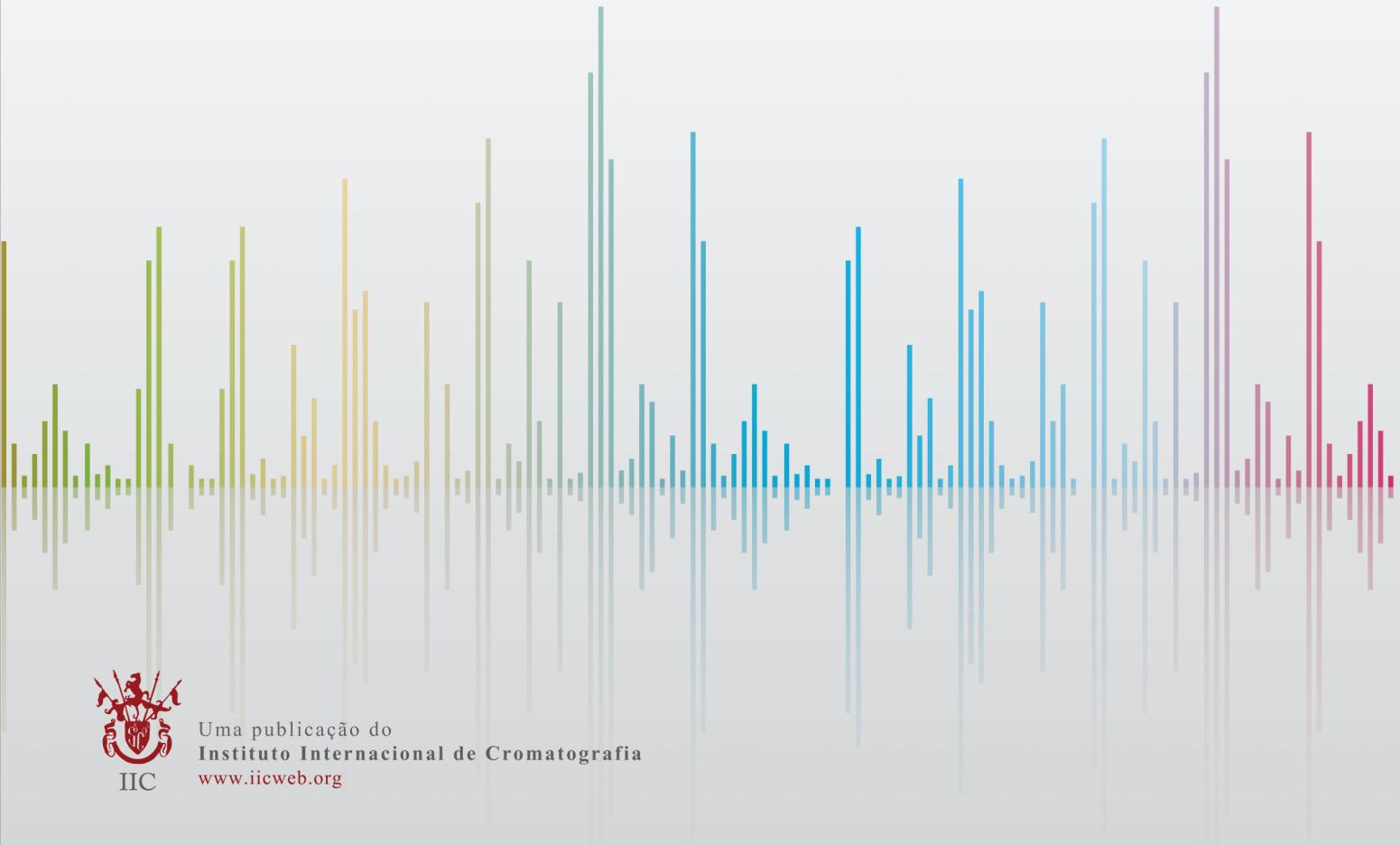




Scientia Chromatographica

2017 | Volume 9 | Número 3



Uma publicação do
Instituto Internacional de Cromatografia
www.iicweb.org

Scientia Chromatographica



EDITOR-IN-CHIEF

FERNANDO MAURO LANÇAS
*Universidade de São Paulo
Instituto de Química de São Carlos
13560-970 São Carlos (SP) - Brasil
editor@scientiachromatographica.com*

EDITORES ASSOCIADOS



MARIA EUGÉNIA QUEIROZ
PREPARO DE AMOSTRAS



RENATO ZANELLA
PREPARO DE AMOSTRAS



JOSÉ MANUEL F. NOGUEIRA
PREPARO DE AMOSTRAS



ISABEL C. S. FONTES JARDIM
CROMATOGRAFIA LÍQUIDA



ELENA STASHENKO
ESPECTROMETRIA DE MASSAS



ALEJANDRO CIFUENTES
TÉCNICAS ELETROFORÉTICAS



FÁBIO AUGUSTO
CROMATOGRAFIA GASOSA



ÁLVARO J. SANTOS NETO
TROUBLESHOOTING



CLÁUDIA ZINI
CROMATOGRAFIA GASOSA



ELINA B. CARAMÃO
CROMATOGRAFIA GASOSA

CORPO EDITORIAL CONSULTIVO

Daniel Armstrong – EUA
Dietrich von Bauer – Chile
Fábio Augusto – Brasil
Fátima Dutra – Brasil
Flávio Leite – Brasil
Frank Svec – EUA
Harold McNair – EUA
Humberto Gómez – México
Isabel Cristina Sales Fontes Jardim – Brasil
Jailson B. de Andrade – Brasil
Janusz Pawliszyn – Canadá
Kiyoratsu Jinno – Japão
Luigi Mondello – Itália
Marcos Eberlin – Brasil
Marina Tavares – Brasil
Milos Novotny – EUA
Milton Lee – EUA
Norberto Peporine Lopes – Brasil
Phillip Marriott – Austrália
Pierina Bonato – Brasil
Quézia Cass – Brasil
Renato Zanella – Brasil

ENDEREÇO DO PERIÓDICO

Scientia Chromatographica
Rua Princesa Isabel, 265 - Jardim Paraíso
13.561-140 - São Carlos (SP) - Brasil
Fone/Fax: (16) 3501-4140
karen.favarro@iicweb.org / info@iicweb.org
www.scientiachromatographica.com

Ficha catalográfica elaborada pela Seção de Aquisição
e Tratamento da Informação do SBI/IQSC

Scientia Chromatographica / Associação Internacional de
Cromatografia. - vol.9 n.3 (jul./set. 2017). São Carlos:
Associação Internacional de Cromatografia, 2017.

Trimestral
ISSN 1984-4433

1. Cromatografia. 2. Lanças, Fernando Mauro, editor chefe.

Periódico Trimestral do Instituto Internacional de Cromatografia



Scientia Chromatographica

2017 | Volume 9 | Número 3



Milestone agora é Analítica!

É com muita satisfação que nós, da Nova Analítica, informamos que adquirimos da Anacom as operações da Milestone no Brasil.

ETHOS UP E ETHOS EASY

SISTEMAS DE DIGESTÃO POR MICRO-ONDAS DE ALTA PERFORMANCE

- Maior cavidade do mercado
- Avançados sensores de temperatura e pressão
- Rotores versáteis
- Rotor de 15 posições para digestões sob alta pressão
- Rotor de 44 posições para alta produtividade
- Interface amigável e funcionalidades simplificadas
- Milestone Connect para controle remoto de suas digestões



MICRO-ONDAS ETHO-X

- Extração de produtos naturais sem solventes
- Permite a extração rápida de óleos essências sem a utilização de solventes
- O novo ETHO-X da Milestone, dedicado à extração de produtos naturais por micro-ondas, aproveita o mecanismo exclusivo de aquecimento seletivo por micro-ondas para liberar o óleo essencial, que é evaporado "in situ" do material vegetal

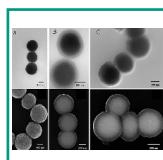
Deseja extrair fragrâncias e sabores com alta qualidade?
Saiba mais em: www.milestonesrl.com/naturalproducts



MLESTONE
HELPING
CHEMISTS

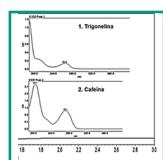
analítica
analiticaweb.com.br

Editorial	143
<i>Fernando Mauro Lanças</i>	



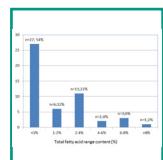
SAMPLE PREPARATION

Ionic liquids in magnetic-assisted microextraction procedures: A step forward for faster and selective sample preparation	145
<i>Maria J. Trujillo-Rodríguez, Jared L. Anderson</i>	



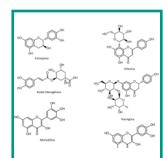
HPLC

Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído	160
<i>Tiago Bervelieri Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf</i>	



HRGC

Trans fatty acids levels of puff pastry products marketed in the central region of Portugal	171
<i>TJorge M. T. B. Varejão, Fabiana F. G. S. Oliveira</i>	



HPLC

Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em <i>Myrcia oblongata</i> DC., <i>Passiflora caerulea</i> L. e <i>Equisetum giganteum</i> L.....	180
<i>Fabiana Agostini, Francine da Motta Michelon, Vanessa Amanda Alves Gomes, Sabrina Bertolazzi, Joséli Schwambach, Sidnei Moura</i>	

Instituto Internacional de Cromatografia	195
Bookstore	196
Normas para Publicação.....	197
Calendário de Eventos	199



Um jeito inteligente de começar a semana bem informado



NOTÍCIAS | LANÇAMENTOS | ARTIGOS | ESPECIAIS | CURSOS | CARREIRA

Assine nossas newsletters
e fique por dentro das principais
notícias do mercado
de análises clínicas
e instrumentação
científica.



Siga-nos nas redes sociais

The screenshot shows the labnetwork website interface. At the top, there are two newsletter snippets: one for May 3-10, 2017, featuring a woman in a lab coat working with a machine, and another for April 19-26, 2017, featuring a woman in a lab coat working with a pipette. Below these are sections for 'ANALISES CLÍNICAS' (Clinical Analysis) and 'INSTRUMENTAÇÃO ANÁLITICA' (Analytical Instrumentation). The 'ANALISES CLÍNICAS' section includes a heading 'Cursos técnicos podem trazer novas oportunidades na área da saúde' (Technical courses can bring new opportunities in the health area) and a 'NOTÍCIA' (HEP-2 com menor taxa de falsos negativos) (HEP-2 with lower false negative rate). The 'INSTRUMENTAÇÃO ANÁLITICA' section includes a heading 'Destques' (Highlights) and a 'NOTÍCIA' (Deteção de "RSV" em 15 minutos) (Detection of "RSV" in 15 minutes). On the right side, there is a circular logo for 'International Society of Oncology and Biomarkers' (ISO-BM) and an 'EVENTO' (Event) section for the 'Congresso de Oncologia e Biomarcadores' (Congress of Oncology and Biomarkers) in Rio de Janeiro. The KA logo is also visible at the bottom right.

➊ Acesse www.labnetwork.com.br

O número 3 do volume 9 do *Scientia Chromatographica* traz uma diversidade bastante interessante de artigos, para todos os gostos. Metade dos artigos foram submetidos na língua inglesa e a outra metade na língua portuguesa atendendo, desta forma, demanda de ambas partes.

Este número inicia com uma revisão sobre o emprego de líquidos iônicos associados a nano partículas magnéticos para micro técnicas de preparo de amostras. A contribuição vem do laboratório do Prof. Jared Anderson, especialista no emprego de líquidos iônicos em química analítica. O grupo da Profa. Suzana Nixdorf (UEL) apresenta e discute um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína em amostras de café torrado e moído. O grupo do Prof. Varejão, da Universidade de Coimbra, Portugal, contribuiu com uma avaliação da presença de ácidos graxos trans em amostras de produtos alimentícios à base de massas folhadas. Uma contribuição liderada pelo grupo da Profa. Fabiana Agostini (Universidade de Caxias do Sul) discute métodos para a determinação de 14 compostos fenólicos em amostras de diferentes plantas empregadas em medicina popular.

Esperamos que os artigos sejam do agrado dos leitores, sendo que o Corpo Editorial do *Scientia* agradece o envio de novas colaborações para avaliação, assim como sugestões que contribuam para sua melhora.

Fernando Mauro Lanças

Editor-in-chief

Scientia Chromatographica

HRGC

Colunas para Cromatografia Gasosa
feitas no Brasil 

Fases estacionárias:

NST-1, NST-5, NST-624, NST-1701, NST-50, NST-225,
NST-100, NST-FFAP, NST-VOC, NST-BIS.

Comprimento:

Todos desde 1m até 100m.

Diâmetro Interno:

0,53mm; 0,32mm; 0,25mm; 0,22mm; 0,20mm; 0,18mm;
0,15mm; 0,10mm; 0,05mm.

Espessura de Filme:

Qualquer tamanho desde 0,01 μm até 5,00 μm .

Colunas Empacotadas:

Empacotamos colunas em aço inox e vidro com uma
grande variedade de fases estacionárias, comprimentos
e diâmetros internos.



Representantes Sudeste:

CMS Instrumentos Analíticos Ltda.
www.cmscientifica.com.br
TEL: 19 3812.9222
cms@cmscientifica.com.br
Cosmópolis SP - Brasil

Representantes Centro-Oeste:

JPChrom Com. de Prod. Lab. Ltda.
TEL: 61 8114.1800
junior.jpchrom@gmail.com
Brasília DF - Brasil

Demais Regiões:

www.nstonline.com.br
TEL: 16 3376.9914
info@nstonline.com.br
São Carlos SP - Brasil

nST
Nano Separation Technologies

Ionic liquids in magnetic-assisted microextraction procedures: A step forward for faster and selective sample preparation

María J. Trujillo-Rodríguez

Jared L. Anderson*

Department of Chemistry, Iowa State University, Ames, Iowa 50011 USA

*andersoj@iastate.edu

Recebido: 15/10/2017

Aceito: 10/11/2017

Abstract

Magnetic separations utilize an extraction material with paramagnetic properties, permitting them to be controlled under a magnetic field and contributing to a simplification of the sample preparation step. Ionic liquids represent an alternative class of solvents to conventional extraction materials, which may be toxic and possess limited selectivity or extraction efficiency. Several studies have proposed the use of ionic liquids in magnetic-assisted microextraction procedures. In some cases, the ionic liquid is combined with other materials such as magnetic nanoparticles, generating a hybrid material able to be used in magnetic-assisted procedures. In other cases, magnetic ionic liquids, which possess inherent magnetism, are directly used as magnetic extraction materials. This review provides an overview of these two possibilities towards magnetic-assisted extraction procedures.

Keywords: ionic liquids, ionic liquid-based surfactants, polymeric ionic liquids, magnetic ionic liquids, magnetic separation, microextraction

Resumo

Separações magnéticas utilizam um material magnético de extração com propriedades paramagnéticas, permitindo seu controle sob um campo magnético e contribuindo para a simplificação da etapa de preparo de amostras. Líquidos iônicos representam uma classe alternativa de solventes aos materiais convencionais de extração, os quais podem ser tóxicos e possuem seletividade limitada ou eficiência limitada de extração. Vários estudos tem proposto o uso de líquidos iônicos em procedimentos de micro extração assistidos por meios magnéticos. Em alguns casos, o líquido iônico é combinado com outros materiais, como nanopartículas magnéticas, gerando materiais híbridos capazes de serem utilizados em procedimentos assistidos por meios magnéticos. Em outros casos, líquidos iônicos magnéticos, os quais possuem magnetismo inherente, são diretamente utilizados como materiais magnéticos para extração. Esta revisão fornece uma visão geral dessas duas possibilidades em direção a procedimentos de extração assistidos por meios magnéticos.

Palavras-chave: líquidos iônicos, surfactantes baseados em líquidos iônicos, líquidos iônicos poliméricos, líquidos iônicos magnéticos, separação magnética, micro extração.

1. Introduction

With the recent advances in instrumentation and automation towards chromatography and related techniques, sample preparation is a bottleneck in any analytical methodology [1]. Thereby, current trends in analytical chemistry are focused on the development of simpler, miniaturized, and faster methods for sample preparation, often following the principles of Green Analytical Chemistry [2] while ensuring proper preconcentration of the target analytes. In this sense, microextraction procedures represent a valid alternative to conventional extraction techniques.

Two main microextraction modes can be distinguished from one another based on whether the extraction material is a solid or a liquid: solid phase-based microextraction (SPME) [3] and liquid-phase based microextraction (LPME) [4], respectively. The use of all these microextraction techniques under their different modes generates a wide range of possibilities for carrying out an analysis. Furthermore, a simplification of both types of microextraction procedures has been possible due to the introduction of magnetic separations. Magnetic separations utilize an extraction material with paramagnetic properties, permitting them to be controlled under a magnetic field [5]. Analytes are enriched in the extraction material and can be subsequently separated from the remaining components of the sample with the aid of a strong Fe-Nd-B magnet [6]. Thus, the method avoids common centrifugation and filtration steps.

Ionic liquids (ILs) are non-molecular solvents with melting points below 100 °C. They possess a wide variety of physicochemical properties, including low to negligible vapor pressure at room temperature, and high chemical and electrochemical stability [7]. ILs are composed completely of ions. In general, they possess organic cations containing nitrogen or phosphorous atoms such as imidazolium, ammonium or phosphonium, and inorganic or organic anions [8]. There are two important aspects that make ILs interesting

materials. First, small modifications to the IL structure are accompanied by a dramatic change in a number of IL properties, including water solubility and viscosity. Furthermore, the incorporation of different moieties within the IL structure can promote different interactions with analytes, resulting in impressive solvation capabilities for different compounds.

ILs represent an alternative to conventional extraction materials that often may be toxic and have limited selectivity or extraction efficiency. Thus, a large number of applications have reported the use of ILs in microextraction studies [9,10]. Furthermore, an increasing number of studies employ magnetic assisted-procedures together with ILs [11,12]. There are two possibilities for incorporating ILs in magnetic assisted-microextraction procedures: (i) the combination of the IL with other materials such as magnetic nanoparticles (MNPs) or microspheres (MMPs), generating a hybrid material with paramagnetic properties, and (ii) the use of magnetic ionic liquids (MILs) which are a subclass of ILs possessing inherent magnetism.

Within this review, we provide an overview in the use of ILs and their derivatives towards magnetic-assisted microextraction procedures. The review is focused on applications that combine the use of microextraction procedures with chromatography and related techniques.

2. Microextraction procedures based on hybrid materials containing an ionic liquid component

This section describes magnetic-assisted microextraction procedures using extraction materials possessing a magnetic core (in general, MNPs) coated/decorated with an IL (MNP@IL). The extraction performance of the material is related to the nature of the IL [13]. These MNP@IL hybrid materials can be prepared by the following two routes: the first route implies the *in situ* formation of the hybrid material (the combination of the MNPs and the IL) during the microextraction

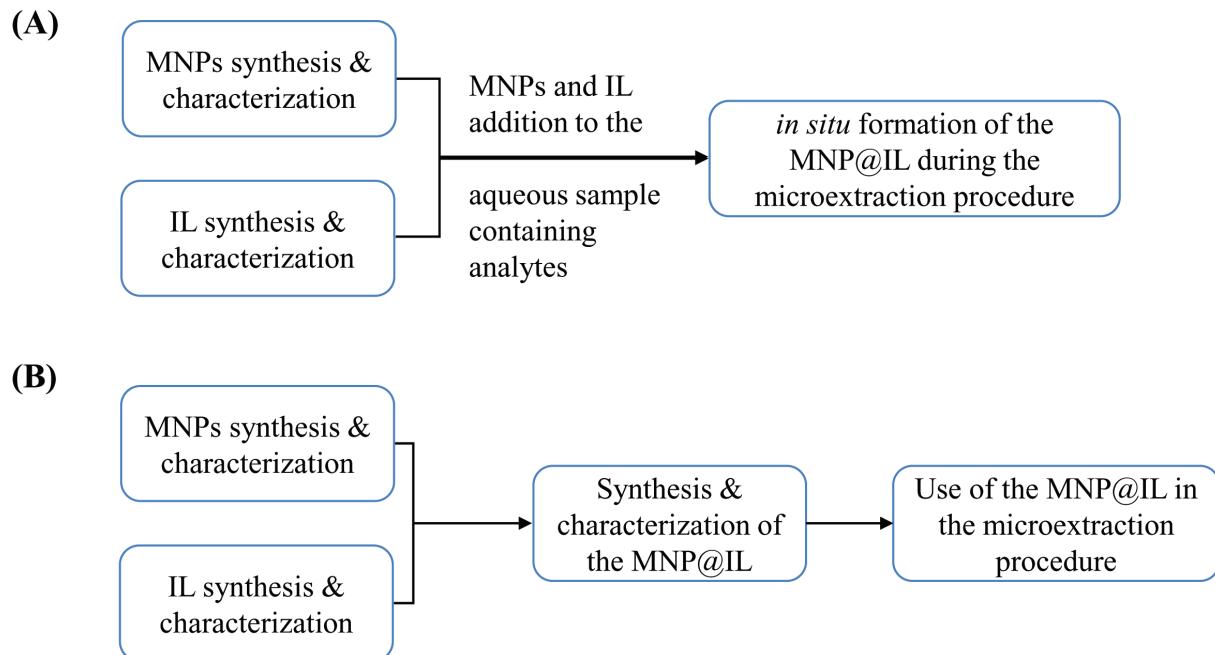


Fig. 1. Scheme of the preparation of hybrid materials based on MNP@IL: (A) *in situ* formation of the hybrid material during the microextraction step, and (B) synthesis and characterization of the material prior its use in the microextraction procedure.

step [11,14] (route (A) of Figure 1). The second route involves the synthesis and characterization of the MNP@IL material prior its use in the microextraction procedure (route (B) of Figure 1).

Regarding the magnetic core, a larger number of magnetic-based extraction procedures use MNPs composed of magnetite ($\alpha\text{-Fe}_3\text{O}_4$) [11,14]. However, bare Fe_3O_4 MNPs tend to aggregate, and they can also experience oxidation in air or biodegradation. For that reason, they are protected with layers of other materials such as silica, generating core-shell structures ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ MNPs) [15], as shown in Figure 2. Furthermore, there are different strategies of functionalization of the surface of the MNPs to create specific moieties able to interact with the corresponding IL (or IL derivative). These strategies include the use of 3-chloropropyltriethoxysilane [15] or 1,6-diisocyanatohexane [16] as coupling agents, among others. In addition, other studies have described the combination of Fe_3O_4 MNPs with carbon-based

materials, including graphene oxide ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{GO}$ MNPs [17] or $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{GO}$ MNPs [18]), or multi-walled carbon nanotubes ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{MWCNTs}$ MNPs [19]). Other magnetic-assisted procedures use $\text{Fe}_3\text{O}_4@\beta\text{-cyclodextrin}/\text{attapulgite}$ [20], barium ferrite nanoparticles [13] or $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{diatomaceous earth}$ [21] as a magnetic core.

Regarding the IL component of these magnetic materials, they will be discussed in the following sections related to the type of microextraction method employed: dispersive liquid-liquid microextraction with magnetic retrieval (m-DLLME) or magnetic-assisted micro-solid phase extraction (m- μ -SPE).

2.1 Dispersive liquid-liquid microextraction with magnetic retrieval

Dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) is a type of LPME procedure based on the use of two types of solvents: a water immiscible solvent acting as an extraction solvent, and a dispersive solvent that is miscible with both the sample and the extraction solvent

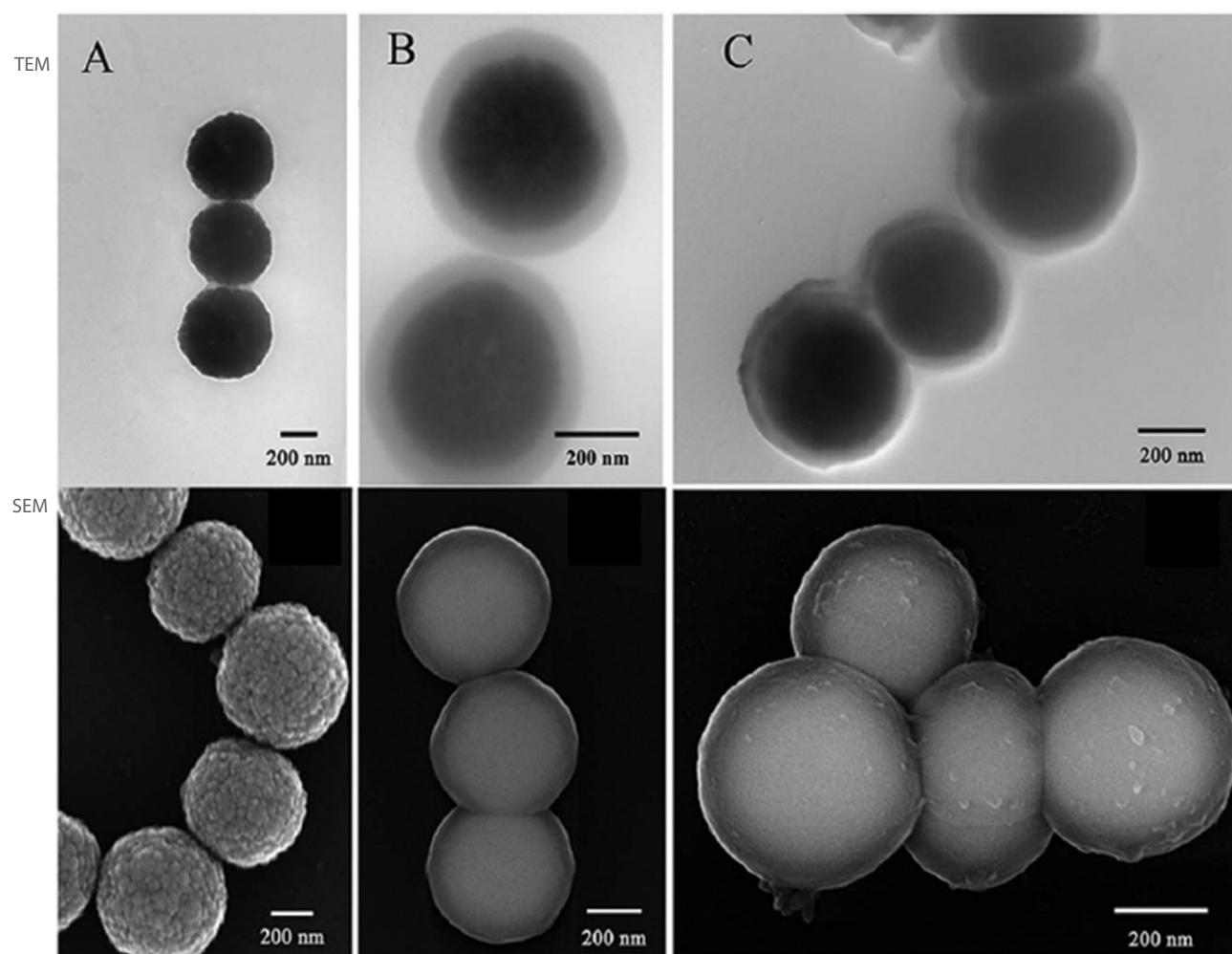


Fig. 2. Transmission electron microscopy (TEM) and scanning electron microscopy (SEM) images of (A) Fe_3O_4 MNPs, (B) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ MNPs, and (C) $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2@\text{PIL}$ MNPs. Reproduced with permission from reference [15].

