UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

LIDIA AKEMI AKAMINE

***Síntese de fases extratoras à base de grafeno e seu emprego
na análise de gingeróis em amostras alimentares.***

São Carlos - SP
2020

LIDIA AKEMI AKAMINE

***Síntese de fases extratoras à base de grafeno e seu emprego
na análise de gingeróis em amostras alimentares.***

Versão Original

Dissertação apresentada ao Instituto de Química de São Carlos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Química Analítica e Inorgânica
Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2020

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Assinatura: *Lidia A. Akamine*
Data: *05/06/2020*

Ficha Catalográfica elaborada pela Seção de Referência e Atendimento ao Usuário do SBI/IQSC

Akamine, Lidia Akemi

Síntese de fases extratoras à base de grafeno e seu emprego na análise de gingeróis em amostras alimentares. / Lidia Akemi Akamine. — São Carlos, 2020.

90 f.

Dissertação (Mestrado em Química Analítica e Inorgânica) — Instituto de Química de São Carlos / Universidade de São Paulo, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

1. Química analítica. 2. Cromatografia líquida. 3. Métodos cromatográficos.
I. Título.

Clelia Junko Kinzú Dimário - CRB: 5814/8

AGRADECIMENTOS

À minha família, por sempre estarem ao meu lado, por todo o amor, paciência, compreensão, apoio e incentivo ao longo desta jornada.

Ao meu orientador Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças pela oportunidade de realizar este trabalho, e os ensinamentos e sugestões que me ajudaram durante esses anos.

Ao Prof. Dr. Wagner Luis Polito e ao Prof. Dr. Laudemir Carlos Varanda, por sanarem as minhas dúvidas em suas respectivas áreas de conhecimento.

À Elaine Aparecida Alves Ferreira Gobato e ao Dr. Guilherme Miola Titato, técnicos do laboratório do grupo de Cromatografia que auxiliaram desde o início com os aspectos práticos necessários durante o desenvolvimento do trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Paulo Campana Filho, pela disponibilização de equipamento e acesso ao laboratório.

À Dra. Silmara França Buchviser, pela disponibilidade de uso de equipamentos.

À Renata Meire dos Santos e ao Reinaldo Hamaguchi, pela disponibilização de equipamentos, uso das instalações dos laboratórios de Ensino e, também, pelas conversas e risadas.

Aos colegas do grupo de Cromatografia, pelas conversas, momentos de descontração e ajuda disponibilizada com este trabalho. Um agradecimento especial ao Arley, Ana Lúcia, e Vivane por toda a ajuda e conhecimentos compartilhados em momentos cruciais durante este trabalho.

Aos meus amigos, Pamela, Rhaissa, Lucas (Lesado), Lucas (Zé), Dawany, pela amizade, paciência e apoio, e ao meu namorado, Eduardo, pelo companheirismo, compreensão, amor e paciência.

Ao IQSC e à USP, pela infraestrutura e pela formação profissional, e o apoio dos funcionários e docentes envolvidos.

A todos os envolvidos, que de alguma forma contribuíram na realização deste trabalho.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FAPESP e CNPq pelo apoio financeiro e, especialmente, à CAPES pela bolsa concedida.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O preparo de amostra é a etapa inicial de uma análise química efetuada para isolar os analitos dos interferentes presentes em uma amostra. No entanto, amostras contendo os analitos de interesse em baixa concentração, precisam ser tratadas para que se possa concentrá-las de forma adequada para serem submetidas a análises cromatográficas. Nesse contexto, surgiram, recentemente, novas técnicas baseadas no desenvolvimento de fases extratoras, as quais possibilitam a extração e concentração dos analitos, proporcionando alto rendimento, redução da quantidade de solvente e tempo consumido. Neste trabalho, materiais baseados em óxido de grafeno foram sintetizados e avaliados quanto à sua capacidade de retenção em relação aos analitos 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol, encontrados no gengibre. O material com a melhor retentividade, o compósito magnético GO-Fe₃O₄ foi utilizado para o desenvolvimento de um método de microextração em fase sólida dispersiva, DSPME. O método alcançou limites de detecção e quantificação de 2-3 µg L⁻¹ e 5 µg L⁻¹, respectivamente, e boa linearidade com valores de R² a 0,9886 (6-gingerol), 0,9906 (8-gingerol) e 0,9806 (10-gingerol), na faixa linear de 5-200 µg L⁻¹. A precisão do método foi determinada em termos de desvio padrão relativo (RSD), variando de 0,69-13,4 % para o mesmo dia, e de 0,4-10,9 % em dias diferentes. A exatidão variou de 81,3 % a 118,3 %, e fatores de enriquecimento de 7-9,9, para 6-gingerol, 19,8-25,7, para 8-gingerol, e 25,5-30,8, para 10-gingerol. Para avaliar a aplicabilidade do método, foram analisadas 5 amostras alimentícias (chás, bala, suplemento termogênico, água tônica e extrato de gengibre fresco) e determinado o teor dos três gingeróis em cada uma delas. Neste trabalho, para solucionar ou retardar o fenômeno de inchamento no material óxido de grafeno, observado experimentalmente e relatado na literatura, foi proposto o desenvolvimento de óxido de grafeno modificado superficialmente com polímero para aplicação na técnica *in-tube* SPME.

Palavras-chave: Óxido de grafeno. DSPME. Gingerol.

ABSTRACT

The sample preparation step is usually performed aiming to isolate the analytes from the interferences present in a sample. However, samples having the analytes at low concentration need to be processed in a way to properly concentrate them in order to be analyzed by a chromatographic technique. Nowadays new extraction phases are being studied, aiming to extract and concentrate analytes, with a high yield, thus reducing solvent use and time consumed. In this work, materials based on graphene oxide were synthesized and evaluated for their retention capacity for the determination of the analytes 6-gingerol, 8-gingerol and 10-gingerol, found in ginger. The material with the best retentivity, GO-Fe₃O₄ magnetic material was selected, using it for the development of a dispersive solid phase microextraction method, DSPME. Limits of detection and quantification ranged between 2-3 µg L⁻¹ and 5 µg L⁻¹, respectively, and good linearity with values from R² to 0.9886 (6-gingerol), 0.9906 (8-gingerol) and 0.9806 (10-gingerol), in the linear range of 5-200 µg L⁻¹. The accuracy of the method was determined in terms of relative standard deviation (RSD), ranging from 0.69-13.4% for the same day, and from 0.4-10.9% on different days. The accuracy varied from 81.3% to 118.3%, and enrichment factors from 7-9.9, for 6-gingerol, 19.8-25.7, for 8-gingerol, and 25.5-30.8, for 10-gingerol. To evaluate the applicability of the method, 5 food samples (teas, candies, thermogenic supplements, tonic water, and fresh ginger extract) were analyzed and the content of the three gingerols in each one was determined. In this work, to solve or delay the swelling phenomenon in the graphene oxide material observed experimentally and reported in the literature, the development of polymer-modified graphene oxide was proposed for application in the SPME in-tube technique.

Keywords: Graphene oxide. DSPME. Gingerol.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do procedimento de preparo dos materiais de grafeno e óxido de grafeno.	21
Figura 2: Estrutura cristalina da magnetita.	23
Figura 3: Ilustração do Zingiber officinale: folhas, flor, caule e rizoma.....	24
Figura 4: Rizoma do gengibre (a) e fórmulas estruturais dos seus principais compostos bioativos, (b) 6-gingerol, (c) 8-gingerol e (d) 10-gingerol.	29
Figura 5: Representação do processo de preparo do compósito GO-Fe ₃ O ₄	43
Figura 6: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais GO, GO@SiO ₂ e redGO@SiO ₂	50
Figura 7: Micrografia do material GO na escala de 1:2 µm.	51
Figura 8: Micrografias dos compósitos: (a) GO@SiO ₂ na escala de 1:20 µm, (b) GO@SiO ₂ na escala de 1:3 µm, (c) redG@SiO ₂ na escala de 1:10 µm e (d) redG@SiO ₂ na escala de 1:3 µm.	51
Figura 9: Microscopia Eletrônica de Transmissão do material Fe ₃ O ₄ : (a) na escala de 1:200 nm e (b) na escala de 1:100 nm; do compósito GO-Fe ₃ O ₄ : (c) na escala de 1:1 µm e (d) na escala de 1:200 nm.....	53
Figura 10: Avaliação da capacidade retentiva dos materiais em relação ao analito 6-gingerol.	54
Figura 11: Sistema DSPME: (a) visão para 6 extrações simultâneas e (b) visão aproximada do frasco durante extração.	56
Figura 12: Resultados da otimização dos parâmetros : (a) massa de adsorvente, GO-Fe ₃ O ₄ .; (b) tempo de extração; (c) tempo de dessorção; (d) velocidade de agitação e (e) solvente para dessorção.....	58
Figura 13: Cromatograma do íon total (TIC) na análise de padrões dos três gingeróis na concentração de 10 µg L ⁻¹	61
Figura 14: Cromatogramas obtidos para as transições de quantificação dos gingeróis.	62
Figura 15: Comparação entre os cromatogramas de água pura fortificada com os padrões analíticos na concentração de 10 µg L ⁻¹ e os cromatogramas das amostras reais: (a) padrões analíticos; (b) chá Y; (c) chá X; (d) bala de gengibre; (e) suplemento termogênico; (f) bebida gaseificada e (g) extrato de gengibre.....	63

Figura 16: Curva analítica do composto 6 – gingerol.....	68
Figura 17: Curva analítica do composto 8 - gingerol.	68
Figura 18: Curva analítica do composto 10 - gingerol.	68
Figura 19: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x^2$ para o composto 6-gingerol.....	69
Figura 20: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x$ para o composto 8-gingerol.....	69
Figura 21: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x^2$ para o composto 10-gingerol.....	69
Figura 22: Representação dos parâmetros de solubilidade de Hansen.....	76
Figura 23: Micrografia dos materiais modificados: (A) GOPS na escala de 1:10 μm e (B) redGO-PS na escala de 1:1 μm	77
Figura 24: Avaliação da capacidade de retenção dos materiais com e sem recobrimento polimérico para os gingeróis empregados no estudo.....	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:Produção de gengibre: os 15 maiores produtores.	25
Tabela 2:Exportação mundial de gengibre.	25
Tabela 3: As principais classes de compostos fenólicos formados no metabolismo de vegetais.	28
Tabela 4:Valores selecionados obtidos pela otimização univariada do método de extração.	60
Tabela 5:Parâmetros otimizados para a detecção dos gingeróis pela espectrometria de massas sequencial.....	60
Tabela 6: Resultados dos limites de detecção e quantificação.....	65
Tabela 7: Valores da somatória de resíduos relativos obtidos pela regressão linear ponderada.....	67
Tabela 8: Resultados obtidos para a avaliação da precisão do método.	70
Tabela 9: Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método.	70
Tabela 10: Resultados obtidos para a avaliação do fator de enriquecimento do método.....	71
Tabela 11: Concentrações dos analitos presentes em cada amostra analisada.....	72
Tabela 12: Solubilidade de dois polímeros em 5 solventes diferentes.....	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

