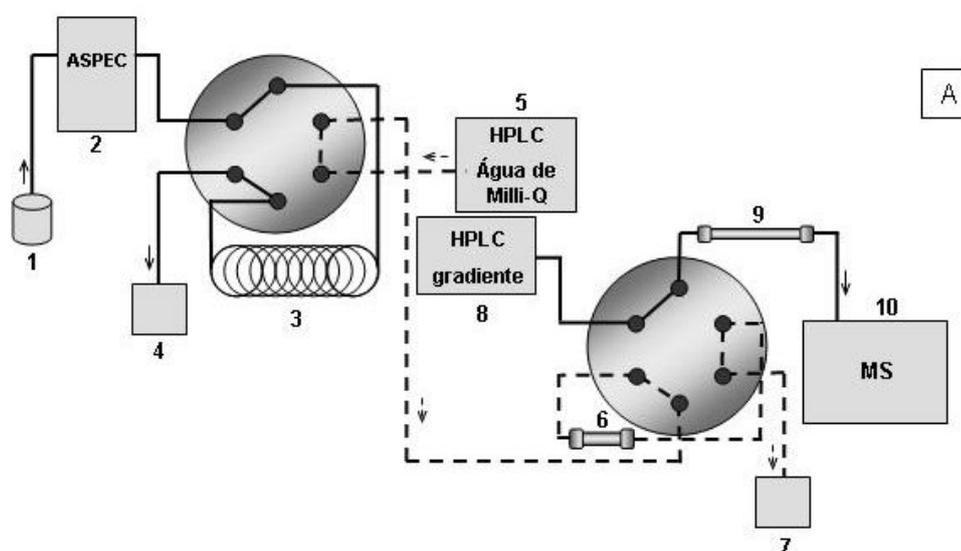


Figura 12. A) Introdução da amostra no sistema de injeção para o preenchimento da alça de amostragem; 1) amostra, 2) sistema ASPEC, 3) alça de amostragem e 4) resíduo

Para o desenvolvimento do procedimento *on-line* foram utilizados 100 mL de amostra (1) pré-tratada e fortificada (item 4.5) sendo que desta 16 mL foram introduzidos por meio do sistema ASPEC (2) (Figura 11, 1). Como o sistema ASPEC possui seringa para sucção da amostra (diluidor) de capacidade de 10 mL, foram programadas duas alíquotas de 8 mL para garantir que a alça de amostragem, com capacidade de 10 mL (3), estivesse completamente preenchida. O excesso de amostra (em teoria 6 mL) seguiu diretamente para o resíduo (4) (Figura 12).

Durante esta etapa (A), enquanto ocorresse o processo de preenchimento da alça de amostragem, a bomba de HPLC, que transportará os compostos da alça para a coluna de TFC (5) (Figura 11, 3) e a bomba que eluirá os compostos para a

coluna analítica (8) (Figura 11, 2), já estão em funcionamento. Isso para garantir que as tubulações e as colunas estejam limpas, sem apresentar resíduos da amostra analisada anteriormente (para evitar *overloading*).

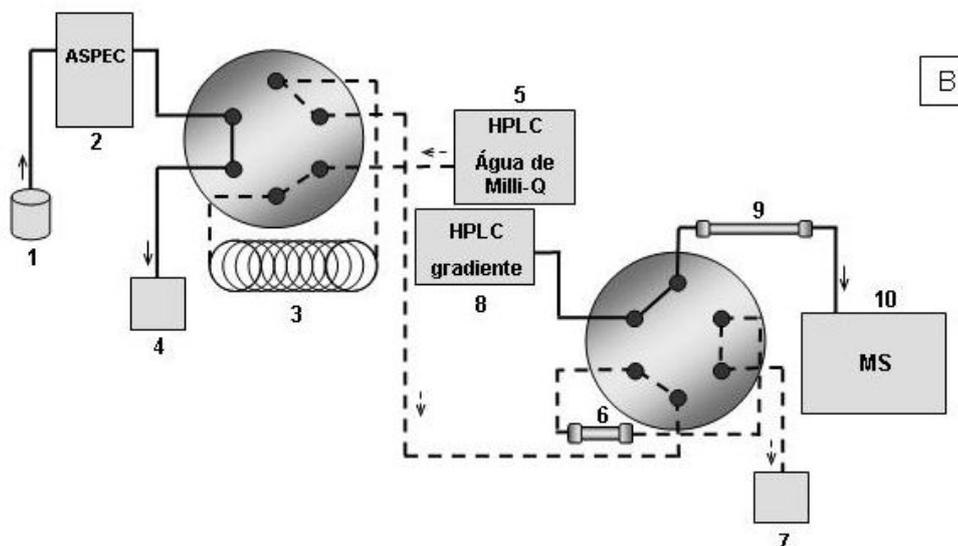


Figura 13. B) Etapa de transferência da amostra contida na alça de amostragem e limpeza da coluna de TFC; 5) Bomba de HPLC, 3) alça de amostragem, 6) coluna de TFC e 7) resíduo

Após as duas alíquotas de 8 mL serem transportadas para a alça de amostragem, as válvulas eram trocadas de posição de forma que a bomba com vazão de 4 mL min^{-1} tivesse sua fase móvel direcionada para a alça de amostragem, para transportar a amostra ali contida diretamente para a coluna de TFC (Figura 13, B). Além do transporte, uma etapa de lavagem foi necessária para que as interferências de alta massa molar ou pequenas partículas hidrofílicas presentes na amostra, que não interagissem com os poros da coluna, fossem removidos pelo fluxo turbulento formado na mesma. Para tal, após a total transferência da amostra, durante um determinado tempo (definido após o teste de volume de *breakthrough*) a alça de amostragem recebeu fase móvel, sob vazão de 4 mL min^{-1} (5) em direção a coluna de TFC (6) e frasco de resíduo (7). Para esta etapa foram testados 5% etanol e 100% água ultra-pura como solventes para a fase móvel e a vazão de 4 mL min^{-1} , como sugerido pelo fabricante da coluna TurboFlow®.

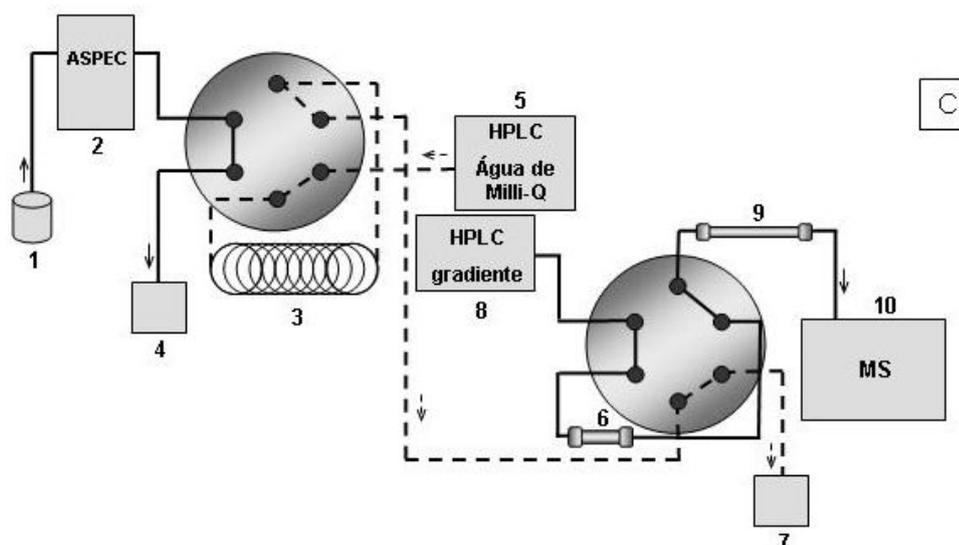


Figura 14. C) Eluição dos compostos retidos na coluna de TFC para a coluna analítica; 8) bomba de HPLC, 6) coluna de TFC, 9) coluna de C18 e 10) MS

Após o tempo de transferência dos compostos da alça de amostragem para a coluna de TFC, as válvulas trocaram de posição (Figura 14, C). Neste momento um gradiente composto por metanol: água (8) a uma vazão de $0,2 \text{ mL min}^{-1}$ começou a eluir os compostos retidos nos poros das partículas da coluna de TFC para a coluna analítica contendo fase estacionária C18 (9) (Figura 11, 2). Nesta etapa os princípios ativos foram separados e introduzidos no espectrômetro de massas (10) para identificação e quantificação (Figura 11, 4).

Para a otimização do tempo de análise, o sistema foi programado de forma que, 12 min antes de terminar a corrida cromatográfica a próxima corrida já pudesse começar a ser preparada (limpeza do ASPEC e preenchimento da alça) (Apêndice A).

4.9 Análise dos solventes (“branco dos solventes”)

Realizou-se o teste em branco para avaliar se os solventes utilizados em todo o processo, apresentavam interferências nos tempos de retenção dos princípios ativos em estudo. Para tal, os solventes utilizados foram injetados no sistema cromatográfico (coluna de TFC e analítica) seguido de todo procedimento de análise.

4.10 Avaliação de amostras para uso como “branco”

Na ausência de material de referência, as amostras obtidas comercialmente em supermercados de Amsterdam, Holanda, foram avaliadas para uso como “amostra branco” no processo de validação. Foram utilizados: vinho tinto (Cabernet-sauvignon + Merlot, Chile), vinho branco (Sauvignon blanc, Chile) e vinho rose (África do Sul). Essas amostras foram submetidas ao procedimento de extração para verificar a presença ou não dos compostos em estudo.

4.11 Avaliação do Efeito Matriz

Sabe-se que a matriz vinho é uma matriz bastante complexa, apresentando por exemplo, diferentes compostos polifenólicos de baixa massa molar que podem interferir na análise proposta. Com a finalidade de confirmar a necessidade do uso da matriz durante todo o estudo desenvolvido, realizaram-se os cálculos de efeito matriz para uma das concentrações estudadas ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) em vinho tinto. O cálculo foi efetuado através da Equação 5.

$$\text{EfeitoMatriz}\% = \frac{x_m - x_s}{x_s} \times 100 \quad (5)$$

Onde:

x_m = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada flavonóide, preparadas no extrato da matriz;

x_s = inclinação da curva obtida pela injeção das soluções analíticas de cada flavonóide, preparadas em metanol (solvente);

Assim, verificou-se se a matriz exerce efeito positivo (aumento de sinal) ou negativo (decréscimo de sinal) sobre o resultado da análise. Quando o resultado for acima de 10% considera-se que o efeito matriz começa a exercer influência nas análises (ZROSTLÍKOVÁ *et al.*, 2001).

4.12 Validação do procedimento

Definidas as melhores condições de separação para os compostos em estudo, validou-se o procedimento segundo os parâmetros descritos no item 2.9.

4.12.1 Curva analítica

As curvas analíticas para os compostos em estudo foram obtidas preparando-se as mesmas em matriz na faixa de concentração de 5 a 200 $\mu\text{g L}^{-1}$ descritas na Tabela 3 (item 4.5), contendo no máximo 7 pontos. Para as amostras que apresentaram princípios ativos antes da realização da etapa de fortificação, foi necessária a realização de curvas de adição padrão. Para tal, as concentrações presentes na Tabela 4 (item 4.5) foram utilizadas. Cada solução foi injetada em triplicata no sistema TFC-LC-MS obtendo-se a área e o tempo de retenção de cada um dos compostos com o auxílio do *software* XcaliburTM. O gráfico da área x concentração foi obtido com auxílio do programa Microsoft Office[®] Excel 2003.

4.12.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

Para determinar o LOD e o LOQ dos compostos estudados as matrizes foram fortificadas adicionando soluções trabalho com concentrações conhecidas nas matrizes em estudo.

Para determinar o LOD foram feitas injeções em ordem decrescente de concentração até atingir áreas dos picos da ordem de três vezes superior em relação ao ruído da linha base no tempo de retenção dos picos de interesse. Para o LOQ, a concentração, cuja área dos picos foi dez vezes superior em relação ao ruído da linha base no tempo de retenção dos picos de interesse.

Nesse trabalho, o LOD e o LOQ foram estabelecidos com base na Figura 9, onde o LOD corresponde a 3 vezes o ruído da linha de base e o LOQ corresponde à concentração que produz uma relação sinal-ruído superior a 10. Mediu-se, com auxílio de um paquímetro, a altura do ruído próximo ao tempo de retenção dos compostos e determinou-se a concentração que corresponde a 3 e 10 vezes essa altura.

4.12.3 Precisão do método

O ensaio de precisão interdia do método foi avaliado efetuando-se o procedimento de extração das matrizes fortificadas em 3 níveis de fortificação, utilizando as concentrações listadas na Tabela 3. Cada nível de concentração foi analisado seis vezes.

Para o ensaio de precisão intradia do método efetuou-se o procedimento de extração e análise da amostra “branco” fortificadas utilizando as concentrações listadas na Tabela 3). Cada nível de concentração foi analisado três vezes, em dias diferentes e com analistas diferentes.

4.13 Aplicação do procedimento desenvolvido

Para avaliar a aplicabilidade do método desenvolvido, foram utilizadas amostras obtidas comercialmente em supermercados de Amsterdam, Holanda. A Tabela 6 apresenta as amostras de vinho branco, rosé e tinto, as variedades das uvas e o país de procedência das amostras.

Tabela 6. Dados das amostras reais utilizadas após a validação do procedimento desenvolvido para a avaliação do mesmo

Amostras	Variedade da uva	Procedência
1	Sauvignon blanc (branco)	Chile
2	Blanc (branco)	Itália
3	Blanc (branco)	Itália
4	Rosé	África do Sul
5	Tinto	França
6	Bonarda (tinto)	Argentina
7	Cabernet sauvignon + Merlot (tinto)	Chile
8	Red (tinto)	África do Sul

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Escolha do modo de ionização e demais condições para o Espectrômetro de Massas

APCI no modo negativo provou ser excelente para ser utilizada em análise de flavonóides e resveratrol, em concordância com a literatura (JUSTESEN, 2000; RIJKE, *et al.*, 2003) na qual foi comparada ESI e APCI nos modos negativo e positivo.

Após a otimização do APCI no modo negativo obteve-se os seguintes valores:

- ✓ temperatura do capilar: 225 °C
- ✓ temperatura de vaporização: 450 °C
- ✓ voltagem do capilar: -35 V
- ✓ *tube lens*: 20 V
- ✓ corrente da corona de descarga: 10 µA
- ✓ vazão do gás de nebulização (nitrogênio): 60 AU
- ✓ vazão do gás de auxiliar (nitrogênio): 20 AU

Para seleção dos ions percursores no MS/MS, as condições ótimas obtidas foram:

- ✓ intervalo de isolamento (antes da fragmentação): 1.5 m/z
- ✓ energia de colisão (Normalized collision energy): 35%

5.2 Seleção do padrão interno

Para a seleção do padrão interno selecionou-se dois estrogênios: β -estradiol e 17 α -etinilestradiol cujas estruturas são similares a dos compostos em

estudo e também por não estarem presentes nas matrizes. Para a seleção considerou-se o tempo de retenção e a sensibilidade do sinal. Os dois princípios ativos poderiam ser utilizados como padrão interno no método de extração desenvolvido, porém, o β -estradiol apresenta massa molar similar (m/z 272,39) ao composto naringenina (Tabela 2). Uma vez que para a identificação dos analitos em estudo utilizou-se as massas moleculares preferiu-se utilizar um padrão interno com massa molar diferente o que não interferiria na identificação dos mesmos. Para tal, 17 α -etinilestradiol foi utilizado.

5.3 Gradiente otimizado para a eluição e separação dos compostos na coluna de fase reversa

O gradiente otimizado (Tabela 5, gradiente 4) consistiu em partir da concentração de metanol de 5 à 45% em 1 min, permanecendo nesta concentração por 10 min, de 45 à 100% em 15 min, permanecendo nesta concentração por 5 min e de 100% de volta a concentração inicial de 5% em 1 min, permanecendo por 5 min para reequilibrar a coluna. Com este gradiente obteve-se boa separação dos compostos na coluna de C18.