[22]. The addition of these two components to the aqueous sample forms a cloudy solution that promotes a rapid partitioning of the analytes into the extraction solvent. In some cases, the application of high temperatures, or the use of microwaves, ultrasound, vortex or any other stirring method has also been reported [10]. The classical DLLME method then requires centrifugation and filtration steps for the separation and isolation of the extraction phase from the sample matrix.

IL-DLLME processes with magnetic retrieval (m-IL-DLLME) avoid the centrifugation and filtration steps of classical DLLME, simplifying the procedure and reducing the extraction time. In these approaches,

the IL acts as the extraction solvent. After the formation of the cloudy solution, MNPs are added to the extraction vial. Weak interactions between the MNPs and the IL containing the extracted analytes are established, and the hybrid material can be isolated using a strong magnet. Analytes are then subsequently eluted from the material. Thus, the hybrid material is prepared using the first route of Figure 1(A).

It is important to mention that some authors have used the DLLME with magnetic retrieval term [23] whereas others use the terminology of dual magnetic microextraction (DMME), describing the methodology

as a combination of DLLME with a subsequent step of μ -SPE [13].

Hydrophobic ILs containing imidazolium cations and the bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide ($[\text{NTf}_2^-]$) [13,20] or hexafluorophosphate ($[\text{PF}_6^-]$) [23] anions are used as extraction solvents in m-IL-DLLME procedures. In addition, hydrophilic ILs have been employed for *in situ* DLLME procedures with magnetic retrieval [14,24]. In these approaches, the hydrophilic IL is mixed with an anion exchange reagent such as lithium $[\text{NTf}_2^-]$ ($\text{Li}[\text{NTf}_2^-]$) [24], sodium dicyanamide ($\text{Na}[\text{N}(\text{CN})_2^-]$) [14] or sodium diethyldithiocarbamate ($\text{Na}[\text{DDTC}^-]$) [14]. The mixture of both reagents in a 1:1 ratio promotes a metathesis reaction, generating a hydrophobic IL in which analytes are extracted. After that, a magnet is held in the extraction vial for the magnetic separation followed by elution of the analytes.

Yang *et al.* proposed an effervescence-assisted m-IL-DLLME procedure for the determination of four fungicides in water, followed by high performance liquid chromatography with ultraviolet detection (HPLC-UV) [25]. A magnetic effervescent tablet composed of Fe_3O_4 MNPs, sodium carbonate, sodium dihydrogen phosphate and 1-hexyl-3-methylimidazolium $[\text{NTf}_2^-]$ ($[\text{C}_6\text{MIM}^+]\text{[NTf}_2^-]$) was added to the aqueous sample as the extraction material [25]. Sodium carbonate and sodium dihydrogen phosphate act as effervescence precursors, generating CO_2 bubbles that assisted the dispersion of the $\text{Fe}_3\text{O}_4@$ IL MNPs, as shown in Figure 3. After that, a magnet is placed at the bottom of the extraction tube to promote magnetic separation. After separation of the sample matrix, analytes are eluted with ethanol [25].

Table 1 [11,15,18-20,24-29] shows representative examples of m-IL-DLLME applications. It is important to highlight that the majority of the procedures have utilized HPLC as a subsequent analytical technique with a wide variety of detection systems, including UV [20] or mass spectrometry [24].

2.2. Magnetic-assisted micro-solid phase extraction

Micro-solid phase extraction (μ -SPE) is the miniaturized version of solid phase extraction (SPE) [30]. Analytes are extracted in a small amount of sorbent material, which is placed in a cartridge (static μ -SPE) [31] or is dispersed on the matrix sample (dispersive μ -SPE, or μ -dSPE) [3]. Analytes are then eluted from the sorbent material using a low volume of a solvent, followed by analytical determination. The classical μ -dSPE requires centrifugation and/or filtration steps to separate the matrix sample and the extraction material prior to the elution. Thus, magnetic-assisted μ -dSPE (m- μ -dSPE) represents an interesting alternative in sample preparation as these steps can be avoided, contributing to the simplification of the procedure.

Hybrid materials containing an IL component have been used in m- μ -dSPE procedures to improve the extraction performance of the methodology. Table 1 also summarizes some of these m- μ -dSPE approaches. The majority of these applications use MNP@IL materials

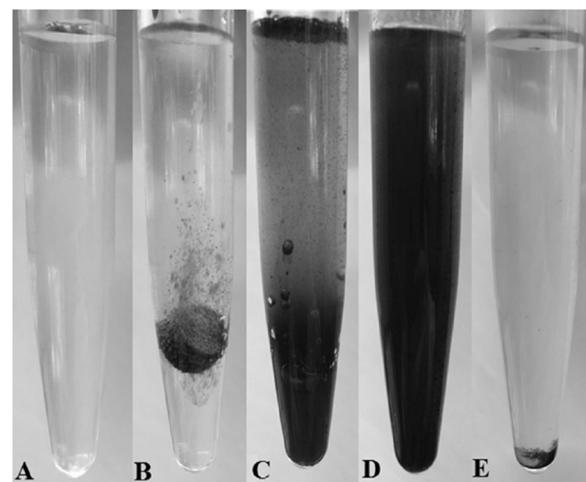


Fig. 3. Steps used during the effervescence-assisted m-IL-DLLME procedure reported in [25]: (A) aqueous sample, (B) addition of the magnetic effervescent tablet, (C) dispersion of the MNP@IL by CO_2 bubbles, (D) extraction vial after dispersion (the disintegrated tablet was homogeneously distributed into the aqueous sample), and (E) MNP@IL MNPs sedimented at the bottom of the extraction vial after magnetic separation. Reprinted with permission from reference [25].

Table 1. Representative magnetic assisted-microextraction procedures based on hybrid materials containing an ionic liquid component

Analites	Sample	Extraction procedure ^a	Extraction material ^b	Analytical technique ^c	LOD ^d ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD ^e (%)	RR ^f (%)	Ref.
fungicides	water	m-DLLME assisted by vortex	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \beta\text{CD/AP} @ [\text{C}_6\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ MNPs	HPLC-UV	0.02–0.04	2.9–4.2	97–115	[20]
acaricides	tea infusion	m-DLLME assisted by vortex	$\text{ZnO} @ \text{Fe}_3\text{O}_4 @ [\text{C}_8\text{MMIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ MNPs	HPLC-DAD	0.44–1.0	4.4–7.4	83.0–104	[26]
endocrine disrupting phenols	water	in situ m-DLLME using $[\text{C}_4\text{MIM}^+][\text{Cl}^-]^b$ and $\text{Li}[\text{NTf}_2^-]$	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ [\text{C}_4\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ MNPs	HPLC-MS	0.004–0.62	0.5–9.3	78.8–103	[24]
fungicides	water	effervescence-assisted m-DLLME	magnetic effervescent tablet with $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ [\text{C}_6\text{MIM}^+][\text{NTf}_2^-]$ MNPs	HPLC-UV	0.02–0.10	2.4–4.9	84.6–113	[25]
bisphenol A	plastic tableware	LLE followed by m- μ -dSPE assisted by stirring and temperature	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ [\text{C}_8\text{MIM}^+][\text{PF}_6^-]$ MNPs	HPLC-UV	0.09	1.2	99.4–101	[27]
triazole herbicides	water	m- μ -dSPE assisted by ultrasound	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{MWCNT} @ [\text{AC}_4\text{C}_4\text{IM}^+][\text{Cl}^-]$ MNPs	GC-MS	0.05–0.22	6.9–11	84.7–111	[19]
preservatives	vegetables	modified QuEChERS (LLE followed by m- μ -dSPE)	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2-\text{NH}_2 @ \text{GO} @ \text{poly}^g[\text{VC}_8\text{IM}^+][\text{Br}^-]$ MNPs	GC-MS	0.82–6.6 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	1.8–12	83.3–118	[18]
sulfonylurea herbicides	soil	m- μ -dSPE assisted by vortex	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2-\text{PEG} @ \text{poly}^g[\text{VMIM}^+][\text{Cl}^-]$ MNPs	HPLC	1.6–2.9	3.2–4.5	77.4–97.6	[15]
endocrine disrupting phenols	water and tea infusion	m- μ -dSPE assisted by ultrasound	mixed hemimicelles of $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ [\text{C}_{12}\text{C}_{12}\text{IM}^+][\text{Br}^-] & [\text{C}_{16}\text{MIM}^+][\text{Br}^-]$ (1:1 ratio) MNPs	HPLC-DAD	0.1–0.6	1.6–13	89.2–112	[11]
cephalosporins	urine	m- μ -dSPE assisted by ultrasound	Mixed hemimicelles of $\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{GO} @ [\text{C}_{16}\text{MIM}^+][\text{Br}^-]$	HPLC-UV	0.6–1.9	< 6.3	82.1–96.8	[28]
non-steroidal anti-inflammatory drugs	human blood	SFE, followed by m- μ -dSPE assisted by vortex	$\text{Fe}_3\text{O}_4 @ \text{SiO}_2 @ [\text{N}_{1,1,18,\text{TMSP}}^+][\text{Cl}^-]$ MNPs	HPLC-UV	0.2–0.5	8.0–10	92.0–97.1	[29]

^a Abbreviations: LLE for liquid-liquid extraction, m-DLLME for dispersive liquid-liquid microextraction with magnetic retrieval, m- μ -dSPE for magnetic-assisted dispersive micro-solid phase extraction, and SFE for supercritical fluid extraction.

^b **IL abbreviations:** Cations: $[\text{AC}_4\text{C}_4\text{IM}^+]$ for 1-(3-aminopropyl)-3-propylimidazolium, $[\text{C}_4\text{MIM}^+]$ for 1-butyl-3-methyl imidazolium, $[\text{C}_6\text{MIM}^+]$ for 1-hexyl-3-methylimidazolium, $[\text{C}_8\text{MIM}^+]$ for 1-octyl-3-methylimidazolium, $[\text{C}_8\text{MMIM}^+]$ for 1-octyl-2,3-dimethylimidazolium, $[\text{C}_{12}\text{C}_{12}\text{IM}^+]$ for 1,3-didodecylimidazolium, $[\text{C}_{16}\text{MIM}^+]$ for 1-hexadecyl-3-methylimidazolium, $[\text{N}_{1,1,18,\text{TMSP}}^+]$ for dimethyloctadecyl[3-(trimethoxysilylpropyl)] ammonium, $[\text{VC}_8\text{IM}^+]$ for 1-vinyl-3-octylimidazolium, and $[\text{VMIM}^+]$ for 1-vinyl-3-methylimidazolium.

Anions: $[\text{Br}^-]$ for bromide, $[\text{Cl}^-]$ for chloride, $[\text{NTf}_2^-]$ for bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, and $[\text{PF}_6^-]$ for hexafluorophosphate.

Others: $\beta\text{CD/AP}$ for β -cyclodextrin/attapulgite, GO for graphene oxide, MNPs for magnetic nanoparticles, and MWCNTs for multi-walled carbon nanotubes.

^c Abbreviations: DAD for diode array detection, GC for gas chromatography, HPLC for high-performance liquid chromatography, MS for mass spectrometry, and UV for ultraviolet detection.

^d Limit of detection.

^e Relative standard deviation.

^f Relative recovery.

^g "Poly" denotes a polymeric ionic liquid.

generated using route (B) of Figure 1. Regarding the nature of the IL, both hydrophobic and hydrophilic ILs can be attached to the magnetic core of the hybrid material (Table 1). Amino functionalized dicationic ILs were coated on the surface of Fe₃O₄@MWCNT@[AC₄C₄IM⁺][Cl⁻] (being [AC₄C₄IM⁺][Cl⁻] the 1-(3-aminopropyl)-3-propylimidazolium chloride IL) was prepared for the determination of triazole fungicides in water [19]. The IL was synthesized on the surface of MWCNTs and chemically attached via CONH⁻ groups.

Polymeric ionic liquids (PILs) have also been used to generate hybrid materials for m-μ-dSPE. PILs are polymers generated by the polymerization of an IL monomer [32]. The majority of PILs employed for sample preparation are of the polycationic type where the backbone of the polymer is in the cationic component and the anionic component is responsible for the ionic conductivity of the material. Zhang *et al.* synthesized an epitope molecularly imprinted polymer using a cyclodextrin-based IL as functional monomer for the specific recognition of cytochrome in aqueous solutions [33]. The epitope polymer shell was coated on Fe₃O₄@SiO₂ MMPs functionalized with [3-(methacryloyloxy)propyl] trimethoxysilane, and characterized by transmission electron microscopy (TEM), Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR), X-ray photoelectron spectrometry (XPS), and thermogravimetric analysis (TGA) [33]. The authors demonstrated a superior adsorption capacity and recognition ability when both β-cyclodextrins and ILs were used together with the Fe₃O₄@SiO₂ MMPs [33]. Another interesting hybrid material was based on Fe₃O₄@SiO₂@GO@PIL MNPs, synthesized using 1-vinyl-3-octylimidazolium bromide ([VC₈IM⁺][Br⁻]) as IL monomer [18]. The hybrid material was used as an adsorbent in a modified QuEChERs method for the determination of 20 preservatives in vegetables, followed by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) [18]. With this method, good clean-up performance and

limits of detection down to 6.6 µg·kg⁻¹ were achieved (Table 1).

Hydrophilic ILs with long alkyl chains, able to act as IL-based surfactants, have also been employed in m-μ-dSPE. When these ionic surfactants are in solution at a concentration near or slightly below their critical micelle concentration (CMC), they can form monolayers or bilayers on the surface of a solid with opposite charge (the MNPs in this particular case). These layers of surfactants are termed hemimicelles and admicelles, respectively [34]. Mixed hemimicelles occur when both aggregation types are present together [11,35]. In hemimicelles, the hydrophobic chain of the surfactant is exposed to the sample while in admicelles, the ionic headgroup of the surfactant is exposed to the sample. Thus, both non-polar and polar analytes can be extracted using mixed hemimicelles. It is important to point out that mixed hemimicelles of IL-based surfactants on the surface of MNPs are generated using route (A) of Figure 1. Several methods describe the use of mixed hemimicelles based on ILs [35]. Furthermore, a successful method for phenol determination was developed using mixed hemimicelles of double salts of IL-based surfactants supported on Fe₃O₄ (Fe₃O₄@DSIL MNPs) [11]. Under optimum conditions, two different IL-based surfactants were mixed to generate a DSIL, namely 1,3-didodecylimidazolium bromide ([C₁₂C₁₂IM⁺][Br⁻]) and 1-hexadecyl-3-methylimidazolium bromide ([C₁₆MIM⁺][Br⁻]) (1:1 ratio) [11].

In another interesting study, non-steroidal anti-inflammatory drugs were determined in biological fluids by subsequently employing two extraction techniques: supercritical fluid extraction (SFE) and m-μ-dSPE using [29] (Table 1). A small matrix effect was observed when the developed technique was applied for the analysis of blood samples [29].

3. Microextraction procedures based on magnetic ionic liquids

Magnetic ionic liquids (MILs) are a subclass of ILs designed to contain a paramagnetic component in the cation or anion of the IL structure, exhibiting a strong response to external magnetic fields [36]. MILs can be clearly differentiated from MNP@IL and MMP@IL hybrid materials, previously discussed in Section 2, that are magnetic suspensions of nanometer to micrometer size. In comparison, MILs are transparent and exist as neat magnetic solvents [37]. Thus, MILs are considered a second generation of paramagnetic fluids, as their magnetism is on the atomic scale [38]. Furthermore, MILs

possess some of the unique physicochemical properties of ILs, including low vapor pressure at room temperature and impressive solvation capabilities for both polar and non-polar compounds, and they can be easily tuned for specific applications. The majority of MILs contain transition metal (Fe(III), Co(II), Mn(II), Ni(II)...) or lanthanide metal (Gd(III), Nd(III), Dy(III)...) complexes as anions [36]. Figure 4 shows representative examples of MILs used for analytical applications. The type of paramagnetic anion, and also the cationic platform, can assist in modulating the magnetic properties of the MIL.

The inherit magnetism of MILs makes them interesting extraction materials in magnetic separations. Up to date, they have been employed in different modes

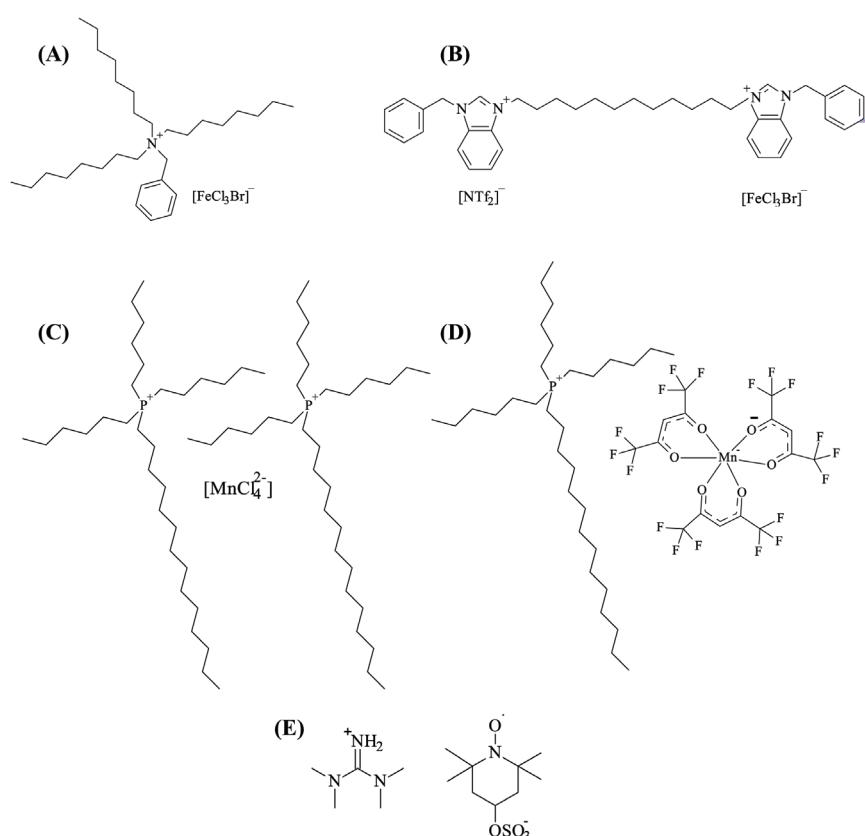


Fig.4 Representative examples of the MILs used in magnetic-assisted microextraction procedures, with (A) bencyltriocetylammonium bromotrichloroferrate(III) ($[N_{8,8,8,Bn}^+][FeCl_3Br^-]$), (B) 1,12-di(3-benzylbenzimidazolium)dodecane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide bromotrichloroferrate (III) ($[[BBnIM]_2C_{12}^{2+}][NTf_2^-][FeCl_3Br^-]$), (C) trihexyltetradecylphosphonium tetrachloromanganate(II) ($[P_{6,6,6,14}^+]_2[MnCl_4^{2-}]$), (D) trihexyl(tetradecyl)phosphonium tris(hexafluoroacetylacetato)manganate(II) ($[P_{6,6,6,14}^+]_2[Mn(hfacac)_3^-]$), and (E) 1,1,3,3-tetramethylguanidine 4-sulfonate 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl ($[TMG^+][TEMPO-OSO_3^-]$).

Table 2. Representative magnetic assisted-microextraction procedures based on the use of magnetic ionic liquids (MILs).

Analites	Sample	Extraction procedure ^a	Extraction material ^b	Analytical technique ^c	LOD ^d ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	RSD ^e (%)	RR ^f (%)	Ref.	
phenols	water	m-DLLME	$[\text{N}_{1,8,8,8}^+][\text{FeCl}_4^-]$	HPLC-DAD (direct injection of the MIL)	1.05–33.0	3.6–7.2	89–94	[42]	
polycyclic aromatic hydrocarbons	water and tea infusion	m-DLLME, followed by back-extraction	$[\text{N}_{8,8,8,B}^+][\text{FeBrCl}_3^-]^g$, $[\text{N}_{8,8,8,\text{MOB}}^+][\text{FeBrCl}_3^-]$, or $[(\text{BBnIM})_2\text{C}_{12}^{2+}][\text{NTf}_2^-,\text{FeCl}_3^-,\text{Br}^-]$	HPLC-FD	0.005–0.02	1.0–13	91.5–119	[6]	
triazine herbicides	vegetable oils	m-DLLME, followed by back-extraction	$[\text{C}_6\text{MIM}^+][\text{FeCl}_4^-]$ & carbonyl iron power to enable magnetic separation	HPLC-UV	1.31–1.49	1.9–7.5	93.7–107	[43]	
organic pollutants	water	m-DLLME	$[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]^g$, or $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$	HPLC-UV	0.05–1.0	0.3–17	71.5–108	[40]	
organic pollutants	water	m-HS-SDME	$[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]^g$, or $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$	HPLC-UV	0.04–1.0	2.3–15	69.2–110	[40]	
free fatty acids	milk	vacuum HS-SDME	$[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$, $[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$, $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{Mn(hfacac)}_3^-]^g$, or $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{Dy(hfacac)}_4^-]$	HSD-GC-MS	14.5–216	2.5–13	79.5–94.4	[44]	
chloramphenicol	water	magnetic-assisted ABS	$[\text{TMG}^+][\text{TEMPO-OSO}_3^-]$ potassium phosphate	&	HPLC-UV	0.14	4.45	90–110	[41]
UV filters	water	SBDLME	$[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{Dy(hfacac)}_4^-]$, $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{Co(hfacac)}_3^-]$, or $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]_2[\text{Ni(hfacac)}_3^-]^g$	HSD-GC-MS	0.01–0.03	1.4–15	89–115	[45]	
phenolic acids	apple	LLE & m- μ -dSPE	molecularly imprinted polymer using $[\text{AlC}_8\text{IM}^+]$ $[\text{FeCl}_4^-]$	HPLC-UV	0.31–1.72	1.1–6.3	81–100	[46]	

^a Abbreviations: ABS for aqueous biphasic system, LLE for liquid-liquid extraction, m-DLLME for dispersive liquid-liquid microextraction with magnetic retrieval, m- μ -dSPE for magnetic-assisted dispersive micro-solid phase extraction, m-HS-SDME for magnetic-assisted headspace single-drop microextraction, vacuum HS-SDME for headspace single-drop microextraction under reduced pressure conditions, and SBDLME for stir-bar dispersive liquid microextraction.

^b **IL abbreviations:** Cations: $[\text{Aliquat}^+]$ for trioctylmethylammonium, $[(\text{BBnIM})_2\text{C}_{12}^{2+}]$ for 1,12-di(3-benzylbenzimidazolium)dodecane, $[\text{C}_6\text{MIM}^+]$ for 1-hexyl-3-methylimidazolium, $[\text{N}_{1,8,8,8}^+]$ for trioctylmethylammonium, $[\text{N}_{8,8,8,B}^+]$ for benzyltrioctylammonium, $[\text{N}_{8,8,8,\text{MOB}}^+]$ for methoxybenzyltrioctylammonium, $[\text{P}_{6,6,6,14}^+]$ for trihexyltetradecylphosphonium, and $[\text{TMG}^+]$ for 1,1,3,3-tetramethylguanidine

Anions: $[\text{Co(hfacac)}_3^-]$ for tris(hexafluoroacetylacetato)cobaltate(II), $[\text{Dy(hfacac)}_4^-]$ for tetra(hexafluoroacetylacetato)dysprosate(III), $[\text{FeBrCl}_3^-]$ for bromotrichloroferrate(III), $[\text{FeCl}_4^-]$ for tetrachloroferrate(III), $[\text{MnCl}_4^{2-}]$ for tetrachloromanganate(II), $[\text{Mn(hfacac)}_3^-]$ for tris(hexafluoroacetylacetato)manganate(II), $[\text{Ni(hfacac)}_3^-]$ for tris(hexafluoroacetylacetato)nickelate(II), $[\text{NTf}_2^-]$ for bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide, and $[\text{TEMPO-OSO}_3^-]$ for 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxyl.

^c Abbreviations: FD for fluorescence detection, HPLC for high-performance liquid chromatography, HSD for headspace desorption, GC for gas chromatography, MS for mass spectrometry, PCR for polymerase chain reaction, and UV for ultraviolet detection.

^d Limit of detection.

^e Relative standard deviation.

^f Relative recovery.

^g Selected as optimum MIL.

^h Molecularly imprinted polymer based on a MIL monomer.

of LPME and SPME, as will be discussed in the following sections.

3.1. Magnetic-assisted liquid phase microextraction

MILs have been employed in two different modes of LPME, including m-DLLME [39] and magnetic-assisted single-drop microextraction (m-SDME) [40]. Furthermore, they have been used as a component of aqueous biphasic systems (ABSs) [41]. Representative examples of these types of applications using MILs are listed in Table 2 [6,40-46].

Regarding m-DLLME, the majority of works use MILs containing Fe(III) anions such as tetrachloroferrate(III) ($[\text{FeCl}_4^-]$) [43] or bromotrichloroferrate(III) ($[\text{FeBrCl}_3^-]$) [47,48], in combination with imidazolium [43], phosphonium [47] or ammonium [47] cations, as in Figure 4(A). Dicationic-based MILs have also been used as extraction solvents in m-DLLME, specifically 1,12-di(3-hexadecylbenzimidazolium) dodecane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide bromotrichloroferrate(III) ($[(\text{C}_{16}\text{BnIM})_2\text{C}_{12}^{2+}] [\text{NTf}_2^-, \text{FeBrCl}_3^-]$) for the determination of DNA in albumin [47] and 1,12-di(3-benzylbenzimidazolium) dodecane bis[(trifluoromethyl)sulfonyl]imide bromotrichloroferrate (III) ($[(\text{BBnIM})_2\text{C}_{12}^{2+}] [\text{NTf}_2^-, \text{FeBrCl}_3^-]$) for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in water [6] (Figure 4(B)). In these cases, the hydrophobicity of the MIL was increased through the use of the dicationic structures while the combination of the two anions serves to control their water solubility without losing the magnetic susceptibility of the material. Other m-DLLME procedures with $[\text{FeCl}_4^-]$ -based MILs required the addition of extra materials such as carbonyl iron powder [49] or Fe_3O_4 MNPs [50] to enable the magnetic separation. The magnetic susceptibility of the tested MILs (1-butyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate(III), $[\text{C}_4\text{MIM}^+]\text{[FeCl}_4^-]$ [49] and 1-hexyl-3-methylimidazolium tetrachloroferrate(III), $[\text{C}_6\text{MIM}^+]\text{[FeCl}_4^-]$ [50]) was not

sufficient for being collected using an external magnetic field. In other cases, the high viscosity of the MIL did not allow direct injection of the MIL microdroplet after m-DLLME and a further step of back-extraction is required [6,43].