C18	Octadecilsilano
CVD	Do inglês, <i>Chemical Vapour Deposition</i>
DSPME	Microextração em fase sólida dispersiva
EPS	Do inglês, <i>Expanded polystyrene</i>
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i>
FAO	Do inglês, <i>Food And Agriculture Organization</i>
Fe₃O₄	Magnetita
Fe₃O₄@GO	Magnetita encapsulada com óxido de grafeno (<i>Core-shell</i>)
Fe₃O₄@SiO₂	Magnetita funcionalizada com aminopropil-silica
Fe₃O₄@SiO₂GO	Óxido de grafeno ancorado em magnetita funcionalizada com aminopropil-silica
FT-IR	Espectroscopia vibracional na região do infravermelho com Transformada de Fourier
GO	Óxido de grafeno
GO-Fe₃O₄	Compósito de óxido de grafeno e magnetita
GOPS	Compósito de óxido de grafeno e poliestireno
GO@SiO₂	Óxido de grafeno ancorado em aminopropil-silica
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ICH	Do inglês, <i>International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use</i>
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
LLE	Extração líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MS	Espectrometria de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
PDMS	Polidimetilsiloxano
PEG	Polietilenoglicol
redGO	Óxido de grafeno reduzido
SBQ	Sociedade Brasileira de Química

SPE	Extração em fase sólida
SPME	Microextração em fase sólida
MRM	Monitoramento de Transições Seleccionadas
TIC	Do inglês, <i>Total Ion Chromatogram</i>
UPLC	Do inglês, <i>Ultra-Performance Liquid Chromatography</i>
UV/vis	Ultravioleta/visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Preparo de amostra	18
2.2 Técnicas de microextração	18
2.2.1 Microextração em fase sólida dispersiva (DSPME).....	19
2.3 Materiais sorventes	20
2.3.1 Grafeno e Óxido de grafeno.....	20
2.3.2 Materiais magnéticos como sorventes versáteis para separação: Magnetita ...	22
2.4 Gengibre	23
2.4.1 Modos de consumo e comercialização do gengibre.....	26
2.4.2 Compostos fenólicos e o Gingerol	27
2.5 Análise de compostos bioativos em matrizes vegetais	31
2.5.1 Espectrometria de Massas em Tandem ou MS/MS com ionização por <i>Electrospray</i>	31
2.6 Validação	32
2.6.1 Seletividade	33
2.6.2 Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ).....	33
2.6.3 Linearidade.....	33
2.6.4 Precisão	34
2.6.5 Exatidão	35
2.6.6 Fator de enriquecimento.....	35
3 OBJETIVOS	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos específicos	36
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	37
4.1 Reagentes e padrões	37

4.2 Materiais	37
4.3 Equipamentos	38
4.4 Amostras reais	38
4.4.1 Amostra obtida a partir do gengibre fresco	38
4.4.2 Chá X / Chá Y	38
4.4.3 Suplemento Termogênico	39
4.4.4 Bala de gengibre	39
4.4.5 Água Tônica	39
4.4.6 Extrato de gengibre fresco	39
4.5 Preparo e síntese de materiais sorventes	40
4.5.1 Preparação de óxido de grafeno (GO)	40
4.5.2 Preparação do óxido de grafeno reduzido (redGO)	40
4.5.3 Síntese do compósito GO@SiO ₂	41
4.5.4 Síntese do compósito red-GO@SiO ₂	41
4.5.5 Síntese de nanopartículas de Fe ₃ O ₄	41
4.5.6 Preparo do compósito Fe ₃ O ₄ @SiO ₂	42
4.5.7 Preparo do compósito Fe ₃ O ₄ @SiO ₂ @GO	42
4.5.8 Preparo do compósito GO-Fe ₃ O ₄	42
4.5.9 Preparo do compósito Fe ₃ O ₄ @GO core-shell	43
4.5.10 Preparo do óxido de grafeno com recobrimento polimérico	44
4.6 Avaliação da capacidade extratora dos materiais	44
4.7 Caracterização dos materiais	45
4.7.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)	45
4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura	45
4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão	45
4.8 Procedimentos de preparo de amostras	46
4.8.1 <i>in-tube</i> SPME	46
4.8.2 Sistema microextração em fase sólida dispersiva (DSPME)	46
4.9 Otimização do método DSPME	47
4.10 Instrumentação e condições para o desenvolvimento e aplicação do método de extração mediante cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem	47

4.11 Validação do método analítico	48
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	49
5.1 Caracterização dos materiais	49
5.1.1 Caracterização dos materiais GO, e os ancorados em sílica.....	49
5.1.2 Caracterização do material magnético Fe ₃ O ₄ e GO-Fe ₃ O ₄	52
5.2 Avaliação da capacidade de retenção dos materiais sintetizados	54
5.3 Desenvolvimento de método para preparo de amostra	55
5.3.1 Sistema de Microextração em fase sólida dispersiva (DSPME)	55
5.3.2 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo de extração	57
5.3.3 Otimização de parâmetros para o método LC-MS.....	60
5.3.4 Avaliação das Figuras de mérito do método desenvolvido.....	62
5.4 Aplicação do método na análise de gingeróis em produtos alimentares.	71
5.5 Potencial aplicação <i>on-line</i> dos materiais preparados na microextração em fase sólida no tubo (<i>in-tube</i> SPME)	73
5.5.1 Caracterização de GO e redGO com recobrimento polimérico.....	77
5.5.2 Avaliação da capacidade de retenção dos materiais em relação aos gingeróis.	78
6 CONCLUSÃO.....	80
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

1 INTRODUÇÃO

Produtos naturais são frequentemente utilizados na busca do alívio de dores e curas de doenças desde os tempos antigos, e estiveram presentes no desenvolvimento das culturas Ocidentais e Orientais. Culturas como a Egípcia, Greco-Romana e Chinesa, principalmente, tem as suas histórias de desenvolvimento marcadas pelo uso de produtos naturais com fins medicinais ou no controle de pragas, defesa e caça. De modo empírico, as plantas eram utilizadas para suprir e solucionar algumas necessidades básicas de sobrevivência.¹

O conhecimento que os povos primitivos e indígenas têm sobre a variedade e potencial químico presentes na natureza, pode ser apontado como fator relevante para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo.¹

No início, os materiais vegetais eram utilizados na sua forma *in natura*, mas ao longo do processo de desenvolvimento dos fármacos, notou-se que o aumento da concentração dos extratos melhorava a intensidade e uniformidade de suas ações.²

Os avanços no conhecimento de química permitiram que compostos bioativos presentes em fontes naturais pudessem ser isolados, identificados, e usados como moléculas sintéticas com atividade terapêutica melhorada.²

Compostos biologicamente ativos são aqueles que exercem algum tipo de efeito sobre um determinado organismo vivo.² As plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes destes produtos naturais e matérias-primas de muitos medicamentos nos tempos recentes.³ No caso das plantas, os compostos orgânicos originados pelo metabolismo primário e secundário são biologicamente ativos, apresentando ação antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, entre outras.⁴

Entre os compostos naturais que apresentam atividade antioxidante, destacam-se os compostos fenólicos (flavonóides, ácidos fenólicos e taninos), compostos nitrogenados (alcalóides, aminoácidos, peptídeos e aminas), carotenóides, o ácido ascórbico e os tocoferóis.²

Na década de 1980, foram identificados 121 compostos de origem vegetal, oriundos de 95 espécies de plantas. Dentre os medicamentos aprovados entre os anos de 1983-1994, 6% foram obtidos diretamente de espécies vegetais, 24% foram provenientes de produtos derivados e 9% desenvolvidos por meio da modelagem

molecular, ou seja, as estruturas moleculares dos compostos bioativos foram utilizadas como precursores nas sínteses químicas.⁵

Até o ano de 2014, 26% dos medicamentos aprovados para o uso clínico eram produtos naturais ou derivados, e 13% possuíam grupamento farmacofórico de origem vegetal.⁶

Os estudos químicos e farmacológicos de plantas nos últimos anos têm apresentado notável avanço em relação à obtenção de novos compostos com propriedades terapêuticas, evidenciando a importância desse recurso, que ao longo do tempo tem contribuído para a obtenção de muitos fármacos que são até hoje amplamente utilizados na área clínica.⁷

Para a investigação de plantas medicinais são utilizados processos de extração, fracionamento e purificação que possibilitam o isolamento e identificação de substâncias bioativas.⁸ Os resumos apresentados nas Reuniões Anuais da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), entre os anos de 1997 a 2001, mostraram que os trabalhos referentes aos fitoquímicos foi substancial, sendo que 51% envolvia o isolamento e determinação estrutural, 16% o desenvolvimento e aplicação de metodologias analíticas e 19% enfocavam trabalhos sobre a atividade biológica.⁹

Entre as técnicas analíticas, a cromatografia é a mais empregada para a separação e análise dos princípios ativos. Encontram-se na literatura muitos trabalhos utilizando, por exemplo, a cromatografia gasosa e/ou a cromatografia líquida de alta eficiência para a determinação de compostos bioativos em amostras naturais e alimentares.^{10 - 12} Essas técnicas são especialmente úteis na análise de amostras complexas, e à nível traço, apresentam seletividade e eficiência frequentemente satisfatórias.¹³

No desenvolvimento de metodologias analíticas, a etapa de preparo de amostra se mostra muito importante e imprescindível, isolando os analitos, aumentando a concentração de forma adequada e, quando possível, eliminando interferentes presentes na matriz. A extração em fase sólida (SPE), aliada ao conceito de miniaturização no preparo das amostra surge, como uma das técnicas analíticas que permite a extração, concentração, e limpeza de analitos (*clean-up*) em matrizes complexas, de modo que as análises resultem em alto rendimento e redução do volume de solventes.¹⁴

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Preparo de amostra

O preparo de amostra é uma etapa muito importante no desenvolvimento de um método analítico, influenciando na seletividade, sensibilidade, precisão e exatidão do mesmo¹⁵. Principalmente, as análises de amostras de matrizes complexas nas quais os analitos estão presentes em baixas concentrações, em nível de traços, precisam de um tratamento ou preparo de amostra antes de serem submetidas à análise instrumental. As matrizes complexas podem conter muitos compostos ou elementos interferentes que podem prejudicar os resultados de um método analítico.¹⁶

2.2 Técnicas de microextração

Os métodos tradicionais de preparo de amostra mais empregados são a extração líquido-líquido (LLE) e a extração em fase sólida (SPE). A extração líquido-líquido faz uso de duas fases imiscíveis, designadas fase A e fase B, uma fase contém os analitos de interesse e a outra não. Ambas as fases, são misturadas e os analitos são distribuídos entre as duas fases; nesse caso, a extração é feita pela diferença de solubilidade dos componentes. A LLE, embora simples, apresenta desvantagens como o uso de grandes quantidades de solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos¹⁴, e de difícil automação.