5.4 Avaliação do volume de *Breakthrough* para a coluna de TFC

Conforme descrito no item 4.7, realizou-se o estudo do volume de *breakthrough*.

Os testes foram iniciados com a solução analítica ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$) com concentração de 10% (v/v) de etanol. Para este teste os compostos começaram a eluir em menos de 1 min ($< 1 \text{ mL}$) após a introdução da solução na coluna de TFC. Para 5% de etanol, o tempo de eluição foi em torno de 32 min (32 mL) e a solução com 2,5% mostrou aumento do sinal da linha de base após 72 min (72 mL) bem como para a solução contendo 100% de água ultra-pura.

Como o *breakthrough* pode ser causado por saturação (*overloading*) da coluna de TFC, realizou-se os mesmos testes com soluções menos concentradas

(25 $\mu\text{g L}^{-1}$). Os testes apresentaram volumes de *breakthrough* similares provando que os resultados não são provenientes de saturação da coluna de TFC (Tabela 7).

Tabela 7. Valores dos volumes de *breakthrough* calculados utilizando-se o tempo de *breakthrough*, a vazão de 1 mL min^{-1} e o volume morto, para as diferentes concentrações de princípios ativos e etanol avaliados

Etanol (%)	2,5 mg L ⁻¹				0,25 mg L ⁻¹			
	0%	2,5%	5%	10%	0%	2,5%	5%	10%
Princípios ativos	Volume (mL)				Volume (mL)			
Resveratrol	32	32	30	1	32	32	30	7
Daidzeína	> 50	> 50	32	1	> 50	> 50	32	11
Genisteína	> 50	> 50	32	1	> 50	> 50	32	11
PI	> 50	> 50	32	1	nd	nd	nd	nd

nd: não detectado

De todas as substâncias estudadas, resveratrol é o princípio ativo mais polar (como verificado injetando-se o mesmo na coluna de C18) portanto, o volume de *breakthrough* deste é o mais importante. Como obteve-se para as duas concentrações testadas, aproximadamente, 32 mL pode-se seguramente trabalhar com volumes menores que este. Desta forma, optou-se por trabalhar com 24 mL, que é o volume em que a fase móvel (100% água) carrega os compostos presentes na alça de amostragem para a coluna de TFC e resíduo.

5.5 Avaliação da etapa de preparo de amostra empregando TFC

Devido a complexidade da matriz e tendo como base o volume de *breakthrough* testado, a diluição testada primeiramente foi a de 1:3. Como em média o vinho possui 12% de teor alcoólico, diluindo-se 4 vezes (1:3, v/v) teria-se em torno de 3% de álcool (modificador orgânico na amostra), o que segundo a Tabela 7, não perderia-se compostos na coluna de TFC.

Porém, verificou-se que, realizando a diluição 1:3 algumas matrizes, teriam uma perda muito grande de sinal. Como o vinho possui uma grande

quantidade de compostos polifenólicos de baixa massa molar (FLAMINI, 2003) e uma vez que algumas destas substâncias são apolares estas poderiam entrar nos poros da coluna de TFC e interagir com as partículas C18. Por este motivo, foi necessário uma maior diluição (1:9, v/v) das amostras para se obter maior detectabilidade no sistema LC-MS.

A etapa de preparo de amostras otimizada para os compostos estudados consistiu na injeção de 10 mL de amostra, diluída 10 vezes (1:9, em água ultra-pura, v/v) injetada no sistema TFC-LC-MS, seguido de 6 min (24 mL) para o carregamento e limpeza da coluna de TFC com 100% água. Após este tempo, o gradiente otimizado (item 5.3) teve início, carreando os compostos da coluna de TFC para a coluna de C18, onde foram separados e posteriormente identificados e quantificados no espectrômetro de massas.

5.6 Avaliação do branco dos solventes e das amostras para uso como “branco”

Os solventes passaram pelo procedimento TFC-LC-MS conforme descrito no item 5.5, sem a presença de princípios ativos para a verificação de possíveis interferentes nos tempos de retenção dos princípios ativos estudados. O cromatograma do teste em branco está representado na Figura 15, sendo que este não apresentou interferências para os tempos de retenção dos compostos em estudo.

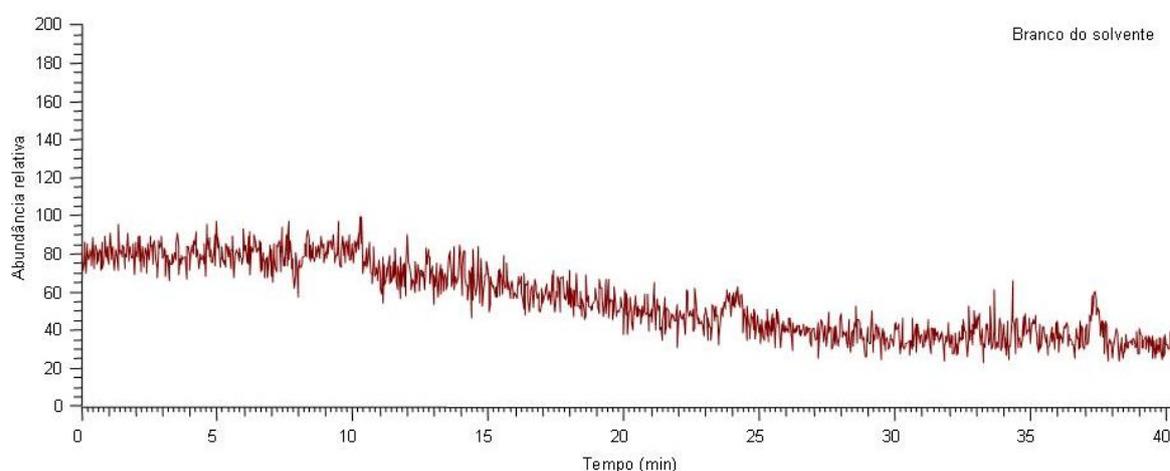


Figura 15. Cromatograma obtido após injeção de solvente (etanol:água, 1:9, v/v)

Na ausência de amostras de referência isentas de flavonóides e resveratrol, amostras obtidas comercialmente na Holanda foram avaliadas para uso como “branco”, conforme descrito no item 4.10. Para fins de comparação de tempos de retenção, para as matrizes estudadas são mostrados os cromatogramas de amostras fortificadas na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (Figuras 16, 17 e 18)

Como pode ser visto nas figuras, obteve-se o cromatograma de íon total (TIC) para as amostras, nas condições otimizadas do procedimento. Para serem visualizadas as substâncias em estudo, filtrou-se o cromatograma de forma que só fossem visualizados os compostos de interesse. Para tal, selecionou-se para o intervalo de massa, a massa de cada um dos compostos, com a janela de massa m/z 1. Isto significa que o intervalo utilizado foi a massa da substância em estudo (m/z) -0,5 até +0,5.

Como utilizou-se APCI no modo negativo, foi utilizado o valor de massa molar da substância menos uma unidade como por exemplo, para hesperetina de massa molar 302, utilizou-se a massa 301 no cromatograma de íon extraído.

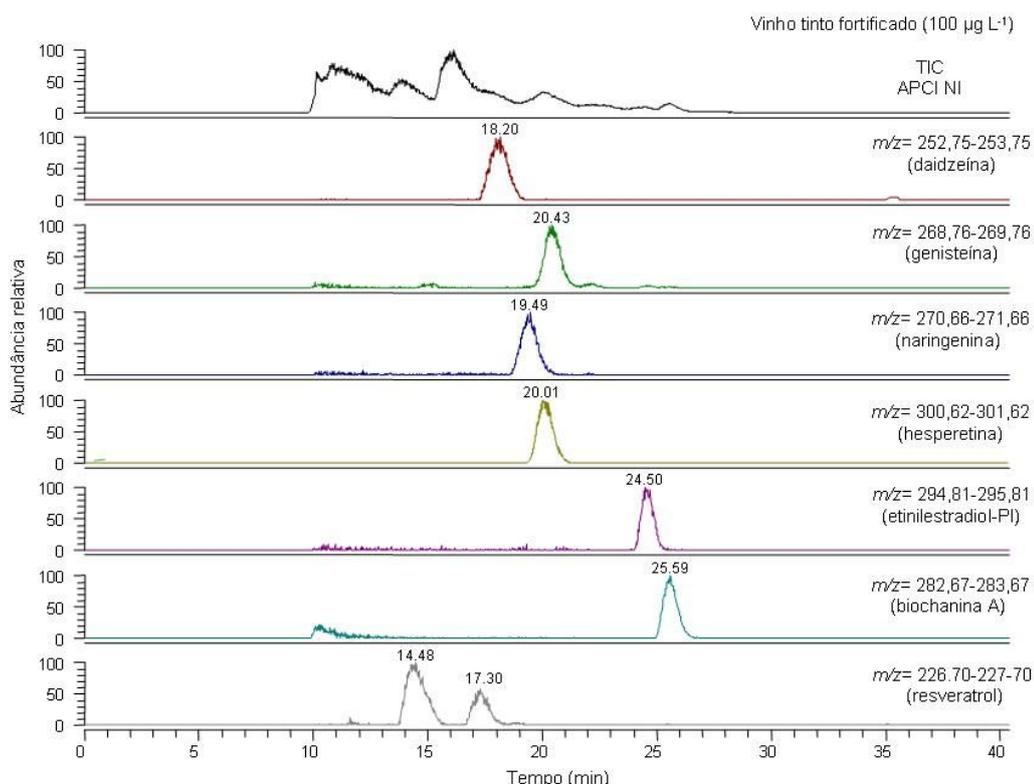


Figura 16. Cromatograma de íon total da amostra de vinho tinto, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$

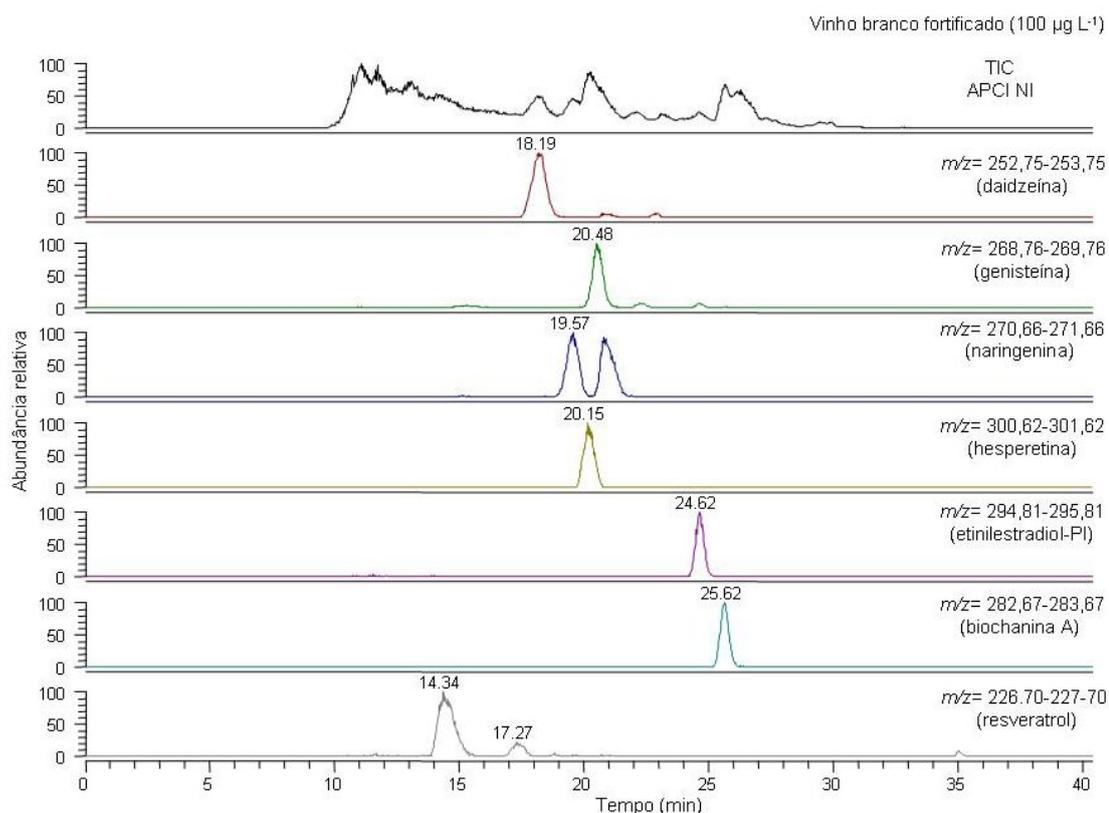


Figura 17. Cromatograma de íon total da amostra de vinho branco, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de $50 \mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração $100 \mu\text{g L}^{-1}$

No cromatograma para a amostra de vinho branco (Figura 17) e vinho rosé (Figura 18), verificou-se um pico de um composto interferente ao lado do padrão da naringenina. Quando comparados os cromatogramas da menor concentração empregada ($5 \mu\text{g L}^{-1}$) até a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ mostrada na figura acima, visualiza-se um aumento no sinal do primeiro pico (naringenina), enquanto que o pico do interferente permaneceu o mesmo em todos os níveis de fortificação. Além disso, o tempo de retenção foi comparado com o de uma solução analítica contendo todos os compostos em estudo, verificando-se assim que este sinal era de uma substância interferente.

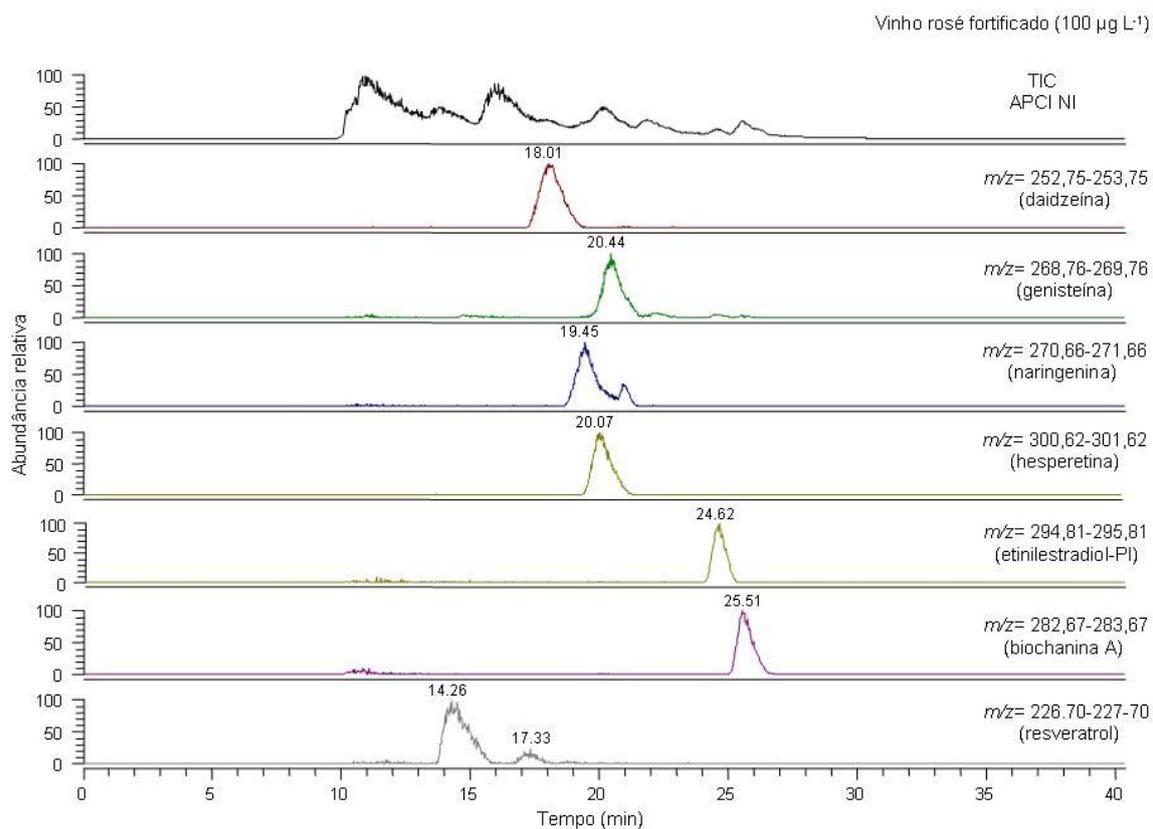


Figura 18. Cromatograma de íon total da amostra de vinho rosé, fortificado com os princípios ativos: daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina, padrão interno etinilestradiol (na concentração de 50 $\mu\text{g L}^{-1}$), biochanina A e resveratrol; tendo como concentração 100 $\mu\text{g L}^{-1}$

A análise dos vinhos tinto, branco e rosé, após submetidos às condições otimizadas de extração, sem fortificação com as substâncias em estudo (apenas padrão interno), apresentaram interferências da matriz no tempo de retenção dos princípios ativos hesperetina (tempo médio de 20,1 min) e resveratrol (tempos médios de 14,4 e 17,3 min). O vinho tinto apresentou um sinal maior para a hesperetina como pode ser visualizado nos cromatogramas conforme pode ser observado nas Figuras 19, 20 e 21. Desta forma, para verificar se o princípios ativos estavam presentes na matriz ou descartar possíveis compostos interferentes no mesmo tempo de retenção realizou-se MS/MS dos mesmos.