Fe(III) anions undergo hydrolysis in water at room temperature and have a strong absorbance at wavelengths in the UV-Visible region, which represents drawbacks for some analytical applications [39]. As an alternative, MILs containing the tetrachloromanganate(II) ($[\text{MnCl}_4^{2-}]$) anion have been developed and used in m-DLLME [39,40] (Table 2). Particularly, trioctylmethylammonium tetrachloromanganate(II) ($[\text{Aliquat}^+]_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$) and trihexyltetradecylphosphonium tetrachloromanganate(II) ($[(\text{P}_{6,6,6,14}^+)_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$) were applied for the determination of different groups of pollutants in water [39,40]. The structure of $[(\text{P}_{6,6,6,14}^+)_2[\text{MnCl}_4^{2-}]$ is represented in Figure 4(C).

Concerning SDME, it is a powerful microextraction technique based on the use of a small droplet of extraction solvent that is directly exposed to the sample (direct immersion SDME, DI-SDME) or using the headspace as intermediate phase (headspace SDME, HS-SDME) [51]. In general, the extraction solvent droplet is suspended with the aid of a microsyringe. However, in m-SDME procedures using MILs as extraction solvent, the common microsyringe is substituted by a rod magnet. With this configuration, a higher microdroplet volume can be hung on the rod magnet for prolonged sampling time, even under strong stirring [40]. Despite this advantage, only a few studies have reported the use of MILs as extraction solvents in m-SDME [40,44,48]. Two of these applications have compared the analytical performance of the m-SDME method with m-DLLME [40,48]. In the first application, three different Fe(III)-based MILs were used in m-DI-SDME and m-DLLME for the determination of DNA [48]. In the second approach, a comparison between m-HS-SDME and m-DLLME was established using $[\text{MnCl}_4^{2-}]$ -based MILs for the determination of organic pollutants [40]. In general, comparable results were

obtained using both types of methodologies. More recently, two MILs containing the $[\text{MnCl}_4^{2-}]$ anion and other novel MILs, namely trihexyl(tetradecyl)phosphonium tris(hexafluoroacetylacetato)manganate(II) ($[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Mn}(\text{hfacac})_3^-]$) and trihexyl(tetradecyl)phosphonium tetrakis(hexafluoroacetylacetato)dysprosate(III) ($[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Dy}(\text{hfacac})_4^-]$), were employed in m-SDME [44] (Figure 4(D), Table 2). In this particular application, a m-HS-SDME method under low pressure conditions (termed as vacuum HS-SDME) was developed for the first time for the determination of free fatty acids in milk [44]. The procedure was combined with headspace desorption (HSD)-GC-MS. This new generation of MILs containing transition or rare earth metals coordinated with bidentate organic ligands are extremely hydrophobic and possess low viscosity and high magnetic susceptibility [52].

A new type of guanidinium-based MIL that does not contain any metal center has been applied in ABS for the determination of chloroamphenicol in water [41] (Table 2). ABS are two immiscible aqueous-rich phase systems based on the combination of two types of components, in general salt-salt, polymer-polymer or salt-polymer combinations [53]. Both types of components are water soluble, but above a certain concentration, they separate into two phases to generate the ABS. When ABS are used with extraction purposes, one of the aqueous phase will be enriched in the analytes. In the developed MIL-ABS approach, the ABS was generated using aqueous solutions of 1,1,3,3-tetramethylguanidine 4-sulfonate 2,2,6,6-tetramethylpiperidine 1-oxy ($[\text{TMG}^+][\text{TEMPO}-\text{OSO}_3^-]$) [41] (Figure 4(E)). Potassium phosphate was used as a salt to promote the phase separation followed by collection of the MIL phase containing chloroamphenicol using an external magnet, and directly injected in HPLC-UV for further determination [41].

3.2. Magnetic-assisted solid-phase microextraction

MILs have also served as platforms for performing SPME extractions. Thus, they have been

used as extraction materials in two SPME modes: stir bar dispersive liquid-liquid microextraction (SBDLME) [45] and m- μ -dSPE [46]. Table 2 summarizes some of the analytical figures of merit of these developed procedures.

SBDLME is a novel technique that combines the principles and advantages of stir bar sorptive extraction (SBSE) and DLLME. The procedure is based on the use of a Nd-core magnetic stir bar as in SBSE, a paramagnetic extraction material (a MIL in this particular case) and high stirring rates during extraction [45]. The MIL is initially retained in the stir bar due to its magnetism but, after increasing stirring rate, the rotational forces of the stir bar surpass the magnetic field and the MIL disperses into the sample solution as fine microdroplets similar to DLLME. Figure 5 shows the dispersion of a MIL during SBDLME. When the stirring is stopped, the MIL containing extracted analytes returns to the stir bar. This new approach has been successfully applied for the determination of UV filters [45] and PAHs [54] in water, both in combination with HSD-GC-MS. Different MILs were tested as possible extraction solvents, including $[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Dy}(\text{hfacac})_4^-]$ [54], trihexyl(tetradecyl)phosphonium tris(hexafluoroacetylacetato)cobaltate(II) ($[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Co}(\text{hfacac})_3^-]$) [45] and trihexyl(tetradecyl)phosphonium tris(hexafluoroacetylacetato)nickelate(II) ($[\text{P}_{6,6,6,14}^+][\text{Ni}(\text{hfacac})_3^-]$) [45,54].

A molecularly imprinted polymer generated using a MIL as monomer has been prepared and used in m- μ -dSPE for the determination of phenolic acids in aqueous extracts of apple samples [46]. The molecularly imprinted polymer was prepared by suspension polymerization using 1-allyl-3-octylimidazolium tetrachloroferrate(III) ($[\text{AlC}_8\text{IM}^+][\text{FeCl}_4^-]$) as MIL monomer, ethylene glycol dimethyl acrylate as crosslinker and chlorogenic acid as template molecule. Furthermore, Fe_3O_4 MNPs were combined with the final polymer to ensure an adequate magnetic susceptibility and to enable magnetic separation during the m- μ -dSPE procedure [46].

4. Conclusions

ILs and derivatives have been successfully used as extraction materials in magnetic-assisted procedures. Two different types of paramagnetic fluids have been generated using ILs: (i) hybrid materials based on MNP@ILs, MNP@PILs or MNP@IL-based surfactants, and (ii) MILs, that are species with inherit magnetism. A simplification of the microextraction procedure is achieved using magnetic materials, as common filtration and centrifugation steps are avoided with these methodologies. The IL-character of the material contributes to highly sensitive and/or selective procedures for the monitoring of a wide variety of analytes and towards environmental, biological and food analysis. Furthermore, MILs have appeared as a new generation of

paramagnetic fluids. Compared to hybrid materials, they are easily synthesized and characterized, and they have served as a tool for developing and exploiting the use of new microextraction procedures, including vacuum HS-SDME and SBDLME. Thus, it can be expected that an increasing number of studies will be published regarding this field in the following years.

Acknowledgements

JLA acknowledges funding from Chemical Measurement and Imaging Program at the National Science Foundation (Grant number CHE-1709372).



Fig. 5. Images of a stir-bar coated with the trihexyltetradecylphosphonium tetrachloronickelate(II) ($[P_{6,6,6,14}]^+ [Ni(hfacac)_3]^-$) MIL (A), and the dispersion of the MIL during a SBDLME procedure (B). Reprinted with permission from reference [45].

References

- [1] Souza-Silva EA, Jiang R, Rodríguez-Lafuente A, Gionfriddo E, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. *Trends Anal. Chem.* 2015;71:224–235.
- [2] Gałuszka A, Migaszewski Z, Namieśnik J. The 12 principles of green analytical chemistry and the significance mnemonic of green analytical practices. *Trends Anal. Chem.* 2013;50:78–84.
- [3] Plotka-Wasylka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. *Trends Anal. Chem.* 2015;73:19–38.
- [4] Spietelun A, Marcinkowski Ł, de la Guardia M, Namieśnik J. Green aspects, developments and perspectives of liquid phase microextraction techniques. *Talanta* 2014;119:34–45.
- [5] Santos E, Albo J, Irabien A. Magnetic ionic liquids: synthesis, properties and applications. *RSC Adv.* 2014;4:40008–40018.
- [6] Trujillo-Rodríguez MJ, Nacham O, Clark KD, Pino V, Anderson JL, Ayala JH, Afonso AM. Magnetic ionic liquids as non-conventional extraction solvents for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Anal. Chim. Acta* 2016;934:106–113.
- [7] Ho TD, Zhang C, Hantao LW, Anderson JL. Ionic liquids in analytical chemistry: fundamentals, advances, and perspectives. *Anal. Chem.* 2014;86:262–285.
- [8] Hapiot P, Lagrost C. Electrochemical Reactivity in Room-Temperature Ionic Liquids. *Chem. Rev.* 2008;108:2238–2264.
- [9] Clark KD, Emaus MN, Varona M, Bowers AN, Anderson JL. Ionic liquids: solvents and sorbents in sample preparation. *J. Sep. Sci.* 2017;00:1–27.
- [10] An J, Trujillo-Rodríguez MJ, Pino V, Anderson JL. Non-conventional solvents in liquid phase microextraction and aqueous biphasic systems. *J. Chromatogr. A* 2017;1500:1–23.
- [11] Trujillo-Rodríguez MJ, Pino V, Anderson JL, Ayala JH, Afonso AM. Double salts of ionic-liquid-based surfactants in microextraction: application of their mixed hemimicelles as novel sorbents in magnetic-assisted micro-dispersive solid-phase extraction for the determination of phenols. *Anal. Bioanal. Chem.* 2015;407:8753–8764.
- [12] Rocío-Bautista P, Pino V. Extraction methods facilitated by the use of magnetic nanoparticles, in: Anderson JL, Berthod A, Pino V, Stalcup A (Eds.), *Analytical Separation Science*, vol. 5, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA, 2015, pp. 1681–1724.
- [13] Li M, Zhang J, Li Y, Peng B, Zhou W, Gao H. Ionic liquid-linked dual magnetic microextraction: A novel and facile procedure for the determination of pyrethroids in honey samples. *Talanta* 2013;107:81–87.
- [14] Fan C, Liang Y, Dong H, Ding G, Zhang W, Tang G, Yang J, Kong D, Wang D, Cao Y. In-situ ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction using a new anion-exchange reagent combined Fe_3O_4 magnetic nanoparticles for determination of pyrethroid pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* 2017;975:20–29.
- [15] Yang L, Su P, Chen X, Zhang R, Yang Y. Microwave-assisted synthesis of poly(ionic liquid)-coated magnetic nanoparticles for the extraction of sulfonylurea herbicides from soil for HPLC. *Anal. Methods* 2015;7:3246–3252.
- [16] Wang B, Wang X, Wang J, Xue X, Xi X, Chu Q, Dong G, Wei Y. Amino acid-based ionic liquid surface modification of magnetic nanoparticles for the magnetic solid-phase extraction of heme proteins. *RSC Adv.* 2016;6:105550–105557.
- [17] Wen Q, Wang Y, Xu K, Li N, Zhang H, Yang Q, Zhou Y. Magnetic solid-phase extraction of protein by ionic liquid-coated $\text{Fe}@\text{graphene oxide}$. *Talanta* 2016;160:481–488.
- [18] Chen Y, Cao S, Zhang L, Xi C, Li X, Chen Z, Wang G. Preparation of size-controlled magnetite nanoparticles with a graphene and polymeric ionic liquid coating for the quick, easy, cheap, effective, rugged and safe extraction of preservatives from vegetables. *J. Chromatogr. A* 2016;1448:9–19.

- [19] Chen F, Song Z, Nie J, Yu G, Li Z, Lee M. Ionic liquid-based carbon nanotube coated magnetic nanoparticles as adsorbent for the magnetic solid phase extraction of triazole fungicides from environmental water. *RSC Adv.* 2016;6:81877–81885.
- [20] Yang M, Xi X, Wu X, Lu R, Zhou W, Zhang S, Gao H. Vortex-assisted magnetic -cyclodextrin/ attapulgite-linked ionicliquid dispersive liquid-liquid microextraction coupled withhigh-performance liquid chromatography for the fast determinationof four fungicides in water samples. *J. Chromatogr. A* 2015;1381:37–47.
- [21] Wang M, Yang F, Liu L, Cheng C, Yang Y. Ionic liquid-based surfactant extraction coupled with magnetic dispersive μ -solid phase extraction for the determination of phthalate esters in packaging milk samples by HPLC. *Food Anal. Methods* 2017;10:1745–1754.
- [22] Leong M-I, Fuh M-R, Huang -D. Beyond dispersive liquid-liquidmicroextraction. *J. Chromatogr. A* 2014;1335:2–14.
- [23] Zhang J, Li M, Yang M, Peng B, Li Y, Zhou W, Gao H, Lu R. Magnetic retrieval of ionic liquids: Fast dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of benzoylurea insecticides in environmental water samples. *J. Chromatogr. A* 2012;1254:23–29.
- [24] Zgoła-Grześkowiak A. Magnetic retrieval of ionic liquid formed during *in situ* metathesis dispersive liquid-liquid microextraction-preconcentration of selected endocrine disrupting phenols from an enlarged sample volume. *Anal. Methods* 2015;7:1076–1084.
- [25] Yang M, Wu X, Jia Y, Xi X, Yang X, Lu R, Zhang S, Gao H, Zhou W. Use of magnetic effervescent tablet-assisted ionic liquid dispersive liquideliquid microextraction to extract fungicides from environmental waters with the aid of experimental design methodology. *Anal. Chim. Acta* 2016;906:118–127.
- [26] Yang M, Zeng H, Wu X, Yang X, Zhou W, Zhang S, Lu R, Li J, Gao H. Magnetic zinc oxide nanoflower-assisted ionic liquid-based nanofluid dispersive liquid-liquid microextraction for the rapid determination of acaricides in tea infusions. *RSC Adv.* 2016;6:111982–111992.
- [27] Chen S, Chen J, Zhu X. Solid phase extraction of bisphenol A using magnetic core-shell ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$) nanoparticles coated with an ionic liquid, and its quantitation by HPLC. *Microchim Acta* 2016;183:1315–1321.
- [28] Wu J, Zhao H, Xiao D, Pham-Huy C, He J, Hea H. Mixed hemimicelles solid-phase extraction of cephalosporins in biological samples with ionic liquid-coated magnetic graphene oxide nanoparticles coupled with high-performance liquid chromatographic analysis. *J. Chromatogr. A* 2016;1454:1–8.
- [29] Amiri M, Yamini Y, Safari M, Asiabi H. Magnetite nanoparticles coated with covalently immobilized ionic liquids as a sorbent for extraction of non-steroidal anti-inflammatory drugs from biological fluids. *Microchim. Acta* 2016;183:2297–2305.
- [30] Vidal L, Riekkola M-L, Canals A, Ionic liquid-modified materials for solid-phase extraction and separation: A review. *Anal. Chim. Acta* 2012;715:19–41.
- [31] Trujillo-Rodríguez MJ, Pino V, Ayala JH, Afonso AM. Ionic liquids in the microextraction context in: Valcárcel M, Cárdenas S, Lucena R (Eds.), *Analytical Microextraction Techniques*, Bentham Science Publishers, Sharjah, UAE, 2017, pp. 70–134.
- [32] Quian W, Texter J, Yan F. Frontiers in poly(ionic liquid)s: syntheses and applications. *Chem. Soc. Rev.* 2017;46:1124–1159.
- [33] Zhang X, Zhang N, Du C, Guan P, Gao X, Wang C, Du Y, Ding S, Hu X. Preparation of magnetic epitope imprinted polymer microspheres using cyclodextrin-based ionic liquids as functional monomer for highly selective and effective enrichment of cytochrome c. *Chem. Eng. J.* 2017;317:988–998.
- [34] Pino V, Germán-Hernández M, Martín-Pérez A, Anderson JL. Ionic liquid-based surfactants in separation science. *Sep. Sci. Technol.* 2012;47:264–276.
- [35] Yang X, Qiao K, Liu F, Wu X, Yang M, Li J, Gao H, Zhang, Zhou W, Lu R. Magnetic mixed hemimicelles dispersive solid-phase extraction based on ionic liquid-coated attapulgite/polyaniline-polypyrrole/ Fe_3O_4 nanocomposites for determination of acaricides in fruit juice prior to high performance liquid chromatography-diode array detection. *Talanta* 2017;166:93–100.

- [36] Clark KD, Nacham O, Purslow JA, Pierson SA, Anderson JL. Magnetic ionic liquids in analytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta* 2016;934:9–21.
- [37] Del Sesto RE, McCleskey TM, Burrell AK, Baker GA, Thompson JD, Scott BL, Wilkes JS, Williams P. Structure and magnetic behavior of transitionmetal based ionic liquids. *Chem. Commun.* 2008;0:447–449.
- [38] Scovazzo P, Portugal CAM, Rosatella AA, Afonso CAM, Crespo JG. Hydraulic pressures generated in magnetic ionic liquids by paramagnetic fluid/air interfaces inside of uniform tangential magnetic fields. *J. Colloid Interface Sci.* 2014;428:16–23.
- [39] Yu H, Merib J, Anderson JL. Faster dispersive liquid-liquid microextraction methods using magnetic ionic liquids as solvents. *J. Chromatogr. A* 2016;1463:11–19.
- [40] An J, Rahn KL, Anderson JL. Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents. *Talanta* 2017;167:268–278.
- [41] Yao T, Yao S. Magnetic ionic liquid aqueous two-phase system coupled with highperformance liquid chromatography: A rapid approach for determination of chloramphenicol in water environment. *J. Chromatogr. A* 2017;1481:12–22.
- [42] Chatzimitakos T, Binellas C, Maidatsi K, Stalikas C. Magnetic ionic liquid in stirring-assisted drop-breakup microextraction: Proof-of-concept extraction of phenolic endocrine disrupters and acidic pharmaceuticals. *Anal. Chim. Acta* 2016;910:53–59.
- [43] Wang Y, Sun Y, Xu B, Li X, Jin R, Zhang H, Song D. Magnetic ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in vegetable oils by liquid chromatography. *J. Chromatogr. A* 2014;1373:9–16.
- [44] Trujillo-Rodríguez MJ, Pino V, Anderson JL. Magnetic ionic liquids as extraction solvents in vacuum headspace single-drop microextraction. *Talanta* 2017;172:86–94.
- [45] Chisvert A, Benedé JL, Anderson JL, Pierson SA, Salvador A. Introducing a new and rapid microextraction approach based on magnetic ionic liquids: stir bar dispersive liquid microextraction. *Anal. Chim. Acta* 2017;983:130–140.
- [46] Tashakkori P, Erdem P, Bozkurt SS. Molecularly imprinted polymer based on magnetic ionic liquid for solid-phase extraction of phenolic acids. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2017;1–10.
- [47] Clark KD, Sorensen M, Nacham O, Anderson JL. Preservation of DNA in nuclease-rich samples using magnetic ionic liquids. *RSC Adv.* 2016;6:39846–39851.
- [48] Clark KD, Nacham O, Yu H, Li T, Yamsek MM, Ronning DR, Anderson JL. *Anal. Chem.* 2015;87:1552–1559.
- [49] Wang Y, Sun Y, Xu B, Li X, Wang X, Zhang H, Song D. Matrix solid-phase dispersion coupled with magnetic ionic liquid dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of triazine herbicides in oilseeds. *Anal. Chim. Acta* 2015;888:67–74.
- [50] Zhu S, Wang L, Su A, Zhang H. Dispersive liquid-liquid microextraction of phenolic compounds from vegetable oils using a magnetic ionic liquid. *J. Sep. Sci.* 2017;40:3130–3137.
- [51] Jain A, Verma KK. Recent advances in applications of single-drop microextraction: A review. *Anal. Chim. Acta* 2011;706:37–65.
- [52] Pierson SA, Nacham O, Clark KD, Nan H, Mudryk Y, Anderson JL. Synthesis and characterization of low viscosity hexafluoroacetylactonate-based hydrophobic magnetic ionic liquids. *New J. Chem.* 2017;41:5498–5505.
- [53] Freire MG, Cláudio AFM, Araújo JMM, Coutinho JAP, Marrucho IM, Canongia Lopes JN, Rebelo LPN. Aqueous biphasic systems: a boost brought about by using ionic liquid. *Chem. Soc. Rev.* 2012;41:4966–4995.
- [54] Benedé JL, Anderson JL, Chisvert A. Trace determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters by magnetic ionic liquid-based stir bar dispersive liquid microextraction. *Talanta* 2018;176:253–261.

Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído

Development, validation and application of a rapid and sensitive method for determining trigonelline and caffeine by UHPLC-DAD present in roasted and ground coffee

Tiago Bervelier Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf*

Laboratório de Desenvolvimento de Instrumentação, Automação e Metodologia Analítica (DIA), Departamento de Química, Universidade Estadual de Londrina, Campus Universitário, Rodovia Celso Garcia CID, Pr 445, Km 380 CEP 86.057-970- Londrina, PR, Brasil

*snixdorf@uel.br

Recebido: 04/09/2017

Aceito: 01/11/2017

Resumo

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas de grande importância biológica. Estão presentes em inúmeros alimentos e fármacos, atuando de diferentes maneiras, com ação estimulante, sendo precursores de compostos bioativos e, como pró-fármacos. Despertam crescente interesse na determinação de seus teores pela diversidade de aplicações, sendo utilizados, por exemplo, como marcadores na diferenciação entre café arábica (*Coffea arabica*) e robusta (*Coffea canephora*). Por este motivo, este trabalho propõe o desenvolvimento de um método cromatográfico sensível para determinação rápida de trigonelina e cafeína em café por cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (UHPLC-DAD). O método desenvolvido foi validado segundo a RE 899/2003 da ANVISA e, aplicado na análise de cafés do tipo torrado e moído comerciais. O método mostrou-se adequado para todas as figuras de mérito, com faixa linear de trabalho de 0,20 a 2,00 %(m/m) para a trigonelina e de 0,60 a 6,00 %(m/m) para a cafeína, com limites de quantificação de 0,03 e 0,06 %(m/m) e de detecção de 0,01 e 0,02 %(m/m), respectivamente. Quanto a precisão apresentou repetitividade com desvio padrão relativo (DPR) de 0,12% para a trigonelina e 0,55% para a cafeína, e DPR para a precisão intermediária respectivamente de 0,52 e 1,14%(m/m), apresentando exatidão média de 99,80% em 3 níveis de concentração baixa, média e alta, para ambos os compostos. O método destina-se a auxiliar no controle de qualidade de cafés torrado e moído comerciais.

Palavras-chave: *Coffea arabica*, blends de café, desenvolvimento de métodos, validação.

Abstract

Trigonelline and caffeine are alkaloids from the group of xanthines of great biological importance. They are found in numerous foods and drugs, acting in different ways, with stimulating action, being precursors of bioactive compounds and, as prodrugs. They arouse growing interest in their contents determination by the diversity of applications, being used, for example, as markers in the differentiation between arabica coffee (*Coffea arabica*) and robusta (*Coffea canephora*). For this reason, this study proposed the development of a sensitive chromatographic method for the rapid determination of trigonelline and caffeine in coffee by ultra high-performance liquid chromatography with diode array detection (UHPLC-DAD). The developed

method was validated according to ANVISA RE 899/2003 and applied in the analysis of commercial roasted and ground coffee. The method was suitable for all merit figures, with a linear working range of 0.20 to 2.00 % (w/w) for trigonelline and from 0.60 to 6.00 % (w/w) for caffeine, with limits of quantification of 0.03 and 0.06 % (w/w) and detection of 0.01 and 0.02% (w/w), respectively. It presented precision as repeatability with relative standard deviation (RSD) of 0.12% for trigonelline and 0.55% for caffeine, with RSD for the intermediate precision of 0.52 and 1.14%, respectively, with average accuracy of 99.80% in 3 levels of low, medium and high concentration, for both compounds. The method intends to assist in the quality control of commercial roasted and ground coffee.

Keywords: *Coffea arabica, coffee blends, method development, validation.*

1. Introdução

A trigonelina e a cafeína são alcaloides do grupo das xantinas e apresentam grande importância biológica, principalmente considerando ser a trigonelina precursora de compostos bioativos e a cafeína um estimulante (1). Pelo fato destes compostos serem considerados pró-fármacos, atuam na latenciação e formas avançadas de transporte de princípios ativos dos fármacos, como em antirretrovirais (2), ou intensificam a ação de alguns medicamentos para o tratamento do câncer. Por isso, são muito utilizados em associações farmacêuticas.

A trigonelina está presente em diversos alimentos amplamente consumidos pela população mundial como cevada, melão, milho, cebola, ervilha, soja, tomate, crustáceos, peixes, mexilhões e em maior concentração no café (3). Nesta planta, a importância biológica da trigonelina se deve, principalmente, ao fato de a mesma ser precursora da niacina no processo de torrefação do café, e precursora do ácido nicotínico durante o processo de desmetilação, ambos correspondentes à vitamina B3, aumentando o valor nutricional da bebida (1).

A cafeína por sua vez, é considerada uma droga estimulante, utilizada em fármacos e bebidas energéticas. Os efeitos comportamentais mais notáveis ocorrem após a ingestão de doses baixas á moderadas deste composto, verificando-se uma melhoria no desempenho cognitivo e psicomotor do consumidor. Essa melhora seu estado de alerta, energia, capacidade de concentração e do

desempenho em tarefas simples, diminuindo a sonolência e o cansaço, isto é, atuando na estimulação do sistema nervoso central de maneira geral. Porém, a cafeína ingerida em excesso pode ser prejudicial à saúde (4, 5). Portanto, efetuar sua quantificação é primordial.

O café destaca-se por ser uma das bebidas mais consumidas no mundo, um produto básico valioso, sendo a 2^a *commodity* básica de maior valor econômico, permanecendo somente atrás do petróleo (6). Entre os seus constituintes destacam-se os carboidratos, a cafeína e a trigonelina, que podem ser considerados como potenciais marcadores de qualidade (4, 5). Marcucci et al. (2013) (7) observaram que a espécie de café arábica apresenta, relativamente, menor concentração de cafeína e maior concentração de trigonelina quando comparada ao café robusta(conilon), ressaltando o potencial destes compostos em fornecer informações a cerca da qualidade e, da possível composição de bebidas provenientes de *blends* de café arábica e conilon (8, 9, 10).

Inúmeros métodos têm sido descritos para análise simultânea destas xantinas na literatura (5, 11, 12, 13), predominando o emprego da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) de fase reversa. Porém, ainda se tem explorado pouco os benefícios da cromatografia líquida de ultra-alta eficiência (UHPLC) que utiliza colunas cromatográficas com partículas de tamanho menor do que 2,0 µm, em geral de 1,7 µm. Esta técnica possibilita a injeção de volumes menores de amostra, com análises mais rápidas (inferiores a 3 min) com maior sensibilidade e resolução, ocasionando maior demanda para o

desenvolvimento de métodos analíticos que utilizem esta nova tecnologia.

Neste panorama, este trabalho visou desenvolver um método cromatográfico rápido e eficiente para determinação de trigonelina e cafeína empregando cromatografia líquida de ultra-alta eficiência com detecção por arranjo de fotodiodos. O método foi validado segundo a normativa da ANVISA RE nº 899/2003 e utilizado para analisar amostras de cafés torrado e moído comerciais.

2. Experimental

2.1. Reagentes e padrões analíticos

As etapas de extração e preparo dos padrões analíticos foram realizadas com água ultrapura Milli-Q®($18,2 \text{ M}\Omega \text{ cm}^{-1}$ a 25 °C, Simplicity 185, Millipore, Billerica, MA, EUA). As fases móveis utilizadas durante o processo de separação foram água ultrapura e acetonitrila (ACN) grau HPLC (J.T. Baker, Center Valley, PA, EUA). Foram utilizados padrões de trigonelina e cafeína com 99,99% de pureza, obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, EUA).