A SPE foi introduzida em 1976 com o propósito de eliminar ou amenizar as dificuldades apresentadas pela extração líquido-líquido.¹⁶ O método de extração em fase sólida apresenta vantagens e características que ampliam as possibilidades e facilidades de aplicação no preparo de amostra, como o menor consumo de solvente orgânico, não formação de emulsões, redução de resíduos, facilidade de automação, capacidade de concentração dos analitos de interesse e bom desempenho na recuperação dos mesmos. Atualmente, é um dos métodos de preparo de amostra mais empregado, devido ao seu extenso campo de aplicação. No entanto, os procedimentos da SPE são ainda trabalhosos e demandam tempo elevado de trabalho laboratorial, além do alto custo dos dispositivos.¹⁷

A evolução da SPE tem estado marcada pelo desenvolvimento de novas fases extratores, passíveis de oferecer diferentes mecanismos de retenção dos analitos por meio de interações mais específicas. De igual forma, novas técnicas miniaturizadas de extração em fase sólida têm sido desenvolvidas, obtendo maiores frequências de análise, com menor consumo de solventes e menor necessidade de manipulação da amostra. Dentre essas técnicas, encontra-se a microextração em fase sólida (SPME), a qual combina a extração e concentração do analito em uma única etapa. Além de possibilitar a automatização do sistema analítico, permite que o mesmo dispositivo no qual ocorreu a extração seja acoplado ao sistema cromatográfico, resultando em análises com alta sensibilidade e reprodutibilidade, e reduzindo os erros cometidos pelos analistas.¹⁴

A SPME, primeira microtécnica de extração, foi introduzida por Arthur e Pawliszyn em 1990,¹⁸ baseada no recobrimento de uma fibra de sílica fundida por um sorvente, geralmente polidimetilsiloxano (PDMS), onde os analitos presentes em uma amostra aquosa ou gasosa ficarão retidos por um tempo necessário para atingir o equilíbrio de partição e, ao final, sofrerão dessorção pela fase móvel do cromatógrafo líquido ou por aquecimento direto no injetor do cromatógrafo a gás.

A SPME passou por muitas modificações com intuito de melhorar a qualidade dos resultados, adaptando o procedimento, ao passo que amostras e aplicações mais complexas foram propostas para estudo.¹⁹

2.2.1 Microextração em fase sólida dispersiva (DSPME)

Em 2003, Anastassiades *et al.*²⁰ introduziram a extração dispersiva em fase sólida (DSPE). Nesta técnica, o material sorvente é diretamente adicionado na amostra em solução, a qual não sofreu algum tratamento prévio, sendo a agitação e centrifugação as forças promotoras da interação entre a amostra e os analitos. O uso deste tipo de técnica de microextração, a qual não requer trabalhosas horas em cada uma das suas etapas, proporciona uma análise rápida, fácil, barata, eficaz, robusta e segura.²¹

A DSPME é uma técnica baseada na dispersão de pequena quantidade de sorvente na amostra em solução, que tem mostrado resultados importantes para a separação e preconcentração de analitos em diferentes matrizes por ser uma técnica

de simples execução, rápida, com boa recuperação, apresentando uma notável redução no consumo de solventes orgânicos ²² e baixo custo.

A fase sólida extratora quando dispersa em solução da amostra consegue interagir com os analitos de interesse de forma homogênea e imediata pela adsorção destes em sua superfície. Após a extração, o sorvente contendo os analitos é separado da solução por meio da centrifugação e, em seguida, a eluição ou dessorção dos analitos é feita com o uso de solvente adequado.^{21,23}

2.3 Materiais sorventes

2.3.1 Grafeno e Óxido de grafeno

O grafeno é uma forma alotrópica do carbono com estrutura bidimensional, e espessura monoatômica composta por átomos de carbono sp^2 ligados entre si em forma de hexágonos, originando uma estrutura semelhante a uma colmeia. O empilhamento de estruturas semelhantes decorrente de interações de atração de van der Waals dá origem à estrutura do grafite. O grafeno é o primeiro cristal bidimensional isolado de forma estável, o qual possui um longo sistema π conjugado que proporciona ao material propriedades notáveis devido, justamente, aos seus elétrons que se comportam como partículas relativísticas de massa zero, resultando em um efeito de *Quantum Hall*, a alta mobilidade dos elétrons e, apresentando condutividade térmica e resistência mecânica muito semelhante à dos nanotubos de carbono. O termo grafeno inclui os grafenos monoatômicos e os multicamadas; porém cada material apresenta propriedades particulares e distintas promovidas pelos acoplamentos eletrônicos entre as folhas de grafeno.^{24, 25}

As características e propriedades encontradas nesses materiais, e a ampla possibilidade de aplicação, despertaram o interesse para o desenvolvimento de rotas de produção, visando o maior rendimento, qualidade e menor custo. As primeiras formas de obtenção de grafeno foram descritas como o método de *peeling*, com o uso de fita adesiva, e o método CVD (do inglês, *Chemical Vapour Deposition*), no qual é induzida a decomposição de precursores de carbono em temperaturas altas, sobre catalisadores metálicos. Ambos geram um material de boa qualidade, porém, com baixo rendimento. Entre os métodos propostos, atualmente, destacam-se os

procedimentos baseados na esfoliação do grafite. As rotas químicas, nesse caso, compreendem, primeiramente, a oxidação do grafite, com a alteração da configuração de vários átomos sp^2 para sp^3 pela adição de grupamentos oxigenados; em seguida, a exfoliação do material resultante para óxido de grafeno; e, finalmente, a redução química ao grafeno.²⁵ A Figura 1 mostra a representação do procedimento de preparo dos materiais grafeno e óxido de grafeno.

Figura 1: Representação do procedimento de preparo dos materiais de grafeno e óxido de grafeno.

Fonte: ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M., 2013.²⁵

Devido à grande área superficial e aos elétrons π deslocalizados, tanto o grafeno, quanto o óxido de grafeno (GO) são considerados como adsorventes superiores com notável capacidade de sorção e uma significativa afinidade pelos compostos orgânicos.²⁶

Por outro lado, a falta de grupos funcionais no grafeno limita o seu uso como fase estacionária, dificultando a sua modificação e estabilização em uma superfície de suporte. O oposto ocorre com o óxido de grafeno (GO), uma vez que em sua estrutura há grupos contendo oxigênio em abundância, tais como C-O-C, C-OH e -COOH, permitindo que seja montado em muitas superfícies de suporte,²⁷ oferecendo um potencial significativo para a produção de materiais de grafeno quimicamente modificados e em larga escala.^{28, 29}

As propriedades eletrônicas, térmicas, eletroquímicas e mecânicas do óxido de grafeno são comparáveis às do grafeno, e ainda são biocompatíveis por causa de sua natureza hidrofílica. O óxido de grafeno geralmente é produzido por meio de três principais métodos: de Brodie ³⁰, Staudenmaier ³¹, e Hummers ³². Os métodos diferem entre si pelo grau de oxidação do grafite que cada um apresenta. O método mais utilizado, no entanto, é o de Hummers. ²⁸.

2.3.2 Materiais magnéticos como sorventes versáteis para separação: Magnetita

A magnetita é um mineral presente em rochas ígneas, sedimentares e metamórficas. Este mineral, Fe_3O_4 , é um óxido misto de ferro com FeO e Fe_2O_3 que contem os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} , formando uma estrutura do tipo espinélio invertido. É estruturalmente representado por $[\text{Fe}^{3+}] \{\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}\}\text{O}_4$, em que os íons Fe^{3+} coordenam o oxigênio em simetria tetraédrica e os íons Fe^{2+} e Fe^{3+} ocupam os sítios octaédricos. Dessa forma os íons Fe^{3+} estão localizados igualmente entre as posições tetraédricas e octaédricas, não existindo momento magnético resultante destes íons, mas sim, dos íons Fe^{2+} presentes nos interstícios octaédricos na rede cristalina do espinélio, atribuindo ao material a sua característica magnética. ^{33,34}

A Figura 2 mostra a representação da estrutura cristalina da magnetita.

As partículas magnéticas atraíram o interesse dos pesquisadores de várias áreas de estudo, não somente por sua capacidade de separação magnética, mas, principalmente, às suas propriedades físicas e químicas dependentes da morfologia, mostrando ser um material biocompatível e com notáveis propriedades magnéticas. Portanto a integração entre partículas magnéticas e o grafeno (e óxido de grafeno) origina compósitos com funcionalidades novas e/ou aprimoradas que, isoladamente, cada componente não consegue apresentar. ³⁵

Figura 2: Estrutura cristalina da magnetita.

Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, *et al.*, 2013.³⁴

2.4 Gengibre

O gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe), ilustrado na Figura 3, é uma planta perene, integrante da família *Zingiberaceae*, cujo rizoma tem importância alimentar e industrial, participando como uma das matérias-primas para a fabricação de bebidas e perfumes, além do uso na medicina popular. É caracterizado pelo seu rizoma articulado, carnoso, revestido de epiderme rugosa e de cor pardacenta,^{36, 37} além do odor característico e sabor pungente. É uma planta herbácea asiática, originária da Ilha de Java, da Índia e da China, de onde se difundiu pelas regiões tropicais da Ásia, África, América e Austrália. Usado como tempero por mais de 2000 anos, o gengibre atualmente é um recurso natural reconhecido e muito valorizado por suas propriedades medicinais.

Atualmente no Brasil o gengibre é principalmente cultivado na faixa litorânea do Espírito Santo, Santa Catarina, Paraná e no sul de São Paulo.³⁸ A produção de gengibre brasileiro é predominantemente destinada para a exportação, sendo aproximadamente 20%, apenas, comercializado no mercado interno. A exportação inclui também seus derivados como o óleo essencial e a oleoresina.^{39, 40}

Figura 3: Ilustração do *Zingiber officinale*: folhas, flor, caule e rizoma.

Fonte: Adaptado de MAGALHÃES *et al.*⁴⁰

Em 2016, o Brasil produziu uma quantidade estimada em 12 mil toneladas, sendo 8 mil produzidas no Espírito Santo. Os principais consumidores do gengibre procedente do Brasil são os Estados Unidos, Canadá⁴¹ e Europa⁴².

No cenário mundial, a Índia, China, Nigéria, Nepal e Indonésia lideraram a produção de gengibre, como mostram os dados recentes obtidos pela Food And Agriculture Organization (FAO)⁴³ na Tabela 1.