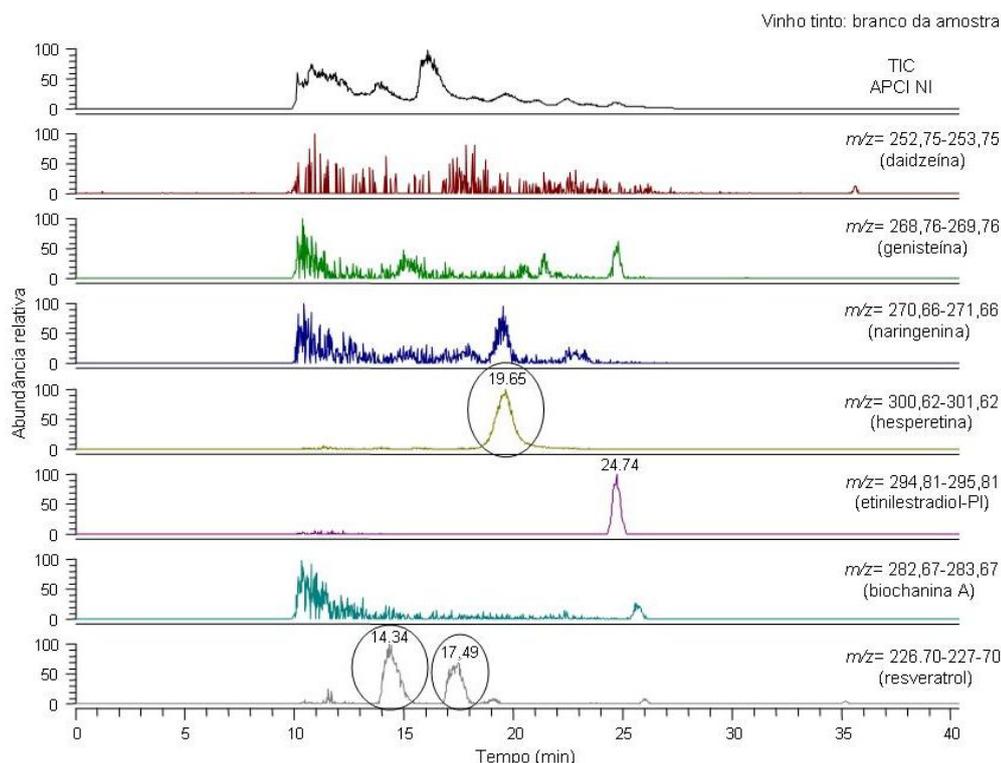


Figura 19. Cromatograma para vinho tinto no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 5.5)

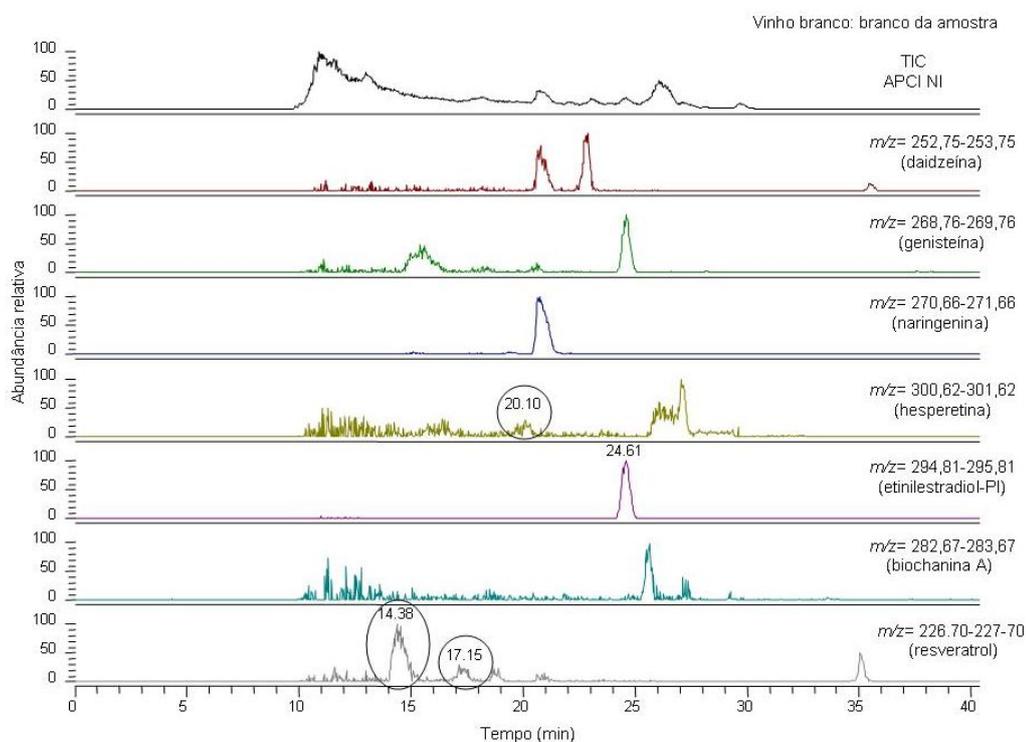


Figura 20. Cromatograma para vinho branco no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 5.5)

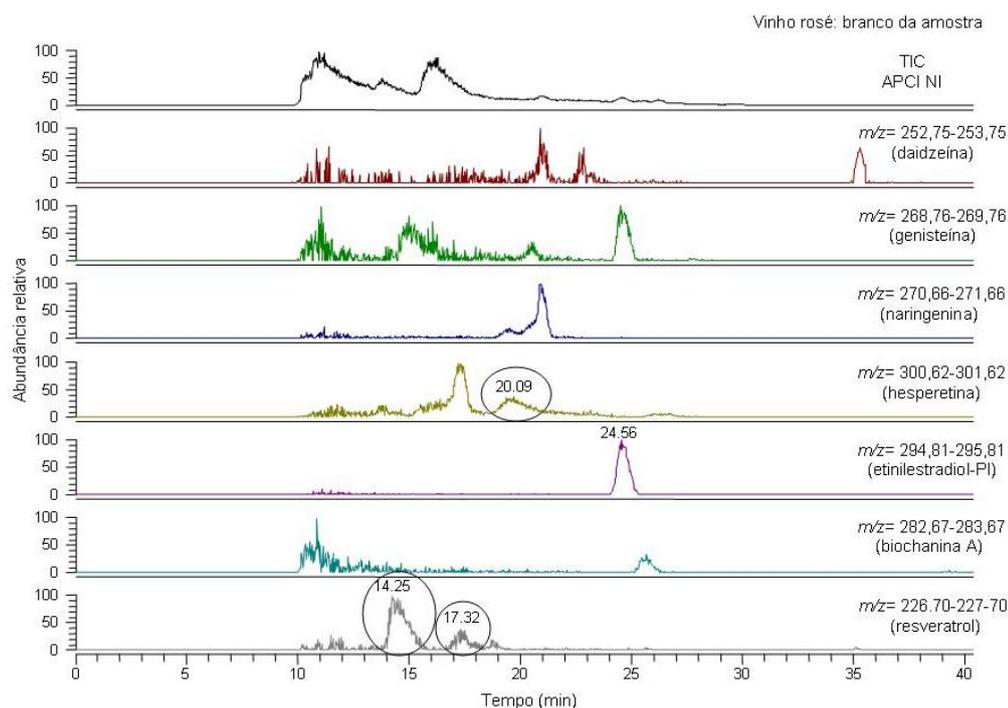


Figura 21. Cromatograma para vinho rosé no modo de íon total e nos intervalos de massas para os sete princípios ativos e padrão interno em estudo (obtido após extração conforme descrito no item 5.5)

5.6.1 Testes para confirmação da substância presente no tempo de retenção da hesperetina

Para que fosse confirmada ou descartada a presença de hesperetina na amostra que seria utilizada como amostra branco, foi necessária a realização de testes de MS/MS. Como verificou-se um maior sinal de hesperetina na amostra de vinho tinto, os testes para a confirmação da presença desta substância foram realizados nesta matriz.

Primeiramente foi realizada a otimização das condições para fragmentação da substância presente com a mesma massa da hesperetina. Para tal, o intervalo de isolamento (*isolation width*) do padrão hesperetina (5 mg L^{-1}) foi otimizado. Foram testados 1, 1,5, 2 m/z e o valor obtido para este composto foi de 1,5 m/z . Nas análises em que se realizou apenas MS (como descrito no item anterior), utilizou o valor de isolamento de 1 m/z (-0,5 até +0,5 m/z). Desta forma, o intervalo para o MS/MS foi mais abrangente.

A energia de colisão normalizada (“*normalized collision energy*”), foi otimizada variando-se entre os valores de 25 a 45%, sendo 35% escolhido como o melhor valor, por se obter uma melhor fragmentação. Com estes valores obteve-se boa fragmentação sem muita perda de sinal no TIC (Figura 22).

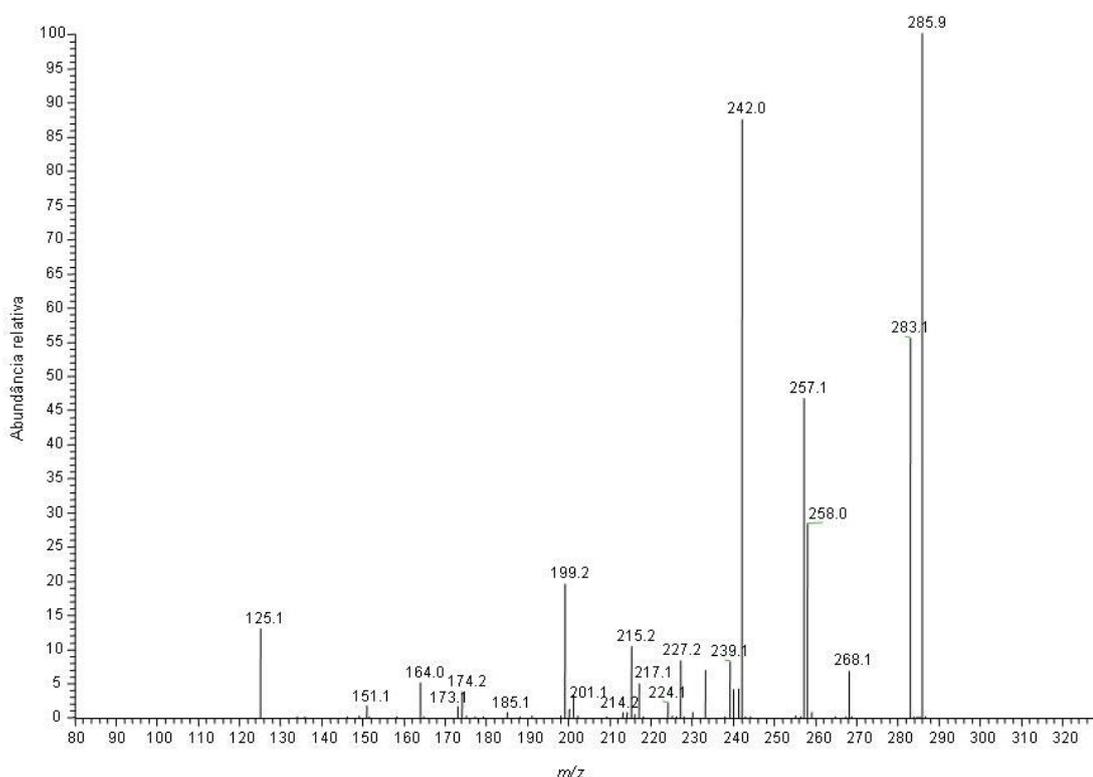


Figura 22. Espectro de massas (MS/MS) da solução padrão de hesperetina (5 mg L^{-1}) para verificação da presença ou não de interferente na amostra no mesmo tempo de retenção e mesma massa molar (intervalo de isolamento de $1,5 \text{ m/z}$, com energia de fragmentação de 35% ($1,75 \text{ V}$))

Após verificados os fragmentos gerados pelo padrão da hesperetina (Figura 22), realizou-se a injeção de uma amostra de vinho tinto onde foi adicionado apenas o padrão interno para o acompanhamento da injeção. Os *scans* durante a corrida foram obtidos alternando MS total e MS/MS do íon 301,15 (utilizando as condições otimizadas, descritas acima) (Figura 23).

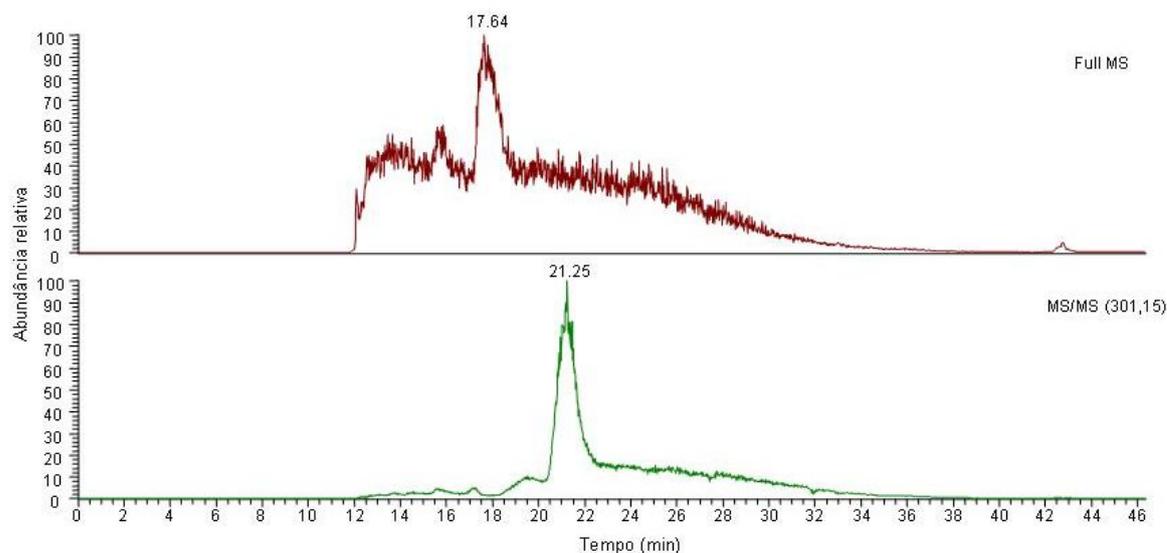


Figura 23. Cromatogramas: *Full MS* (MS total) e *MS/MS* para a massa 301,15, obtidos injetando-se amostra de vinho tinto não fortificada para confirmação da hesperetina na matriz a ser utilizada como branco da amostra

Na Figura 23 têm-se o cromatograma *Full MS* e o cromatograma *MS/MS*, e ao mesmo tempo a massa isolada (filtrada) de 301,15 tendo *MS/MS* somente desta (por este motivo visualiza-se apenas um pico no segundo cromatograma).