2.2. Preparo das soluções padrão de trigonelina e cafeína

Para trigonelina preparou-se uma solução estoque de concentração 100,0 mg L⁻¹, pesando-se 0,01000 g de trigonelina anidra em balança analítica de 5 casas (XS205, Mettler-Toledo Columbus, OH, EUA). Uma solução estoque de cafeína na concentração de 300 mg L⁻¹ foi preparada, pesando-se 0,0300 g de cafeína anidra. Os padrões foram dissolvidos em água ultrapura Milli-Q®.

2.3. Sistema cromatográfico

Utilizou-se um sistema cromatográfico de ultra-alta performance (UPLC, Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA) composto por: bomba binária, sistema de gerenciamento de solventes e desgaseificador, injetor automático e detector de arranjo de diodo. Para injeção da amostra otimizou-se o volume de 1,0 µL no

modo *Partial Loop With Needle Overfill*, com solventes de lavagem fraca (H₂O) e forte (ACN), tendo as amostras sido mantidas a 10 °C. A coluna utilizada foi uma Acquity UPLC® BEH C18 (2,1 x 50 mm; 1,7 µm; Waters) mantida a 40 °C durante toda análise. Para detecção dos analitos empregou-se um detector do tipo Acquity® Ultra Performance LC (Waters) e λ DAD no modo 3D, com varredura espectral de 190 a 400 nm, com comprimento de onda fixo em 272 nm.

2.4. Método cromatográfico

O método cromatográfico desenvolvido utilizou como fase móvel água (A) e acetonitrila (B) e eluição por gradiente, conforme as proporções descritas na Tabela 1.

2.5. Validação do método cromatográfico

O método cromatográfico foi validado segundo a normativa da ANVISA (RE nº 899/2003) sendo avaliados os parâmetros de especificidade, seletividade, precisão (repetitividade intra-dia), precisão intermediária (reprodutibilidade inter-dias), faixa dinâmica de trabalho e linearidade, limite de detecção e quantificação, exatidão (adição e recuperação) e robustez.

A especificidade e a seletividade do método proposto foram avaliadas considerando-se a ausência de sinais analíticos nos tempos de retenção dos padrões de trigonelina e cafeína no solvente extrator e na amostra de café. Esses parâmetros foram ainda confirmados pela porcentagem de recuperação, considerando-se a amostra de café sem adição de padrão e, a amostra de café adicionada de padrão. Como último recurso, utilizou-se a pureza espectral característica ao longo dos picos dos analitos, nos seus respectivos comprimentos de onda de máxima absorção.

A precisão foi avaliada para as concentrações de 0,8 % (m/m) para trigonelina e de 2,5 % (m/m) para cafeína pela repetitividade de 10 análises consecutivas da amostra e, a precisão intermediária de 2 análises consecutivas da amostra em 3 dias distintos (n=6) (Tab. 2).

Tabela 1. Proporções de água (**A**) e acetonitrila (**B**) utilizadas no método cromatográfico proposto

	Tempo (min)	Vazão (mL min⁻¹)	% A	% B	Curva
1	Inicial	0,4	99,0	1,0	6 - linear
2	1,00	0,4	50,0	50,0	6 - linear
3	1,01	0,4	5,0	95,0	6 - linear
4	1,10	0,4	5,0	95,0	6 - linear
5	1,11	0,4	99,0	1,0	6 - linear
6	3,00	0,4	99,0	1,0	6 - linear

A: Água ultrapura Milli-Q®; B: Acetonitrila.

A linearidade foi avaliada para a faixa de trabalho de 0,2 a 2,0 %(m/m) para a trigonalina e de 0,6 a 6,0 %(m/m) para a cafeína, utilizando o detector DAD(Acquity Ultra Performance LC, Waters, Milford, EUA).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram calculados a partir das equações das retas dos 2 compostos para o detector DAD.

A exatidão foi determinada pelo ensaio de recuperação para as concentrações de 0,2; 1,2 e 2,0 %(m/m) para a trigonalina e de 0,6; 3,0 e 6,0 %(m/m) para a cafeína utilizando o DAD.

Tabela 2. Parâmetros de validação cromatográfica do método desenvolvido para a determinação de cafeína e trigonalina em amostras de cafés torrado e moído empregando UHPLC-DAD

Tempo (min)	Parâmetros de validação	Trigonalina	Cafeína
Faixa dinâmica de trabalho (% m/m)		0,2 a 2,0	0,6 a 6,0
Equação da reta		$y = 141026x - 2833,5$	$y = 369528x + 1097,9$
Coeficiente de correlação linear, r		0,9999	0,9999
Coeficiente de determinação, R ²		0,9996	0,9997
Limite de detecção, LD (% m/m)		0,01	0,02
Limite de quantificação, LQ (% m/m)		0,03	0,06
Precisão [0,8; 2,5 %(m/m)] n=10(DPR%)		0,12	0,55
Precisão intermediária, n=6 (DPR%)		0,52	1,14
	[0,2; 0,6 %(m/m)]	92,50	109,05
Exatidão (% de recuperação)	[1,2; 3,0 %(m/m)]	96,70	104,10
	[2,0; 6,0 %(m/m)]	100,50	96,00

DPR – desvio padrão relativo.

A robustez do método cromatográfico foi avaliada para variações: na proporção do gradiente da fase móvel em $\pm 1,0\%$ da composição dos solventes A e B; de $\pm 5^{\circ}\text{C}$ da temperatura da coluna; e utilizando-se o solvente B de diferentes marcas (J. T. Baker e Fischer, ambos grau HPLC).

2.6. Aplicação

Aplicou-se o método desenvolvido em 20 amostras de café torrado e moído comerciais, obtidas em mercados da região de Londrina (Paraná), visando sua futura aplicação em análises de rotina de controle de qualidade.

2.7. Determinação de umidade

Para caracterização das amostras e cálculo da concentração dos componentes em base seca, avaliou-se a umidade das amostras de café torrado e moído utilizando analisador de umidade com lâmpada halógena (OHAUS-MB 45, Parsippany, EUA). Na determinação, utilizou-se programação de modo normal a 105°C durante 7 minutos,

empregando 2,000 g de amostra e considerando-se 0,01 g, como diferença de perda de massa (DIAS, 2005; MARCUCCI et al., 2013). As análises foram realizadas em triplicata.

2.8. Extração de trigonelina e cafeína

Para o preparo das amostras de cafés comerciais, adaptou-se as condições de extração da ISO 20481:2008. Após a determinação da umidade, pesou-se o equivalente a 0,50000 g de amostra, em base seca, em balança analítica (AX200, Shimadzu, Quioto, Japão). Foram adicionados às amostras 2,00 g de óxido de magnésio (Merck, Darmstadt, Alemanha) e 100,00 mL de água ultrapura em Erlenmeyer de 500 mL. A massa do Erlenmeyer, juntamente com as massas da amostra, do MgO e da água foram anotadas (massa inicial). Fechou-se o frasco com a mistura, homogeneizou-se e aqueceu-se em chapa aquecedora (NT339, Nova Técnica, Piracicaba-SP) até a fervura por 20 minutos, sendo homogeneinizadas a cada 5 minutos. Após o resfriamento, pesou-se o frasco

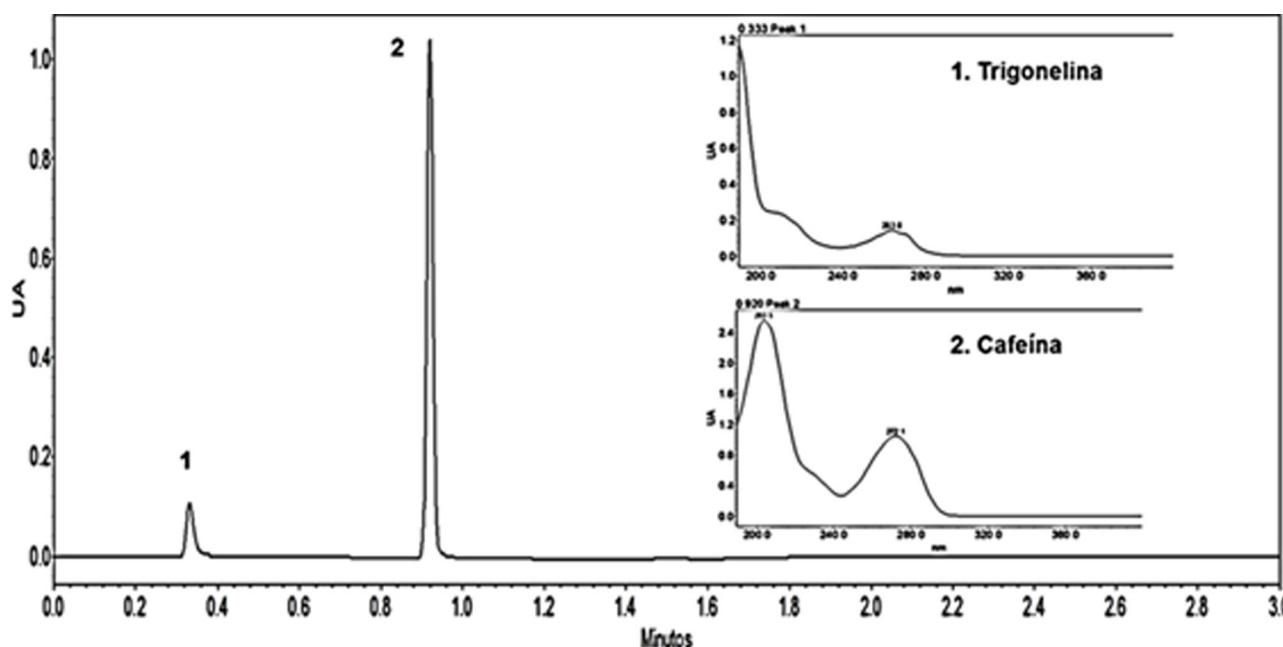


Figura. 1. Cromatograma dos padrões de trigonelina 0,5 % (m/m) (pico 1) e cafeína 2,0 % (m/m) (pico 2) com seus respectivos espectros de absorção molecular empregando UHPLC-DAD.

novamente e adicionou-se a água apenas para recompor a massa, perdida por evaporação. O extrato foi filtrado em papel filtro qualitativo e o sobrenadante passado em membrana de acetato celulose 0,22 µm (Sartorius Stedim, Göttingen, Alemanha) para ser injetado no sistema cromatográfico.

3. Resultados e discussão

A Figura 1 apresenta um cromatograma obtido a partir do método proposto para uma mistura de padrões de trigonelina e cafeína em concentrações próximas às encontradas em amostras de café, 0,5 %(m/m) e 2,0 %(m/m), respectivamente.

Pode-se observar, a partir da Figura 1, que o método proposto atende à proposta de rapidez, sendo que os dois analitos são detectados em menos de 1 minuto, sendo os tempos de retenção da trigonelina e cafeína de 0,33 e 0,93 minutos, respectivamente. A parte final do cromatograma de 1 a 3 min corresponde às etapas de limpeza e reequilíbrio das condições iniciais das proporções das fases móveis (Tab. 1). O método foi desenvolvido visando sua aplicação em todos os tipos de equipamento de UHPLC, tanto nos que fazem a mistura da fase móvel á base de volume quanto à base de tempo. Porém, esta etapa pode ser otimizada diminuindo o tempo de análise para 1,5 min, empregando um sistema de UHPLC binário, como neste trabalho, em virtude do seu menor volume morto. O mesmo vale para a etapa de gradiente. O método cromatográfico proposto pode ser considerado o mais rápido encontrado na literatura para detecção simultânea dos dois compostos, sem assimetria de picos, com elevada resolução e sensibilidade. Comparativamente, o método proposto por O' Driscoll (2014) (11) apresentou tempos de retenção para trigonelina de 1,00 e para a cafeína de 6,46 minutos, apresentando em média tempo de análise 5 vezes maior.

O método foi validado de acordo com a RE 899/2003 da ANVISA e as figuras de mérito da validação do método estão apresentadas na Tabela 2.

O método desenvolvido mostrou-se: linear ($r > 0,99$) na faixa dinâmica de trabalho proposta para a trigonelina (0,2 a 2,0 % (m/m) (Fig. 2a) e para a cafeína (0,6 a 6,0% (m/m) (Fig. 2b); apresentando limites de detecção e quantificação adequados, considerando as concentrações das amostras de cafés torrado e moído comerciais; preciso (DPR<1%) com dados aleatorizados, sem tendência e, com baixa dispersão nos gráficos de resíduos (Fig. 2c e 2d); e exato, com uma taxa de recuperação média para as concentrações de ambos os compostos na ordem de 99,80%, considerando-se os três níveis de concentração: baixo, médio e alto.

A especificidade e seletividade foram avaliadas pelo perfil dos espectros de absorção dos analitos (Fig. 3) nos tempos de retenção de 0,33 min para a trigonelina e em 0,93 min para cafeína. As especificidade e seletividade do método foram também confirmadas pela adição de padrão na amostra, onde os picos dos analitos tiveram suas áreas acrescidas proporcionalmente à concentração dos padrões adicionados. Uma vez que os dois analitos apresentam comprimentos máximos de absorção relativamente próximos, a análise dos dois analitos foi realizada em 272 nm, sem prejuízo de sensibilidade para a trigonelina, com comprimento de absorção máximo de 264 nm. O método mostrou-se robusto frente às variações aplicadas de proporção de fase móvel ($\pm 1\%$), temperatura da coluna ($\pm 5^{\circ}\text{C}$), e variação de 2 marcas de acetonitrila, apresentando taxas de recuperação adequadas, próximas a 100% e, portanto, dentro da faixa recomendada pela ANVISA, de 70 a 120%.

Após a validação do método realizou-se a análise de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais dos tipos superior, tradicional e extraforte, adquiridas em supermercados da região metropolitana de Londrina – PR, visando observar a aplicabilidade do método proposto em análises de rotina para estes analitos (Fig. 3).

Os espectros de absorção dos analitos trigonelina e cafeína das amostras analisadas (Fig. 3b e 3c) foram comparados com os espectros dos padrões analíticos (Fig. 1) a fim de se observar possíveis indícios de coeluição

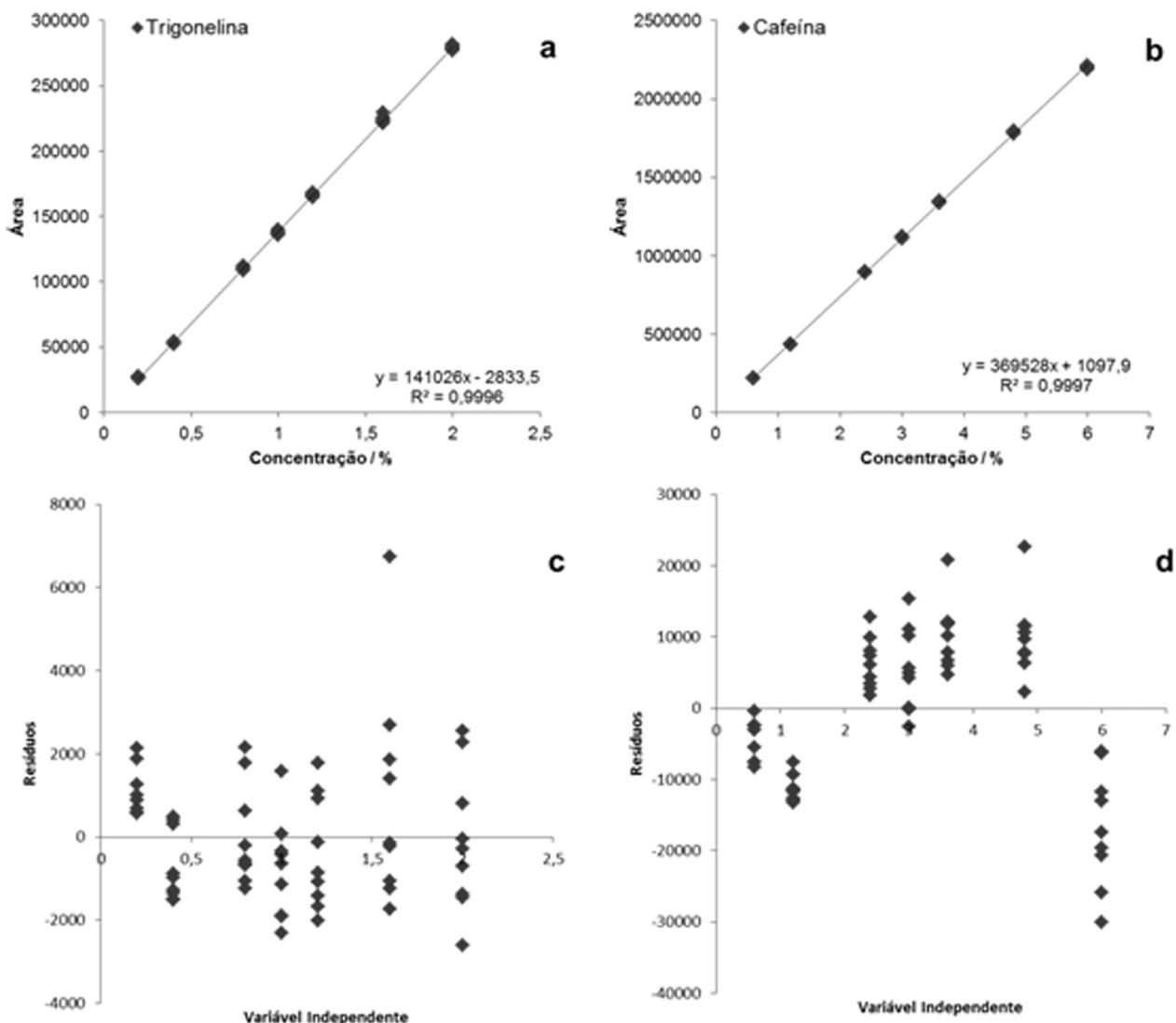


Figura. 2. Curvas analíticas (a, b) e análises de resíduos (c, d) para trigonelina e cafeína.

de picos cromatográficos pela modificação ou surgimento de novas bandas de absorção. Pode se observar que em ambos os casos os espectros foram idênticos, indicando ausência de coeluições que poderiam ser ocasionadas por possíveis interferentes nas matrizes amostrais. Os resultados de quantificação das amostras comerciais estão apresentados na Tabela 3.

Dentre as amostras analisadas (Tab. 3), observou-se que houve elevada variação de trigonelina e cafeína, com concentrações entre 0,03 - 1,07%(m/m) e 1,11 -

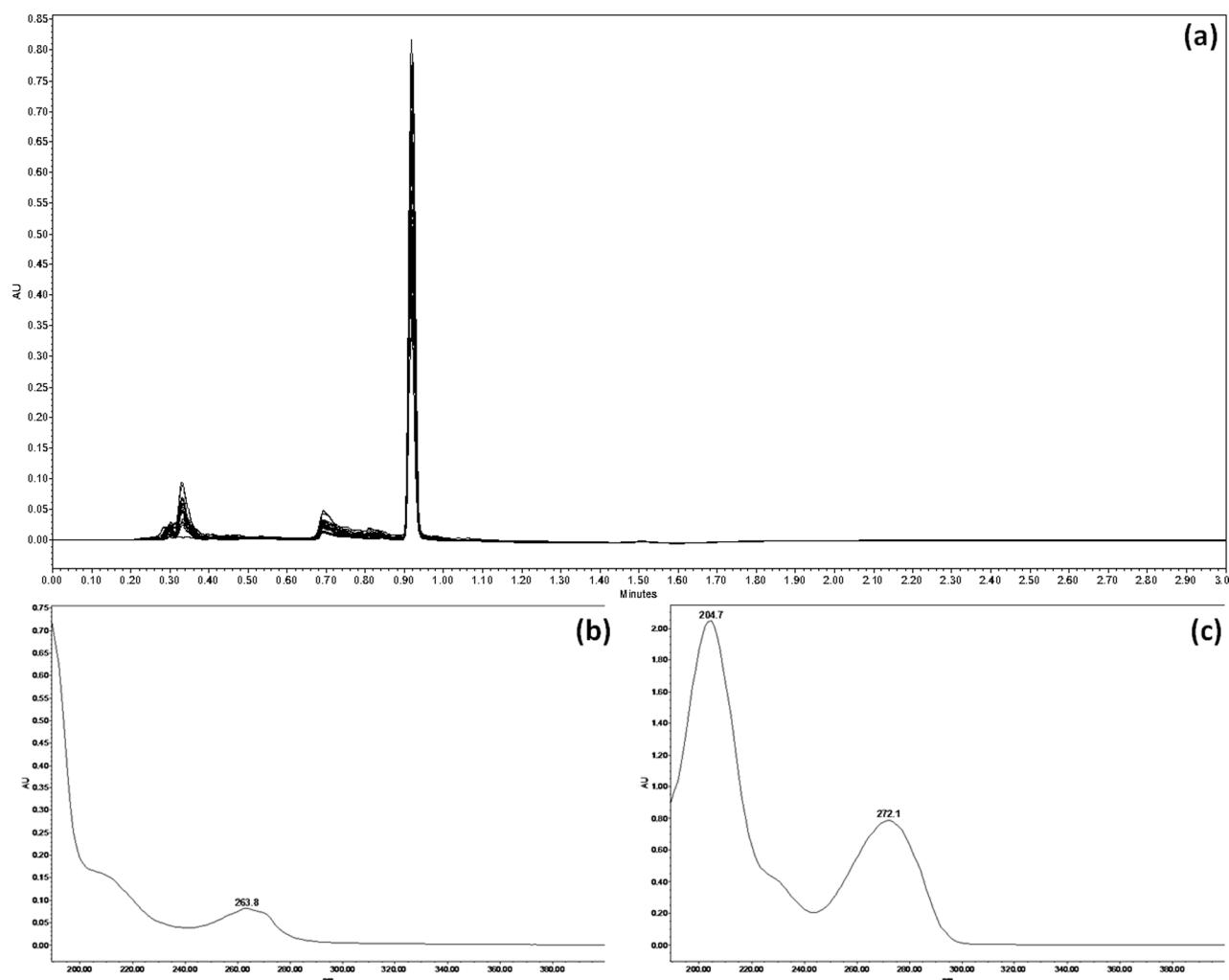


Figura. 3. (a) Cromatogramas referentes às análises de 20 amostras de cafés torrado e moído comerciais com seus respectivos espectros de absorção dos analitos (b) trigonelina e (c) cafeína, visando verificar a aplicabilidade do método em análises de rotina de controle de qualidade.

Tabela 3. Concentração de trigonelina e cafeína nas 20 amostras de cafés comerciais analisadas

Amostra	Tipo	Trigonelina (n = 2)		Cafeína (n = 2)	
		Media (%) ± DP	CV (%)	Media (%) ± DP	CV (%)
1	EF	0,65 ± 0,00	0,00	2,33 ± 0,01	0,36
2	EF	0,14 ± 0,00	0,00	1,61 ± 0,00	0,00
3	EF	0,29 ± 0,00	0,00	1,64 ± 0,00	0,00
4	EF	0,14 ± 0,00	2,48	1,61 ± 0,01	0,39
5	NI	0,03 ± 0,00	0,00	1,12 ± 0,00	0,00
6	EF	0,40 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
7	T	0,34 ± 0,00	0,00	2,08 ± 0,00	0,00
8	T	0,51 ± 0,01	2,36	1,11 ± 0,00	0,38
9	EF	0,49 ± 0,02	3,74	1,59 ± 0,00	0,00
10	S	0,41 ± 0,01	2,41	1,60 ± 0,00	0,04
11	T	0,34 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
12	T	0,62 ± 0,02	3,42	1,54 ± 0,00	0,05
13	T	0,36 ± 0,01	1,62	1,77 ± 0,00	0,00
14	T	0,40 ± 0,00	0,00	1,69 ± 0,00	0,00
15	NI	0,40 ± 0,00	1,23	1,70 ± 0,08	5,00
16	T	0,54 ± 0,00	0,00	1,49 ± 0,00	0,00
17	NI	0,37 ± 0,01	1,91	1,12 ± 0,01	0,82
18	G	1,07 ± 0,00	0,00	1,67 ± 0,00	0,00
19	NI	0,36 ± 0,00	0,00	1,75 ± 0,00	0,00
20	G	1,04 ± 0,05	4,78	1,41 ± 0,02	1,20

Informações na embalagem - T: tradicional; EF: extraforte; S: superior; NI: não informada; G: Gourmet.

2,33%(m/m), respectivamente, indicando, que a maioria das amostras são compostas por *blends* de café arábica e café robusta (conilon).

4. Conclusão

O método analítico desenvolvido para análise de trigonelina e cafeína nas matrizes de cafés comerciais por UHPLC-DAD foi considerado rápido, seletivo, preciso, linear, com limites de detecção e quantificação

adequados e robusto, garantido a quantificação dos compostos com confiabilidade na faixa de concentração analítica dos cafés torrado e moído comerciais.

Agradecimentos

À CAPES pelo UPLC-DAD-MS/MS – Projeto AUX-PE-NANOBIOTEC-710/2009 - PROCESSO. no. 23038.019085/2009-14; pelas bolsas de doutorado do

Programa de Pós-Graduação de Química Associação
UEL-UEPG-Unicentro; e pelas bolsas de IC concedidas
pelo Projeto PROCAD/2013 – Processo no. 3007/2014.

Referências

- [1] Nogueira M, Trugo LC. Distribuição de Isômeros de ácido clorogênico e teores de cafeína e trigonelina em cafés solúveis brasileiros, Ciênc. Tecnol. Aliment. 2003; 23(2): 296-299.
- [2] Chung MC, Silva ATA, Castro LF, Güido RVC, Nassute JC, Ferreira, EI. Latenciação e formas avançadas de transporte de fármacos. Rev. Bras. Cienc. Farm., 2005; 41 (2): 28036.
- [3] Perrone D, Marino Donangelo C, Farah A. Fast simultaneous analysis of caffeine, trigonelline, nicotinic acid and sucrose in coffee by liquid chromatography-mass spectrometry. Food Chem, 2008; 110: 1030-1035.
- [4] Alves RC, Casal S, Oliveira B. Benefícios do café na saúde: mito ou realidade? Quim. Nova, 2009; 32 (8): 2169-2180.
- [5] Jesus JS. Determinação e identificação de impurezas em café torrado e moído em Anápolis – GO [Trabalho de Conclusão de Curso em Ciências Exatas e Tecnológicas]. Anápolis: Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas (UNUCET); 2014.
- [6] International Coffee Organization (ICO). Londres [atualizado em 30 ago. 2017]. Disponível em: <http://www.ico.org/>
- [7] Marcucci CT, Benassi MT, Almeida MB, Nixdorf SL. Teores de trigonelina, ácido 5-cafeoilquínico, cafeína e melanoidinas em cafés solúveis comerciais brasileiros. Quím. Nova, 2013; 36 (4): 544-548.
- [8] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017a]. História do café. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=38>.
- [9] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017b]. Espécies de café. Disponível em: <http://www.abic.com.br>.
- [10] Associação Brasileira da Indústria De Café (ABIC). Rio de Janeiro [atualizado em 29 ago. 2017c]. Café e composição química. Disponível em: <http://www.abic.com.br/publique/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=279>.
- [11] O'Driscoll DJ. Analysis of coffee bean extracts by use of ultra-performance liquid chromatography coupled of quadrupole time-of-flight mass spectrometry, MethodsX, 2014; 1: 264–268.
- [12] Cheng ZX, Wu JJ, Liu ZQ, Lin N. Development of a hydrophilic interaction chromatography-UPLC assay to determine trigonelline in rat plasma and its application in a pharmacokinetic study. Chin. J. Nat. Medicines, 2013; 11 (2): 164–170.
- [13] Meyer S, Dunkel A, Hofmann T. Sensomics-Assisted Elucidation of the Tastant Code of Cooked Crustaceans and Taste Reconstruction Experiments. J. Agric. Food Chem. 2016; 64: 1164–1175.