No mesmo período, os cinco maiores exportadores foram a China, Tailândia, Países Baixos, Perú e Índia; o Brasil ocupa a 9ª posição (Tabela 2). Os principais importadores da commodity são os Estados Unidos, Paquistão e Japão.⁴

Tabela 1:Produção de gengibre: os 15 maiores produtores.

País	Exportação (ton)
Índia	1070000
China, Continental	557303
Nigéria	349895
Nepal	279504
Indonésia	216587
Tailândia	167479
Camarões	91821
Bangladesh	77478
Japão	51466
Mali	38179
Filipinas	27482
China, Província de Taiwan	25823
Sri Lanka	16326
Malásia	14279
Etiópia	10771

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

Tabela 2:Exportação mundial de gengibre.

País	Exportação (ton)
China continental	454549
Tailândia	83315
Países Baixos	53796
Perú	26789
Índia	24416
Indonésia	17800
Nigéria	13270
Nepal	11618
Brasil	5639
Costa Rica	4287
Alemanha	3400
United Arab Emirates	3044
Espanha	2248
EUA	2141
Áustria	1693

Fonte: Adaptado de FAO (2017).

A composição do rizoma de gengibre consiste em 60-70% carboidratos, 3-8% fibra bruta, 9% proteínas, 8% cinzas, 3-6% gorduras e 2-3% de óleos voláteis. Os óleos essenciais do gengibre são compostos por sesquiterpenóides, sendo estes o α -zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno e α -farneseno e monoterpenóides (geraniol, canfeno, citral, etc.). A característica pungente do gengibre fresco é conferida pela presença de gingeróis presentes na oleoresina, principalmente, do 6-gingerol, enquanto que nos gengibres secos ou cozidos essa característica é relacionada aos shogaóis, provenientes dos gingeróis. O composto menos pungente, entre eles, é a zingerona, também derivada dos gingeróis.⁴⁴ Os gingeróis e os óleos essenciais estão presentes em 3% do gengibre fresco.

2.4.1 Modos de consumo e comercialização do gengibre

Os extratos de rizoma do gengibre podem ser encontrados em formulações de produtos farmacêuticos, cosméticos, de higiene e em produtos alimentícios. São encontrados xampus, cremes, sabonetes e sprays bucais aromatizantes ou com efeito anti-inflamatório, por exemplo.

Muitos produtos que contém o gengibre como um dos seus ingredientes são encontrados nos mercados em forma de chás, bebidas alcoólicas, refrigerantes, pães, bolos, biscoitos, geleias, preparo de condimentos, conservas e picles, e sopas e molhos feitos com a forma *in natura* do rizoma.⁴⁵

As bebidas a base de gengibre também são muito populares em outros países, como o “Ginger-ale”, refrigerante encontrado nos Estados Unidos, Canadá e Inglaterra, as bebidas alcoólicas “Ginger-beer”, na Inglaterra, e “Ingwerbier”, na Alemanha, e o “quentão” brasileiro muito consumido nas quermesses ou festas populares (por exemplo, a festa junina).⁴⁶

O rizoma é comercializado internacionalmente na sua forma *in natura*, em conserva, desidratado e cristalizado e seco. O Brasil exporta gengibre majoritariamente em sua forma fresca, mas além do rizoma; os produtos derivados, como o óleo essencial e a oleoresina também são internacionalmente comercializados. O óleo essencial é constituído pelos compostos voláteis, responsáveis pelo aroma, e a oleoresina contém componentes voláteis e os não voláteis, responsáveis pelo sabor pungente.⁴⁰

2.4.2 Compostos fenólicos e o Gingerol

São descritos mais de 115 componentes provenientes do gengibre fresco e seco, sendo o 6-gingerol, 6-shogaol e a zingerona os principais. Os benefícios para a saúde aos quais são relacionados assim como seu sabor pungente, são devidos à presença desses compostos fenólicos.³⁶ Os compostos fenólicos são substâncias orgânicas aromáticas com a presença de 1 ou mais grupos substituintes do tipo hidroxila. Essas substâncias podem ser encontradas naturalmente em espécies do reino vegetal, majoritariamente em plantas superiores, resultante do metabolismo secundário, e uma pequena quantidade em animais e raramente em divisões como bactéria, *algae* e *fungi*.⁴⁷ Nas divisões *algae* e *fungi* os compostos fenólicos são provenientes da relação simbiótica em que vivem com os líquens, não sendo comumente observada rotas biossintéticas como as que ocorrem nas plantas.⁴⁷

As plantas apresentam metabolismo primário e secundário. Os produtos provenientes do metabolismo primário (lipídios, carboidratos, proteínas e ácidos nucleicos) são normalmente produzidos e consumidos para a sobrevivência do vegetal e participam de processos como a respiração e fotossíntese. As substâncias produzidas pelo metabolismo secundário são resultantes de uma série de rotas biossintéticas, formando compostos diversos e estruturalmente complexos que desempenham papel importante no crescimento, desenvolvimento e reprodução do vegetal.⁴⁸ Os compostos fenólicos, especificamente, são formados por meio de dois tipos de rota biossintéticas: a do ácido shiquímico, onde são formados, principalmente, fenilpropanoides, e a do ácido acético, na qual os principais produtos formados são os fenóis simples.⁴⁹

A produção dos compostos fenólicos também pode ser estimulada em condições de estresse, atuando como agentes de proteção contra radiações UV, microorganismos e herbívoros, além de contribuírem para a pigmentação da planta e atuarem como atraentes para polinizadores, entre outros.⁵⁰

Há muito interesse nesses compostos fenólicos, devido à sua atividade antioxidante, pois são associadas à potencialização dos efeitos promotores da saúde humana, auxiliando na prevenção de diversas doenças. Muitos compostos fenólicos encontrados na alimentação podem ser utilizados com fins terapêuticos devido às suas propriedades farmacológicas.⁵¹ Na Tabela 3 são apresentadas as principais classes de compostos fenólicos formados no metabolismo de vegetais.

Tabela 3: As principais classes de compostos fenólicos formados no metabolismo de vegetais.

Classe	Esqueleto básico	Estrutura básica
Fenólicos simples	C ₆
Benzoquinonas	C ₆
Ácidos hidroxibenzoícos	C ₆ – C ₁
Acetofenona	C ₆ – C ₂
Ácidos fenilacéticos	C ₆ – C ₂
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C ₆ – C ₃
Fenilpropenes	C ₆ – C ₃
Cumarinas, isocumarinas	C ₆ – C ₃
Cromonas	C ₆ – C ₃
Nafitoquinonas	C ₆ – C ₄
Xantonas	C ₆ – C ₁ – C ₆
Estilbenos	C ₆ – C ₂ – C ₆
Antraquinonas	C ₆ – C ₂ – C ₆
Flavonóides, isoflavonóides	C ₆ – C ₃ – C ₆
Lignanas, neolignanas	(C ₆ – C ₃) ₂
Ligninas	(C ₆ – C ₃) _n

Fonte: Adaptada de REIS GIADA, M. L. 50

Os compostos fenólicos encontrados no gengibre, como os gingeróis e os shogaóis, apresentam comprimentos de cadeia variados, com o número de carbonos entre 6 e 10 contados a partir, e inclusive, do grupo álcool.³⁶ A Figura 4 ilustra as fórmulas estruturais dos gingeróis.

O 6-gingerol é o composto bioativo mais abundante encontrado no gengibre e apresenta um número significativo de atividades farmacológicas e efeitos fisiológicos, tais como, antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, anti-pirética, antieméticos, antitussivo, cardiotônico, anticancerígeno, antiplaquetário, citotóxico, antitumoral e anti-hepatotóxico.^{52, 53}

Figura 4: Rizoma do gengibre (a) e fórmulas estruturais dos seus principais compostos bioativos, (b) 6-gingerol, (c) 8-gingerol e (d) 10-gingerol.

(a) Rizoma do gengibre (*Zingiber officinale*)

(b) 6-gingerol

(c) 8-gingerol

(d) 10-gingerol

Fonte: Autoria própria

Devido a todo esse potencial encontrado no gengibre, tornou-se relevante o desenvolvimento de metodologias analíticas para identificar, quantificar e padronizar os extratos bioativos presentes neste rizoma.

Na literatura encontram-se alguns trabalhos focados no desenvolvimento de métodos para a determinação de compostos fenólicos, como gingeróis em amostras de gengibre. No trabalho de Wang et al.⁵⁴, foi realizada uma separação preparativa de

gingeróis através de cromatografia de contra-corrente de alta velocidade por eluição escalonada. A partir de uma massa inicial de 300 g de gengibre, obtiveram-se 132 mg de 6-gingerol, 31 mg de 8-gingerol e 61 mg de 10-gingerol de 360 mg de amostra pré-purificada, sendo a pureza de cada composto superior a 98%, conforme determinado por HPLC. Park e Jung ¹¹ desenvolveram um método de separação, identificação e quantificação de compostos relacionados ao gingerol presentes no gengibre, empregando as técnicas cromatografia líquida e espectrometria de massas por tempo de voo (HPLC-TOF/MS). Os limites de detecção e limites de quantificação foram encontrados na faixa de 0,007-0,01 e 0,033-0,021 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os resultados experimentais, sugeriram que o método desenvolvido foi de 70-100 vezes mais sensível que um método comum em HPLC-UV e que o desvio padrão relativo (RSD) foi menor que 6,67%, indicando uma boa precisão. Ashraf et al.¹² determinaram três gingeróis (6-, 8- e 10-gingerol) em amostras do rizoma de gengibre por meio da cromatografia líquida de ultra-eficiência, acoplada à técnica de espectrometria de massas em tandem (UPLC-MS/MS). O método foi validado, obtendo-se limites de detecção (LOD) entre 0,921-1,069 ng mL^{-1} , limites de quantificação na faixa de 2,727-3,013 ng mL^{-1} , e boa linearidade e valores de R^2 entre 0,998-0,999. Foram determinados teores de 1,12-2,03 mg g^{-1} , para o composto 6-gingerol, 0,41-0,51 mg g^{-1} , para 8-gingerol, e 0,22-0,43 mg g^{-1} para 10-gingerol. You et al.⁵⁵ reportaram um método para a determinação de compostos não voláteis em gengibre em uma variedade de amostras de suplementos alimentares. A separação foi realizada por cromatografia líquida com detecção ultravioleta (HPLC-UV), obtendo um método seletivo e linear ($R^2 \geq 0,999$) na faixa de 0,25-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, com recuperação de 90-107%. Ainda se encontra pouca literatura sobre o desenvolvimento de métodos envolvendo o estudo de preparo de amostra para determinação de gingeróis. Havlíková et al.¹⁷ descreveram uma nova técnica de enriquecimento de amostras por sorção baseada em SPE. A técnica permite a extração direta e eficaz de analitos de amostras líquidas, seguida pelo acoplamento HPLC-UV. Na análise dos gingeróis, a recuperação do método foi na faixa de 95,26 a 104,25% para três concentrações diferentes. O método desenvolvido por Cheng et al.⁵⁶ foi realizado por meio de uma técnica de extração em fase sólida dispersiva, acoplada ao sistema de cromatografia líquida de ultra-eficiência e a espectrometria de massas sequencial (UPLC-MS/MS) para a análise de uma erva medicinal. Esse método alcançou baixos limites de

detecção de 0,40 ng para os gingeróis. Para todos os gingeróis (6-, 8- e 10-gingerol) e outros analitos presentes, a recuperação do método foi obtida na faixa de 80,9-103%. Em um trabalho de Ji et al.⁵⁷, foi desenvolvido um método com a utilização de polímeros molecularmente impressos (MIPs), como sorventes seletivos, e análises em HPLC-UV, para a preparação de gingeróis de alta pureza extraídos do gengibre. Por esse método, foi possível obter uma recuperação de 80% e pureza de 99,1%.