Como não foi adicionado o padrão de hesperetina na matriz injetada, o pico e os fragmentos encontrados para o pico da Figura 23 devem ser provenientes apenas do composto com o mesmo tempo de retenção e massa da hesperetina como se vê na amostra branco (Figura 19).

A Figura 24 apresenta o espectro de massas do pico no tempo de retenção de 21,25 min. Se forem comparados os espectros de massas presentes nas Figuras 16 e 19 verifica-se que os fragmentos, obtidos com a substância padrão de hesperetina e da substância presente na amostra, os mesmos são diferentes, confirmando a presença de um interferente no mesmo tempo de retenção e massa que a da hesperetina.

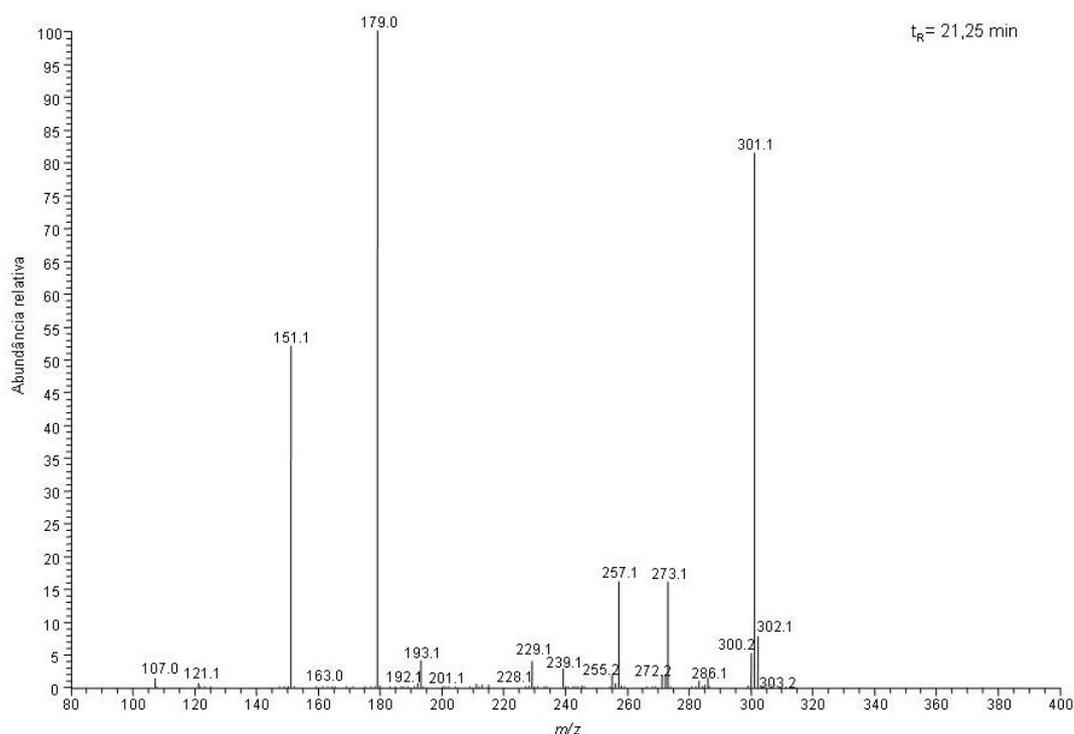


Figura 24. Espectro de massas do pico cromatográfico obtido realizando-se MS/MS no intervalo de massa m/z 301. O composto apresenta o tempo retenção de 21,25 min e os fragmentos obtidos podem ser comparados com os fragmentos do padrão de hesperetina (Figura 19)

Após verificar as massas para as substâncias avaliadas (Figura 22 e 24), realizou-se a injeção da amostra utilizando como intervalo as massas 242 (pode ser visto no espectro de massas da hesperetina) e 179 (pode ser visto no espectro de massas da outra substância). Estas massas foram escolhidas por serem únicas para cada um dos compostos, tornando a investigação mais específica.

Na Figura 25 têm-se os cromatogramas obtidos isolando-se os íons de m/z 179 e 242. Esta etapa foi realizada para verificar os tempos de retenção dos íons selecionados, para avaliar se a substância presente era mesmo a hesperetina. Para tal, foi injetada solução fortificada com solução padrão de hesperetina na concentração de 100 mg L^{-1} e 50 mg L^{-1} de padrão interno (17α -etinilestradiol).

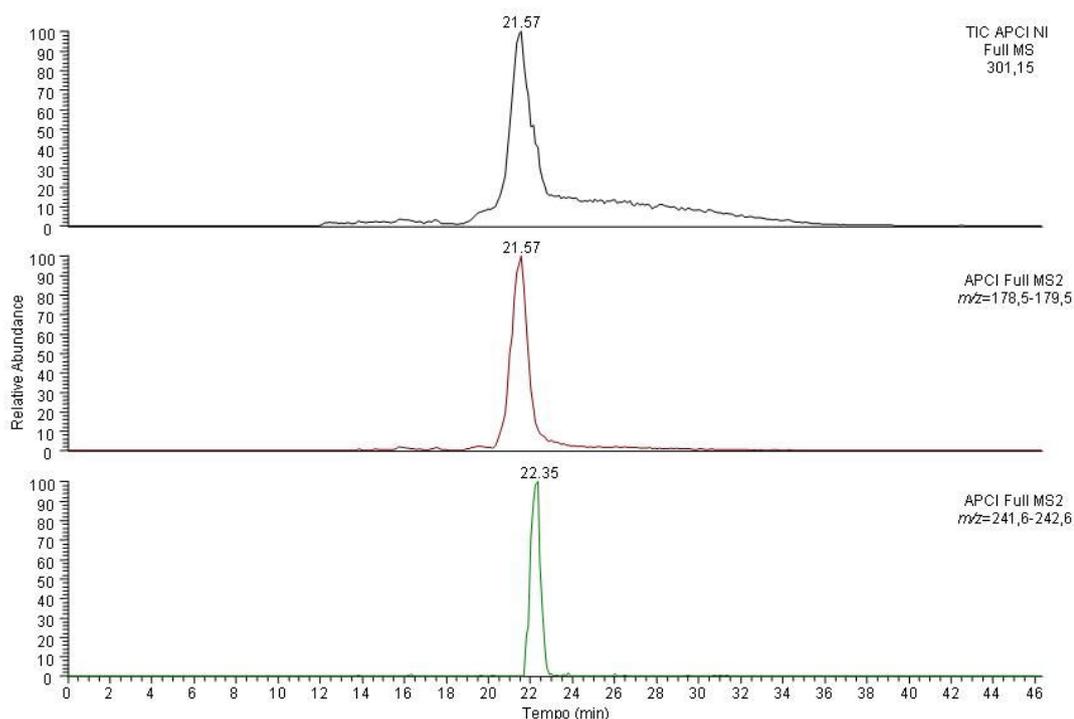


Figura 25. Cromatograma de íon total da amostra de vinho tinto fortificado com a solução padrão de hesperetina (100 mg L^{-1} e PI 50 mg L^{-1}); o segundo cromatograma é o obtido para o íon m/z 179 (específico para a substância desconhecida) e o íon m/z 242,1 (íon específico da hesperetina)

Comparando-se os cromatogramas pode-se visualizar o tempo de retenção do composto hesperetina (m/z 242,1) e da substância interferente (m/z 179), apresentando-se distintos.

Em virtude dos fragmentos escolhidos para estes testes serem únicos para ambos os compostos, e os tempos de retenção para estes fragmentos terem se mostrado diferentes, pode-se afirmar que a substância presente na amostra a ser utilizada como branco da matriz não é o flavonóide hesperetina.

Como o íon 242,1 é específico para hesperetina, e nas demais matrizes também foi verificada a presença de um pico no mesmo tempo de retenção e massa que os da hesperetina, foi necessário a utilização de SRM (do inglês, *Single Reaction Monitoring*) para todas as amostras estudadas para se quantificar o flavonóide em estudo e não a substância interferente.

5.6.2 Testes para confirmação das substâncias presentes nos tempos de retenção do resveratrol

Como foram detectados picos nos mesmos tempos de retenção e mesmo intervalo de massas da substância resveratrol, para as matrizes de vinho tinto, branco e rosé, realizaram-se testes para a confirmação das substâncias, assim como foram realizados os testes com a hesperetina (intervalo de isolamento de 1,5 m/z ; energia de colisão de 35%).

Primeiramente, o padrão de *trans*-resveratrol foi injetado em fluxo (*flow injection*) para obter-se o espectro de massas do mesmo (Figura 26).

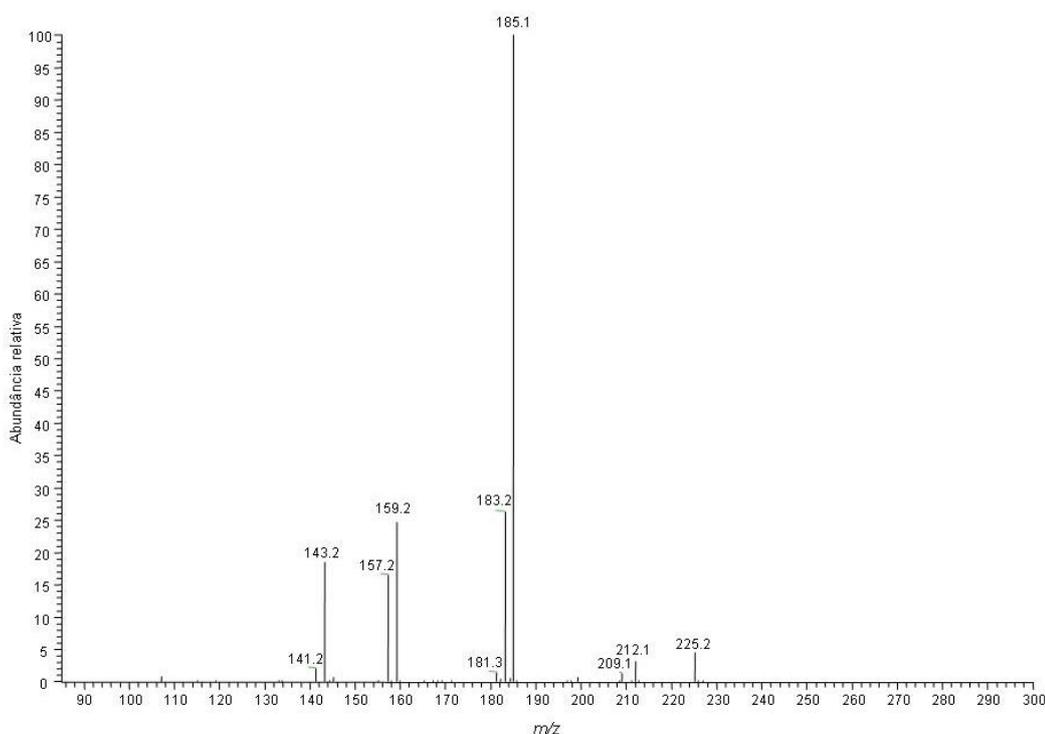


Figura 26. Espectro de massas da injeção em fluxo do padrão de *trans*-resveratrol para a verificação dos fragmentos do mesmo

Posteriormente, realizou-se a injeção da amostra de vinho tinto (utilizando o sistema completo) sem fortificação. Obteve-se o cromatograma total da amostra, seguido de *Full MS* e *MS/MS* para o íon m/z 227 (massa do resveratrol).

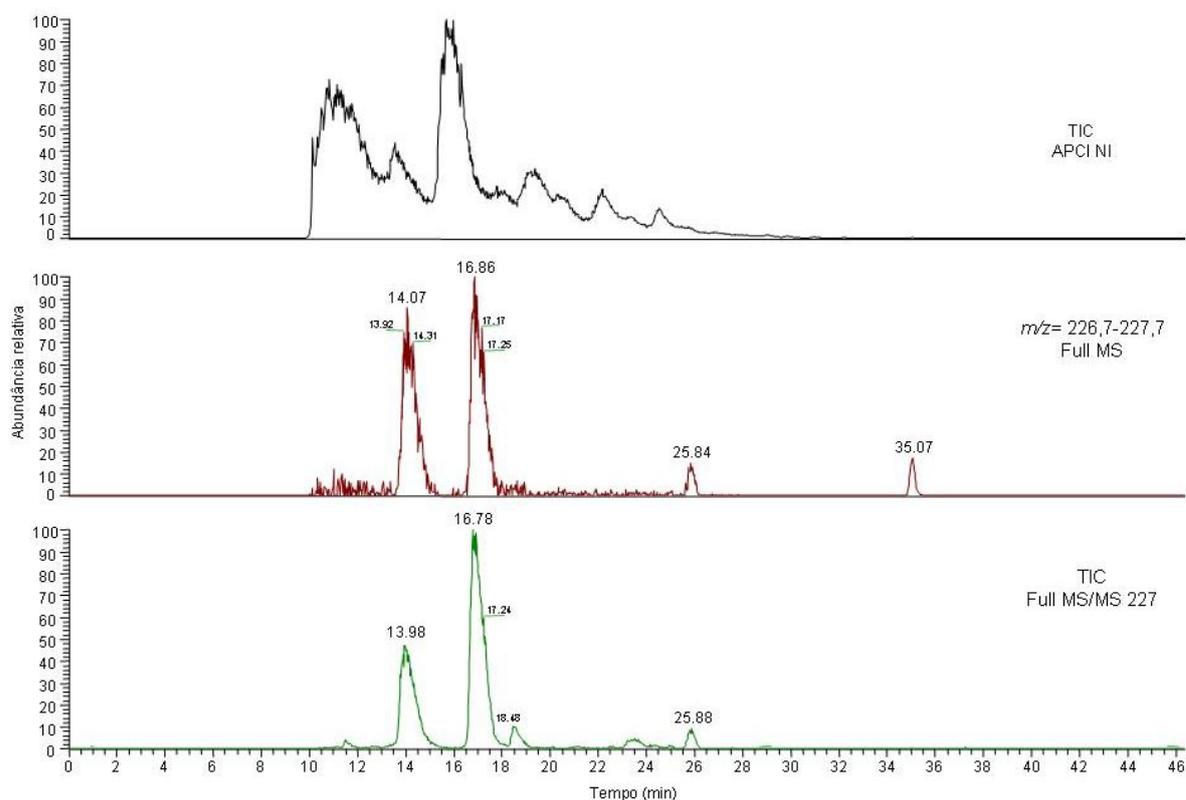


Figura 27. Análise de vinho tinto utilizando todo o sistema de análise (TFC-LC-MS) sem adição do padrão resveratrol. Verifica-se o cromatograma de íon total, *Full MS* e *MS/MS*

No *Full MS* (m/z 227) e *MS/MS* (m/z 227) (Figura 27), obteve-se o cromatograma das substâncias com os tempos de retenção médio de 14,03 e 16,82 min.

Comparando-se os espectros de massas obtidos do padrão de resveratrol (Figura 26) com o obtido no tempo de retenção 14,07 min (Figura 28) verifica-se que as substâncias são muito similares. O mesmo ocorre com a substância no tempo de retenção 16,8 min (Figura 29). Esta similaridade comprova a presença de *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol na amostra a ser utilizada como branco. Isto ocorre para as diferentes matrizes (vinhos tinto, branco e rosé).