Trans fatty acids levels of puff pastry products marketed in the central region of Portugal

Níveis de ácidos graxos trans em produtos folhados comercializados na região central de Portugal

Jorge M. T. B. Varejão^b, Fabiana F.

G. S. Oliveira^a,

^{a,b} Polytechnic Institute of Coimbra,
Escola Superior Agrária, CERNAS,
Department of Exact Science, Ben-
canta, 3000-316 Coimbra, Portugal

Escola Superior Agraria, Department of
Exact Science, Bencanta, 3000-316 Coim-
bra, Portugal

*jvarejao@esac.pt

Recebido: 22/02/2017

Aceito: 01/11/2017

Resumo

Portugal tem um elevado consumo de produtos de massa folhada, altamente apreciados localmente e cuja produção pode envolver a utilização de gordura vegetal parcialmente hidrogenada (PHVF). A ingestão de ácidos gordos *trans* (TFA) é uma preocupação crescente para a saúde, uma vez que existem fortes evidências entre sua ingestão e o aumento da lipoproteína de baixa densidade (LDL) /diminuição do colesterol de lipoproteína de alta densidade (HDL), respostas metabólicas relacionadas com um maior risco de doença coronária. Para avaliar os níveis de ácidos gordos trans em produtos de confeitoraria populares na região centro de Portugal, cinquenta amostras destes produtos foram coletadas e analisadas por cromatografia gasosa de alta resolução (HRGC). Os resultados mostram um teor médio de ácidos gordos trans de $1,88 \pm 0,60\%$ (intervalo de confiança de 95%) nos lípidos combinados totais. A maior parte das amostras analisadas (54%) apresentou um teor muito baixo de ácidos gordos *trans*, menor que 1,00%.

Abstract

Portugal has a high consume of puff pastries products, highly appreciated locally and whose production may involve the use of partially hydrogenated vegetable fat (PHVF). The intake of trans fatty acids (TFA) is a growing health concern since strong evidence exists between their ingestion and the increase of low density lipoprotein (LDL)/decrease of high-density lipoprotein(HDL) cholesterol, metabolic responses which are related to a higher risk of coronary heart disease. To access the levels of *trans* fatty acids in popular pastry products in the center region of Portugal, fifty samples of these products were collected and analyzed using high-resolution gas chromatography (HRGC). Results show a mean content of *trans* fatty acids of $1.88 \pm 0.60\%$ (95% confidence interval) from total combined lipid fatty acids. The major part of the examined samples (54%) showed very low *trans* fatty acid content, lesser than 1.00%.

Keywords: Coronary heart disease, Fat, Portuguese puff pastry, *Trans* fatty acids.

1. Introduction

Portugal has a rich heritage of pastry products very appreciated locally as well as in Portuguese influence countries. From central Europe to Asia is possible to find on sale “pastel de nata” a typical example of a Portuguese puff pastry product. This and other variants of puff pastries require fat to make the outer multilayered structure when cooked. Industrial fat such margarines and “shortenings” are available from different local sources, some of them involving partially hydrogenated vegetable fat.

Cardiovascular diseases account for more than half of all deaths in Europe [1] (WHO, 2013). Different studies agree that *trans* fatty acid intake in diet, originated from hydrogenated fats, leads to inflammatory markers associated with a higher production of reactive oxygen species (ROS). [2] Their cumulative effects may lead to low density lipoprotein(LDL) raising and high density lipoprotein cholesterol (HDL) lowering [3,4,5], factors associated with the increased risk of coronary heart disease [2,3,5]. *Trans* fats are originated in the fat hydrogenation process and are often found in foods like bakery products, snack foods, margarine/“shortenings”. [6] For this reason is of great interest to know their content and then frequently to access their levels in bakery and pastry products.

The hydrogenation of fat is an industrial process in which liquid fatty oils are converted into a most desirable solid fat. However as the result of a secondary reaction, the natural *cis* fatty acids may be isomerized to the *trans* configuration. This depends on the type of catalyst used in the hydrogenation step [7,8] existing those that do not produce significant *trans* fat derivatives. Recommendations to the producers may be emitted if the information of *trans* fatty acid levels turn available. Common fat materials are often rich in oleic acid, 18:1($\Delta 9c$), being elaidic acid 18:1($\Delta 9t$) its isomerization product most frequently found after the hydrogenation process. [5] Other *trans* fatty acid found is that derived from the isomerization of one double bond of linoleic acid, 18:2($\Delta 9c,12c$). *Trans* fatty acids derived from the

isomerization of linolenic acid, 18:3($\Delta 9c,12c,15c$) were not determined in this work, since its content is very low in pastry fat.

Denmark was among the first countries to be concerned with the ingestion of high levels of *trans* fat; there, in 2004, was imposed a maximum limit of 2.00% of *trans* fatty acids in all oils and fats intended for food, thus driving the law to the sources rather than to the final products [10]. Other countries such as Canada and the United States of America have also implemented legislation aiming to control *trans* fatty acid content in food. [11,12, 13].

The evaluation of *trans* fat at European level started in 1998 by the TRANSFAIR study [14] in which the content in food samples from 14 different countries were accessed. Results had shown values ranging from 15.20 to 46.10% for the presence of total *trans* fatty acids for European food with the presence of partially hydrogenated vegetable oils indicated in their label.[15] For In Portugal, the results showed the presence of some high values of *trans* fatty acid in “croissants” (8.64%) and in “donuts” (6.00%) while in cakes, and pastries and biscuits, in general, the percentage of *trans* fatty acids varied between 0.21 to 6.78%. [16] According to the same study, the consumption of *trans* fatty acids, on average, per person in Portugal was 1.60 g/day. Other studies accessed the levels of *trans* fatty acids in vegetable spread creams from the Portuguese market, giving an average value of 2.60% from total fatty acids [17] (Torres et al., 2002). In pastries less evaluations were made along the years but one work found levels higher than 5.00% in a few samples. [18] This study involved 16 pastries, from which 7 had a high content of *trans* fatty acids. One of the samples, a French type croissant reached a value as high as 15.00%. [18] For other foodstuffs like chips it appears that their levels are very low, with *trans* fatty acids in the range of 0.01 to 0.28% relatively to total fat. [19]

The food industry has several options to produce products with lower content of *trans* fatty acids. [20-21] Interesterified fat (chemical or enzymatic) or catalyst change in the chemical fat hydrogenation process are solutions that decrease their content in the final products.

These technologies are available to the food industry but the lack of information may prevent their implementation. [22] With this goal in mind a population of fifty popular pastries products marketed in the center region of Portugal have been sampled and analyzed by us.

2. Materials and methods

2.1. Sampling

The samples were collected between the months of February to July 2014 in several locations of Coimbra, Aveiro and Viseu districts (Portugal), in different types of commercial establishments, grouped in supermarket and hypermarkets (assigned with an *s* in Table 1) including traditional pastry shops and café's (assigned with an *t* in Table 1). Both samples of the whole pastry products or components namely puff pastry were collected. The products selection took in account their level of appreciation in Portuguese diet. The samples included different pastries like cream cake ("Pastel de Nata" in Portuguese), custard tart, pies, croissants and cookies, reaching a total of fifty different samples.

2.2. Sample preparation

The samples containing high percentage of moisture were previously dried in a vacuum oven at a pressure of 10^{-4} atm. at 40 °C for 4 hours. Dried samples were weighed (approximately 1.0g) and placed in a 15mL glass tube and rod crushed in heptane (6mL). To each solution 400 μ L of fresh 0.2M sodium methoxide was added. The solution was vigorously stirred in vortex for 1-2 minutes. The formation of fatty acids methyl esters (FAME) from triglycerides takes place at room temperature by simple strong agitation. After decanting sample supernatants were injected in the gas chromatography system.

2.3. Gas chromatography and combined fatty acids profiles

Fatty acid methyl esters (FAME) profiles were determined using a gas chromatograph Agilent 6890 series, equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector. The capillary column was a Tracer CN100 (Spain, 60m x 0.25 mm; stationary phase thickness of 0.2 μ m). Injection mode was splitless ($t=45$ s) with helium as carrier gas (Injector head pressure=150KPa). Injector and detector temperatures were 270°C. The column heating program was: initial temperature of 90°C for 7 minutes followed by a heating ramp at 5°C/min. to 220°C, then isotherm for 17 minutes, giving a run total time of 50 min. FAME solutions were injected (0.5 μ L) using a Hamilton #7102 2 μ L micro syringe. Chromatographic data was acquired through a Hercule Lite digital analogic interface connected to a PC running the Jasco-Borwin software version 5.1. The identification of FAMEs was made by comparison of each fatty acid relative retention time (RRT, oleic acid as reference) to those obtained with authentic standards (Supelco FAME™ C14-C22 MIX reference 18917-1AMP and Sigma L8404 linoleic acid mix). Results are expressed as a relative percentage of total fatty acids (Table 1).

3. Results

3.1. Fatty acid composition of the pastry products lipid

Combined fatty acid composition profiles from pastry lipid population are shown in Table 1. Profile result analysis of the fatty acids suggest that they can be grouped in two classes – those rich in palmitic acid alluding palm oil as main fat origin and the group of oleic acid rich fat profile which provenience may come from sources such as olive, soy or rapeseed oils. A few samples contained higher level of linoleic relatively to oleic acid suggesting sources such as soybean or corn oils. [24]

4. Discussion

As expected the predominant *trans* fatty acid determined was elaidic acid C18:1 Δ^9t , with an average content of $1.67 \pm 0.67\%$, followed by the derivatives of

Table 1. Fatty acid composition profiles¹ of the pastry sample lipid.

Fatty acid	Saturated fatty acids (%)				Monounsaturated fatty acids (%)				Polyunsaturated fatty acids (%)						
	C14	C16	C18	C20	C16:1	C9-C18:1	T9-C18:1	C9,12-C18:2	C18:2 Δ 9t,12t	C18:2 Δ 9c,12t	C18:2 Δ 9t,12c	C18:3	other	Trans (total)	
Sample n. ^a	Cake type														
1	Bean cake, t ^b	2,78 ± 1,28	37,47 ± 3,61	3,94 ± 0,35	0,24 ± 0,08	0,06 ± 0,04	28,94 ± 2,72	0,11 ± 0,04	14,3 ± 1,18	n.d.	0,22 ± 0,09	0,18 ± 0,07	0,74 ± 0,06	11,00 ± 3,66	0,49 ± 0,09
2	Bean cake, t	1,78 ± 1,11	35,19 ± 3,44	6,21 ± 0,61	n.d.	0,46 ± 0,03	29,07 ± 1,58	0,36 ± 0,18	16,14 ± 0,83	n.d.	n.d.	n.d.	0,70 ± 0,43	9,99 ± 5,72	0,70 ± 0,26
3	Pizza Dough, s	n.d.	34,98 ± 0,83	12,4 ± 5,51	0,40 ± 0,03	n.d.	35,19 ± 7,99	0,93 ± 0,66	13,04 ± 3,44	n.d.	n.d.	n.d.	0,87 ± 0,21	2,63 ± 1,21	0,62 ± 0,77
4	Orange Cupcake, s	n.d.	29,53 ± 1,26	8,12 ± 1,37	n.d.	0,11 ± 0,09	27,53 ± 15,45	1,24 ± 1,47	23,14 ± 11,63	n.d.	n.d.	n.d.	1,07 ± 0,58	9,19 ± 2,39	1,20 ± 1,42
5	Croissant Brioche, t	1,48 ± 0,18	53,13 ± 1,55	3,49 ± 0,63	0,35 ± 0,21	0,04 ± 0,00	25,32 ± 0,66	1,17 ± 0,26	12,18 ± 0,52	n.d.	0,14 ± 0,02	0,11 ± 0,02	0,25 ± 0,07	2,30 ± 0,79	1,42 ± 0,25
6	Apple/coconut pie, t	2,79 ± 0,93	46,43 ± 7,51	3,37 ± 0,61	0,06 ± 0,07	0,04 ± 0,01	23,36 ± 7,18	0,21 ± 0,26	16,17 ± 4,52	0,01 ± 0,00	0,33 ± 0,11	0,25 ± 0,03	0,21 ± 0,02	6,75 ± 3,24	0,79 ± 0,38
7	Cake, s	1,23 ± 0,21	47,72 ± 4,02	3,52 ± 0,74	0,41 ± 0,06	0,06 ± 0,01	30,37 ± 2,39	0,28 ± 0,16	12,59 ± 0,71	n.d.	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,02	0,58 ± 0,02	2,92 ± 0,63	0,53 ± 0,17
8	Chicken Pie, s ^b	1,05 ± 0,57	37,99 ± 4,54	8,90 ± 1,05	0,36 ± 0,16	n.d.	26,65 ± 1,82	2,20 ± 0,65	15,64 ± 0,62	n.d.	0,19 ± 0,12	0,20 ± 0,10	0,66 ± 0,19	6,16 ± 1,85	2,59 ± 0,75
9	Cream Cake (Nata), t ^b	1,16 ± 0,57	42,87 ± 0,52	4,55 ± 0,52	0,45 ± 0,25	0,05 ± 0,01	32,26 ± 1,39	2,75 ± 0,38	11,6 ± 0,48	0,05 ± 0,02	0,21 ± 0,00	0,18 ± 0,01	0,6 ± 0,08	3,21 ± 0,42	3,19 ± 0,40
10	Chocolate cookie, s	0,28 ± 0,24	9,92 ± 2,26	3,25 ± 0,38	0,49 ± 0,38	0,04 ± 0,03	67,4 ± 1,77	0,44 ± 0,32	12,78 ± 0,65	n.d.	0,07 ± 0,01	0,1 ± 0,09	0,57 ± 0,12	4,58 ± 3,25	0,57 ± 0,40
11	Chocolate cookie, s	0,75 ± 0,24	30,17 ± 3,1	4,85 ± 0,57	0,52 ± 0,33	0,04 ± 0,02	47,05 ± 2,46	0,33 ± 0,34	12,49 ± 0,53	n.d.	0,13 ± 0,08	0,14 ± 0,12	0,54 ± 0,05	2,95 ± 0,36	0,60 ± 0,56
12	Cream Cake (Nata), t ^b	0,84 ± 0,70	29,03 ± 5,35	12,64 ± 3,02	0,48 ± 0,35	0,03 ± 0,02	24,19 ± 2,24	2,18 ± 0,34	26,57 ± 0,81	n.d.	0,12 ± 0,00	0,13 ± 0,05	0,51 ± 0,16	3,24 ± 0,56	2,43 ± 0,28
13	Stuffed Palmerie, s ^b	0,8 ± 0,49	34,6 ± 4,28	13,28 ± 3,26	0,44 ± 0,35	n.d.	27,31 ± 1,20	0,64 ± 0,44	17,77 ± 0,84	n.d.	0,11 ± 0,02	0,2 ± 0,23	1,95 ± 0,34	2,91 ± 1,24	0,95 ± 0,69
14	Fried cake, s	1,07 ± 0,46	31,73 ± 4,70	17,36 ± 6,23	0,31 ± 0,21	0,17 ± 0,06	19,33 ± 7,07	2,65 ± 1,32	20,51 ± 2,44	n.d.	n.d.	0,67 ± 0,89	1,30 ± 0,15	6,26 ± 0,33	2,15 ± 2,79
15	strawberry cake, t	0,73 ± 0,22	25,37 ± 6,91	7,92 ± 2,88	n.d.	0,67 ± 0,50	29,62 ± 5,23	3,95 ± 0,74	21,03 ± 4,60	n.d.	0,22 ± 0,17	0,47 ± 0,14	0,93 ± 0,31	9,12 ± 1,82	4,18 ± 0,62
16	Rice cake, t	0,46 ± 0,13	19,92 ± 2,67	9,08 ± 0,34	0,34 ± 0,13	0,12 ± 0,02	24,47 ± 0,6	0,16 ± 0,06	37,09 ± 0,36	n.d.	0,16 ± 0,08	0,17 ± 0,18	0,36 ± 0,03	7,56 ± 2,25	0,49 ± 0,32
17	Margarine (in bread), s	1,46 ± 0,30	19,47 ± 1,08	7,70 ± 0,71	0,63 ± 0,09	n.d.	31,07 ± 1,48	0,66 ± 0,44	28,81 ± 2,01	n.d.	0,2 ± 0,04	0,14 ± 0,06	1,48 ± 0,09	8,48 ± 2,34	0,89 ± 0,47
18	Vanilla wafer, s	6,95 ± 1,59	34,61 ± 1,44	6,29 ± 2,24	0,50 ± 0,19	0,03 ± 0,01	24,99 ± 3,55	0,91 ± 0,21	5,98 ± 0,61	n.d.	0,08 ± 0,05	0,08 ± 0,03	0,14 ± 0,01	19,43 ± 3,70	1,06 ± 0,23
19	Cake, s	0,54 ± 0,14	27,01 ± 1,05	10,04 ± 0,17	0,44 ± 0,09	0,11 ± 0,03	26,77 ± 1,59	0,50 ± 0,13	21,22 ± 0,80	n.d.	n.d.	n.d.	1,46 ± 0,12	11,80 ± 0,67	0,50 ± 0,16
20	Chocolate cake, s	1,86 ± 0,66	38,22 ± 2,70	18,45 ± 2,17	1,19 ± 0,32	0,04 ± 0,01	31,13 ± 1,48	0,25 ± 0,24	4,70 ± 0,15	0,01 ± 0,00	0,06 ± 0,01	0,07 ± 0,04	0,22 ± 0,05	3,79 ± 0,76	0,38 ± 0,27
21	Rice cake, t	0,17 ± 0,09	18,68 ± 1,25	9,77 ± 0,36	0,43 ± 0,36	0,11 ± 0,06	24,38 ± 1,03	0,72 ± 0,76	32,43 ± 7,10	n.d.	0,07 ± 0,03	0,05 ± 0,01	2,79 ± 0,51	10,20 ± 6,36	0,73 ± 0,68
22	Cookie, s	1,19 ± 0,17	28,52 ± 2,95	4,47 ± 0,39	0,40 ± 0,08	0,03 ± 0,00	33,47 ± 2,03	0,10 ± 0,02	25,68 ± 1,07	n.d.	0,21 ± 0,00	0,16 ± 0,04	2,40 ± 0,11	3,34 ± 0,66	0,47 ± 0,05
23	Chocolate cake, s ^b	8,56 ± 1,27	28,48 ± 1,33	12,44 ± 1,08	0,21 ± 0,04	0,17 ± 0,02	24,47 ± 1,38	1,88 ± 0,14	5,82 ± 0,29	0,24 ± 0,03	0,40 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,95 ± 0,07	16,01 ± 0,43	2,72 ± 0,17
24	Cream Cake (Nata), t	0,56 ± 0,14	32,71 ± 3,50	5,62 ± 0,75	0,53 ± 0,13	0,02 ± 0,00	41,79 ± 2,67	0,46 ± 0,13	12,99 ± 0,87	n.d.	0,12 ± 0,01	0,12 ± 0,03	2,73 ± 0,08	2,31 ± 0,37	0,70 ± 0,15
25	Sponge cake, s	0,12 ± 0,01	22,27 ± 1,61	15,54 ± 0,51	0,04 ± 0,01	0,27 ± 0,02	27,73 ± 0,54	0,19 ± 0,03	18,85 ± 0,33	n.d.	0,07 ± 0,01	0,03 ± 0,00	0,44 ± 0,01	14,19 ± 1,71	0,39 ± 0,04
26	Puff pastry (Tentugal), t	0,74 ± 0,01	26,46 ± 0,74	12,05 ± 0,23	0,22 ± 0,05	0,23 ± 0,01	30,39 ± 0,21	0,36 ± 0,07	16,75 ± 0,24	n.d.	0,16 ± 0,06	0,12 ± 0,04	0,73 ± 0,01	11,55 ± 1,02	0,64 ± 0,17
27	Chicken pie, s ^b	1,43 ± 0,74	40,72 ± 5,48	5,99 ± 1,34	0,26 ± 0,08	0,04 ± 0,00	32,40 ± 2,93	2,56 ± 0,69	13,45 ± 1,08	n.d.	0,19 ± 0,04	0,24 ± 0,1	0,62 ± 0,23	2,07 ± 0,25	2,99 ± 0,83

Table 1. Fatty acid composition profiles¹ of the pastry sample lipid (continuation).

Fatty acid	Saturated fatty acids (%)				Monounsaturated fatty acids (%)				Polyunsaturated fatty acids (%)				Trans (total)	
	C14	C16	C18	C20	C16:1	C18:1	C18:1t	C18:2	C18:2 Δ 9t,12t	C18:2 Δ 9c,12t	C18:2 Δ 9t,12c	C18:3		
Sample n. ^a														
28 Stuffed Palmer, t ^a	1,16 ± 0,83	33,04 ± 5,07	10,8 ± 1,02	0,30 ± 0,13	0,02 ± 0,00	22,55 ± 2,89	1,75 ± 0,16	26,94 ± 3,44	n.d.	0,09 ± 0,00	0,08 ± 0,02	0,27 ± 0,05	3,00 ± 1,71	1,90 ± 0,16
29 Chicken pie, t ^a	1,28 ± 0,54	39,17 ± 5,03	9,92 ± 1,97	0,30 ± 0,12	0,02 ± 0,00	27,54 ± 2,60	4,09 ± 0,37	14,03 ± 0,74	0,04 ± 0,02	0,15 ± 0,05	0,18 ± 0,02	0,89 ± 0,09	2,37 ± 0,22	4,46 ± 0,41
30 Cream Cake (Nata), s ^a	1,36 ± 1,13	20,98 ± 1,25	14 ± 4,33	0,47 ± 0,27	0,06 ± 0,02	23,49 ± 3,49	6,73 ± 2,61	22,07 ± 4,52	n.d.	n.d.	n.d.	2,03 ± 0,25	8,75 ± 5,57	6,73 ± 2,62
31 Bean cake, t ^a	3,01 ± 1,65	23,81 ± 1,72	10,64 ± 1,96	0,46 ± 0,28	0,06 ± 0,02	27,17 ± 5,01	9,74 ± 2,47	6,36 ± 1,29	0,09 ± 0,03	0,10 ± 0,05	0,52 ± 0,82	1,52 ± 0,39	16,46 ± 8,68	10,44 ± 3,25
32 Puff pastry (longaço) ^a	3,98 ± 1,85	38,32 ± 3,70	4,08 ± 1,66	0,22 ± 0,12	0,06 ± 0,01	27,32 ± 10,13	0,25 ± 0,14	8,84 ± 2,91	0,02 ± 0,00	0,12 ± 0,04	0,10 ± 0,03	1,08 ± 0,38	15,55 ± 13,18	0,48 ± 0,17
33 Cream Cake (Nata), t ^a	1,15 ± 0,61	30,79 ± 3,79	12,01 ± 3,01	0,24 ± 0,11	n.d.	20,84 ± 2,20	2,78 ± 1,42	27,6 ± 2,3	n.d.	0,15 ± 0,01	0,43 ± 0,55	1,09 ± 0,12	2,92 ± 1,02	3,36 ± 1,97
34 Vegetable cream, s	0,91 ± 0,37	25,87 ± 2,22	7,18 ± 4,19	0,14 ± 0,03	0,03 ± 0,00	27,14 ± 0,89	0,18 ± 0,06	28,05 ± 3,49	n.d.	0,2 ± 0,02	0,17 ± 0,02	6,01 ± 0,07	4,12 ± 1,73	0,53 ± 0,01
35 Chicken pie, s ^a	1,31 ± 0,61	40,18 ± 5,55	6,03 ± 1,33	0,24 ± 0,18	0,04 ± 0,01	34,48 ± 3,65	2,34 ± 0,24	12,59 ± 0,87	n.d.	0,15 ± 0,03	0,13 ± 0,02	0,53 ± 0,12	1,96 ± 0,28	2,61 ± 0,26
36 Cereal bar, s	0,41 ± 0,26	20,79 ± 5,64	8,04 ± 0,83	0,63 ± 0,30	0,05 ± 0,02	56,97 ± 3,36	0,03 ± 0,01	8,34 ± 0,54	n.d.	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	1,6 ± 0,58	3,07 ± 0,67	0,04 ± 0,03
37 Cream Cake (Nata), t	1,50 ± 0,82	43,69 ± 5,90	6,29 ± 1,23	0,31 ± 0,16	n.d.	31,73 ± 3,85	0,93 ± 0,14	12,02 ± 1,1	n.d.	0,23 ± 0,04	0,2 ± 0,03	0,59 ± 0,12	2,50 ± 0,08	1,36 ± 0,2
38 Puff pastry cake, s	1,32 ± 0,81	39,95 ± 5,66	6,48 ± 1,22	0,21 ± 0,07	n.d.	32,14 ± 3,79	0,15 ± 0,05	16,46 ± 1,4	n.d.	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,52 ± 0,06	2,57 ± 0,20	0,35 ± 0,09
39 Veg. fat (in bread), s	1,08 ± 0,64	24,35 ± 2,05	8,36 ± 3,84	0,22 ± 0,06	n.d.	29,96 ± 1,19	0,3 ± 0,13	32,73 ± 0,22	n.d.	0,32 ± 0,03	0,29 ± 0,03	0,37 ± 0,1	2,03 ± 0,4	0,91 ± 0,09
40 Margarine (in bread), s	1,84 ± 0,96	46,83 ± 8,25	7 ± 2,86	0,28 ± 0,15	0,04 ± 0,00	31,24 ± 5,56	0,15 ± 0,03	9,58 ± 1,86	n.d.	0,14 ± 0,01	0,13 ± 0,01	0,34 ± 0,15	2,45 ± 1,36	0,44 ± 0,03
41 Birthday Cake, s	1,2 ± 0,46	31,06 ± 3,55	6,27 ± 0,68	0,12 ± 0,04	0,07 ± 0,01	29,12 ± 2,41	0,09 ± 0,03	28,16 ± 2,04	n.d.	0,27 ± 0,04	0,23 ± 0,02	0,25 ± 0,02	3,12 ± 1,20	0,53 ± 0,02
42 Chicken pie, s ^a	1,98 ± 0,79	54,11 ± 4,57	3,97 ± 0,63	0,16 ± 0,02	0,06 ± 0,02	28,47 ± 4,51	1,51 ± 0,06	7,31 ± 0,92	0,02 ± 0,00	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,33 ± 0,04	1,83 ± 0,83	1,72 ± 0,05
43 Cake (Bobilema), t	1,45 ± 1,12	21,80 ± 6,12	7,67 ± 1,25	n.d.	0,31 ± 0,14	32,04 ± 0,57	0,2 ± 0,02	30,68 ± 6,08	n.d.	n.d.	n.d.	1,25 ± 0,5	4,29 ± 0,98	0,20 ± 0,13
44 Ançã cake, t	n.d.	29,54 ± 1,7	6,7 ± 0,26	n.d.	n.d.	16,61 ± 0,18	n.d.	39,96 ± 1,5	n.d.	n.d.	n.d.	2,5 ± 0,52	4,69 ± 0,25	-
45 Chocolate Croissant, t ^a	3,12 ± 0,17	39,67 ± 1,38	7,45 ± 0,25	0,28 ± 0,04	0,09 ± 0,02	29,27 ± 0,71	6,19 ± 0,15	6,85 ± 0,16	0,06 ± 0,01	0,12 ± 0,02	0,09 ± 0,01	1,63 ± 0,06	5,08 ± 0,34	6,46 ± 0,16
46 Cream Cake (Nata), t ^a	1,18 ± 0,61	29,58 ± 5,28	9,98 ± 1,84	0,32 ± 0,16	n.d.	26,17 ± 1,96	3,46 ± 0,30	25,77 ± 1,52	0,02 ± 0,01	0,22 ± 0,02	0,2 ± 0,04	0,38 ± 0,07	2,74 ± 0,54	3,89 ± 0,35
47 Chocolate Croissant, t	2,9 ± 0,22	31,06 ± 2,08	7,62 ± 1,27	n.d.	n.d.	19,32 ± 5,76	2,06 ± 0,29	23,61 ± 4,88	n.d.	n.d.	n.d.	0,96 ± 0,41	12,48 ± 3,48	2,06 ± 0,29
48 Bean cake, t ^a	1,66 ± 0,13	37,42 ± 3,05	5,93 ± 0,92	0,37 ± 0,07	0,04 ± 0,01	33,02 ± 0,83	7,25 ± 0,71	7,75 ± 0,24	0,02 ± 0,01	0,15 ± 0,02	0,17 ± 0,14	2,26 ± 0,06	3,94 ± 1,06	7,59 ± 0,85
49 Stuffed Palmer, t ^a	3,83 ± 0,44	35,36 ± 4,67	3,71 ± 0,19	0,2 ± 0,03	0,02 ± 0,00	22,5 ± 1,21	0,44 ± 0,49	6,65 ± 0,31	n.d.	0,06 ± 0,02	0,12 ± 0,12	0,91 ± 0,03	26,19 ± 6,06	0,62 ± 0,57
50 Meat patty, t ^a	1,82 ± 0,43	44,83 ± 2,97	6,09 ± 0,58	0,19 ± 0,04	0,05 ± 0,01	30,66 ± 2,39	3,03 ± 0,24	10,57 ± 0,97	n.d.	0,12 ± 0,02	0,19 ± 0,12	0,39 ± 0,06	2,00 ± 0,66	3,34 ± 0,36
Maximum	8,56 ± 1,27	54,11 ± 4,57	18,45 ± 2,17	1,19 ± 0,32	0,67 ± 0,50	67,4 ± 1,77	9,74 ± 2,47	39,96 ± 1,5	0,24 ± 0,03	0,40 ± 0,05	0,67 ± 0,89	6,01 ± 0,07	26,19 ± 6,06	10,50 ± 3,25
Minimum	0,12 ± 0,01	9,92 ± 2,26	3,25 ± 0,38	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00	16,61 ± 0,18	0,03 ± 0,01	4,70 ± 0,15	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,14 ± 0,01	1,83 ± 0,83	0,09 ± 0,03
Mean	1,71 ± 0,44	32,91 ± 2,58	8,15 ± 1,02	0,35 ± 0,05	0,1 ± 0,04	29,73 ± 2,38	1,67 ± 0,58	17,65 ± 2,48	0,05 ± 0,02	0,16 ± 0,02	0,18 ± 0,04	1,07 ± 0,28	6,56 ± 1,48	1,88 ± 0,59