2.5 Análise de compostos bioativos em matrizes vegetais

2.5.1 Espectrometria de Massas em Tandem ou MS/MS com ionização por *Electrospray*

A espectrometria de massas (MS - do inglês, *mass spectrometry*) é uma técnica analítica para a detecção e identificação de compostos orgânicos ou inorgânicos de interesse, sendo utilizada como uma ferramenta em análises químicas, bioquímicas, farmacêuticas, entre outros campos da ciência. O princípio básico de funcionamento dessa técnica é a geração de íons de determinada substância, em fase gasosa que, em seguida, são separados no espectrometro de massas conforme a sua razão massa-carga (m/z), podendo ser detectados qualitativamente e quantitativamente de acordo com a sua razão e abundância.⁵⁸

Um espectrômetro de massas é usualmente constituído por uma fonte de íons, um analisador de massas e o detector que, em geral, trabalham sob alto vácuo. O espectro de massas obtido pela análise é representado por meio de uma relação bidimensional entre a intensidade do sinal e a razão massa-carga. O sinal, comumente chamado de pico, fornece a informação de intensidade ou abundância de um íon gerado após a amostra passar pela fonte de íons. Quando esse tipo de sistema é acoplado a um cromatógrafo, é possível produzir cromatogramas com um número significativo de espectros de massa adquiridos, sendo que cada espécie eluída da amostra analisada e detectada possui uma informação espectral particular, podendo ser identificada por seu espectro de massas. Os cromatogramas obtidos dessa associação relacionam a abundância dos íons aos seus tempos de retenção. Salvo exceções, o analisador de massas de um espectrometro de massas somente é

designado para espécies carregadas provenientes da ionização de átomos ou moléculas, entre outros.⁵⁸

A espectrometria de massas em tandem ou MS/MS é um sistema que emprega dois analisadores de massas de modo sequencial, separados por uma câmara de colisão. No primeiro analisador ocorre a separação dos íons por carga, sendo que os que foram selecionados passam para a câmara de colisão onde serão fragmentados. Ao final, os fragmentos passam no segundo analisador onde são filtrados ou separados de acordo com a sua razão m/z .⁵⁸

A espectrometria de massas com ionização por electrospray foi introduzida por Yamashita e Fenn em 1984.⁵⁹ Na ionização por electrospray, um spray da solução contendo o analito é bombeado para um tubo capilar à uma vazão muito pequena, de alguns microlitros por minuto, sob um forte campo eletrostático gerado pela aplicação de potencial entre o capilar e um contra-eletrodo. Tal campo elétrico promove uma acúmulo de carga na superfície do líquido localizado na ponta do capilar. À medida que o solvente evapora na presença dos gases nebulizante e secante, a densidade de cargas presentes na gota aumenta. Quando a densidade supera a tensão superficial do líquido, a gota se rompe formando gotículas cada vez menores, até que sobrem apenas os íons livres (formação dos íons na fase gasosa).^{59,60}

A ESI é uma técnica branda utilizada em análises de proteínas, biopolímeros e pequenas moléculas polares.⁶⁰

2.6 Validação

Para garantir que um novo método analítico produza resultados confiáveis ele deve passar por uma avaliação conhecida como validação. O objetivo da validação é demonstrar que o método é adequado para a análise do que foi proposto e que garante a conformidade com exigências legais. É feito por meio de procedimentos e estudos em laboratório, avaliando características analíticas que irão gerar evidências documentadas do desempenho do método. Há muitos parâmetros que podem ser avaliados na validação de um método analítico. Neste trabalho as figuras de mérito avaliadas foram: seletividade, linearidade, precisão, exatidão, limite de quantificação, limite de detecção e recuperação. As definições de cada parâmetro serão feitas a seguir, com base nas regulamentações da MAPA⁶¹, ICH⁶² e INMETRO⁶³.

2.6.1 Seletividade

A seletividade de um método é a capacidade para determinar os analitos de interesse em amostras complexas, na presença de possíveis interferentes como impurezas, metabólitos, e/ou produtos de degradação.

Uma das formas de avaliação da seletividade é fazer a comparação entre a análise dos padrões analíticos e de amostras contendo os mesmos. Se nenhum composto for detectado no mesmo tempo de retenção do(s) composto(s) de interesse (não houver coeluição), significa que o método desenvolvido e analisado pelo sistema de cromatografia líquida acoplado a detecção em MS/MS é seletivo.

2.6.2 Limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ)

O limite de detecção de um método é definido como a menor concentração do analito que pode ser detectada e, não obrigatoriamente, quantificada. A relação sinal-ruído é um método utilizado para o cálculo do limite de detecção e só pode ser aplicado em procedimentos analíticos em que o ruído aparece na linha de base. Para tal, faz-se uma comparação entre o valor do sinal-ruído das amostras em baixas concentrações conhecidas, sendo a concentração limite de detecção responsável por gerar um sinal três vezes maior que o ruído.

O limite de quantificação é a menor concentração que se pode quantificar. Seguindo um raciocínio semelhante para o cálculo do LOD, o LOQ é obtido pela relação sinal-ruído, no qual o sinal deve ser dez vezes maior que o ruído presente na linha de base.

2.6.3 Linearidade

A linearidade é a capacidade que o método tem em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma determinada faixa de trabalho. Para avaliar a linearidade, são preparadas diferentes amostras com concentrações ou massas conhecidas do analito, sendo 5 ou 6 pontos de uma curva. A relação entre o sinal e concentração ou massa desses pontos gera uma equação de reta (Equação 1) denominada curva analítica. Por meio do tratamento matemático e dados experimentais para a construção da curva analítica é possível calcular os coeficientes a e b da equação de reta, utilizando a regressão linear, e o coeficiente de

correlação, R . Este parâmetro permite avaliar a dispersão dos dados obtidos experimentalmente, quanto mais próximo a o valor de 1, menor será a dispersão e incerteza de regressão.

$$y = a + bx$$

Equação 1

Sendo y o valor do sinal obtido para cada valor de concentração de solução padrão, x , e b correspondendo a sensibilidade do método, e a o coeficiente linear da reta (média das medidas do branco ou linha de base).

2.6.4 Precisão

Representa a dispersão dos resultados entre ensaios independentes, ou seja, os erros e variações que o método pode apresentar para uma mesma amostra. É determinada em três níveis de concentração, por meio da repetitividade, precisão intermediária e reprodutibilidade. A precisão é expressa em termos de desvio padrão (S) e desvio padrão relativo (DPR), os quais podem ser calculados pelas Equações 2 e 3.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n-1}}$$

Equação 2

em que: Xi é o valor de cada medição, $\bar{X}$ é a média das medições e n é o número de medições.

$$RSD = \frac{(S)}{\bar{X}} \times 100$$

Equação 3

sendo: S o desvio padrão entre as amostras e a média das replicatas.

2.6.5 Exatidão

É o grau de concordância entre os valores obtidos experimentalmente e um valor de referência. A precisão e a exatidão são medidas por meio de experimentos variando, em no mínimo, 3 níveis de concentrações (baixo, médio e alto) dentro da faixa de trabalho da curva analítica.

2.6.6 Fator de enriquecimento

O fator de enriquecimento é calculado por meio da relação entre os valores das concentrações dos analitos de interesse pré-concentradas pelo sistema de DSPME e as injetadas sem a extração.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Desenvolver um método analítico no sistema UPLC-ESI-MS/MS utilizando fase extratora baseada em óxido de grafeno e magnetita, e aplicar na determinação de gingeróis em amostras alimentares.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar materiais:
 - Sintetizar o óxido de grafeno e grafeno, e ancorar cada um deles em sílica;
 - Sintetizar materiais com óxido de grafeno e magnetita.
- Avaliar os materiais quanto à capacidade de retenção em relação aos analitos de interesse;
- Caracterizar o material com a melhor retentividade;
- Desenvolver a técnica miniaturizada de preparo de amostra, DSPME;
- Avaliar as melhores condições e parâmetros do preparo de amostra;
- Desenvolver um método cromatográfico para a análise dos compostos 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol;
- Determinar as condições ótimas de detecção de gingeróis mediante MS/MS;
- Validar ou avaliar algumas figuras de mérito do método desenvolvido para a determinação dos analitos de interesse;
- Aplicar o método à análise de amostras reais contendo gingeróis.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e padrões

Para a síntese dos materiais foram utilizados os seguintes reagentes: grafite em pó (Sigma-Aldrich, Suíça), sílica gel esférica amino-funcionalizada (SUPELCO, Japão), nitrato de sódio, ácido sulfúrico (Tedia, EUA), ácido clorídrico e hidróxido de amônio (QUEMIS, Brasil), peróxido de hidrogênio, PEG400 (Synth, Brasil), hidrazina hidratada (Merck, França), EDC (Cloridrato de N- 3-dimetilaminopropil – N' etil carbodiimida) (Sigma Aldrich, Japão), NHS (N-hidroxiisoccinimida) da Sigma-Aldrich, sulfato de amônio heptahidratado e cloreto férrico hexahidratado, 3-aminopropil trimetoxisilano e sulfato de amônio e ferro (II) hexahidratado (Sigma-Aldrich, EUA), tetraetóxisilano e citrato trissódico (J.T. Baker). O isopor foi obtido em comércio local a partir de produtos para embalagem e o *D*-limoneno foi adquirido da empresa Sucorrico Citrus Industrial e Agrícola Ltda.