Como já citado na parte teórica deste estudo, o resveratrol apresenta propriedades bastante importantes e, por esse motivo, vem sendo cada vez mais estudado. Relatos da presença destes dois compostos no vinho podem também serem encontrados na literatura (MONTSKO *et al.*, 2007; MONTORO *et al.*, 2004; DOMÍNGUEZ *et al.*, 2001; BUIARELLI *et al.*, 2006). BUIARELLI *et al.* (2006) em seu estudo verificaram similar espectro de massas ao obtido na Figura 26 confirmando

da mesma forma a presença de *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol nas amostras estudadas neste trabalho.

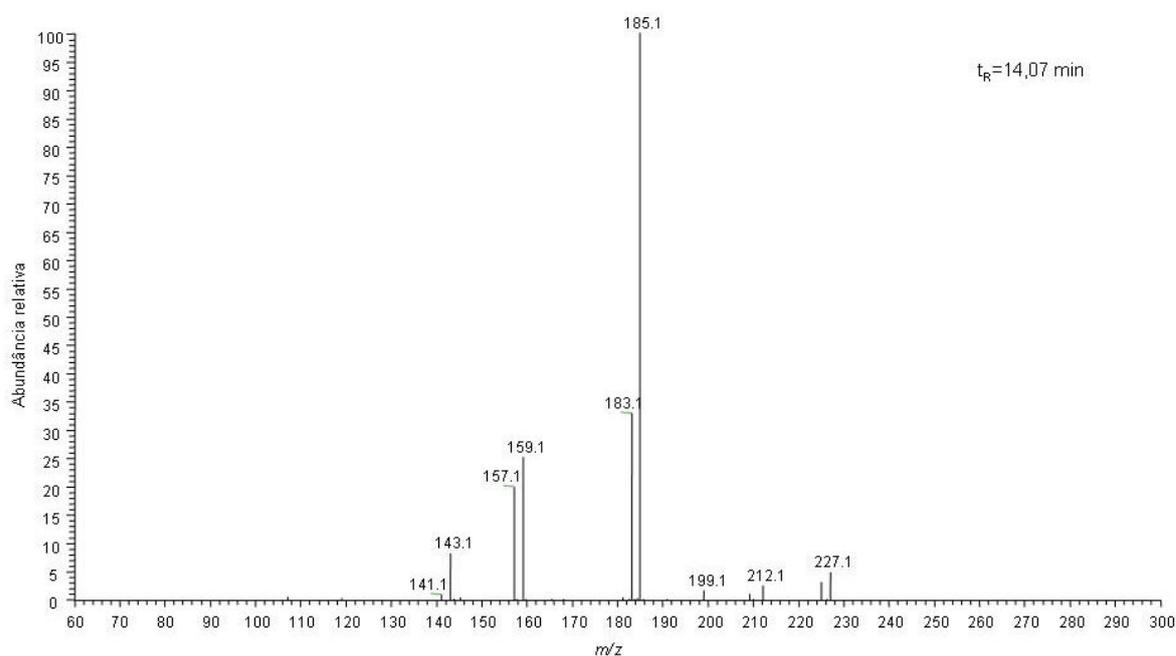


Figura 28. Espectro de massas (MS/MS) do composto no tempo de retenção 14,07 min para ser comparado com o espectro de massas do padrão de resveratrol (Figura 26)

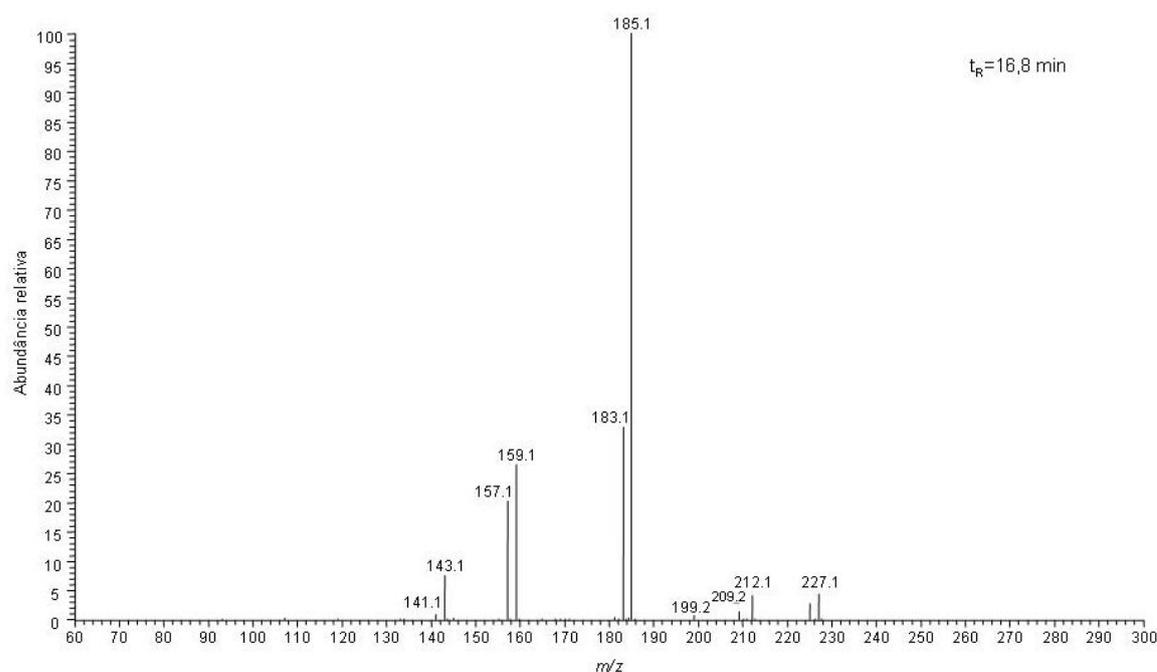


Figura 29. Espectro de massas (MS/MS) do composto no tempo de retenção 16,8 min para comparação com o espectro de massas do padrão de resveratrol (Figura 26)

A Figura 27 apresenta dois picos nos tempos de retenção 25,84 e 35,07 min que poderiam ser representativos uma vez que foram obtidos para o intervalo de massas de m/z 227 (assim como para *cis*-resveratrol e *trans*-resveratrol).

Por este motivo, comparou-se os espectros de massas obtidos para estas substâncias (Figuras 30 e 31) com o espectro da Figura 26, verificando-se que ambos apresentaram espectros bastante diferentes do padrão de resveratrol, sendo então considerados interferentes da matriz vinho.

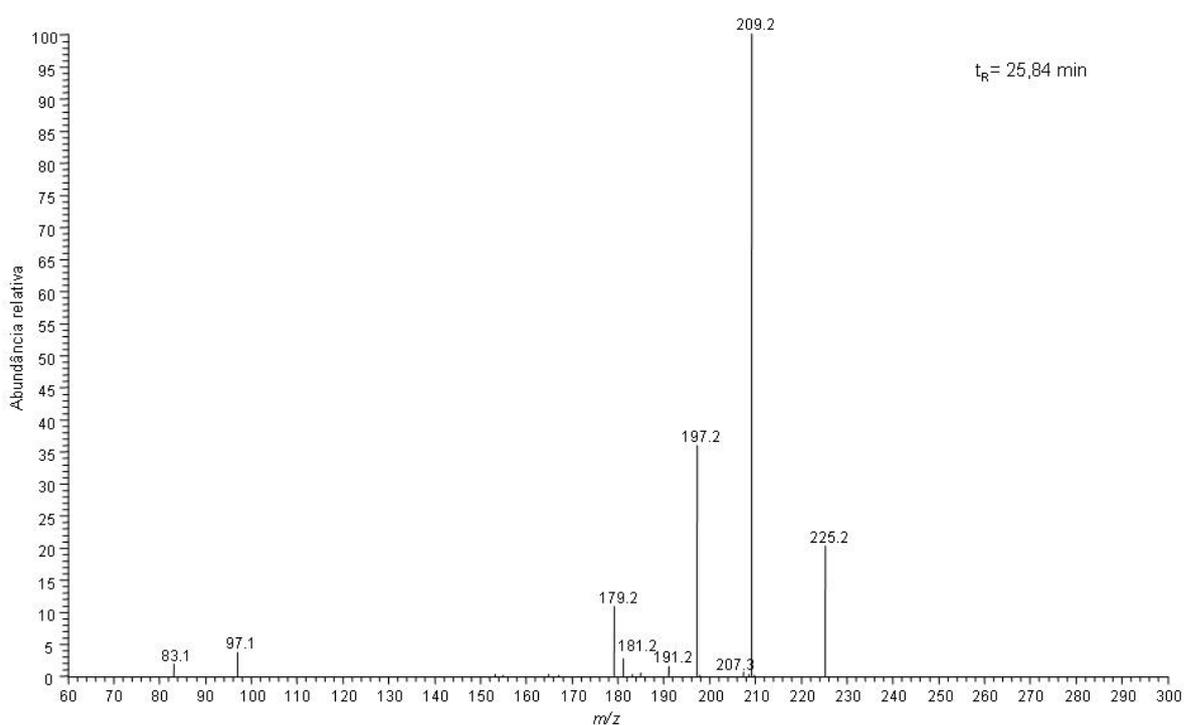


Figura 30. Espectro de massas (MS/MS) do composto no tempo de retenção 28,5 min para comparação com o espectro de massas do padrão resveratrol (Figura 26)

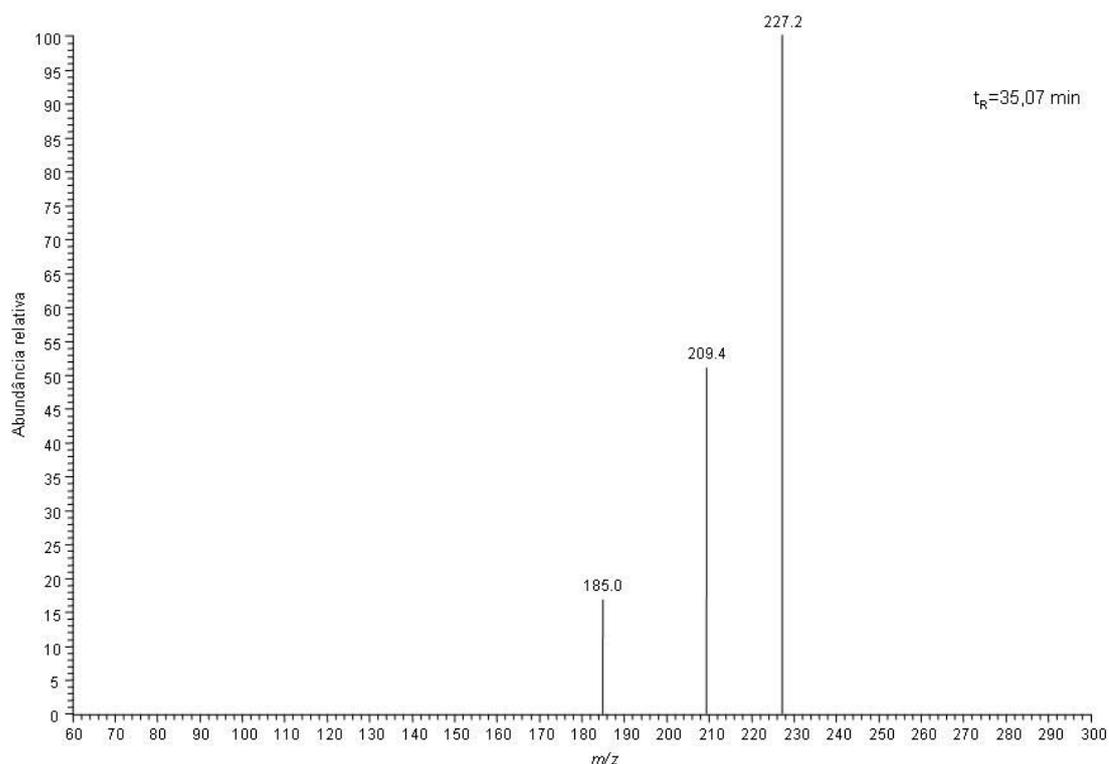


Figura 31. Espectro de massas (MS/MS) do composto no tempo de retenção 35,07 min para comparação com o espectro de massas do padrão resveratrol (Figura 26)

5.6.2.1 Testes para verificação dos tempos de retenção do *cis* e *trans*-resveratrol

Como já foi verificado no item 5.6.2, dois picos com a mesma massa molar são detectados aproximadamente nos tempos de retenção 14 e 17 min. Sabe-se que o resveratrol apresenta-se em duas formas isômeras, *cis* e *trans*. Para ter certeza do tempo de retenção dos isômeros, foram preparadas duas soluções, uma sem proteção do frasco da ação da luz UV do laboratório e outra protegendo-se o frasco, baseando-se no princípio de que o *cis*-resveratrol é instável (sensível) à presença de luz. As soluções foram preparadas nas concentrações de 50 mg L^{-1} , contendo padrão interno na mesma concentração e injetadas ($10 \mu\text{L}$) no sistema de LC-MS apenas com coluna analítica C18 (sem coluna de TFC). Posteriormente, injetou-se em todo o sistema, como verificado nas Figuras 32 e 33.

O cromatograma da Figura 32 demonstra os picos obtidos nos tempos de retenção 14,9, 17,6 (resveratrol) e 24,7 min (17 α -etinilestradiol, padrão interno).

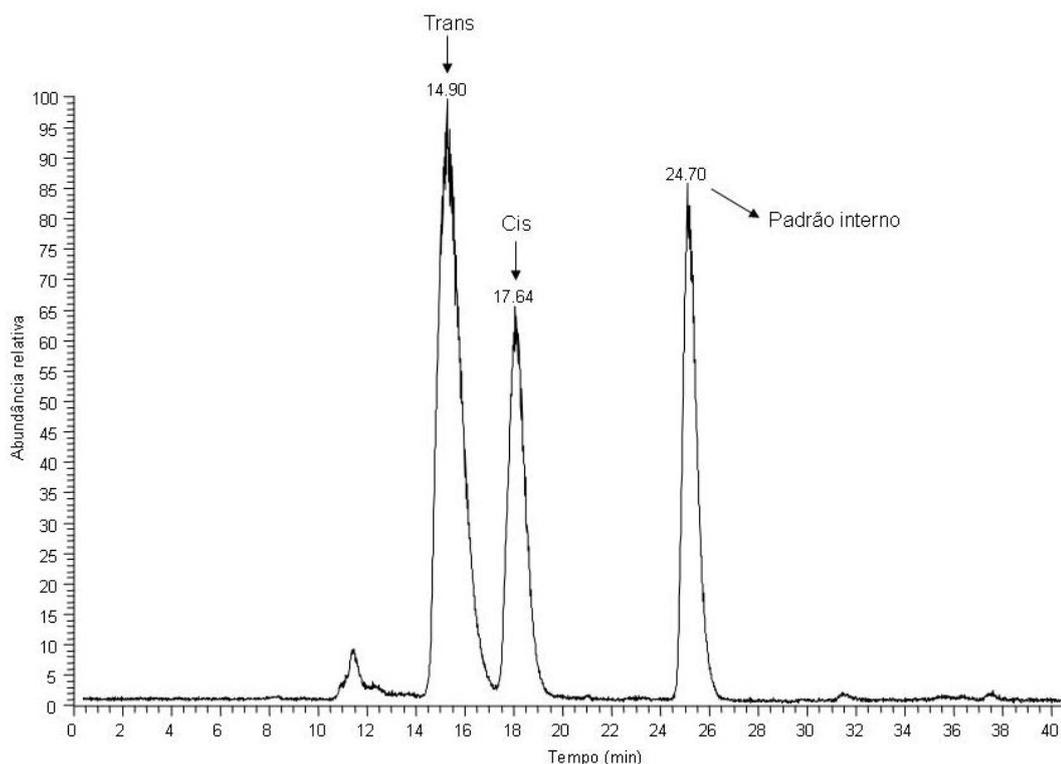


Figura 32. Cromatograma da solução de *trans*-resveratrol e padrão interno (50 mg L⁻¹), preparada e armazenada sem contato com a luz UV e injetada na coluna analítica

O cromatograma da Figura 33, em que a solução utilizada não sofreu ação da luz UV até o momento da análise apresentou picos nos tempos de retenção 14,9, 17,6 e 24,7 min.