1. Relative percentage of each fatty acid in relation to total fatty acid. The values were obtained by averaging the three replicates injections made for each sample. Results expressed as confidence interval (95%). Group of pastry product acquired in supermarket and hypermarkets assigned with an s; Group of pastry product acquired in traditional pastry shops and cafés assigned with an t; Samples of puff pastry component are assigned with an asterisk; n.d.- not detectable.

linoleic acid with one of the double bonds isomerized, with a content of $0.16 \pm 0.02\%$ for the isomer C18:2 $\Delta^{9t,12c}$ and $0.18\% \pm 0.02\%$ and the isomer C18:2 $\Delta^{9c,12t}$. The double isomerized derivative C18:2 $\Delta^{9t,12t}$ was found with an average of $0.05 \pm 0.02\%$. The distribution of the total *trans* fatty acid levels found in the population is shown in Figure 1.

While *trans* fatty acids were detected in all samples with only one exception (sample 44) for more than half of the population ($n=27$, 54%) their level is below 1.00% and this may indicate the absence of use of hydrogenated fat in confectioning. Vegetable fat samples show low levels of *trans* fatty acids. [24] The samples with higher content in the total *trans* fatty acids suggest the use of industrial hydrogenated fat. Denmark stated to be acceptable in foodstuffs the presence of *trans* fatty acids at levels lower than 2.00%. [10] In the group of 1-2%, the present study results found 6 samples (12%). With higher content, the range of 2-4% there were found 11 samples (22%), for the 4-6% range 2 samples (4%) and higher than 6% 4 samples (8%). The total population medium value was $1.88 \pm 0.59\%$. The sample number 31 (puff of bean pastry) (puff pastry component) showed the highest content of *trans* fatty acids, a value of $10.44 \pm 3.25\%$.

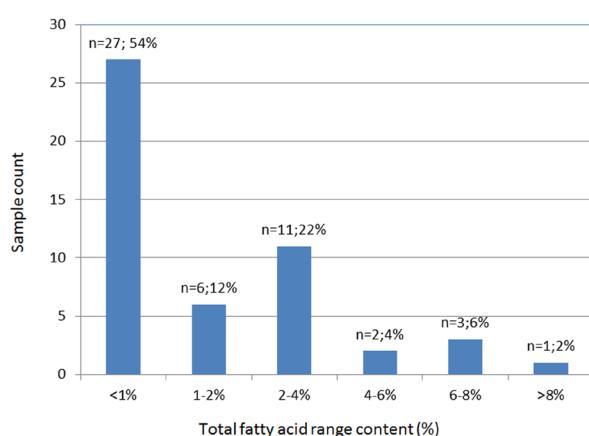


Figure. 1. Distribution count for the levels of total trans fatty acids found in puff pastry products marketed in the Central region of Portugal.

For vegetable creams, the percentage of *trans* fatty acids to total fatty acids ranged from 0.44 to 0.89%, a very low value, similar to that found in a 2002 study [17], in which a range of 0.2-0.5% levels was obtained in that time.

Looking at particular cases of the Table 1 the same type of product can show very different levels of *trans* fat. For example samples 1, 31 and 48 (Puff from bean pastry, see Table 1) are the same product but were acquired from different sources and the values detected are significantly different: 0.55%, 10.5% and 7.63% respectively. The same occurs with samples 9, 30, 33 and 46 (Puff from cream cake) which values are respectively 3.24%; 6.79%; 3.36% and 3.89%.

Table 2 presents an analysis of *trans* fat data sorted by the main establishment considered in the sampling program: one group including the traditional pastry house including traditional cafe's (referred as *t* in Table 1 and 2) and the other acquired in supermarket or hypermarket (referred as *s* in Table 1 and 2). Analysis of both pastries puff component or the whole pastry were made. Results showed that the levels of *trans* fat when considering the whole pastry are moderately low but higher in traditional shops (1.56%) relatively to those buy in super/hypermarket (0.65%).

The highest levels of *trans* fatty acids is found predominantly in products made of puff dough and acquired in pastry shop's, as can be seen in samples 31, 45 and 48, mainly puff pastry cakes or puff component, with respectively values of 10.50%, 6.55% and 7.63% of *trans* fatty acids. Table 2 results yields a mean value of 3.74% for *trans* fat in traditional commerce samples and 2.90 % for those coming from super/ hypermarkets. It should be emphasized that the sampling method was specifically directed to the puff pastry, a component which seems to be more susceptible to the presence of hydrogenated fat (samples assigned with an asterisk in Table1).

Comparing these results with previous studies [14], [17-18], there are a clear reduction in the absolute

Table 2. Comparison of trans fat in different pastry products and from different provenience.

Trans fatty acid content (%) from total fat				
Type of sample	Whole pastry		Puff pastry	
Provenience	Traditional (t)	Super/hypermarket (s)	Traditional (t)	Super/hypermarket (s)
Number of samples	13	9	12	16
Mean	1.56	0.65	3.74	2.90
Standard deviation	2.08	0.45	2.83	1.69

values of trans fat found in pastry products as also in the medium value. This tendency follows that observed in other EU countries, where there is, in recent years, a clear reduction in the levels of trans fatty acids, although in some of them, Government or laws, do not impose any obligation to contribute to this reduction. [25]

5. Conclusions

Evidence exists and also literature reports a correlation between the intake of trans fatty acids and increased incidence of various coronary heart diseases. The relevance of frequent analysis of their content as a source of indicators to the producers is unquestionable. In this work, a population of pastry products – whole or puff - were analyzed and 54% of the samples showed very low trans fatty acid content (< 1.00%). The mean content value of trans fatty acids present was 1.88% ± 0.59% relativity to the content total fatty acids. The

results obtained are significantly lower than those found in earlier studies carried out in pastry products in Portugal [14], [17-18]. This seems to indicate a reduction tendency of use of hydrogenated fat or the modification of the techniques used by the specific industry along the time. The values here presented in foodstuffs may be even lower. However this study showed that even better results can be achieved with benefits on public health if pastry high trans fat content could be eradicated or at least, if Government Public Health services impose more severe rules on, in order to guarantee the actually seen progressive reduction.

Acknowledgements

To the staff of the Department of Exact Sciences of Escola Superior Agrária de Coimbra. To CERNAS/FCT(UID/AMB/00681/2013) for financial support.

References

- [1] WHO (2013) Cardiovascular diseases. euro.who. 2013 [Online at 2013 October 8] <http://www.euro.who.int/en/what-we-do/health-topics/noncommunicable-diseases/cardiovascular-diseases/data-and-statistics>.
- [2] Willett W, Stampfer M., Manson J., Colditz G., Speizer F., Rosner B., Sampson L., Hennekens C. (1993) Intake of trans fatty acids and risk of coronary heart disease among women. *The Lancet* 341:581–585.
- [3] Eva K. R., Karem A. S., Martin R. L. S., Colombani P. C. (2009) Trans fatty acid content of selected Swiss foods: The TransSwissPilot study. *J. of Food Comp. and Anal.* 5, 22, 479-484.
- [4] Mozaffarian D, Aro A, Willett W. (2009) Health effects of trans-fatty acids: experimental and observational evidence. *Eur. J. of Clin.Nut.* 63:S5–S21.
- [5] Brouwer A, Wanders A e Katan M (2010) Effect of Animal and Industrial Trans Fatty Acids on HDL and LDL Cholesterol Levels in Humans – A Quantitative Review. *PLoS ONE*. 5:e9434.
- [6] Bendsen N, Christensen R, Bartels E, Astrup A (2011) Consumption of industrial and ruminant trans fatty acids and risk of coronary heart disease: a systematic review and meta-analysis of cohort studies. *Eur. J.of Clin.Nut.* 65:773-783.
- [7] Elias S and Innis S(2002) Bakery foods are the major dietary source of trans-fatty acids among pregnant women with diets providing 30 percent energy from fat. *J.of the Am. Diet. Ass.* 102: 46–51.
- [8] Allen R and Kiess A(1955) Isomerization during hydrogenation. I. Oleic acid. *J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, 7:400-405.
- [9] Allen R. (1962) Practical aspects of hydrogenation. *J. of the Am. Oil Chem. Soc.*, 39:457-459.
- [10] Leth T., Jensen H.G., Mikkelsen A.A., Bysted A. (2006)The effect of the regulation on trans fatty acid content in Danish food. *Atherosclerosis Supplements*.7, 53-56.
- [11] L'Abbé M. R.;Stender S., Skeaff C. M., Ghafoorunissa andTavella M.(2009) Approaches to removing trans fats from the food supply in industrialized and developing countries. *Eur. J. of Clin.Nut.*63, S50–S67.
- [12] Ratnayake W. M., L'Abbe M.R., Farnworth S., Dumais L., Gagnon C., Lampi B., Casey V., Mohottalage D., Rondeau I., Underhill L., Vigneault M., Lillycrop W., Meleta M., Wong L.Y., Ng T., Gao Y., Kwong K., Chalouh S., Pantazopoulos P., Gunaratna H., Rahardja A., Blagden R., Roscoe V., Krakalovich T., Neumann G., Lombaert G. A. (2009) Trans Fatty Acids: Current Contents in Canadian Foods and Estimated Intake Levels for the Canadian Population. *J. of AOAC Int.* 92, 1258-1276.
- [13] Angell S.Y., Cobb L.K., Curtis C.J., Konty K.J., Silver L.D. (2012) Change in Trans Fatty Acid Content of Fast-Food Purchases Associated With New York City's Restaurant Regulation: A Pre–Post Study. *Annals of Internal Medicine*. 157, 81-86.
- [14] Poppel, G. van.(1998) Intake of trans fatty acids in western Europe; the TRANSFAIR study. *The Lancet*.351, 1099.
- [15] Wolff R. L., Nicole A. Combe, F. D., Boué C.,Precht D., Molkentin J.,Entressangles B. (2008) Follow-up of the Δ4 to Δ16 trans-18:1 isomer profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995–1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids*. 35, 815-825.
- [16] van Erp-Baarta M. A, Couetb C., Cuadradoc C., Kafatosd A., Stanleye J., van Poppela G. (1998) Trans Fatty Acids in Bakery Products from 14 European Countries:the TRANSFAIR Study. *J. of Food Comp. and Anal.* 2, 11, 161–169.
- [17] Torres, D., Casal, S., Oliveira, M. B. P. P. (2002) Fatty acid composition of Portuguese spreadable fats with emphasis on trans isomers. *Eur. Food Res. and Tech.* 214, 108-111.
- [18] Casal S.I., Noronha B., Mendes E., Oliveira M. B. P. P.(2006) Avaliação nutricional de produtos de pastelaria. *Alimentação humana*. 12, 21-27.

- [19] Albuquerque, T. G. (2009) Composição em ácidos gordos de batatas fritas de pacote comercializadas em Portugal e sua importância na nutrição. Faculdade de Medicina, Universidade de Coimbra. Coimbra, Master thesis degree.
- [20] Menaa F., Menaa A., Tréton J., Menaa B. (2013) Technological Approaches to Minimize Industrial Trans Fatty Acids in Foods. *J. of Food Sci.* 78, R377–R386.
- [21] Eckel R. H., Borra S., Lichtenstein, A.H., Yin-Piazza S. (2007) Understanding the Complexity of Trans Fatty Acid Reduction in the American Diet. *Circulation*.pp. 2231-2246.
- [22] Tarrago-Trani M.T., Phillips K.M., Lemar L.E., Holden J.M. (2006) New and Existing Oils and Fats Used in Products with Reduced Trans-Fatty Acid Content. *J.of the Am. Diet.Ass.* 106, 867–880.
- [23] Varejão J. M. T. B., Santos S. M., Cruz Costa M. C. (1999) Development of a method for the characterization of adulteration of olive oil by mixture of edible oils; Conference: 4º Encontro de Química de Alimentos, Coimbra, Portugal.
- [24] Wolff R. L., Nicole A. Combe, F. D., Boué C., Precht D., Molkentin J., Entressangles B. (2008) Follow-up of the Δ4 to Δ16 trans-18:1 isomer profile and content in French processed foods containing partially hydrogenated vegetable oils during the period 1995–1999. Analytical and nutritional implications. *Lipids*. 35, 815-825.
- [25] Ansorena D., Echarte A., Ollé R., Astiasarán I. (2013) 2012: No trans fatty acids in Spanish bakery products. *Food Chem.*138, 422–429.
- [26] Roe M., Pinchen H., Church S., Elahi S., Walker M., Farron-Wilson M., Buttriss J., Finglas P. (2013) Trans fatty acids in a range of UK processed foods. *Food Chem.* 140, 427–431.
- [27] Downs, S. M., Thow, A. M. and Leeder, S. R. (2013). The effectiveness of policies for reducing dietary trans fat: a systematic review of the evidence. *Bull World Health Organ.* 91, 262–269H.

Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L.

Fabiana Agostini^{1*}, Francine da Motta Michelon¹, Vanessa Amanda Alves Gomes¹, Sabrina Bertolazzi¹, Joséli Schwambach² e Sidnei Moura¹

¹LBIOP - Laboratório de Biotecnologia de Produtos Naturais e Sintéticos, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul – RS, Brasil.

²LBV - Laboratório de Biotecnologia Vegetal, Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas, 1130, 95070-560, Caxias do Sul – RS, Brasil.

*fagosti1@ucs.br

Recebido: 01/11/2017

Aceito: 29/11/2017

Abstract

Among the main active compounds present in plants used in traditional medicine are the phenolic compounds. However, there is a methodological restriction for qualification and simultaneous quantification of several representative of this class. Thus, this study aimed to optimize and validate a high-performance liquid chromatography (HPLC) with ultraviolet (UV) detection method for the simultaneous determination of 14 phenolic compounds. In order to confirm the method efficiency, decoctions of *Passiflora caerulea* L. (blue passion fruit), *Myrcia oblongata* DC. (Guamirim) and *Equisetum giganteum* L. (giant horsetail) were used. There are few studies in the literature with these species. Nevertheless, these plants have been widely spread and used in folk medicine for their antioxidant characteristics. The method showed linearity, repeatability and accuracy. The correlation coefficients were between 0.9972 and 0.9999; detection limits ranged from 0.01 to 4.48 µg/mL and the quantitation limit from 0.04 to 13.58 µg/mL. In the tested decoctions, 09 compounds were identified, the major ones being vitexin and naringin in Guamirim; chlorogenic acid and naringin in horsetail; and vitexin and gallic acid in passion fruit. It was observed that *Myrcia oblongata* has a higher antioxidant potential with respect to the concentration of phenolics and their phenolic compounds individually investigated.

Keywords: giant horstail; decoction; phytotherapy; guamirim; blue passion flower

Resumo

Dentre os principais compostos ativos presentes em plantas usadas na medicina tradicional encontram-se os compostos fenólicos. No entanto, existe uma restrição metodológica para qualificação e quantificação simultânea de vários representantes desta classe. Desta forma, este estudo buscou a otimização e validação de um método por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) com detector de ultravioleta (UV) para a determinação simultânea de 14 compostos fenólicos. Para confirmar a eficiência do método, foram utilizadas decocções de *Passiflora caerulea* L. (maracujá), *Myrcia oblongata* DC. (guamirim) e *Equisetum giganteum* L. (cavalinha). São escassos os estudos apresentados na literatura com essas espécies. No entanto, estas plantas têm sido amplamente difundidas e usadas na medicina popular pelas suas características antioxidantes. O método apresentou linearidade, repetitividade e precisão. Os coeficientes de correlação ficaram entre 0,9972 e 0,9999; os limites de detecção variaram de 0,01 a 4,48 µg/mL e os de quantificação de 0,04 a 13,58 µg/mL. Nas decocções testadas, foram identificados 09 compostos, sendo os majoritários a

vitexina e naringina no guamirim; ácido clorogênico e naringina na cavalinha; e ainda, vitexina e ácido gálico no maracujá. Observou-se que *Myrcia oblongata* tem um maior potencial antioxidante no que diz respeito à concentração de fenólicos totais e de seus compostos fenólicos avaliados individualmente.

Palavras-chave: cavalinha; decocção; fitoterapia; guamirim; maracujá.

1. Introdução

Na medicina tradicional, algumas plantas com potencial aplicação fitoterápica como *Passiflora caerulea* L. (maracujá), *Myrcia oblongata* DC. (guamirim) e *Equisetum giganteum* L. (cavalinha), tem recebido destaque pelo seu uso popular na forma de chás preparados por infusão ou decocção, como é o caso de outras ervas abundantes na dieta de milhares de pessoas em todo o mundo⁽¹⁾, sendo estes chás, uma das maiores fontes de compostos fenólicos em nossa dieta⁽²⁾. Estes compostos estão associados às propriedades sensoriais e aos efeitos benéficos destas bebidas⁽³⁾, além de apresentarem atividades biológicas como a ação antioxidant⁽¹⁾. Assim, a caracterização fenólica de preparados de ervas é importante para determinar seus benefícios à saúde⁽⁴⁾.

Estudos a respeito do uso de *P. caerulea* indicam-na como sedativa, diurética, ansiolítica, antimicrobiana⁽⁵⁾, anti-inflamatória e hipotensiva⁽⁶⁾. Já com relação ao gênero *Equisetum*, são citadas propriedades anti-inflamatória^(7,8), antioxidant⁽⁹⁾, diurética⁽¹⁰⁾, anti-hipertensiva e bacteriostática⁽¹¹⁾. O gênero *Myrcia*, é empregado na medicina popular para o tratamento de diabetes, diarreias, hemorragias e úlcera da boca⁽¹²⁾. No entanto, a composição fenólica nestas espécies não tem sido determinada de forma sistemática.

Não obstante, a qualificação e quantificação simultânea destes compostos em métodos sensíveis e precisos é um desafio tecnológico. Para tanto, as técnicas de separação, tais como cromatografia gasosa (CG), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

e eletroforese capilar (EC), vem se destacando na química analítica pela capacidade de realizarem análises qualitativas e quantitativas em amostras ambientais, farmacêuticas, biológicas e em alimentos e bebidas⁽¹³⁾.

Cada vez mais observa-se a necessidade de se mostrar a qualidade de medições químicas, por meio de sua comparabilidade, rastreabilidade e confiabilidade. Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, este deve sofrer validação⁽¹³⁾, uma forma de assegurar a aplicabilidade e o alcance de um método durante as operações de rotina de um laboratório⁽¹⁴⁾. A validação de um método é um processo contínuo que começa no planejamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo o seu desenvolvimento e transferência⁽¹³⁾.

Assim, o objetivo deste estudo é indicar um método por CLAE-UV para determinação simultânea de compostos fenólicos em decocções. Como protótipos para este estudo, elegemos as espécies *Passiflora caerulea* L., *Myrcia oblongata* DC. e *Equisetum giganteum* L., com varias atividades fitoterapêuticas relatadas na literatura mas, no entanto, com pouca investigação de composição fenólica determinada de forma sistemática.

2. Experimental

2.2 Solventes, Reagentes e Padrões Analíticos

O reagente de Folin-Ciocalteau, a acetonitrila (C_2H_3N) com grau HPLC, o carbonato de sódio (Na_2CO_3) e o ácido orto-fosfórico (H_3PO_4) foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Brasil). Os padrões analíticos ácido gálico (99,5%), catequina (97%), ácido

clorogênico (95%), epicatequina (98%), vitexina (95%), rutina (94%), ácido ferulico (99%), naringina (95%), hesperidina (97%), miricetina (98%), resveratrol (99%), queracetina (95%), apigenina (95%) e canferol (97%) também foram adquiridos da Sigma Aldrich® (Brasil). Toda água ultra-pura utilizada nas extrações e análises foi obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q® Millipore (EUA).

2.2. Coleta e Preparo do Material Vegetal

O material vegetal de *E. giganteum* foi coletado na cidade de Garibaldi, de *M. oblongata* foi obtido na cidade de São Marcos e de *P. caerulea* na cidade de Caxias do Sul, todas localizadas no estado do Rio Grande do Sul - Brasil, em novembro de 2014. A identificação botânica do material coletado foi realizada no herbário da Universidade de Caxias do Sul (HUCS), no qual foram depositadas exsicatas das espécies (*E. giganteum* sob o nº 4014, *M. oblongata* sob o nº 41820 e *P. caerulea* sob o nº 41813). Após a coleta, as partes aéreas foram manualmente selecionadas e acondicionadas em estufa com circulação e renovação de ar forçada DeLeo® (Brasil) a 40°C por 48 horas para desidratação.

2.3. Preparo das Decocções de estudo

As folhas de *M. oblongata* e *P. caerulea* e os talos de *E. giganteum* foram macerados com nitrogênio líquido e 5 g de cada espécie foi submetido à decocção com 150 mL de água Milli-Q® em agitador magnético com aquecimento IKA® HS7 (Brasil) a 80°C com agitação mecânica por 20 min, segundo adaptações de Saito⁽¹⁵⁾. Após, procedeu-se a filtragem e evaporação do líquido em Banho-Maria DeLeo® (Brasil) a 40°C, para obtenção do extrato seco de cada decocção. Antes de cada análise, os extratos secos foram ressuspensos em água ultra-pura (Milli-Q®), na concentração de 5 mg mL⁻¹.

2.4. Validação do Método Analítico

Os parâmetros de validação avaliados foram seletividade, linearidade, precisão, e os limites de detecção e de quantificação, segundo Ribani *et al.*⁽¹³⁾. A seletividade foi verificada através de comparação dos tempos de retenção dos picos dos compostos padrões injetados individualmente. Para avaliar a linearidade do método, foram construídas curvas analíticas de cada padrão através da injeção em triplicata das suas respectivas soluções em seis concentrações diferentes. A precisão do método foi verificada pela repetibilidade da mesma amostra analisada em nove replicatas, com valores expressos através da média e desvio padrão relativo. Para o cálculo dos limites de detecção (LD) e de quantificação (LQ) dividiu-se o coeficiente linear pelo coeficiente angular da curva analítica, para cada um dos padrões. Estes resultados foram multiplicados por 3 para LD e por 10 para LQ.⁽¹³⁾

2.5. Análise Química por CLAE – UV

As análises foram realizadas em equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência Agilent HP 1100 (EUA), coluna Lichrospher® 100 RP₁₈ (5 µm), detector UV a 210 nm e um sistema quaternário de bombas. A análise em fase reversa foi baseada em Morelli⁽¹⁶⁾ e constituída de: solvente A – água Milli-Q® com 1% de ácido orto-fosfórico e solvente B – acetonitrila. O sistema de bombeamento da fase móvel foi do tipo gradiente, com 90% do solvente A de 0 a 5 min, 60% de A de 5 a 40 min e 90% de A de 40 a 50 min. O fluxo padrão foi mantido a 0,5 mL/min. Para definir as condições cromatográficas adequadas para a separação dos compostos fenólicos, utilizou-se uma solução dos padrões ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, epicatequina, vitexina, rutina, ácido ferulico, naringina, hesperidina, miricetina, resveratrol, queracetina, apigenina e canferol com concentração de 1 mg mL⁻¹. A solução foi previamente filtrada em membrana de Nylon de 0,45 µm de diâmetro de poro. Os compostos fenólicos

foram identificados de acordo com sua ordem de eluição e por comparação de seu tempo de retenção com aqueles de seus padrões puros. A quantificação foi realizada pelo método de padronização externa, através da correlação da área (mAU^*s) do pico do composto à curva padrão realizada com cada padrão avaliado.