Para o desenvolvimento do método cromatográfico foram utilizados os solventes acetonitrila, metanol, etanol grau HPLC (Tedia, EUA) e água deionizada em sistema Milli-Q (Millipore, EUA). Os padrões de 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol foram adquiridos da Sigma-Aldrich (EUA). Para o teste da capacidade de retenção utilizou-se a fase comercial octadecilsilano (C18) da Alltech (EUA).

As soluções de padrão dos gingeróis foram preparadas a partir de soluções estoque na concentração de 50 e 1000 mg L⁻¹.

4.2 Materiais

- Tubos para centrifugação tipo Falcon de 50 mL;
- cápsula de porcelana;
- espátulas;
- pistilo e almofariz;
- condensador;
- balões de fundo redondo de 50, 100 e 500 mL;
- balão de fundo redondo de 3 bocas.
- balão volumétrico de 100 e 500 mL;
- béquer de 25 mL;

- seringa de 1 mL;
- membrana de celulose regenerada 0,22 µm.

4.3 Equipamentos

- HPLC – UV/vis, Proeminence LC 20A (Shimadzu, Japão);
- UPLC, Aquity Ultra Performance LC – Waters (Massachusetts, EUA) com detector de massas sequencial, modelo XEVO TQ MS – Waters (Massachusetts, EUA);
- Banho Ultra-sônico Ultra Clear (Unique, Brasil);
- Centrífuga Rotina 380 (Hettich, Alemanha);
- Liofilizador (Liotop L101);
- Balança analítica AG285 (Mettler, Estados Unidos);
- agitador vórtex - Modelo MS 3 basic (IKA, Alemanha);
- agitador magnético múltiplo de 15 posições, SP – 10015/5 (SPLABOR, Brasil).

4.4 Amostras reais

4.4.1 Amostra obtida a partir do gengibre fresco

Rizomas frescos de gengibre foram cortados em fatias finas e colocados para secar na estufa a 55°C. Depois de secos, triturou-se o gengibre seco até obter um pó. Para a extração, 10 g do gengibre em pó foram adicionados a 100 mL de etanol absoluto em um sistema sob refluxo a temperatura de 80°C por 4 horas. O extrato de gengibre foi filtrado em filtro Whatman No.1 e armazenado a 4°C.⁵²

4.4.2 Chá X / Chá Y

Os chás, comprados em comércio local, foram retirados do saquinho (1,5 g) e triturados 4 vezes por 3 minutos, separadamente, até virar um pó fino.

Em um tubo Falcon de 50 mL, adicionou-se 2 mg do chá em pó aos quais foi acrescentada água até o volume máximo do Falcon. A solução foi deixada sob agitação por 5 min a 30000 rpm e centrifugação por 3 minutos a 5000 rpm, para

extração dos analitos presentes no chá e sedimentação do pó, respectivamente. Todo o volume do Falcon foi vertido em um balão volumétrico de 500 mL para a diluição final.

4.4.3 Suplemento Termogênico

O conteúdo da cápsula do suplemento termogênico foi triturado a fim de obter-se uma amostra mais homogênea para extração, de forma semelhante às amostras dos chás. Em seguida, preparou-se uma solução de 50 mL em um tubo Falcon com 2 mg do pó obtido, e deixou-se sob agitação por 5 minutos a 30000 rpm e centrifugação a 5000 rpm por 3 minutos.

4.4.4 Bala de gengibre

O preparo da amostra de bala foi feito em duas etapas sequenciais. Primeiramente, a bala foi triturada até virar pó. Em seguida, 25 mg deste material foram pesados e diluídos em água para 100 mL, levando para agitação e centrifugação nas mesmas condições descritas para as amostras anteriores.

4.4.5 Água Tônica

Para a extração, 500 μ L da bebida gaseificada foram diluídos em água deionizada para o preparo de uma solução de 500 mL.

4.4.6 Extrato de gengibre fresco

A amostra foi preparada com a diluição de 50 μ L do extrato etanólico, preparo descrito no item 4.4.1, para obter uma solução final de 500 mL.

4.5 Preparo e síntese de materiais sorventes

4.5.1 Preparação de óxido de grafeno (GO)

O óxido de grafeno foi preparado de acordo com o método originalmente descrito por Hummers.^{32, 64} Em um balão de fundo redondo de 500 mL, mergulhado em um banho de gelo, foram adicionados 50 mL de H_2SO_4 (96%), com posterior agitação. Em seguida, foram adicionados 1,0 g de grafite em pó e 1,0 g de NaNO_3 e deixou-se o sistema sob forte agitação por 2 horas para evitar a aglomeração dos reagentes. Após esse tempo, adicionou-se lentamente 6,0 g de KMnO_4 , mantendo a agitação por mais 1 hora e o banho de gelo para que a temperatura não exceda a 10°C . O balão foi retirado do banho de gelo e colocado sob agitação a temperatura de 40°C durante toda a noite. Percebeu-se uma mudança gradual de cor da mistura que se torna amarronzado claro. Retornou-se o balão ao banho de gelo e, com forte agitação, foram adicionados lentamente 40 mL de água destilada. Então, 160 mL de água foram adicionados para manter a temperatura abaixo de 80°C . A seguir, adicionaram-se gota a gota 10 mL de H_2O_2 com o sistema sob agitação; neste momento observou-se que a mistura muda novamente de cor, tornando-se amarela. Deixou-se a mistura para descansar por um dia para obter-se o precipitado amarronzado de GO. Ao final, o precipitado foi lavado com 1000 mL de uma solução aquosa de HCl 5% (v/v), no intuito de remover impurezas e íons sulfato, e posteriormente com água até atingir pH 7. O produto obtido foi redispersado em água no banho de ultrassom por 30 minutos e seco a temperatura ambiente. O material seco foi triturado, redispersado novamente em água e liofilizado.

4.5.2 Preparação do óxido de grafeno reduzido (redGO)

A redução do GO foi realizada adicionando-se hidrazina hidratada a uma suspensão aquosa de GO (3mg mL^{-1}), previamente submetida a ultrassom. A mistura foi deixada em agitação a 80°C por 12 horas, até ser observado o aparecimento de um precipitado preto que acompanha a diminuição do teor de grupos oxigênio do óxido de grafeno e leva a formação de redGO.^{65,66}

4.5.3 Síntese do compósito GO@SiO₂

Na síntese do compósito GO@SiO₂, o GO foi covalentemente imobilizado na sílica pelo acoplamento entre os grupos amino de sílica amino-funcionalizada e os grupos carboxila de GO. A síntese em fase aquosa faz uso de uma solução de EDC/NHS como agente de acoplamento, pois o GO apresenta uma boa solubilidade em água.

O procedimento foi iniciado com a dispersão, em banho de ultrassom, de 20 mg de GO em 40 mL de água. Em seguida, adicionou-se à dispersão de GO 0,4 g de uma solução aquosa de 10 mmol L⁻¹ EDC/5 mmol L⁻¹ NHS recém-preparada, e deixou-se sob agitação por 0,5 hora. Então, foram adicionados 0,5 g de aminopropil-sílica à mistura em agitação. Após 4 horas de reação em agitação, o sólido foi isolado com o auxílio da centrifugação a 1500 rpm por 10 minutos, lavado muitas vezes com água e metanol e levado para liofilização por 24 horas.⁶⁷

4.5.4 Síntese do compósito red-GO@SiO₂

Para a obtenção do compósito red-GO@SiO₂ fez-se a redução de GO@SiO₂ por meio da reação com hidrazina.

Em 10 mL de água, foram adicionados 0,2 g de GO@SiO₂ e 0,1 mL de hidrazina, e essa mistura foi mantida a 95°C por 2 horas. Após esse tempo de reação, o sólido resultante foi coletado por meio da centrifugação e lavado com água e metanol. O produto seco foi obtido por liofilização.⁶⁷

4.5.5 Síntese de nanopartículas de Fe₃O₄

A síntese das nanopartículas de Fe₃O₄ foi realizada pelo método convencional de co-precipitação, semelhante ao descrito por Zhu e Chen.⁶⁸

Em um balão de fundo redondo, adicionaram-se 3,24 g de cloreto férrico hexahidratado (FeCl₃.6H₂O) dissolvidos em 75 mL de água deionizada, previamente purgada com gás nitrogênio. Em seguida, acrescentaram-se 30 mL de uma solução aquosa de polietilenoglicol (10% *m/m*) e 3,92 g de (NH₄)₂Fe(SO₄)₂, sob agitação. Então, foram adicionados rapidamente 10 mL do hidróxido de amônio (26,5 %, *m/m*)

sob forte agitação. Após agitação e aquecimento a 80°C por uma hora, a solução foi deixada para resfriar a temperatura ambiente. O Fe₃O₄ precipitado foi coletado com o uso de um ímã, lavado com água 5 vezes e seco a 60°C por 12 horas em uma estufa a vácuo.

4.5.6 Preparo do compósito Fe₃O₄@SiO₂

O preparo de Fe₃O₄@SiO₂ foi realizado de acordo com o proposto por Chen.⁶⁸ Em um balão de fundo redondo de 250 mL, foi dissolvido 1,0 g de Fe₃O₄ em 150 mL de etanol e 30 mL de água deionizada. Após 15 minutos no ultrassom, foram adicionados 2 mL de hidróxido de amônio e 4 mL de TEOS. A mistura resultante foi levada para um banho a 60°C, sob agitação por 6 horas.

4.5.7 Preparo do compósito Fe₃O₄@SiO₂@GO

Para o preparo do compósito Fe₃O₄@SiO₂@GO, uma dispersão de 0,5g de GO em 300 mL de água foi preparada em um balão de fundo redondo de 500 mL e submetida a ultrassom por 2 horas para o processo de esfoliação do material. Em seguida, 100 mg de cloridrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil) carbodiimida (EDC) e 80 mg de N-hidroxisuccinimida (NHS) foram adicionados na dispersão de GO e deixou-se em agitação por 30 minutos e ultrassom por mais 30 minutos para a homogeneização dessa mistura. Então, adicionaram-se 0,5 g de Fe₃O₄@SiO₂ e, novamente, a mistura foi submetida ao ultrassom por 30 minutos. Assim, a reação procedeu a 80°C sob agitação durante 1 hora. O material obtido foi separado com o auxílio de um ímã e lavado várias vezes com água deionizada.⁶⁹

4.5.8 Preparo do compósito GO-Fe₃O₄

O compósito foi sintetizado com uma suspensão de GO em uma reação de coprecipitação. Foi preparada uma suspensão com 0,9 gramas de GO em 600 mL, e submetida a ultrassom por 1 hora. A suspensão resultante foi transferida para um balão de fundo redondo de 3 bocas, colocada sob agitação e purgada com gás nitrogênio. Soluções aquosas de FeSO₄.7H₂O (4,01 mmol em 15 mL de água) e de FeCl₃.6H₂O (3,74 mmol em 15 mL de água) foram adicionadas à suspensão de GO,

e a mistura foi levada para aquecimento a 80°C em banho de óleo. Em seguida, adicionou-se uma solução de hidróxido de amônio (25%) e manteve-se sob agitação a 80°C por 30 minutos. Ao final, adicionou-se 1,0 de citrato trissódico, enquanto aumentava-se a temperatura para 95°C, o que resultou em uma suspensão de coloração preta. O precipitado foi separado magneticamente, lavado várias vezes com água deionizada e levado para secar a 60°C.⁷⁰ A Figura 5 mostra o esquema de síntese do composto GO-Fe₃O₄.