Como pode ser observado, no cromatograma da Figura 32, obtido com a solução não protegida, verifica-se um intenso sinal para ambos os compostos. No cromatograma da Figura 33, no qual o padrão de *trans*-resveratrol foi preparado sob proteção contra a luz ultravioleta até o momento de sua injeção, o sinal em 14,96 min é mais intenso.

Na literatura, diferentes trabalhos identificam os compostos *cis* e *trans*-resveratrol utilizando-se HPLC-UV. Estes indicam o primeiro pico como sendo *trans*-resveratrol e o segundo *cis* (TRELA, 1996; MONTSKO, 2007), assim como foram verificados nos resultados obtidos nos testes realizados neste trabalho.

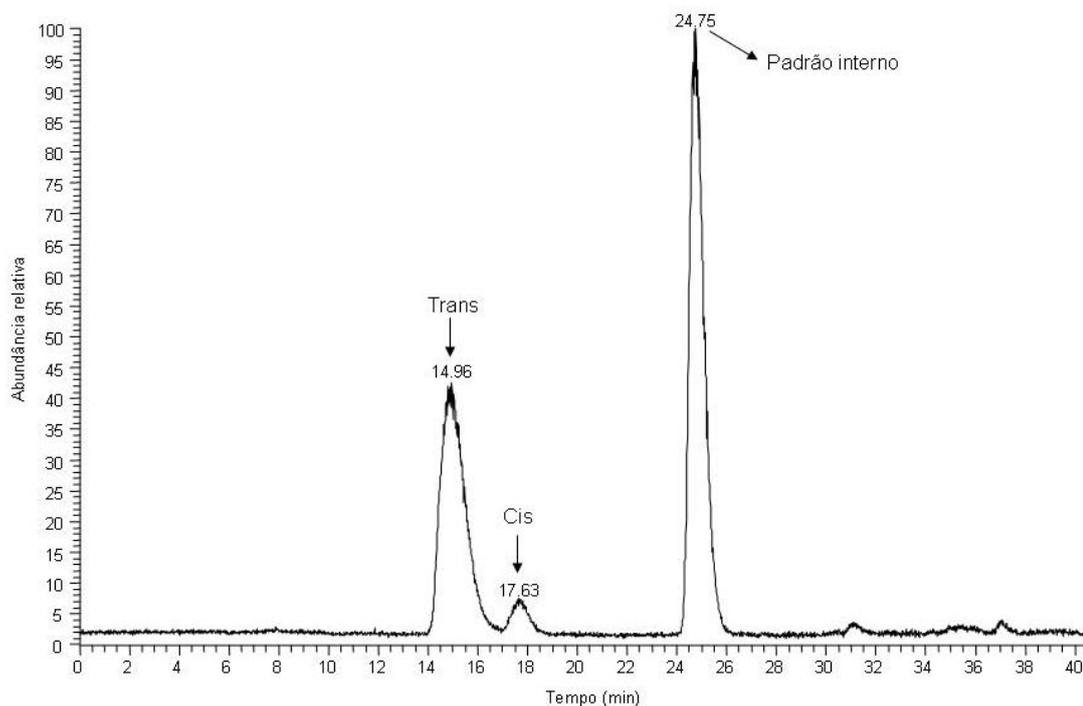


Figura 33. Cromatograma da solução de *trans*-resveratrol e padrão interno (50 mg L⁻¹), preparada e armazenada sem contato com luz UV e injetada na coluna analítica

5.7 Validação do procedimento analítico desenvolvido

Definidas as melhores condições de separação para os compostos estudados, o passo seguinte foi a avaliação da metodologia para análise, segundo os parâmetros descritos na seqüência. Como as curvas analíticas bem como todos os testes foram realizados utilizando-se a matriz (injetando-se a matriz diretamente no sistema *on-line*), os testes de recuperação não puderam ser calculados. Isto porque o procedimento para a construção das curvas analíticas e os experimentos para recuperação são idênticos (HILL & REYNOLDS, 1999).

5.7.1 Curva analítica

Para a construção das curvas analíticas verificou-se primeiramente se as análises sofreriam influência do efeito matriz (item 4.11). Para tal, preparou-se uma solução 1:9 (etanol:água, v/v) e uma solução utilizando a mesma diluição com vinho

tinto, ambos na concentração $5 \mu\text{g L}^{-1}$. Após a injeção das soluções no sistema TFC-LC-MS realizou-se o cálculo para verificação de efeito matriz. Como obtiveram-se valores acima de 99% concluiu-se que, como já esperado, deve-se fazer o uso de soluções analíticas preparadas em matriz para a quantificação dos compostos em estudo, em virtude da grande quantidade de interferentes de baixa massa molar presentes no vinho.

Prepararam-se soluções analíticas, conforme descrito no item 4.5. A Tabela 8 (vinho tinto), 9 (vinho branco) e 10 (vinho rosé) apresentam os intervalos lineares, os r^2 e as equações das curvas obtidas com as soluções analíticas preparadas em matriz, para todos os compostos estudados.

Tabela 8. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho tinto, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS

Princípios ativos	Intervalo Linear (mg L^{-1})	r^2	Equação da curva
Biochanina A	0,05 – 2	0,9958	$y = 19537998x - 30263227$
Daidzeína	0,05 – 2	0,9826	$y = 24273098x - 38923289$
Genisteína	0,05 – 2	0,9920	$y = 15377954x + 100102777$
Hesperetina	0,05 – 2	0,9886	$y = 2338077x - 4470499$
Naringenina	0,05 – 2	0,9809	$y = 18970127x - 33627345$
Resveratrol	1 – 50	0,9958	$y = 2905443x + 1252370540$

Para a construção da curva analítica para o resveratrol em vinho tinto, utilizou-se concentrações mais altas, uma vez que o mesmo apresenta-se no branco da matriz em maiores concentrações. Para tal, utilizou-se o método de adição padrão, onde as amostras foram fortificadas e injetadas do sistema TFC-LC-MS bem como o branco da amostra. Posteriormente, construiu-se uma curva analítica relacionando as quantidades da substância adicionada a amostra com as respectivas áreas obtidas. A extrapolação da reta definiu, no eixo das abscissas, a concentração da substância na amostra analisada (Figura 8, item 2.9.1). Os valores

obtidos para as curvas analíticas para o resveratrol foram todas consideradas satisfatórias.

Tabela 9. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho branco, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS

Princípios ativos	Intervalo Linear (mg L ⁻¹)	r ²	Equação da curva
Biochanina A	0,05 – 2	0,9996	y= 15620922x + 21759819
Daidzeína	0,05 – 1	0,9992	y= 17610208x + 25648642
Genisteína	0,05 – 1	0,9987	y= 16473093x + 46487985
Hesperetina	0,05 – 1	0,9953	y= 1445664x + 7060203
Naringenina	0,05 – 2	0,9978	y= 15652186x + 98620996
Resveratrol	0,05 – 2	0,9999	y= 87579000x + 183908583

Tabela 10. Parâmetros das curvas analíticas obtidas para os princípios ativos preparados em vinho rosé, diluído 1:9 (v/v) de etanol em água ultra-pura e analisados por LC-MS

Princípios ativos	Intervalo Linear (µg L ⁻¹)	r ²	Equação da curva
Biochanina A	0,05 – 2	0,9996	y= 21162393x – 16439106
Daidzeína	0,05 – 2	0,9984	y= 19888936x + 86097940
Genisteína	0,05 – 2	0,9967	y= 18660386x + 157705870
Hesperetina	0,05 – 1	0,9969	y= 2245345x + 7428900
Naringenina	0,05 – 1	0,9997	y= 20770358x + 13266199
Resveratrol	0,05 – 2	0,9984	y= 10769910x + 365985136

Analisando-se as equações das curvas obtidas pode-se concluir que o modelo linear é bastante adequado já que os coeficientes de determinação (r^2) foram todos maiores que 0,9953, o que segundo a literatura é satisfatório. (BRASIL, 2003; INMETRO, 2003; RIBANI *et al.*, 2004). Apenas alguns valores para vinho tinto mostraram valores abaixo de 0,9920 entretanto, ainda considerados satisfatórios para análise de resíduos.

5.7.2 Limite de Detecção e Limite de Quantificação

A Tabela 11 apresenta os valores de LOD e LOQ nas matrizes estudadas (conforme item 4.12.2). Assim como para todos os procedimentos realizados neste estudo, primeiramente realizou-se a diluição das amostras 1:9 (v/v) com água de milli-Q. Posteriormente, realizou-se a filtração das amostras e fortificação para posterior injeção no sistema TFC-LC-MS. Desta forma, após estimar os valores de limite de detecção e quantificação, estes foram multiplicados por 10 para se ter o real valor.

Tabela 11. Resultados cromatográficos de LOD e LOQ em $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de vinhos tinto, branco e rose estudadas

Princípios ativos	Vinho tinto		Vinho branco		Vinho rosé	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
Biochanina A	11,0	36,0	5,0	18,0	6,0	21,0
Daidzeína	16,0	54,0	7,0	24,0	13,0	42,0
Genisteína	22,0	73,0	7,0	22,0	12,0	40,0
Hesperetina	4,0	73,0	10,0	32,0	19,0	64,0
Naringenina	11,0	15,0	2,0	6,0	3,0	9,0
Resveratrol	18,0	60,0	21,0	70,0	34,0	113,0

Como os valores de LOD e LOQ foram determinados injetando-se as matrizes fortificadas, os interferentes presentes na matriz (compostos de massa molar e afinidade similar ao dos compostos estudados) permaneceram na coluna de TFC e foram concentrados juntamente com os compostos em estudo. Desta forma, levando-se em consideração a complexidade das matrizes analisadas, pode-se considerar os resultados como sendo muito bons.

Para obter-se menores valores de LOD e LOQ uma outra etapa de limpeza da coluna de TFC, antes da eluição dos compostos para a coluna de fase reversa, utilizando-se diferentes solventes poderia ser avaliado.

5.7.3 Precisão do método

As Tabelas 12 e 13 apresentam os valores de repetitividade (*interday* ou *interday*) do método, bem como os resultados encontrados para os ensaios precisão intermediária (*intradia* ou *intraday*) para a resposta, em termos de área, das matrizes fortificadas com os princípios ativos nas referidas concentrações. O teste de precisão em termos de repetitividade foi feito injetando-se três diferentes concentrações, três vezes cada padrão. O teste de precisão intermediária foi realizado em dois dias diferentes, injetando-se três vezes cada padrão (três diferentes concentrações).

Tabela 12. Resultados de precisão interdia (em termos de repetitividade, RSD%) para as matrizes de vinho tinto, branco e rosé contendo a mistura dos compostos em estudo e PI. Condições conforme item 5.5

Princípios ativos	Concentração (mg L ⁻¹)	Precisão Interdia (RSD%)		
		Tinto	Branco	Rosé
Daidzeína	0,1	3,8	4,5	15,2
	0,5	2,4	7,4	5,8
	1	8,7	7,6	2,8
Genisteína	0,1	4,3	8,3	11,3
	0,5	8,2	11,1	4,7
	1	11,4	9,8	6,5
Naringenina	0,1	17,9	6,5	17,8
	0,5	5,2	7,1	17,5
	1	12,3	11,5	11,7
Hesperetina	0,1	3,7	8,4	11,0
	0,5	4,6	9,6	7,0
	1	10,5	8,7	4,7
Biochanina A	0,1	4,5	7,0	8,1
	0,5	6,7	8,4	4,7
	1	5,7	6,9	3,2
Resveratrol	0,1	17,8	12,3	17,4
	0,5	17,1	6,9	7,5
	1	16,1	10,2	4,5

n= 3 (três concentrações diferentes, injetadas três vezes cada)

Tabela 13. Resultados da precisão intradia (em termos de precisão intermediária, RSD%) para as matrizes de vinho tinto, branco e rosé contendo a mistura dos compostos em estudo e padrão interno. Condições conforme item 5.5

Princípios ativos	Concentração (mg L ⁻¹)	Precisão Intradia (RSD%)		
		Tinto	Branco	Rosé
Daidzeína	0,1	6,9	2,9	3,3
	0,5	2,9	0,6	2,6
	1	4,9	0,6	2,6
Genisteína	0,1	10,2	2,2	8,5
	0,5	6,2	0,5	0,5
	1	11,4	1,4	7,8
Naringenina	0,1	9,0	9,5	5,1
	0,5	7,0	2,6	1,9
	1	7,1	4,0	5,1
Hesperetina	0,1	11,2	1,4	2,6
	0,5	5,8	0,3	1,3
	1	11,3	2,8	0,9
Biochanina A	0,1	11,5	2,7	2,5
	0,5	4,6	0,5	0,2
	1	3,0	2,1	4,1
Resveratrol	0,1	7,9	6,9	5,7
	0,5	5,0	3,0	6,3
	1	5,0	4,0	5,8

n= 3 (três concentrações diferentes, injetadas três vezes cada)

Os resultados dos ensaios de precisão interdia e intradia obtidos para todas as concentrações das matrizes fortificadas são aceitáveis uma vez que estão dentro do limite aceito pelo roteiro de validação de métodos cromatográficos (SANCO, 2007), onde a precisão para valores de área deve ser $\leq 20\%$.

5.8 Aplicação do procedimento desenvolvido

O procedimento desenvolvido foi aplicado em 8 amostras de vinho de diferentes variedades de uvas, conforme procedimento descrito no item 5.5.

A aplicação do procedimento desenvolvido não apresentou dificuldades, pois durante as etapas de desenvolvimento e validação empregou-se amostras reais para os testes.

Tabela 14. Resultados encontrados empregando procedimento *on-line* desenvolvido em 8 amostras de vinho

Amostras	Vinho	Concentração de resveratrol ($\mu\text{g L}^{-1}$)
1	Branco	210,0
2	Branco	251,4
3	Branco	56,2
4	Rosé	339,8
5	Tinto	2011,3
6	Tinto	2912,8
7	Tinto	4310,4
8	Tinto	2121,4

Dos seis compostos estudados (5 flavonóides e resveratrol) apenas resveratrol foi encontrado nas amostras em que o procedimento foi aplicado.

O vinho tinto apresentou as maiores concentrações de resveratrol variando de 2,01 à 4,31 mg L^{-1} . Valores médios de resveratrol citados na literatura incluem: 0,13 mg L^{-1} na Califórnia (LAMUELA-RAVENTÓS & WATERHOUSE, 1993), 0,87 mg L^{-1} na Grécia (DOURTOGLOU *et al.*, 1999), 0,99 mg L^{-1} na Califórnia (GOLDBERG *et al.*, 1996), 2,57 mg L^{-1} no Brasil (SOUTO *et al.*, 2001), 1,21 mg L^{-1} no Chile e Argentina (GOLDBERG *et al.*, 1995).

A quantidade de resveratrol pode variar consideravelmente em diferentes tipos de vinhos, como dependendo da variedade da uva utilizada, fatores ambientais, técnicas para o cultivo da uva e técnicas de vinificação (LIMA *et al.*, 1999; SOUTO *et al.*, 2001), como pode-se observar nos resultados obtidos, listados na Tabela 14.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem concluir que o sistema TFC-LC-MS reflete suas vantagens principais na rapidez, simplicidade, confiabilidade e baixo consumo de solventes.

Por ser um método automatizado (*on-line*) faz-se necessário um sistema mais complexo, que exige diferentes equipamentos. Porém, o método *on-line* elimina e substitui muitas etapas de manuseio das amostras empregadas nos métodos tradicionais, uma vez que neste método são realizados como pré-tratamento a diluição e filtração das amostras seguido de injeção das mesmas no sistema TFC-LC-MS.