2.6. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A quantificação dos compostos fenólicos foi adaptada de Roesler *et al.*⁽¹⁷⁾ onde a 0,5 mL da amostra, adicionou-se 2,5 mL de Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de Na_2CO_3 a 7,5%. O tubo foi agitado em Vortex Quimis® Q 220-2 (Brasil) e incubado por 5 min em Banho-Maria DeLeo® (Brasil) a 50°C. A quantificação foi feita em espectrofotômetro UV-VIS Beckman DU®530 (Alemanha), com comprimento de onda de 760 nm. A concentração de fenólicos foi estimada correlacionando-se a absorbância das amostras a uma curva padrão realizada a partir de 6 pontos com concentração de 10 a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico^(18,19), onde o resultado é expresso em mg de equivalentes de ácido gálico/g de material vegetal (mg EAG g MV⁻¹).

3. Resultados e discussão

3.1. Validação do Método Cromatográfico (CLAE)

O procedimento de validação teve início com a avaliação da seletividade para os padrões selecionados. Após todos os padrões estarem devidamente separados entre si (Figura 1A- padrões), procedeu-se com a análise da faixa linear de trabalho, a partir da construção de curvas de calibração que podem ser visualizadas na Tabela 1, onde os níveis de concentração também podem ser observados. Percebe-se, através do R^2 de cada curva, e de seus limites de detecção e quantificação, que os resultados foram adequados e satisfatórios, além

de permitir a determinação de concentrações baixas de compostos ativos.

Para a avaliação da repetibilidade, duas concentrações de cada padrão foram analisadas nove vezes consecutivas, verificando-se a área de cada composto (Tabela 2) e seu tempo de retenção (Tabela 3). Assim, foi comprovado que o desvio padrão relativo (DPR) de cada composto padrão e em cada concentração avaliada permanece dentro dos limites aceitáveis, segundo Ribani *et al.*⁽¹³⁾.

3.2. Análise química por CLAE – UV

A separação dos compostos presentes nas decocções de *E. giganteum*, *M. oblongata* e *P. caerulea*, com e sem adição de padrões, foi conduzida sob a melhor condição obtida para a mistura dos padrões, segundo Morelli⁽¹⁶⁾, em sistema de cromatografia líquida de alta eficiência.

Os compostos identificados na decocção de *E. giganteum* foram os ácidos gálico e clorogênico, além de epicatequina, naringina e rutina. Na decocção de *M. oblongata*, também foram identificados os ácidos gálico e clorogênico, juntamente com catequina, naringina, vitexina, miricetina e queracetina. A decocção de *P. caerulea* teve os compostos ácido gálico, catequina, epicatequina, vitexina e queracetina identificados. Na Figura 1 visualiza-se o perfil cromatográfico das três decocções e podem-se observar as concentrações de cada composto identificado por CLAE e na Figura 2, suas estruturas químicas.

Comparando com dados publicados por Pereira *et al.*⁽²⁰⁾, *P. caerulea* apresentou os compostos rutina, vitexina, orientina e isoorientina, quando avaliada por CLAE, a partir de seu extrato hidroalcoólico. A fração aquosa do extrato metanólico também foi avaliada por CLAE, em estudo de Ozarowskia e Thiema⁽⁶⁾, onde se observa a presença de vitexina, isovitexina, rutina, ácido clorogênico, luteolina e apigenina. A Análise

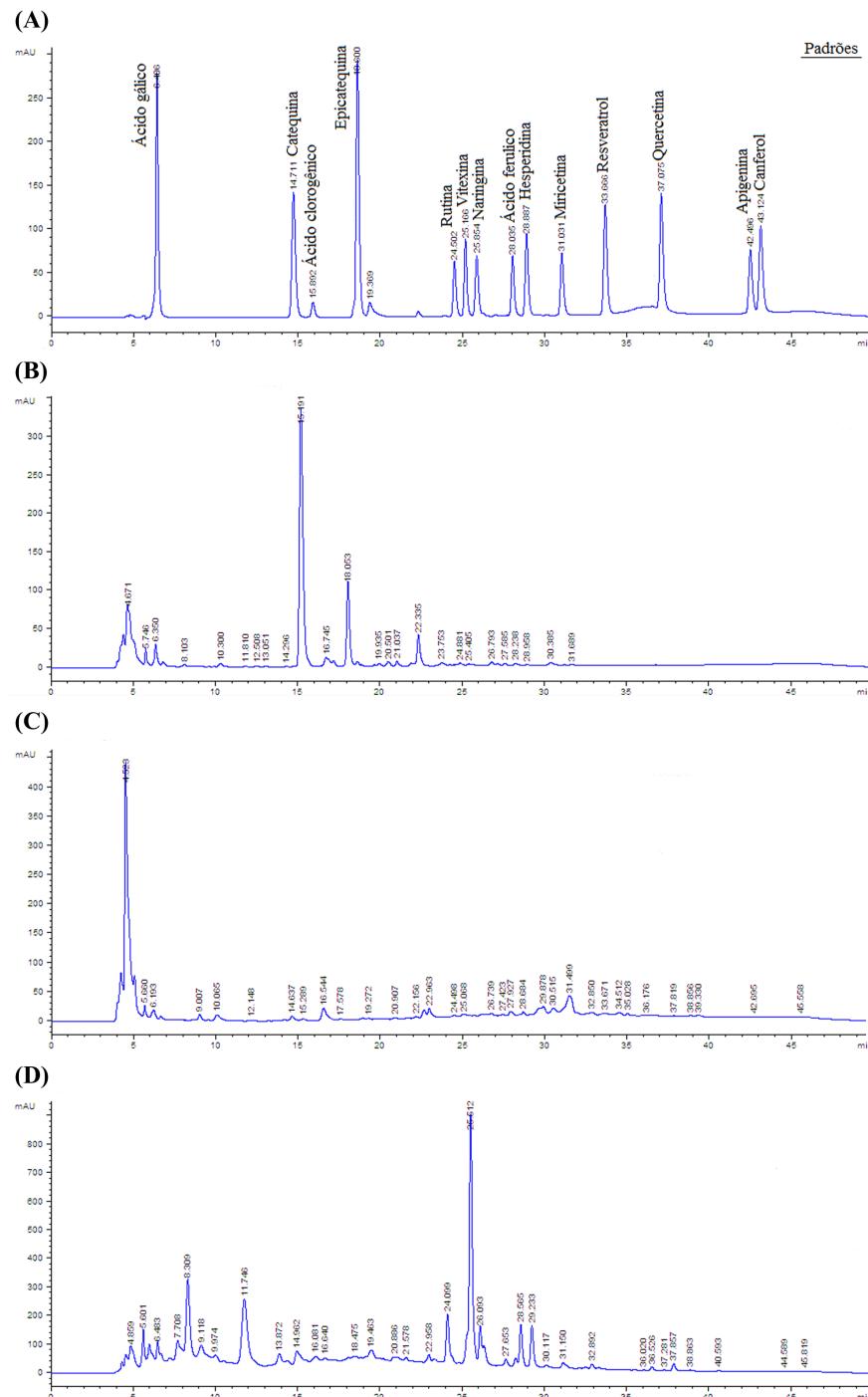


Figura 1. Perfil cromatográfico e concentrações ($\text{mg } 100\text{g}^{-1}$ de material vegetal) dos compostos avaliados nos chás obtidos das respectivas decocções.

(A) padrões analíticos selecionados para a validação do método (ACG=Ácido gálico; CAT=Catequina; ACC=Ácido clorogênico; EPIC= Epicatequina; RUT=Rutina; VIT=Vitexina; NAR=Naringina; ACF=Ácido ferulico; HESP=Hesperidina; MIR=Miricetina; RESV=Resveratrol; QUER=Quercetina; APIG=Apigenina; CANF=Canferol).

(B) compostos fenólicos da cavalinha (ACC=44,56±3,15; ACF= 42,75±1,44; ACG=2,52±0,09; EPIC=2,22±0,06; VIT=1,19±0,27);

(C) compostos fenólicos do maracujá (ACC=3,03±0,07; CAT=1,75±0,02; EPIC=2,67±0,05; MIR=24,43±1,90; QUER=0,64±0,03; VIT=4,79±0,49).

(D) compostos fenólicos do guamirim (ACC=84,58±6,65; ACF=658,55±12,72; ACG=34,92±2,82; CAT=23,26±0,79; MIR=10,62±0,12; QUER=1,21±0,18; RUT=1950,78±18,08; VIT=262,77±1,07).

Tabela 1. Parâmetros das curvas de calibração dos compostos avaliados ($\mu\text{g mL}^{-1}$)

Compostos fenólicos	Coeficiente (R^2)	Níveis de concentração	Curva de calibração	LD	LQ
Ácido clorogênico	0,9932	0,6-80	$Y=12,14x - 16,49$	0,15	0,50
Ácido ferulico	0,9990	0,1-50	$Y=113,61x - 11,98$	0,03	0,11
Ácido gálico	0,9999	0,1-30	$Y=69,95x + 0,66$	0,03	0,10
Apigenina	0,9999	0,1-50	$Y=85,62x + 16,16$	0,02	0,08
Canferol	0,9998	0,1-125	$Y=63,95x - 21,68$	0,03	0,10
Catequina	0,9982	0,06-16	$Y=179,43x - 30,56$	0,02	0,06
Epicatequina	0,9995	0,1-50	$Y=123,22x - 54,57$	0,04	0,09
Hesperidina	0,9993	0,1-12,5	$Y=40,76x + 4,50$	0,02	0,08
Miricetina	0,9972	0,2-50	$Y=105,82x - 64,59$	0,05	0,18
Naringina	0,9926	0,1-16	$Y=55,59x + 45,30$	0,03	0,09
Quercetina	0,9999	0,1-25	$Y=64,11x - 0,68$	0,04	0,12
Resveratrol	0,9999	0,1-12,5	$Y=63,76x + 0,27$	0,03	0,10
Rutina	0,9996	0,1-25	$Y=29,71x + 1,19$	0,04	0,12
Vitexina	0,9972	0,2-60	$Y=38,89x+1,62$	0,06	0,19

LD: Limite de detecção; LQ: Limite de quantificação

cromatográfica do extrato aquoso de *P. alata* realizada por Colomeu *et al.*⁽²¹⁾ resultou nos compostos vitexina, isovitexina e isoorientina; *P. edulis* apresentou estes mesmos compostos em seu extrato aquoso segundo Silva *et al.*⁽²²⁾. Comparando estes dados relatados na literatura com os obtidos na decocção de *P. caerulea* têm-se vitexina em comum.

Cinco espécies de *Equisetum* tiveram seus extratos hidroalcoólicos avaliados por CLAE, no estudo de Milovanović *et al.*⁽²³⁾, onde os compostos identificados foram apigenina, canferol e quercetina. Três ácidos fenólicos foram identificados no extrato aquoso de *E. arvense* por Mimica-Dukic *et al.*⁽²⁴⁾; já, o extrato metanólico forneceu compostos como ácidos clorogênico, cafeico e ferulico, além de isoquerctina e luteolina-5-glicosídeo, para a mesma espécie, segundo Oniszczuka *et al.*⁽²⁵⁾. Novamente encontrou-se apenas um composto em comum na decocção de *E. giganteum*

e nas espécies citadas na literatura consultada, o ácido clorogênico.

Segundo Wubshet *et al.*⁽²⁶⁾, casuarinina, miricetina e querctina foram os compostos identificados no extrato de acetato de etila de *Myrcia palustris*. Dos três compostos encontrados na literatura, miricetina e querctina também foram encontrados na decocção de *M. Oblongata*. Observa-se ainda que a decocção de *M. oblongata* apresentou as maiores concentrações dos compostos identificados quando comparado com as decocções de *P. caerulea* e de *E. giganteum*.

Os dados de comparação apresentados para as três espécies demostram a grande diversidade de compostos existentes nas diferentes espécies de um mesmo gênero, as diferentes formas extração e a diferença na seletividade do solvente usado para a extração dos compostos de interesse.

Tabela 2. Avaliação da repetibilidade do método para os padrões, com relação à área e utilizando níveis de concentração baixo e intermediário

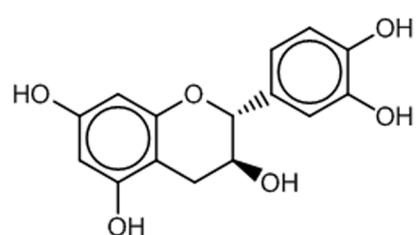
Compostos fenólicos	Nível de concentração baixo				Nível de concentração intermediário			
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido clorogênico	1,0	5,17	0,26	5,12	10,0	78,92	0,43	0,55
Ácido ferulico	0,5	52,21	0,78	1,50	6,0	607,17	0,66	0,11
Ácido gálico	0,2	16,08	0,15	0,95	7,5	936,71	3,97	0,42
Apigenina	0,4	36,49	0,35	0,95	6,2	564,55	1,47	0,26
Canferol	0,4	25,48	0,87	3,42	7,8	471,92	2,56	0,54
Catequina	1,0	169,79	1,60	0,94	8,0	1355,47	4,61	0,34
Epicatequina	1,0	116,24	0,43	0,37	6,2	618,94	0,56	0,09
Hesperidina	0,2	9,40	0,33	3,48	6,2	263,77	5,27	2,00
Miracetina	0,4	27,21	0,23	0,83	3,1	249,19	0,67	0,27
Naringina	0,2	38,46	0,35	0,91	3,9	310,63	1,94	0,63
Quercetina	0,8	51,29	0,42	0,82	12,5	794,64	0,80	0,10
Resveratrol	0,4	25,64	0,38	1,50	6,2	394,16	2,20	0,56
Rutina	0,4	11,43	0,34	2,96	12,5	381,18	2,30	0,60
Vitexina	0,7	30,77	0,35	1,15	15,0	630,89	0,41	0,06

DPR: Desvio padrão relativo

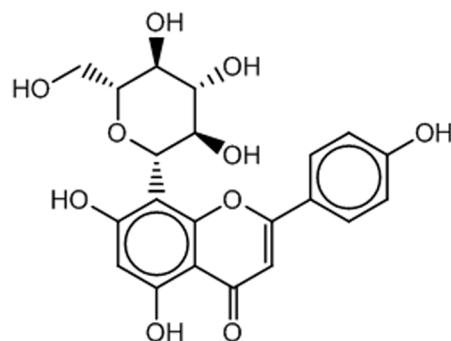
Tabela 3. Avaliação da repetibilidade do método para os padrões, com relação ao tempo de retenção e utilizando níveis de concentração baixo e intermediário

Compostos fenólicos	Nível de concentração baixo				Nível de concentração intermediário			
	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Média	Desvio Padrão	DPR (%)
Ácido clorogênico	1,0	15,99	0,06	0,39	10,0	16,02	0,07	0,44
Ácido ferulico	0,5	28,18	0,06	0,23	6,0	28,29	0,05	0,21
Ácido gálico	0,2	4,46	0,01	0,27	7,5	4,47	0,02	0,43
Apigenina	0,4	42,87	0,66	1,54	6,2	42,73	0,44	1,04
Canferol	0,4	43,55	0,34	0,78	7,8	43,46	0,33	0,77
Catequina	1,0	14,74	0,24	1,65	8,0	14,71	0,21	1,41
Epicatequina	1,0	18,62	0,28	1,50	6,2	18,61	0,33	1,78
Hesperidina	0,2	28,91	0,29	1,02	6,2	28,68	0,26	0,89
Miracetina	0,4	31,44	0,41	1,32	3,1	31,36	0,34	1,08
Naringina	0,2	25,94	0,12	0,41	3,9	25,95	0,24	0,86
Quercetina	0,8	37,41	0,29	0,77	12,5	37,32	0,27	0,74
Resveratrol	0,4	33,54	0,28	0,84	6,2	33,58	0,33	0,98
Rutina	0,4	24,50	0,23	0,91	12,5	24,64	0,21	0,83
Vitexina	0,7	25,33	0,28	1,15	15,0	25,34	0,30	1,24

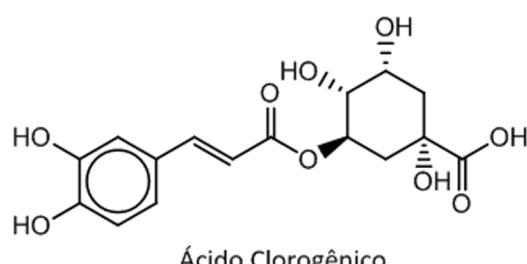
DPR: Desvio padrão relativo



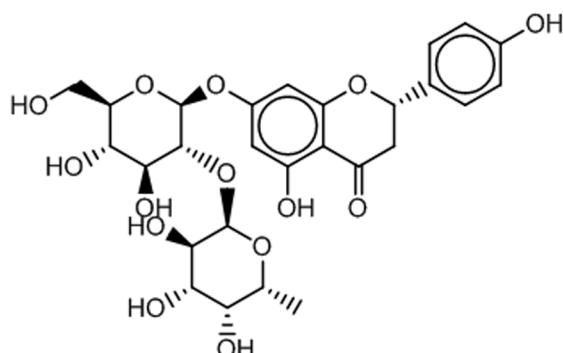
Catequina



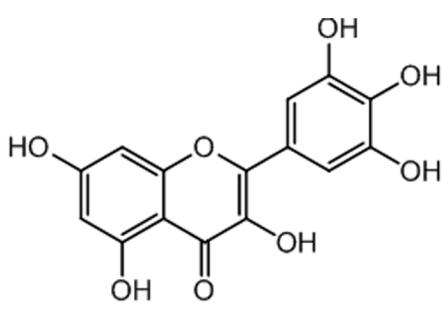
Vitexina



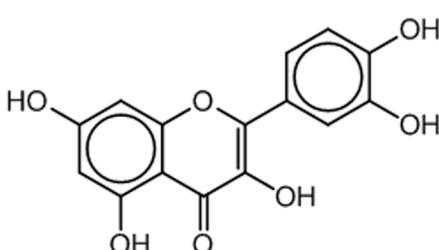
Ácido Clorogênico



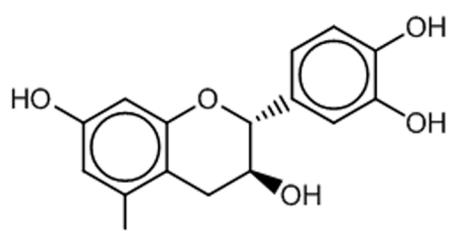
Naringina



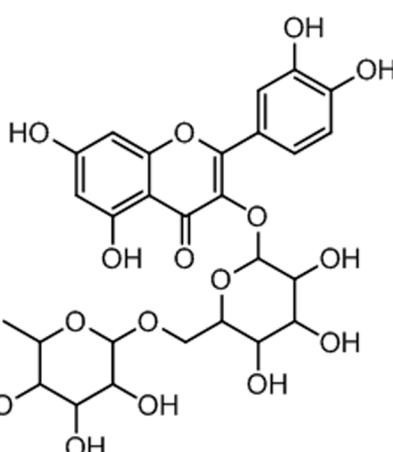
Miricetina



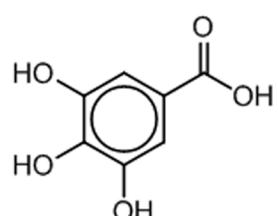
Quercetina



Epicatequina



Rutina



Ácido Gálico

Figura 2. Estruturas químicas dos compostos avaliados nos chás obtidos por decocção de cavalinha (*E. giganteum*), maracujá (*P. caerulea*) e guamirim (*M. oblongata*).

Segundo Colomeu *et al.*⁽²¹⁾, vitexina e rutina estão entre os compostos que apresentam potencial para neutralizar radicais livres presentes no organismo, juntamente com naringina (Thangavel *et al.*)⁽²⁷⁾, queracetina e miricetina (Dornas *et al.*)⁽²⁸⁾. Muller *et al.*⁽²⁹⁾ citam que vitexina também apresenta atividades como anti-inflamatória, antiespasmódica, antimicrobiana e hipotensiva. À naringina também são atribuídas ações anti-inflamatória, anti-carcinogênica e na redução de lipídios (Thangavel *et al.*)⁽²⁷⁾). Segundo Garambone e Rosa e Belinati o ácido clorogênico também é considerado um excelente antioxidante^(30,31) além de promover efeito hipotensor, reduzir a absorção de glicose pelo organismo e atuar como agente anti-inflamatório (Belinati)⁽²⁹⁾. Barbosa⁽³²⁾ relata que propriedades antioxidantas, antimicrobianas e antimutagênicas são atribuídas ao ácido gálico e seus derivados.

3.3. Determinação de Compostos Fenólicos Totais

A avaliação de fenólicos totais nas decocções indicou variações entre as espécies estudadas. Estas foram expressas em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de material vegetal (mg EAG g MV⁻¹). *P. caerulea* teve concentração de 13,82 mg EAG g MV⁻¹ ± 0,27, *E. giganteum* apresentou 4,34 mg EAG g MV⁻¹ ± 0,10 e *M. oblongata* 95,07 mg EAG g MV⁻¹ ± 2,41.

Com relação à concentração de fenólicos totais observada na decocção de *P. caerulea*, pode-se afirmar que o valor encontrado está de acordo com dados relatados por Borneo *et al.*⁽³³⁾, que apontam uma concentração de 10,20 mg EAG g MV⁻¹ obtida de infusão para a mesma espécie em estudo. *P. alata*, segundo Colomeu *et al.*⁽²¹⁾, apresentou 9,50 mg EAG g MV⁻¹ a partir de extrato aquoso e o mesmo tipo de extrato foi avaliado para *P. edulis*, onde a concentração de fenólicos totais foi de 8,30 mg EAG g MV⁻¹, segundo Silva *et al.*⁽²²⁾. Desta forma, a concentração obtida no presente estudo mostrou ser maior do que as encontradas em outros trabalhos.

O extrato aquoso de *E. giganteum*, segundo Ricco *et al.*⁽³⁴⁾, apresentou uma concentração de 7,89 mg de equivalentes de ácido tântico g MV⁻¹, quase duas vezes o obtido no presente estudo. Para outras espécies do gênero, observaram-se valores maiores de fenólicos totais, como para *E. arvense* que apresentou um valor de 12,80 mg EAG g MV⁻¹ no extrato aquoso, dado relatado por Nagai *et al.*⁽³⁵⁾. Milovanović *et al.*⁽²³⁾ avaliaram o extrato hidroalcoólico de cinco outras espécies de *Equisetum* apresentando concentrações que variaram de 10,39 mg de equivalentes de ácido clorogênico g MV⁻¹ em *E. arvense* a 39,44 mg de equivalentes de ácido clorogênico g MV⁻¹ em *E. sylvaticum*. Com relação à decocção de *E. giganteum* pode-se observar uma concentração reduzida de fenólicos totais, quando comparada com outras espécies do gênero, mas semelhante àquela apresentada para a mesma espécie.

Na avaliação dos compostos fenólicos totais para a espécie de *Myrcia* estudada, o valor total obtido foi considerado alto. *Myrcia tomentosa*, espécie deste mesmo gênero, estudada por Borges *et al.*⁽³⁶⁾, teve seu extrato aquoso avaliado em diferentes meses nos anos de 2010 e 2011 frente à concentração de fenólicos totais, com uma variação de 45,00 mg de equivalentes de ácido tântico g MV⁻¹ a 110,50 mg de equivalentes de ácido tântico g MV⁻¹. Comparando com este estudo, observa-se que a concentração de compostos fenólicos obtida na decocção de *M. oblongata* está de acordo com a literatura, no que diz respeito ao gênero, e que em comparação as outras duas decocções avaliadas, a concentração de fenólicos totais é bastante superior para esta espécie.

Em estudo com infusões de diferentes espécies, Moraes-de-Souza⁽³⁷⁾ avaliou o teor de compostos fenólicos, apresentando concentrações que variaram de 5,20 a 46,46 mg EAG g MV⁻¹ em *Pimpinella anisum* L. (anis) e *Melissa officinalis* L. (melissa), respectivamente. Entre eles estão *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (chá mate) com 42,45 mg EAG g MV⁻¹, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze (chá verde) com 40,02 mg EAG g MV⁻¹ e

Camellia sinensis (L.) O. Kuntze (chá preto) com 38,22 mg EAG g MV⁻¹.

Em outro estudo, Moraes-de-Souza *et al.*⁽³⁸⁾, compararam infusões de cinco espécies e o chá verde (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) apresentou as maiores concentrações (59,18 a 103,98 mg EAG g MV⁻¹) sendo anis (*Pimpinella anisum* L.) o chá com menores concentrações (5,24 a 8,90 mg EAG g MV⁻¹). Chá preto *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze), chá mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) e chá de camomila (*Matricaria recutita* L.) tiveram concentrações intermediárias.

Comparando-se o chá obtido por decocção de *M. oblongata* com os diferentes chás ou infusões de uso popular relatados na literatura observa-se uma maior concentração de compostos fenólicos totais, mesmo no que diz respeito ao chá verde, conhecido por seu poder antioxidante. Em contrapartida, os chás obtidos por decocção de *P. caerulea* e *E. giganteum* estão entre aqueles que apresentam menores concentrações citadas na literatura consultada.

4. Conclusões

A validação do método mostrou-se eficaz demonstrando, através da seletividade, ser linear e preciso. Para os 14 padrões avaliados, os coeficientes de correlação ficaram acima de 0,99 e a repetitividade do método permaneceu dentro dos limites aceitáveis,

segundo a literatura. Permitindo que este protocolo de identificação e quantificação seja utilizado de forma eficiente e rápida para a caracterização de compostos fenólicos em espécies vegetais.

Dos 14 padrões avaliados, nove foram verificados nas decocções testadas, sendo que os compostos majoritários foram vitexina e naringina em *M. oblongata*, ácido clorogênico e naringina em *E. giganteum* e ainda, vitexina e ácido gálico em *P. caerulea*. Observou-se que a espécie *Myrcia oblongata* tem uma maior concentração de fenólicos totais e de compostos fenólicos identificados individualmente. As diferentes ações benéficas dos compostos presentes nos chás obtidos por decocção de maracujá, guamirim e cavalinha, juntamente com seus teores de fenólicos totais, sugerem que a introdução destes chás na dieta pode favorecer o funcionamento do organismo, auxiliar na metabolização de compostos e prevenir danos causados por disfunções fisiológicas.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Universidade de Caxias do Sul, a CAPES, CNPq e à FAPERGS.