Figura 5: Representação do processo de preparo do composto GO-Fe₃O₄.

Fonte: Adaptado de GADLY, T. et al., 2017.⁷⁰

4.5.9 Preparo do composto Fe₃O₄@GO core-shell

O preparo de Fe₃O₄@GO core-shell foi realizado por meio de duas etapas, a amino-funcionalização das nanopartículas de Fe₃O₄ e o encapsulamento com o óxido de grafeno. Na primeira etapa, 0,4 g de Fe₃O₄ foram dispersos em 200 mL de etanol por sonicação durante 30 minutos. Após isso, adicionaram-se 2,0 mL de 3-aminopropil trimetoxissilano (APTMS) e deixou-se a mistura em refluxo por 4 horas a 80°C. O precipitado preto obtido correspondente ao APTMS-Fe₃O₄, foi lavado várias vezes com etanol e seco a 60°C. Para a segunda etapa, uma dispersão de APTMS- Fe₃O₄, previamente submetida a ultrassom, foi adicionada a uma suspensão de GO (0,2 mg mL⁻¹), e essa mistura foi deixada sob agitação por 2 horas a temperatura ambiente. A

proporção entre as massas de GO e APTMS-Fe₃O₄ foi de 0,02:1. O balão contendo a mistura foi colocado para repousar em cima de um imã por 30 minutos para a separação entre material magnético sintetizado e a solução.^{71,72}

4.5.10 Preparo do óxido de grafeno com recobrimento polimérico

Para o recobrimento do GO, optou-se por usar o poliestireno expandido, internacionalmente conhecido como EPS, que tem como marca registrada o nome Isopor®. Primeiramente, foram solubilizados 12,5 g de isopor em solvente D-Limoneno para obter 60 mL de uma solução. A solubilização foi feita em um béquer de 100 mL, sob agitação magnética em temperatura ambiente, e aquecimento a 50°C por 3 minutos para garantir a sua homogeneidade. A solução obtida foi utilizada como solução estoque de polímero.

Para o preparo do material, foram preparados aproximadamente 5 mL de solução de polímero na concentração de 0,01 mg mL⁻¹, pipetando-se uma alíquota de 25 µL da solução estoque e completando o volume com *D*-limoneno. Em um vidro de relógio, misturou-se 1 mL dessa solução em uma determinada quantidade de GO.

4.6 Avaliação da capacidade extratora dos materiais

O teste foi realizado no sistema HPLC – UV/Vis utilizando uma coluna analítica Kinetex (Phenomenex, EUA) EVO C18 (2,1 mm x 150 mm, 5 µm). A fase móvel empregada foi água/acetonitrila (60:40, v/v) com vazão de 0,5 mL min⁻¹ e modo de eluição isocrático.

Para o teste pesou-se 5,0 mg de cada material em tubos de centrifugação de 2 mL, e em cada tubo foi adicionado 1,0 mL de uma solução fortificada com os padrões 6 – gingerol, 8 – gingerol e 10 – gingerol na concentração de 1 ppm. Os tubos de centrifugação foram, então, colocados em uma mesa agitadora (Marca IKA® - Modelo VXR Basic Vibrax, Alemanha) por 1 hora a 1000 rpm. Em seguida, foram levados para centrifugar por 10 minutos a 10000 rpm, fazendo a transferência do sobrenadante para outro tubo de centrífuga para separar o precipitado da solução. Essa etapa de separação foi repetida até que não se notasse a presença de materiais precipitados. Ao final, o sobrenadante foi filtrado utilizando uma membrana de celulose regenerada

0,22 μm para a injeção no HPLC – UV/Vis. O procedimento descrito acima foi feito em duplicata.

4.7 Caracterização dos materiais

A caracterização dos materiais desenvolvidos durante o estudo, foram realizadas na Central de Análises Químicas Instrumentais – CAQI do Instituto de Química de São Carlos – USP, usando os equipamentos e condições a seguir.

4.7.1 Espectroscopia vibracional na região do Infravermelho com Transformada de Fourier (FT-IR)

Os materiais foram analisados em espectrofotômetro Shimadzu IRAffinity-1 (Kyoto, Japão), na faixa de 4000 a 400 cm^{-1} e 32 *scans*. Para o preparo das pastilhas, foi utilizado como material de referência o brometo de potássio (KBr).

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

As imagens de microscopia eletrônica de varredura foram obtidas em um microscópio ZEISS LEO - Modelo 440 com detector OXFORD (modelo 7060). As amostras foram metalizadas com ouro usando o *Coating System* MED 020 (BAL-TEC).

4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão

A análise do material contendo magnetita foi realizada em Microscópio Eletrônico de Transmissão JEOL JEM2100. As partículas magnéticas foram dispersas em isopropanol, obtendo uma suspensão de coloração cinza claro, e gotejados sobre uma grade de cobre com filtro de carbono, deixando-se secar em dessecador por dois dias.

4.8 Procedimentos de preparo de amostras

4.8.1 *in-tube* SPME

As colunas de extração confeccionadas em laboratório, foram feitas utilizando-se tubos capilares de aço inoxidável (500 μm i.d. x 50 mm) para o empacotamento das fases em por via seca. Nas extremidades das colunas, foram usadas anilhas e uniões; algumas colunas receberam *frits* de 10 μm de porosidade, outras de 2 μm . Uma bomba de alta pressão (Shimadzu Prominence LC-20A, Japão) foi empregada para garantir o empacotamento do material no tubo, submetendo a coluna de extração a um fluxo de metanol a 0,2 mL min⁻¹. Em seguida, trocou-se o solvente anterior por água e, utilizando a mesma vazão para condicionar a fase com o mesmo solvente de carregamento utilizado no sistema *in-tube* SPME.

4.8.2 Sistema microextração em fase sólida dispersiva (DSPME)

O sistema de microextração em fase sólida dispersiva foi desenvolvido utilizando-se frascos de 10 mL com tampa metálica, barras de agitação magnética de 1 cm e um agitador magnético.

Para as extrações foram adicionados 8 mL de amostra em cada frasco e a dispersão de 10 mg da fase extratora foi promovida por agitação da barra magnética. Após a extração e pré-concentração dos analitos da amostra, a solução sobrenadante foi retirada e, em seguida, foram adicionados 500 μL de solvente no frasco para dessorção dos analitos. O mesmo volume de 500 μL adicionado para a dessorção, foi retirado do frasco, filtrado utilizando uma membrana de celulose regenerada e uma seringa de 1mL e, então, injetado no sistema UPLC-MS/MS.

Após a utilização do sistema, as fases extratoras são lavadas preenchendo-se os frascos com 8 mL, cada, do solvente acetonitrila, fechados com a tampa metálica e colocados no agitador magnético durante 10 minutos. Cessada a agitação, o material contido em cada frasco foi separado do solvente e colocado para secar em estufa à 60-70°C.

4.9 Otimização do método DSPME

A otimização do método foi realizada selecionando os 5 fatores que mais influenciam o processo de extração; a massa do adsorvente, tempo de extração, tempo de dessorção, solvente de dessorção e velocidade de agitação.

Para a avaliação dos parâmetros foi utilizado, em cada extração, 8 mL de uma solução em água contendo os padrões de 6-, 8- e 10-gingerol na concentração de 0,1 mg L⁻¹. Os experimentos foram realizados em triplicatas em modo univariado.

Nesta etapa de otimização, a avaliação dos parâmetros foi realizada em sistema HPLC – UV/Vis, utilizando uma coluna Nucleoshell RP 18 (4 mm x 100 mm, 2,7 µm), no modo de eluição isocrático, fase móvel água/acetonitrila (40:60, v/v) com vazão de 0,3 mL min⁻¹, injeção de 20 µL da amostra e detecção a 282 nm.

4.10 Instrumentação e condições para o desenvolvimento e aplicação do método de extração mediante cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem.

Para a validação e aplicação do método foi empregado o sistema UPLC – MS/MS (Acquity Ultra Performance LC – Waters e Xevo TQ MS Detector – Waters com ionização a pressão atmosférica por *electrospray*) com a aquisição e tratamento dos dados no software Mass Lynx V. 4.1.

Os parâmetros utilizados na detecção dos gingeróis pela espectrometria de massas em tandem (MS/MS) foram obtidos com a injeção de amostras na concentração de 0,100 mg L⁻¹ para os três analitos e analisadas no modo de monitoramento das transições selecionadas (MRM). As transições e os parâmetros estão apresentados no item 5. O equipamento operou com voltagem capilar de 3,0 kV, temperatura de fonte, temperatura do gás de dessolvatação (N₂) a 600°C e vazão de 1000 L h⁻¹, vazão do gás de colisão (Ar) a 0,15 mL min⁻¹, e modo de ionização negativo (ESI-).

Neste sistema, as análises foram feitas usando a coluna Nucleoshell RP 18 (4 mm x 100 mm, 2,7 µm) e fase móvel água/acetonitrila (20:80, v/v). Para a eluição isocrática, a vazão da fase móvel foi mantida a 0,5 mL min⁻¹ com injeção de 3,75 µL. O tempo da corrida cromatográfica foi de 3,5 minutos.

4.11 Validação do método analítico

Para a determinação das figuras de mérito seguiu-se as diretrizes do guia Q2 (R1) da International Conference on Harmonization (ICH). O método foi avaliado quanto à seletividade, linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

Para a avaliação da seletividade do método em relação aos gingeróis, fez-se a comparação entre os cromatogramas obtidos das análises dos padrões analíticos e das amostras reais selecionadas.

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação, foram realizados experimentos injetando-se amostras com concentrações conhecidas até encontrar a concentração mais baixa em que os analitos poderiam ser detectados, com sinal três vezes maior que o ruído, e quantificados, apresentando sinal dez vezes maior que o ruído.

A determinação da linearidade foi feita pela construção de curvas analíticas, para cada analito, com a fortificação em 6 níveis diferentes de concentrações (5,0, 10, 25, 50, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$) a partir de amostras de água isentas de gingeróis. Cada nível de concentração foi feito em 3 réplicas.

A estimativa da precisão foi feita pela avaliação da precisão intra-dia (repetitividade) e da precisão inter-dia. Para isso, foram feitos experimentos em 3 níveis de concentração (5,0, 100 e 200 $\mu\text{g L}^{-1}$), e cada um realizado em triplicata.