Neste método, o uso de modificadores orgânicos foi reduzido apenas pelo uso dos mesmos no gradiente para eluição dos compostos da coluna de TFC para a coluna analítica onde serão separados. Na etapa que utiliza a maior quantidade de solvente, a etapa de transferência dos compostos para a coluna de TFC e limpeza desta (emprega-se vazão de 4 mL min^{-1}) utilizou-se 0% de modificador orgânico, o que se mostra como vantagem para o método desenvolvido. Esta etapa reduz custos e os resíduos químicos gerados.

A realização de concentração das amostras pela quantidade de volume injetado é outra vantagem do método desenvolvido. Como a matriz vinho é bastante complexa, a diluição da mesma requer uma compensação que pode ser obtida injetando-se uma maior quantidade de amostra. Desta forma, baixas concentrações podem ser obtidas.

Por outro lado, a concentração das amostras também fez com que interferentes fossem concentrados. Para evitar estes interferentes, uma outra etapa de limpeza da coluna de TFC, utilizando diferentes solventes poderia ser avaliado, bem como testar colunas contendo materiais com diferentes mecanismos de retenção.

O uso do LC-MS com APCI no modo negativo de ionização proporcionou boa precisão e detectabilidade. Os LODs obtidos para vinho tinto variaram de 0,004 a 0,022 mg L⁻¹, vinho branco de 0,002 a 0,021 mg L⁻¹ e para vinho rosé de 0,003 a 0,034 mg L⁻¹.

Os parâmetros avaliados durante a etapa de validação foram considerados satisfatórios para a grande maioria dos compostos, pois estão de acordo com os valores sugeridos na literatura. As curvas analíticas se mostraram lineares dentro das suas respectivas faixas de aplicação. Para a faixa de 0,05 a 2 mg L⁻¹, para os princípios ativos biochanina A, daidzeína, genisteína, naringenina, hesperetina e resveratrol obteve-se $r^2 > 0,99$. Para o resveratrol em vinho tinto, foram necessárias concentrações maiores para os testes de linearidade, pois a amostra apresentava uma grande quantidade de resveratrol. Trabalhou-se na faixa de 1 a 50 mg L⁻¹, e para tal obteve-se $r^2 > 0,99$. Os ensaios de precisão também se mostraram-se satisfatórios para a maioria dos compostos, obtendo-se para todos os vinhos utilizados na validação valores < 18% para repetitividade e < 12% para precisão intermediária.

Na aplicação do procedimento desenvolvido verificou-se apenas a presença de resveratrol para todas as amostras analisadas, sendo que para vinho tinto encontrou-se uma maior quantidade deste composto comparado com os vinhos branco e rosé. Pode-se observar também que os diferentes vinhos apresentaram diferentes concentrações de resveratrol. Isto porque a concentração de resveratrol dependerá da variedade da uva, das condições climáticas durante a produção das uvas, do processo de vinificação e de armazenamento dos vinhos (LIMA *et al.*, 1999; SOUTO *et al.*, 2001).

A utilização de TFC-LC-MS na análise de vinho é uma novidade, uma vez que revisando-se a literatura verificou-se que a grande parte das aplicações utilizando-se TFC são para amostras biológicas e drogas (medicamentos) enquanto que apenas um trabalho foi realizado com pesticidas em água.

O trabalho desenvolvido pode ser uma poderosa ferramenta na determinação de outros analitos de interesse contidos em matrizes complexas, como por exemplo pesticidas e outros flavonóides em alimentos, bebidas e matrizes biológicas.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- ✓ Estudo de outros polifenóis presentes em vinho como as antocianinas, quercetinas, epicatequinas utilizando o sistema proposto.
- ✓ A avaliação dos vinhos de cultivares brasileiras desde o início da sua produção até o final do mesmo, verificando possíveis variações na sua composição.
- ✓ O estudo de outras bebidas como espumantes, licores e cerveja para verificar a presença dos flavonóides e resveratrol estudados.
- ✓ O estudo de polifenóis em vinho utilizando a coluna de TFC como método de *clean-up* e concentração utilizando diferentes técnicas para identificação e quantificação.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ASPERGER, A., *et al.* Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation. **Journal of Chromatography A**, v. 960, p.109-119, 2002.

BARCELÓ, D.; HENNION, M. C. **Trace determination of pesticides and their degradation products in water**. 3. ed., The Netherlands: Elsevier, 1997, 542 p.

BARNES, K. A., *et al.* Determination of pesticides diflubenzuron and clofentezine in plums, strawberries and blackcurrant-based fruit drinks by high-performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 9, p. 1441-1445, 1995.

BIGGS, D. R.; LANE, G. A. Identification of isoflavones calycosin and pseudobaptigenin in *Trifolium pretense*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 1683-1684, 1978.

BUIARELLI, F., *et al.* Chromatographic Analysis of Trans Resveratrol in Italian Wines: Comparisons between FL, UV and MS Detection. **Chromatographia**, v. 64, p. 475-481, 2006.

BRONNER, W. E; BEECHER, G. R. Extraction and measurement of prominent flavonoids in orange and grapefruit juice concentrates. **Journal of Chromatography A**, v. 705, p. 247-256, 1995.

CAO, Y. *et al.* Analysis of flavonoids in *Ginkgo biloba* L. and its phytofarmaceuticals by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 374, p. 294-299, 2002.

CHEN, H. Q.; JIN, Z. Y.; LI, G. H. Biochanin A protects dopaminergic neurons against lipopolysaccharide-induced damage through inhibition of microglia activation and proinflammatory factors generation. **Neuroscience Letters**, v. 417, p. 112-117, 2007.

CONSTANTINOU, A. I. *et al.* The soy isoflavone daidzein improves the capacity of tamoxifen to prevent mammary tumours. **European Journal of cancer**, v. 41, p. 647-654, 2005.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, p. 1-15, 2004.

DAVID, J. M. *et al.* Resveratrol: ações e benefícios à saúde humana. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano V, n. 10, maio, 2007. ISSN 1678-0493. Disponível na internet.< <http://www.ftc.br/dialogos>>. Acesso em 20 fev 2008.

DENG, F.; ZITO, S. W. Development and validation of a gas chromatographic-mass spectrometric method for simultaneous identification and quantification of marker compounds including bilobalide, ginkgolides and flavonoids in *Ginkgo biloba* L. extract and pharmaceutical preparations. **Journal of Chromatography A**, v. 986, p.121-127, 2003.

DOMÍNGUEZ, C.; GUILLÉN, D. A.; BARROSO, C. G. Automated solid-phase extraction for sample preparation followed by high-performance liquid chromatography with diode array and mass spectrometric detection for the analysis of resveratrol derivatives in wine. **Journal of Chromatography A**, v. 918, p. 303-310, 2001.

DOURTOGLOU, V. G. *et al.* *Trans*-resveratrol concentration in wines produced in Greece. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 12, p. 227-233, 1999.

DU, L.; MUSSON, D. G.; WANG, A. Q. High turbulence liquid chromatography online extraction and tandem mass spectrometry for the simultaneous determination of suberoylanilide hydroxamic acid and its two metabolites in human serum. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 1779-1787, 2005.

DURÁN-MERÁS, I.; GALEANO-DÍAZ, T.; AIRADO-RODRÍGUEZ, D. Post-column on-line photochemical derivatization for the direct isocratic LC-FLD analysis of resveratrol and piceid isomers in wine. **Food Chemistry**, v. 109, p. 825-833, 2008.

EL-SHAFAE, A. M.; EL-DOMIATY, M. M. Improved LC methods for the determination of diosmin and/or hesperidin in plants extracts and pharmaceutical formulations. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 26, p. 539-545, 2001.

EMBRAPA, Sistema de produção de uvas rústicas para processamento em regiões tropicais do Brasil. Embrapa Uva e Vinho, 2005. Disponível na internet. <<http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Uva/UvasRusticasParaProcessamento/mercado.htm>>. Acesso em 29 fev 2008.

EPA. **UCMR (1999) List 1 and List 2 Chemical Analytical Methods and Quality Control Manual**. Dez. 2001. Disponível em: <<http://www.epa.gov/safewater/standard/ucmr/qclist1chem.pdf>>. Acesso em 28 jan. 2008.

FABRE, N. *et al.* Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of American Society Mass Spectrometry**, v. 12, p. 707-715, 2001.

FAIRHURST, R. E.; *et al.* A direct comparison of the performance of ground, beaded and silica-grafted MIPs in HPLC and Turbulent Flow Chromatography applications **Biosensors and Bioelectronics**, v. 20, p. 1098-1105, 2004.

FANG, F. *et al.* Determination of red wine flavonoids by HPLC and effect of aging. **Food chemistry**, v. 101, p. 428-433, 2007a.

FANG, F. *et al.* Effects of grape variety, harvest date, fermentation vessel and wine ageing on flavonoid concentration in red wines. **Food Research International**, (2007b), doi:10.1016/j.foodres.2007.09.004.

FAO, Food and Agriculture organization of the United Nations, 2008. Disponível na internet. <<http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx>>. Acesso em 22 fev 2008.

FEINBERG, M.; RAGUÉNÉS, N. Development and application of a standardized validation procedure for food chemistry laboratories. **Analytica Chimica Acta**, v. 391, Issue 2, p. 239-252, 1999.

FERNANDEZ-ALBA, A. **Chromatographic-mass spectrometric food analysis for the trace determination of pesticides residues**. In. Comprehensive analytical chemistry. The Netherlands: Elsevier. 2005, 287 p.

FERNÁNDEZ, M.; *et al.* Determination of carbamate residues in fruits and vegetables by matrix solid-phase dispersion and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 871, p. 43-56, 2000.

FIAMENGOS, Y. C. *et al.* Analytical procedure for the in-vial derivatization—extraction of phenolic acids and flavonoids in methanolic and aqueous plant extracts followed by gas chromatography with mass-selective detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1041, p. 11-18, 2004.

FLAMINI, R. Mass Spectrometry in grape and wine chemistry. Part I: polyphenols. **Mass Spectrometry Reviews**, v. 22, p. 218-250, 2003.

GOLDBERG, D. M., *et al.* Direct Gas-Chromatographic-Mass Spectrometry Method to Assay trans-resveratrol in wines: Preliminary Survey of Its concentration in Commercial wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 43, n. 5, p. 1245-1250, 1995.

GOLDBERG, D. M. *et al.* Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. **Analytical Chemistry**, v. 88, p. 1688-1694, 1996.

GRIFFITH, A.; COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid-chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 913, p. 397-413, 2001.

HERMAN, J. L.; The use of turbulent flow chromatography and the isocratic focusing effect to achieve on-line cleanup and concentration of neat biological samples for low-level metabolite analysis. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 696-700, 2005.

HERMAN, J. L. Turbulent-Flow LC-MS, Principles and Applications, In: NIESSEN, W. M. A. **The Encyclopedia of Mass Spectrometry**, Hyphenated Methods, vol. 8. Elsevier: Oxford, 1^a ed. 2006. p. 205-216, p. 760-775.

HERNANDEZ F., *et al.* Strategies for quantification and confirmation of multi-class polar pesticides and transformation products in water by LC-MS using triple quadrupole and hybrid quadrupole time-of-flight analyzers. **TRENDS in Analytical Chemistry**, v. 24, p. 596-612, 2005.

HILL, A. R. C.; REYNOLDS, S. L. Guidelines for in-house validation of analytical methods for pesticide residues in food and animal feeds. **The Analyst**, v. 124, p. 953-958, 1999.

HOGENBOOM, A. C., *et al.* T. The role of column liquid chromatography-mass spectrometry in environmental trace-level analysis. Determination and identification of pesticides in water. **Journal of Separation Science**, v. 24, p. 331-354, 2001.

INMETRO; INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL. **DOQ-CGCRE-008**: Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. Brasília, 2003. 35 p.

JUSTESEN, U., KNUTHSEN, P., LETH, T. Quantitative analysis of flavonols, flavones, and flavonones in fruits, vegetables and beverages by high-performance liquid chromatography with photo-diode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 799, p. 101-110, 1998.

JUSTESEN, U. Negative atmospheric pressure chemical ionization low-energy collision activation mass spectrometry for the characterization of flavonoids in extracts of fresh herbs. **Journal of Chromatography A**, v. 902, p. 369-379, 2000.

KATAOKA, H.; LORD, H. L.; PAWLISZYN, J. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 880, p. 35-62, 2000.

KLEJDUS, B. *et al.* Determination of isoflavones in soybean food and human urine using liquid chromatography with electrochemical detection. **Journal of Chromatography B**, v. 806, p. 101-111, 2004.

KOLOUCHOVÁ-KOLOUCHOVÁ-HANZLÍKOVÁ, I.; *et al.* Rapid method for resveratrol determination by HPLC with electrochemical and UV detection in wine. **Food Chemistry**, v. 87, p. 151-158, 2004.

KRISTENSON, E. M. *et al.* Miniaturized automated matrix solid-phase dispersion extraction of pesticides in fruit followed by gas chromatographic–mass spectrometric analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 917, p.277-286, 2001.

KOPP, P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'?. **European Journal of Endocrinology**, v. 138, p. 619-620, 1998.

LAMUELA-RAVENTÓS, R.; WATERHOUSE, A. L. Occurrence of resveratrol in selected California Wines by a new HPLC method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, n. 4, p. 521-523, 1993.

LANGE, D. W. From red wine to polyphenols and back: A journey through the history of the French Paradox. **Thrombosis Research**, v. 119, p. 403-406, 2007.

LANÇAS, F. M. **Validação de Métodos Cromatográficos de Análise**, v. 6, São Carlos: RiMa, 2004. 62. p.

LIGGINS, J. *et al.* Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.

LIMA, M. T. R., *et al.* Determination of Stilbenes (*trans*-Astringin, *cis*- and *trans*-Piceid and *cis*- and *trans*-Resveratrol) in Portuguese wines. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 2666-2670, 1999.

MARCH, R. E. Quadrupole ion trap mass spectrometry: a view at the turn of the century. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 200, p. 285–312, 2000.

MAXWELL, C. A.; PHILIPS, D. A. Concurrent Synthesis and Release of nod-Gene-Inducing Flavonoids from Alfalfa Roots. **Plant Physiology**, v. 93, p. 1552-1558, 1990.

McCLAIN, R. M. *et al.* Reproductive safety studies with genistein in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1319-1332, 2007.

MIDDLETON, E. M.; TERAMURA, A. H. The Role of Flavonol Glycosides and Carotenoids in Protecting Soybean from Ultraviolet-B Damage. **Plant physiology**, v. 103, p. 741-752, 1993.

MIKSICEK, R. J. Commonly occurring plant flavonoids have estrogenic activity. **Molecular Pharmacology**, v. 44, p. 37-43, 1993.

MITANI, K.; NARIMATSU, S.; KATAOKA, H. Determination of daidzein and genistein in soybean foods by automated on-line in-tube solid-phase microextraction coupled to high-performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 986, p. 169-177, 2003.

MITRA, S. Sample Preparation Techniques in Analytical Chemistry. In WINEFORDNER, J. D. **Chemical Analysis: A series of monographs on analytical Chemistry and its applications**. New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., v. 162, 2003, p. 78-106, p. 250-251, 458 p.

MONTSKO, G. *et al.* Determination of products derived from *trans*-resveratrol UV photoisomerisation by means of HPLC-APCI-MS. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, 2007, doi: 10.1016/i.jphotochem.2007.11.011.

MULLETT, W. M., Determination of drugs in biological fluids by direct injection of samples for liquid-chromatographic analysis. **Journal of Biochemical Biophysical Methods**, v. 70, p. 263-273, 2007.

NARASIMHACHARI, N.; RUDLOFF, E. V. Gas-liquid chromatography of some flavonoid compounds and hydroxy diphenyls. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 40, p. 1123-1129, 1962.

NIESSEN, W. M. A. **Liquid chromatography-Mass Spectrometry**. Flórida: Boca Raton, 3^a ed. 2006. p. 413-437.