Referências

- [1] Morais SM de, Cavalcanti ESB, Costa SMO, Aguiar LA. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 19 (2009) 315-320.
- [2] Atoui AK, Mansouri A, Boskou G, Kefalas P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. *Food Chemistry* 89 (2005) 27-36.
- [3] Yaoa L, Jianga Y, Dattab N, Singanusongc R, Liud X, Duana J, Raymonte K, Lislee A, Xuf Y. HPLC analyses of flavanols and phenolic acids in the fresh young shoots of tea (*Camellia sinensis*) grown in Australia. *Food Chemistry* 84 (2004) 253-263.
- [4] Zielinski AAF, Haminuk CWI, Alberti A, Nogueira A, Demiate IM, Granato D. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International* 60 (2014) 246-254.
- [5] Patel SS, Soni H, Mishra K, Singh AK. Recent updates on the genus *Passiflora*: A review. *International Journal of Research in Phytochemistry & Pharmacology* 1 (2011) 1-16.
- [6] Ozarowska M, Thiema B. Progress in micropropagation of *Passiflora* spp. to produce medicinal plants: a mini-review. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23 (2013) 937-947.
- [7] Michielin EMZ. Avaliação do processo de extração com fluido supercrítico do óleo resina de cavalinha (*Equisetum arvense*). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Brasil, 2002. 105p.
- [8] Nascimento MA, Silva AK, França LCB, Quignard ELJ, Lopez JA, Almeida MG. *Turnera ulmifolia* L. (Turneraceae): Preliminary study of its antioxidant activity. *Bioresource Technology* 97 (2006) 1387-1391.
- [9] Martins DMFH, Santos JGJr, Russe M, Lanziotti VMND, Leal LKAM, Cunha GMA. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of the hydroalcoholic extract of stems from *Equisetum arvense* L. in mice. *Pharmacological Research* 49 (2004) 239-243.
- [10] Francescato LN, Debenedetti SL, Schwanz TG, Bassani VL, Henriques AT. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta* 105 (2013) 192-203.
- [11] Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5a. ed., Editora da UFRGS / Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 2004. 833p.
- [12] Borges LL, Alves SF, Sampaio BL, Conceição EC, Bara MTF, Paula JR. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 23 (2013) 230-238.
- [13] Ribani M, Bottoli CBG, Collins CH, Jardim ICSF, Melo LFC. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova* 27 2004 771-780.
- [14] Ribeiro FAL de, Ferreira MMC, Morano SC, Silva LR da, Schneider R P. Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados. *Química Nova* 31 (2008) 164-171.
- [15] Saito ST. Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante de chá-verde brasileiro (*Camellia sinensis* var. *Assamica*) Cultivar IAC-259. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil, 2007. 108p.
- [16] Morelli LLL. Avaliação de compostos fenólicos majoritários em geleia de uva produzida com a variedade IAC-138-22 (máximo). Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas, Brasil, 2010. 133p.
- [17] Roesler R, Malta LG, Carrasco LC, Holanda RB, Sousa CAS, Pastore GM. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* 27 (2007) 53-60.
- [18] Baydar NG, Özkan G, Sagdiç O. Total phenolic contents and antibacterial activities of grape (*Vitis vinifera* L.) extracts. *Food Control* 15 (2004) 335-339.

- [19] Waterhouse AL, Ignelzi S, Shirley JR. A comparison of methods for quantifying oligomeric proanthocyanidins from grape seed extracts. *American Journal of Enology and Viticulture* 51 (2000) 383-389.
- [20] Pereira CAM, Yariwake JH, Lanças FM, Wauters J-N, Tits M, Angenot L. A HPTLC densitometric determination of flavonoids from *Passiflora alata*, *P. edulis*, *P. incarnata* and *P. caerulea* and comparison with HPLC method. *Phytochemistry Analysis* 15 (2004) 241-248.
- [21] Colomeu TC, Figueiredo D, Cazarin CBB, Schumacher NSG, Maróstica Jr MR, Meletti LMM, Zollner RL. Antioxidant and anti-diabetic potential of *Passiflora alata* Curtis aqueous leaves extract in type 1 diabetes mellitus (NOD-mice). *International Immunopharmacology* 18 (2014) 106-115.
- [22] Silva JK da, Cazarin CBB, Colomeu TC, Batista AG, Meletti LMM, Paschoal JAR, Júnior SB, Furlan MF, Reyes FGR, Augusto F, Maróstica Jr MR, Zollner RL de. Antioxidant activity of aqueous extract of passion fruit (*Passiflora edulis*) leaves: In vitro and in vivo study. *Food Research International* 53 (2013) 882-890.
- [23] Milovanović V, Radulović N, Todorović Z, Stanković M, Stojanović G. Antioxidant, antimicrobial and genotoxicity screening of hydro-alcoholic extracts of five Serbian Equisetum species. *Plant Foods for Human Nutrition* 62 (2007) 113-119.
- [24] Mimica-Dukic N, Simin N, Cvejic J, Joyin E, Orcic D, Bozin B. Phenolic compounds in field horsetail (*Equisetum arvense* L.) as natural antioxidants. *Molecules* 13 (2008) 1455-1464.
- [25] Oniszczuka A, Podgórska R, Oniszczukb T, Zukiewicz-Sobczakc W, Nowakd R, Waksmundzka-Hajnosa M. Extraction methods for the determination of phenolic compounds from *Equisetum arvense* L. herb. *Industrial Crops and Products* 61 (2014) 377-381.
- [26] Wubshet SG, Moresco HH, Tahtah Y, Brighente IMC, Staerk D. High-resolution bioactivity profiling combined with HPLC–HRMS–SPE–NMR: α-Glucosidase inhibitors and acetylated ellagic acid rhamnosides from *Myrcia palustris* DC. (Myrtaceae). *Phytochemistry* 116 (2015) 246-252.
- [27] Thangavel P, Muthu R, Vaiyapuri M. Antioxidant potential of naringin – a dietary flavonoid – in N-Nitrosodiethylamine induced rat liver carcinogenesis. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2 (2012) 193-202.
- [28] Dornas WC, Oliveira TT, Rodrigues-das-Dores RG, Santos AF, Nagem TJ. Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 28 (2007) 241-249.
- [29] Muller SD, Vasconcelos SB, Coelho M, Biavatti MW. LC and UV determination of flavonoids from *Passiflora alata* medicinal extracts and leaves. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 37 (2005) 399-403.
- [30] Garambone E, Rosa G. Possíveis benefícios do ácido clorogênico à saúde. *Alimentos e Nutrição Araraquara* 18 (2007) 229-235.
- [31] Belinati KD. Efeitos do ácido clorogênico sobre funções de neutrófilos: estudos *in vivo*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2010. 62p.
- [32] Barbosa VF de. Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos *in vitro* e *ex vivo*. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista, Brasil, 2010. 83p.
- [33] Borneo R, León AE, Aguirre A, Ribotta P, Cantero JJ. Antioxidant capacity of medicinal plants from the Province of Córdoba (Argentina) and their *in vitro* testing in a model food system. *Food Chemistry* 112 (2009) 664-670.
- [34] Ricco RA, Agudelo I, Garcés M, Evelson P, Wagner ML, Gurni AA. Polifenoles y actividad antioxidante en *Equisetum giganteum* L. (Equisetaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10 (2011) 325-332.
- [35] Nagai T, Myoda T, Nagashima T. Antioxidative activities of water extract and ethanol extract from field horsetail (tsukushi) *Equisetum arvense* L. *Food Chemistry* 91 (2005) 389-394.

- [36] Borges LL, Alves SF, Sampaio BL, Conceição EC, Bara MT, Paula JR. Environmental factors affecting the concentration of phenolic compounds in *Myrcia tomentosa* leaves. Revista Brasileira de Farmacognosia 23 (2013) 230-238.
- [37] Moraes-de-Souza RA. Potencial antioxidante e composição fenólica de infusões de ervas consumidas no Brasil. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Brasil, 2007. 59p.
- [38] Moraes-de-Souza RA, Oldoni TLC, Cabral ISR, Alencar SM de. Compostos fenólicos totais e atividade antioxidante de chás comercializados no brasil. Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos, 29 (2011) 229-236.

Cursos 2017



IIC

Calendário anual de atividades

Visite www.iicweb.org

CÓDIGO	MÊS	DATA	DISCIPLINA	HORAS
LC-01	Março	15 a 17	Cromatografia Líquida Básica	24
GC-02	Abril	26 a 28	Cromatografia Gasosa Moderna	24
LC-04	Maio	18 e 19	Prever, Evitar e Resolver Problemas em LC	16
LC-MS-01	Junho	20 a 23	Acoplamento LC-MS e LC-MS/MS	32
LC-03	Agosto	23 a 25	Cromatografia Líquida Avançada	24
LC-06	Outubro	05 e 06	Otimização de Métodos em HPLC	16
LC-MS-01	Novembro	21 a 24	Acoplamento LC-MS e LC-MS/MS	32
LC-01	Dezembro	06 a 08	Cromatografia Líquida Básica	24

O Instituto Internacional de Cromatografia (IIC) possui como uma de suas principais missões o oferecimento de cursos de curta duração nas áreas de cromatografia e técnicas relacionadas.

Os objetivos dos cursos do IIC são o aprimoramento/formação/ atualização dos usuários das técnicas cromatográficas e afim (Preparo de Amostras, Espectrometria de Massas, Gestão da Qualidade, dentre outras), tanto do ponto de vista teórico quanto prático.

A filosofia educacional do IIC é: "ao invés de ensinar apenas como operar um equipamento específico (dar o peixe) o IIC ensina a técnica (como pescar)".

Os cursos do Instituto Internacional de Cromatografia são coordenados pelos Diretores do IIC, e ministrados pelos coordenadores, auxiliados por uma equipe técnica e científica altamente qualificada, constituída de docentes pós-graduados nos melhores centros do país na área, e pós-graduandos em fase de conclusão de suas teses. Na época em que cada curso for oferecido, uma relação dos instrutores é disponibilizada no website do IIC.

O programa detalhado de cada curso pode ser obtido através de contacto com o IIC.

Os cursos são ministrados com auxílio de recursos audiovisuais modernos (datashow-computador; vídeos, demonstrações, resolução de problemas e outros recursos instrucionais). Os alunos recebem um livreto contendo cópia de todos os slides apresentados pelos instrutores, além de material bibliográfico de apoio. Em vários cursos também são fornecidos livros de autoria dos próprios docentes dos cursos. A maior parte dos cursos também tem aulas práticas de laboratório, conforme anunciado no folheto explicativo de cada curso.

Observações:

- O I.I.C. oferece também cursos "in-house" ("in-company"). Interessados nesta modalidade devem contatar o IIC para obter mais detalhes.
- Com exceção dos cursos da área da qualidade (ISO, Validação e Auditoria) todos os demais possuem aulas teóricas e práticas de laboratório.
- O oferecimento efetivo de um curso depende de um número mínimo de inscritos no mesmo.
- O número de vagas dos cursos que envolvem laboratório está sendo limitado para melhor aproveitamento dos participantes.
- Visite o website www.iicweb.org para obter mais informações.

O Bookstore divulgará o material de informação e formação produzido pelo IIC, incluindo Livros, filmes, slides, material didático de cursos e outras formas de divulgação dos materiais por ele produzido. Esses materiais podem ser adquiridos do IIC através do website www.iicweb.org/biblioteca.php

Cromatografia Líquida Moderna - Fernando M. Lanças



Livro publicado pela Editora Átomo em maio de 2009, aborda de forma simples e didática os principais assuntos relacionados à Cromatografia Líquida Moderna (HPLC ou CLAE), desde a Teoria, Instrumentação, Colunas, Detectores, até aspectos da Validação, Preparo da Amostra e Análise Quantitativa.

O IIC recomenda este livro para todos os interessados em iniciar-se ou atualizar-se nesta técnica.

Cromatografia em Fase Gasosa - Fernando M. Lanças



Livro de autoria do Prof. Lanças, abordando todos os princípios básicos: instrumentação, análise qualitativa e quantitativa, detectores e muitos outros aspectos da Cromatografia Gasosa. Altamente recomendado para os iniciantes na técnica, os quais encontrarão explicações detalhadas e simples a respeito da maior parte dos fundamentos básicos da técnica.

Extração em Fase Sólida - Fernando M. Lanças



De autoria do Prof. Lanças, este livro apresenta e discute as várias formas de extração em fase sólida (SPE), desde a mais clássica empregando cartuchos até as mais atuais como discos, placas, ponteiras, e outras. Também discute os princípios da micro extração em fase sólida (SPME) e da extração por sorção em barras de agitação (SBSE).

Normas para publicação de artigos no *Scientia Chromatographica* (a versão detalhada está disponível em nosso portal www.scientiachromatographica.com).

Escopo

Scientia Chromatographica publica trabalhos em todas as áreas da Cromatografia, incluindo **GC** (colunas capilares, empacotadas, preparativas), **LC** (convencional, HPLC, U-HPLC, Prep-LC, micro-LC, nano-LC, TLC, PC), **SFC** (colunas empacotadas ou capilares), **Técnicas Acopladas** (GC-MS, LC-MS, SFC-MS, LC-GC, SFE-CE, GCxGC, LCxLC) e **Técnicas de Preparo de Amostras** (SPME, SBSE, MEPS, QuEChERS, LLE, MAE, SPE, LLE, etc.). A partir de 2012 o *Scientia* publica os seguintes formatos de artigos:

- Artigos Originais de Pesquisa
- Comunicação ("Short Communication")
- Artigos de Revisão Crítica

Os artigos de Revisão Crítica deverão antes de sua submissão serem discutidos com um dos co-editores mais relacionados ao assunto em questão. Devem conter uma contribuição nova a respeito de um assunto de grande interesse atual, incluindo uma discussão a respeito das vantagens e desvantagens do mesmo. O *Scientia* não publica apenas relato de artigos descritos na literatura, sem uma discussão crítica sobre os mesmos.

Os artigos Originais de Pesquisa deverão conter resultados de laboratório e/ou teóricos, que signifiquem uma contribuição expressiva para a área de técnicas de separação, seja ela conceitual, na instrumentação, ou na aplicação.

Os artigos do tipo Comunicação deverão ter a mesma qualidade dos artigos Originais, porém devido a seu caráter de comunicação preliminar usualmente são de menor extensão.

Envio do Artigo

Os artigos deverão ser encaminhados para periodico@scientiachromatographica.com. Os artigos do tipo Revisão deverão antes de seu envio pelo website ter o aval de um dos co-Editores do periódico, caso contrário não serão avaliados. Todos os artigos, independentemente do formato, deverão ser submetidos exclusivamente ao *Scientia*, com o entendimento de que eles não foram anteriormente submetidos, não estão sendo e não serão posteriormente publicados em outro veículo. Autores que utilizarem tabelas, ilustrações, figuras, ou textos contendo mais de 25 palavras, anteriormente publicados em outro periódico – sendo ou não autores do artigo – deverão obter a devida permissão **por escrito** do portador dos direitos de cópia ("Copyright"). Esse documento deverá permanecer de posse dos autores, sendo encaminhado ao *Scientia*, quando solicitado.

Idioma

Os artigos, com exceção dos de Revisão, podem ser escritos preferencialmente em inglês, porém em Português e Espanhol também serão aceitos. Os autores cujo idioma nativo não for o empregado na redação do artigo são orientados a solicitar a colaboração de colegas fluentes no idioma, antes de enviar o artigo para o periódico.

Tipos de contribuições aceitas para publicação no Scientia

O *Scientia Chromatographica* considera para publicação quatro tipos de contribuição:

Artigos Originais de pesquisa: descrevem resultados de estudos completos. Deverão conter resultados de laboratório e/ou teóricos, que signifiquem uma contribuição expressiva para a área de técnicas de separação, seja ela conceitual, na instrumentação, ou na aplicação. Este tipo de contribuição é limitado a 6.000 palavras, incluindo as legendas das figuras e as referências, e no máximo 5 tabelas e/ou figuras **somados**. No momento do envio da prova de impressão, caso isto ocorra o autor será consultado se prefere revisar o artigo para enquadrá-lo em até 7 páginas, ou se prefere pagar as páginas excedentes. O número de páginas de um artigo depende muito das figuras e tabelas do mesmo. Este critério não é aplicado aos artigos convidados, cujo número de páginas será informado ao autor no momento do convite.

Comunicações ("Short Communication"): são artigos completos, porém que relatam resultados mais curtos, oportunos, e/ou cuja relevância requer sua rápida publicação. Deverão ter a mesma qualidade dos artigos *Originais* porém, devido a seu caráter de comunicação preliminar, usualmente são de menor extensão. Este tipo de publicação deve ter no máximo quatro páginas impressas, incluindo todo o artigo, ou seja, tabelas, figuras e referências. O autor deve indicar claramente que se trata de uma comunicação no topo da primeira página do artigo.

Artigos de Revisão crítica: revisões críticas sobre uma área específica das técnicas cromatográficas e relacionadas são também consideradas para publicação. Esses artigos devem se limitar a no máximo 10.000 palavras, incluindo as legendas, e até 10 tabelas e figuras **somadas**. Os artigos de Revisão Crítica deverão antes de sua submissão serem discutidos com um dos co-Editores mais relacionados ao assunto em questão. Artigos não encaminhados desta forma serão antes enviados a um co-Editor da área em que se enquadre para parecer e, somente então, serão enviados aos revisores, podendo atrasar significativamente sua publicação. Devem conter uma contribuição nova a respeito de um assunto de grande interesse atual, discutindo as vantagens e desvantagens do mesmo. O *Scientia* não publica apenas relato de artigos descritos na literatura, sem uma discussão crítica sobre os mesmos.

Artigos de Alta Prioridade: são publicados no primeiro número disponível do periódico, recebendo prioridade máxima de todo o sistema Editorial do periódico. Para justificar sua publicação como alta prioridade, os manuscritos deverão apresentar, de forma resumida, resultados importantes de recentes desenvolvimentos na área de cromatografia e técnicas relacionadas (espectrometria de massas, preparo de amostras, eletroforese capilar e outros). Não precisam conter resultados experimentais detalhados, sendo limitados a 2.500 palavras e três figuras e/ou tabelas **combinadas**.

HPLC 2017 - Prague, 45th Int. Symp. on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

 18-23.6.2017

 Prague, Czech Republic

 <http://www.hplc2017-prague.org/>

IMSC 2016, 21st Int. Mass Spectrometry Conference

 20-26.8.2016

 Toronto, Canada

 <http://www.imsc2016.ca/>

Euroanalysis 2017, 19th European Conf. on Analytical Chemistry

 28.8.-1.9.2017

 Stockholm, Sweden

 <http://euroanalysis2017.se/>

ITP 2017, 24th Int. Symp. on Electro- and Liquid-phase Separation Techniques

 3-6.9.2017

 Gdansk, Poland

HPLC 2017 – Jeju, 46th Int. Symp. on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques

 5-9.11.2017

 Jeju, Korea

 <http://www.hplc2017-jeju.org/>

SETAC NORTH AMERICA

SETAC North America 38th Annual Meeting

Minneapolis, MN, USA / Nov 12 2017 - Nov 16 2017

ANALYTICA

26th International Trade Fair for Laboratory Technology, Analysis, Biotechnology and analytica conference.

Munich, Germany / Apr 10 2018 - Apr 13 2018

ARABLAB 2018



ARABLAB The Largest Annual Trade Show in the World for Laboratory Science & Instrumentation.

Dubai, UAE / Mar 18 2018 - Mar 21 2018

ACS

255th American Chemical Society National Meeting & Exposition.

New Orleans, LA, USA / Mar 18 2018 - Mar 22 2018

CHINA LAB 2018

China Analytic & Laboratory Equipment Expo & Conference

Guangzhou, China / Mar 27 2018 - Mar 29 2018

ISCC

42nd International Symposium on Capillary Chromatography and 15th GCxGC Symposium ...with particular emphasis on all Comprehensive Separation Technologies and MS Hyphenation.

Riva del Garda, Italy | May 13 2018 - May 18 2018

ASMS CONFERENCE

66th Conference on Mass Spectrometry and Allied Topics

San Diego, CA, USA | Jun 03 2018 - Jun 07 2018

ACHEMA 2018



ACHEMA 2018 - World Forum and Leading Show for the Process Industries

Frankfurt, Germany | Jun 11 2018 - Jun 15 2018

ISC 2018

32nd International Symposium on Chromatography

Cannes-Mandelieu, France | Sep 23 2018 - Sep 27 2018

EAS 2017 (EASTERN ANALYTICAL SYMPOSIUM AND EXPO...)

The EAS is held each year to provide professional scientists and students continuing education in the analytical and allied sciences.

Plainsboro NJ, USA | Nov 13 2017 - Nov 15 2017

ANALYTICA CHINA



9th International Trade Fair for Laboratory Technology, Analysis, Biotechnology and Diagnostics.

Shanghai, China | Oct 31 2018 - Nov 02 2018



PEFTEC is a focused international conference and exhibition for Analytical Chemists, Scientists, Process Operators, Laboratory Personnel and Environmental Managers who work in around the Petroleum, Refining, Chemical and Petrochemical industries.

Antwerp, Belgium | Nov 29 2017 - Nov 30 2017

The logo for MSB2017 features a red windmill and a field of tulips on the left, and a red cube with a white cross and wavy lines on the right. The text "MSB2017" is in red, and "THE NETHERLANDS NOORDWIJKERHOUT MARCH 26-29" is in smaller text. The website "www.msb2017.org" is also listed.

33rd International Symposium
on Microscale Separations and Bioanalysis
Noordwijkerhout, The Netherlands, March 26-29



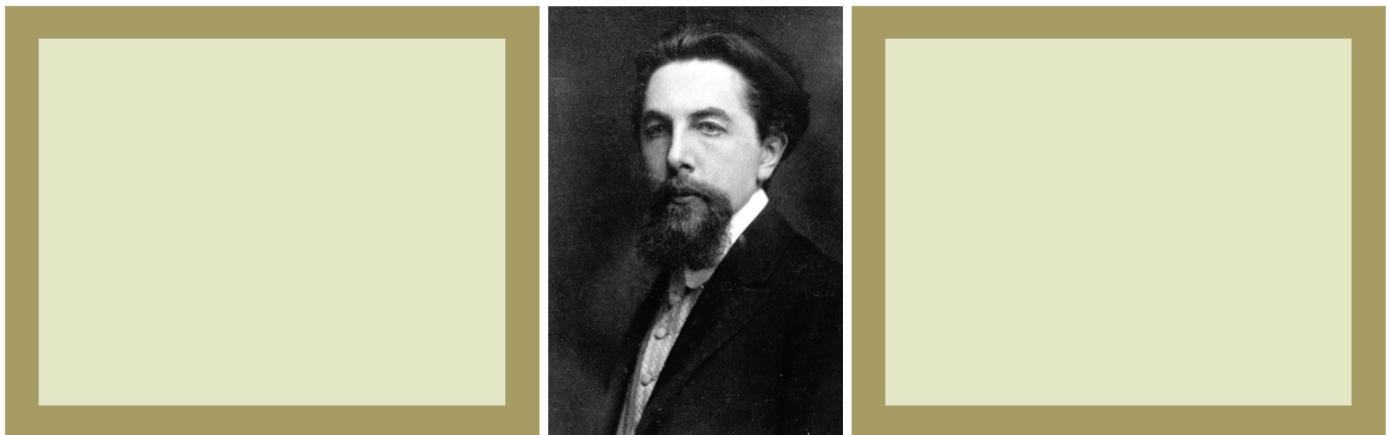
HPLC 2017 PRAGUE
18–22 June 2017 | CZECH REPUBLIC

3rd International Conference and Exhibition on
Advances in HPLC & Chromatography Techniques

July 13-14, 2017 Berlin, Germany



A ESCOLA de CROMATOGRÁFIA



Mikhail Semenovich Tswett (1872-1919) é considerado o
“Pai da Cromatografia” .

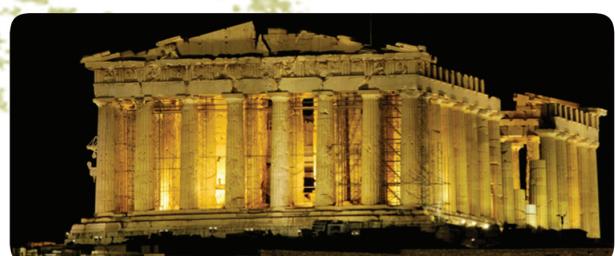
A **Escola de Cromatografia** do I.I.C. é uma iniciativa ímpar no Brasil. Consiste em um conjunto de eventos da área de cromatografia e técnicas afim (Espectometria de Massas, Preparo de Amostras e outras) um treinamento altamente qualificado, consistindo de cursos, palestras, workshops, aulas práticas, sessões de discussão, etc. Estes eventos são organizados a partir da constatação da carência dos mesmos em diferentes regiões geográficas do país.

Os **Cursos de Iniciação** são, prioritariamente, destinados aos interessados em aprenderem a teoria, a prática (ou ambas) envolvidas nas técnicas selecionadas. Tipicamente incluem duas ou três disciplinas correlacionadas, em um mesmo tema (60 horas-aula). Não exigem pré-requisitos ou formação acadêmica.

Os **Cursos de Atualização** são, prioritariamente destinados aos interessados em se atualizarem na teoria, prática, ou ambas, envolvidas nas técnicas escolhidas. Tipicamente incluem entre 3 e 5 disciplinas correlacionadas, em um mesmo tema (90 horas-aula). Não exigem pré-requisitos ou formação acadêmica.

Os **Cursos de Aperfeiçoamento** são, prioritariamente destinados aos interessados em se aprofundarem na teoria, prática, ou ambas, envolvidas no assunto escolhido. Tipicamente incluem entre 8 e 12 disciplinas correlacionadas, em um mesmo tema (180 horas-aula). Estes cursos, por serem de Extensão Universitária, possuem como pré-requisito um curso de graduação, em qualquer área.

Os **Cursos da Escola de Cromatografia** envolvem um conjunto de disciplinas pedagogicamente ordenadas de forma a oferecer uma melhor visão do conhecimento técnico e científico atual da área escolhida. Estando em contato permanente com o I.I.C. e seus docentes, através das disciplinas cursadas, o aluno terá uma maior oportunidade para discutir suas dificuldades (inclusive em disciplinas anteriores), solicitar literatura complementar, utilizar a biblioteca do I.I.C., assistir palestras, workshops e outras atividades as quais irão colaborar para o aprimoramento de sua formação na área de Cromatografia e correlatas.



ΠΑΡΘΕΝΩΝ (The Parthenon), Athens, Greece (438 B.C.)

Venha estudar Cromatografia e Técnicas Relacionadas com quem está envolvido em seu desenvolvimento



INSTITUTO INTERNACIONAL DE CROMATOGRÁFIA

www.iicweb.org

2017

Volume 9 | Número 3

- 145 Ionic liquids in magnetic-assisted microextraction procedures: A step forward for faster and selective sample preparation

Maria J. Trujillo-Rodriguez, Jared L. Anderson

- 160 Desenvolvimento, validação e aplicação de um método rápido e sensível para determinação de trigonelina e cafeína por UHPLC-DAD em café torrado e moído

Tiago Bervelieri Madeira, Giselle Lopes Silva, Lycio Shinji Watanabe, Caroline Teixeira Lopes, Alexandre Vinicius Guedes Mazalli, Mariana Bortholazzi Almeida, Suzana Lucy Nixdorf

- 171 Trans fatty acids levels of puff pastry products marketed in the central region of Portugal

TJorge M. T. B. Varejão, Fabiana F. G. S. Oliveira

- 180 Otimização de um método por CLAE-UV para análise de compostos fenólicos em *Myrcia oblongata* DC., *Passiflora caerulea* L. e *Equisetum giganteum* L.

Fabiana Agostini, Francine da Motta Michelon, Vanessa Amanda Alves Gomes, Sabrina Bertolazzi, Joséli Schwambach, Sidnei Moura