OLSSON, L. C., *et al.* Differential flavonoid response to enhanced uv-b radiation in brassica napus. **Phytochemistry**, v. 49, p. 1021-1028, 1998.

PEZET, R.; PONT, V.; CUENA, T. P. Method to determine resveratrol and pterostilbene in grape berries and wines using high-performance liquid chromatography and highly sensitive fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 663, p. 191-197, 1994.

PHILLIPS, R. **A Short History of Wine**. Harper Collins, 2000, p. 37, ISBN 0060937378. Disponível na internet. http://pt.wikipedia.org/wiki/Vinho#_note-Phillips_pg_37

PIMENTEL, M. F.; NETO, B. D. Calibração: uma Revisão para Químicos Analíticos. **Química Nova**, v. 19, p. 268-277, 1996.

REEMTSMA, T. Liquid chromatography-mass spectrometry and strategies for trace-level analysis of polar organic pollutants. **Journal of chromatography A**, v. 1000, p. 477-501, 2003.

REUBER, S.; BORNMAN, J. F., WEISSENBOCK, G., Phenylpropanoid compounds in primary leaf tissues of rye (*Se-ale cereale*). Light response of their metabolism and the possible role in UV-B protection. **Physiology Plant**, v. 97, p. 160-168, 1996.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G. COLLINS, C. H. *et al.* Validação em métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; BOTTOLI, C. B. G. Validation of chromatographic methods: Evaluation of detection and quantification limits in the determination of impurities in omeprazole. **Journal of Chromatography A**, v. 1156, p. 201-205, 2007.

RIBEIRO, J. A. *et al.* Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 52-53, p. 13-18, 2008.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **TRENDS in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

RIJKE, E., *et al.* Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion trap instruments. **Journal of Chromatography A**, v. 984, p. 45-58, 2003.

RIJKE, E. *et al.* Liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectroscopy for the identification of isoflavone glucoside malonates in *T. pratense* L. leaves. **Journal of Separation Science**, v. 27, p. 1061-1070, 2004.

RIJKE, E. *et al.* Flavonoids in Leguminosae: Analysis of extracts of *T. pratense* L., *T. dubium* L., *T. repens* L., and *L. corniculatus* L. leaves using liquid chromatography with UV, mass spectrometry and fluorescence detection **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 378, p. 995-1006, 2004.

RIJKE, E. *et al.* Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, 1-2, p. 31-63, 2006.

RODRÍGUEZ-DELGADO, M. A., *et al.* Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 912, p. 249-257, 2001.

SANCO, COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES (2003). **Document nº SANCO/2007/3131. Method validation and quality control procedures for pesticide residues analysis in food and feed.** 3^a ed., Bruxelas, Bélgica. 31/10/2007.

SANGSTER, T. *et al.* Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method. **Rapid Communication in Mass Spectrometry**, v. 18, p.1361-1364, 2004.

SATTERFIELD, M.; BRODBELT, J. S.. Structural characterization of flavonoid glycosides by collisionally activated dissociation of metal complexes. **Journal of American Society of Mass Spectrometry**, v. 12, p.537-549, 2001.

SCHUSTER, I. D. S. Soja e Saúde. COODETEC- Tecnologia da nossa terra. Disponível na internet.<<http://www.coodetec.com.br/sojasaude/isoflavonoides.htm>>. Acesso em 20 dez 2007.

SEITZ, C. T.; WINGARD, R. E. An improved conversion of hesperidin into hesperetin including purity determination by gradient-elution, high-pressure liquid chromatography. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 278-280, 1978.

SIMPSON, N. J. K.; WELLS, M., J., M. Introduction to solid-phase extraction. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed) **Solid-phase extraction: principles, techniques and applications**. New York: Marcel Dekker, Inc., 2000. p. 1-17.

SOUTO, A. A. *et al.* Determination of *trans*-resveratrol concentration in Brazilian red wines by HPLC. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 14, p. 441-445, 2001.

STERNBERG, J. C.; POULSON, R. E. Particle to-Column Diameter Ratio Effect on Band Spreading. **Analytical Chemistry**, v. 36, p. 1492-1502, 1964.

TADEO, J. L.; SANCHEZ-BRUNETE, C. Analysis of pesticide residues in fruit juices by matrix-solid phase dispersion and gas chromatographic determination. **Chromatographia**, v. 57, p. 793-798, 2003.

TEIXEIRA, D. M.; COSTA, C. T. Novel methods to extract flavanones and xanthenes from the root bark of *Maclura pomifera*. **Journal of Chromatography A**, v. 1062, p. 175-181, 2005.

THIS, P.; LACOMBE, T.; THOMAS, M. R. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 9, p. 511-519, 2006.

TOMÁŠ, Č.; *et al.* Use of automated direct sample introduction with analyte protectants in the GC-MS analysis of pesticide residues. **Journal of Separation Science**, v. 28, p.1048-1060, 2005.

TRELA, B. C.; WATERHOUSE, A. L. Resveratrol: Isomeric Molar Absorptives and Stability. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 44, p. 1253-1257, 1996.

VANAMALA, J., *et al.* Variation in the content of bioactive flavonoids in different brands of orange and grapefruit juices. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, p. 157-166, 2006.

VINHA, A. F., *et al.* Phenolic profiles of Portuguese olive fruits (*Olea europaea* L.): influences of cultivar and geographical origin. **Food Chemistry**, v. 89, p. 561-568, 2005.

VISSER, N. F. C.; LINGEMAN, H.; IRTH, H. On-line SPE-RP-LC for the determination of insulin derivatives in biological matrices. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 32, p. 295-309, 2003.

VRJOVSEK, U. *et al.* Quantification of polyphenols in different apple varieties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 6532-6538, 2004.

XIAO, H. B. *et al.* Determination and identification of isoflavonoids in *Radix astragali* by matrix solid-phase dispersion extraction and high-performance liquid chromatography with photodiode array and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 1032, p.117-124, 2004.

XU, X.; *et al.* Quantitative determination of a novel dual PPAR α/γ agonist using on-line turbulent flow extraction with liquid chromatography–tandem mass spectrometry. **Journal of chromatography B**, v. 814, p. 29-36, 2005.

ZAND, R. S. R., JENKINS, D. J. A., DIAMANDIS, E. P. Flavonoids and steroid hormone-dependent cancers. **Journal of Chromatography B**, v. 777, p. 219-232, 2002.

ZANELLA, R.; et. al. Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for the determination of clomazone residues in surface water. **Journal of Chromatography A**, v. 904, p. 257-262, 2000.

ZHOU, S.; *et al.*, High-throughput biological sample analysis using on-line turbulent flow extraction combined with monolithic column liquid chromatography/tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 19, p. 2144-2150, 2005.

ZROSTLÍKOVÁ, J.; *et al.* Performance of programmed temperature vaporizer, pulsed splitless and on-column injection techniques in analysis of pesticide residues in plant matrices. **Journal of Chromatography A**, v. 937, p.73-86, 2001.

WANG, C. Y., *et al.* Analysis of Puerariae radix and its medicinal preparations by capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, v. 802, p. 225-231, 1998.

APÊNDICES

APÊNDICE A

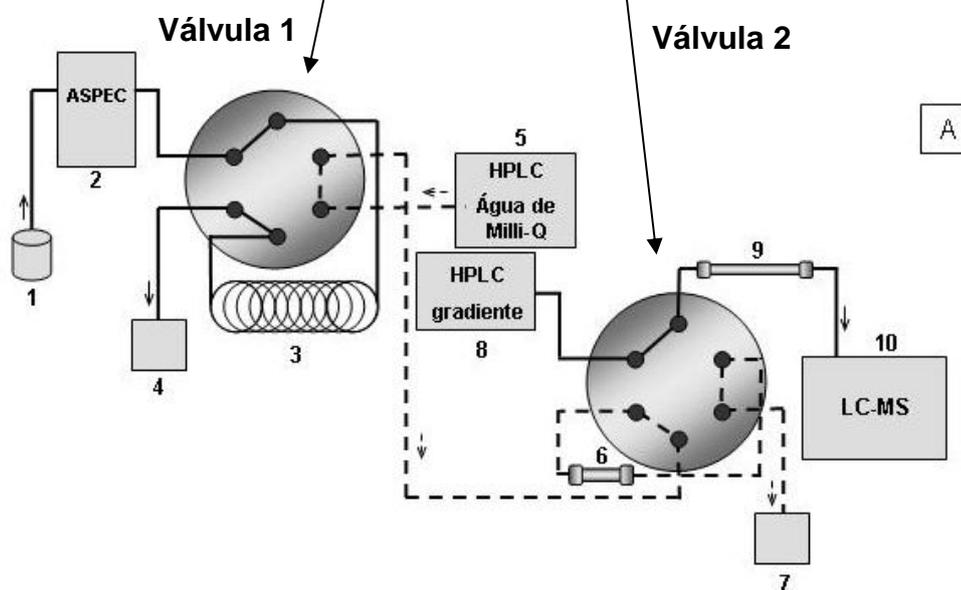
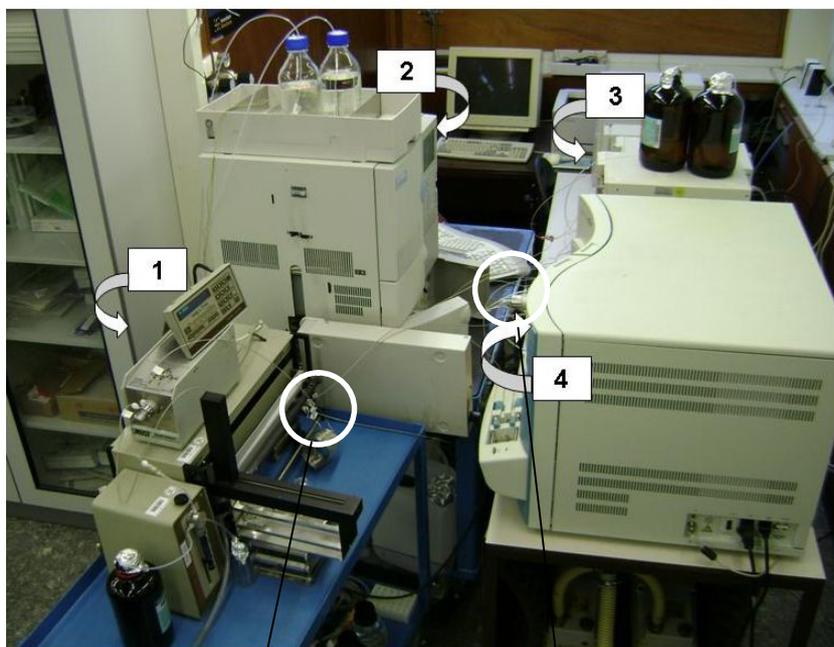
Tabela contendo o programa utilizado para controlar os eventos para o procedimento desenvolvido (automação do sistema).

Figura	Tempo (min)	Evento (início)	Observação
12	0,0	Troca da válvula do aspec para a posição de preenchimento, para a limpeza da alça de amostragem	A alça de amostragem neste momento está em linha com a bomba de seringa do aspec
	1,9	Limpeza da seringa de amostragem do aspec, seguido de aspiração de 8 mL de amostra	
	6,6	Bomba de seringa dispensa o volume de 8 mL de amostra na alça de amostragem	
	8,1	Aspiração de 8 mL de amostra	
	11,1	Bomba de seringa dispensa o volume de 8 mL de amostra na alça de amostragem	
13	12,6	Troca da válvula do aspec e o MS é sinalizado eletricamente para ter início	Alça de amostragem em linha com a coluna de TFC: amostra da alça sendo eluída para a coluna de TFC com auxílio de uma bomba de HPLC (água de Milli-Q - 5)
14	18,6	Troca da segunda válvula (MS) e inicia o programa de gradiente sob a coluna de TFC	TFC está em linha com a coluna analítica e o gradiente (bomba de HPLC)
12	55,6	Final do gradiente (gradiente 4, Tabela 5)	Alça de amostragem em linha com a bomba de seringa do aspec.
		Ambas as válvulas voltam para as posições iniciais	TFC sendo lavada com água de Milli-Q com auxílio da bomba de HPLC (5) Coluna analítica recebendo apenas o gradiente O sistema está pronto para a próxima amostra

Destaca-se neste programa que, após 18,6 min o sistema já começa a ser limpo e outra amostra pode começar a ser preparada para a análise. Desta forma, o tempo total de análise para várias amostras será menor.

APÊNDICE B

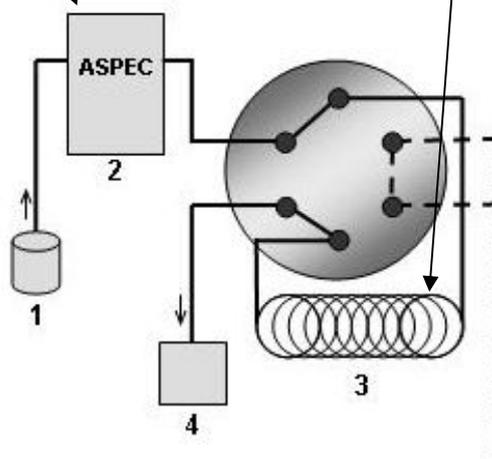
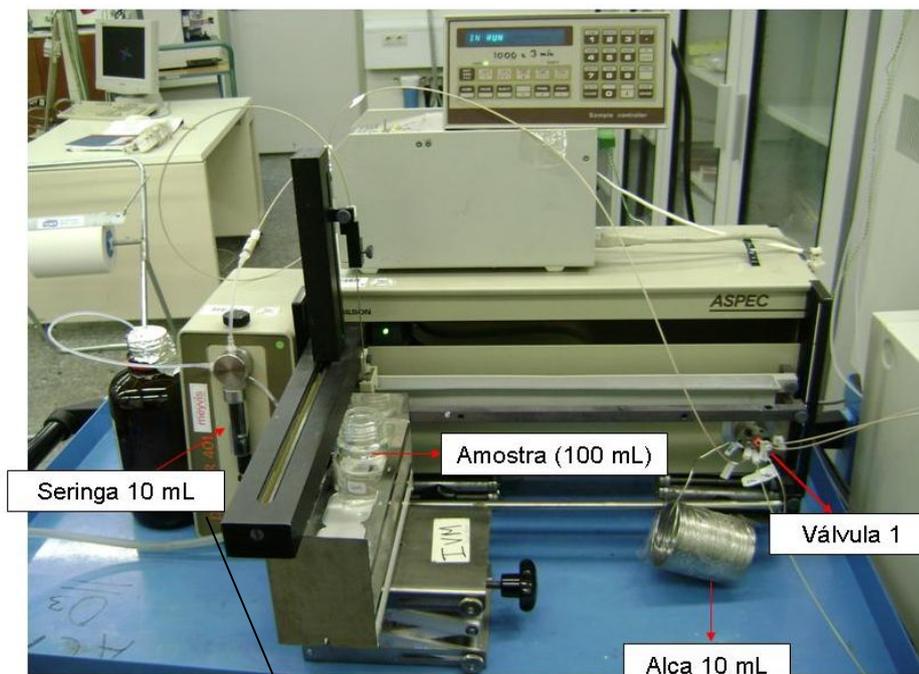
Foto do sistema utilizado no desenvolvimento deste trabalho e esquema das válvulas 1 e 2 para a visualização das mesmas.



Válvula 1 e 2 sendo indicadas na foto que apresenta todo o sistema utilizado no desenvolvimento deste trabalho. Válvula 1 está localizada no sistema ASPEC e a válvula 2 no Espectrômetro de Massas.

APÊNDICE C

Foto do sistema ASPEC, utilizado no desenvolvimento deste trabalho contendo: seringa de 10 mL, frasco com 100 mL de amostra, alça de amostragem de 10 mL e válvula 1.



APÊNDICE D

Foto do espectrômetro de massas contendo: válvula 2, coluna de TFC, coluna de C18 e APCI.