A exatidão foi calculada comparando-se os resultados das análises experimentais com os valores de referência estabelecidos para a curva analítica.

A determinação do fator de enriquecimento foi feita por meio da relação entre os valores das concentrações dos analitos de interesse pré-concentradas pelo sistema de DSPME e as injetadas sem a extração.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização dos materiais

5.1.1 Caracterização dos materiais GO, e os ancorados em sílica.

Os primeiros materiais preparados neste estudo foram o óxido de grafeno (GO) e o óxido de grafeno reduzido (redGO). Para a obtenção do óxido de grafeno seguiu-se um método originalmente descrito por Hummers, utilizando-se NaNO_3 e KMnO_4 como agentes oxidantes do grafite. Para a redução química do óxido de grafeno foi utilizada a hidrazina hidratada. Esses procedimentos têm sido largamente empregados para o preparo desses materiais.

O óxido de grafeno obtido foi ancorado em aminopropil-sílica esférica por meio da ligação covalente entre os grupos amino da aminopropil-sílica e os grupos carboxila de GO. Nesse procedimento fez-se uso de uma solução de EDC (Cloridrato de N- 3-dimetilaminopropil – N' – etil - carbodiimida) e NHS (N-hidroxiisocinimida) como agentes acoplantes, ativando os grupos carboxila do óxido de grafeno. A presença desses grupos facilita e possibilita a ligação química com outros componentes de interesse e, portanto, o material redGO@SiO₂ foi obtido pela redução do óxido de grafeno ancorado nas partículas de aminopropil-sílica.

A espectrometria vibracional no infravermelho (FT-IR) permitiu verificar a presença de grupos funcionais, ou característicos, na estrutura dos materiais sintetizados, auxiliando na identificação do composto ou análise de sua composição química. A Figura 6 mostra os espectros vibracionais das amostras de GO, GO@SiO₂ e redGO@SiO₂.

Pela observação e análise dos dados, e com apoio da literatura, pode-se inferir que as bandas presentes nos espectros caracterizam o material de forma esperada. Com pode ser observado nos espectros vibracionais, as bandas em 800 e 1095 cm⁻¹ são relacionados a vibração de deformação angular Si-OH e à vibração de estiramento de Si-O-Si (ligações), respectivamente. A banda em 1624 cm⁻¹ é correspondente a vibração de deformação angular C=O de uma ligação peptídica formada entre o oxigênio do GO e grupos do suporte da sílica. A banda em 3392 cm⁻¹ pode ser relacionada com a vibração de deformação angular -OH.

Figura 6: Espectros vibracionais na região do infravermelho dos materiais GO, GO@SiO₂ e redGO@SiO₂

A microscopia eletrônica de varredura foi a técnica utilizada para avaliar a morfologia da superfície dos materiais (topografia da superfície, composição), a forma e para estimar o tamanho das partículas. Nas Figuras 7 e 8 são apresentadas as micrografias dos materiais GO, GO@SiO₂ e redGO@SiO₂.

As imagens de MEV mostram que a síntese dos compósitos GO@SiO₂ e redGO@SiO₂, foi bem sucedida, apesar de não ter resultado no encapsulamento completo das partículas de sílica pelas folhas de grafeno e óxido de grafeno. Observou-se também a quebra de algumas esferas de sílica após o ancoramento, provavelmente devido a agitação com a barra magnética durante a síntese que provocou, em algum momento, choques inelásticos entre as partículas.

Figura 7: Micrografia do material GO na escala de 1:2 μm .

Fonte: Autoria própria.

Figura 8: Micrografias dos compósitos: (a) GO@SiO_2 na escala de 1:20 μm , (b) GO@SiO_2 na escala de 1:3 μm , (c) redG@SiO_2 na escala de 1:10 μm e (d) redG@SiO_2 na escala de 1:3 μm .

Fonte: Autoria própria.

5.1.2 Caracterização do material magnético Fe_3O_4 e $\text{GO-Fe}_3\text{O}_4$.

A morfologia e o tamanho médio das partículas de magnetita e do compósito $\text{GO-Fe}_3\text{O}_4$ foram avaliados por análise de microscopia eletrônica de transmissão (MET).

A Figura 9 apresenta as micrografias da magnetita obtidas em ampliações diferentes. Nas Figuras 9a e 9b, pode ser observado que as partículas de magnetita foram obtidas em diferentes tamanhos e formatos. Com base nas micrografias, pode-se estimar que as partículas apresentam um tamanho médio entre 10 e 20 nm. As morfologias obtidas para a magnetita estão de acordo com os relatados e apresentados na literatura.^{73,74}

Geralmente, na síntese de nanopartículas como a magnetita utiliza-se polímeros para o recobrimento superficial com o intuito de permitir sua dispersão em água, aumentar sua estabilidade coloidal e evitar a agregação das partículas. Os polímeros são capazes de aumentar as forças de repulsão e contrabalancear as forças de atração magnética e de van der Waals que agem nas partículas.⁷⁵

Na síntese de magnetita deste trabalho, foi utilizado o polímero PEG400. Apesar do uso do polímero, as regiões mais escuras observadas nas imagens (Figuras 9a e 9b) indicam possíveis pontos de aglomeração das partículas magnéticas.

A síntese do $\text{GO-Fe}_3\text{O}_4$ resultou no compósito híbrido apresentado nas Figuras 9c e 9d, visto em duas ampliações diferentes.

As micrografias mostram que as partículas de Fe_3O_4 formam quimicamente depositadas em GO; isto provavelmente ocorreu por meio dos grupos carboxílicos ($-\text{COOH}$) existentes no mesmo. Neste material também são observadas algumas regiões mais escuras, que podem ser decorrentes tanto a aglomeração das partículas de magnetita, quanto resultantes das dobras das folhas de GO. As morfologias observadas são semelhantes às descritas na literatura.^{76,77}

Figura 9: Microscopia Eletrônica de Transmissão do material Fe_3O_4 : (a) na escala de 1:200 nm e (b) na escala de 1:100 nm; do compósito GO- Fe_3O_4 : (c) na escala de 1:1 μm e (d) na escala de 1:200 nm.

Fonte: Autoria própria.

5.2 Avaliação da capacidade de retenção dos materiais sintetizados

Todos os materiais preparados foram avaliados quanto à capacidade de retenção em relação ao analito 6-gingerol, e os resultados são apresentados na Figura 10.

Figura 10: Avaliação da capacidade retentiva dos materiais em relação ao analito 6-gingerol.

Como o esperado, as fases extratoras GO, redGO e C18 foram eficientes na extração do analito de interesse e apresentam capacidades de retenção superiores a 70%. Dentre as fases contendo magnetita, os materiais GO-Fe₃O₄ e Fe₃O₄@SiO₂@GO mostraram uma extração muito próxima de 100%. Os resultados obtidos para os materiais ancorados se devem, provavelmente, pela insuficiência do grafeno e óxido de grafeno recobrindo as esferas de aminopropil-silica.

O composto $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ não mostrou boa afinidade pelo analito, apresentando baixa capacidade de retenção e indicando que as fases GO e redGO são os maiores responsáveis pela interação com o gingerol.

5.3 Desenvolvimento de método para preparo de amostra

5.3.1 Sistema de Microextração em fase sólida dispersiva (DSPME)

A propriedade magnética do adsorvente $\text{GO-Fe}_3\text{O}_4$ permitiu que o procedimento de separação entre material e solução fosse facilitada, de forma semelhante à relatada na literatura, e por essa característica, o material foi escolhido para aplicação nos experimentos de DSPME.

Logo que a agitação se inicia, utilizando-se a velocidade adequada, o material é disperso por todo o líquido contido no frasco. Assim que a agitação é cessada, a fase extratora volta rapidamente para a superfície da barra de agitação magnética, separando-se da solução. Para garantir que possíveis partículas não visíveis aos olhos do analista não sejam retiradas juntamente com a solução sobrenadante, foi utilizado ímã de neodímio na base dos frascos no procedimento de separação.

Os procedimentos foram semelhantes após a dessorção dos analitos. Após o uso do sistema de extração, foram feitas lavagens do material com acetonitrila e colocadas imediatamente na estufa para preservar a integridade da fase, evitando a oxidação e garantindo que alguns compostos remanescentes da amostra sejam volatilizados.

Nas Figuras 11a e 11b, são apresentados o sistema DSPME desenvolvido durante a extração simultânea de 6 amostras e uma visão mais aproximada do frasco com o material disperso, respectivamente.

Figura 11: Sistema DSPME: (a) visão para 6 extrações simultâneas e (b) visão aproximada do frasco durante extração.

Fonte: Autoria própria.

5.3.2 Avaliação dos parâmetros determinantes da eficiência do processo de extração

Foram avaliadas massas de 5, 10 e 15 mg do material GO-Fe₃O₄ para a extração. Para esta primeira avaliação, os experimentos foram realizados utilizando uma velocidade de agitação de 1250 rpm e tempo de extração e dessorção de 5 minutos e a acetonitrila como solvente de dessorção.

As extrações feitas com a massa de 10 mg de GO-Fe₃O₄ mostraram uma melhor adsorção dos analitos quantitativamente e qualitativamente em comparação com os resultados obtidos para as massas de 5 e 15 mg, como mostrado na Figura 12a.

O material é constituído por óxido de grafeno preparado a partir do método de Hummers que parece apresentar um alto nível de funcionalização, majoritariamente, pela presença de grupos álcoois e epóxidos, e regiões cuja hibridização do carbono ainda permanecem com a configuração sp².⁷⁸ Segundo Fang Liu e colaboradores ⁷⁹, a adição de óxido de grafeno ao material é capaz de aumentar a área superficial e a intensidade das interações π - π entre o óxido de grafeno e os anéis aromáticos existentes no p-nitrofenol. Assim, pode ocorrer de forma semelhante nas interações entre os gingeróis e o óxido de grafeno. A presença dos grupos oxigenados na estrutura do GO, assegura a adsorção de substâncias hidrofílicas, polares, fenóis, pigmentos, entre outros, por meio das ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.⁸⁰⁻⁸³

Com as massas inferiores e superiores a 10 mg, observou-se uma extração menos homogênea, em que a adsorção de um ou dois analitos é prejudicada pelo aumento ou diminuição de massa, no caso, os compostos 8-gingerol e 10-gingerol. A diferença de adsorção pode ser explicada pela presença ou ausência de número suficiente de sítios onde ocorrem as interações com o analito.

O tempo e a velocidade de agitação são parâmetros simples que influenciam significativamente na eficiência dos processos de extração e dessorção dos analitos da amostra, como pode ser observado nas Figuras 12b, 12c e 12d. Foram testados tempos entre 3 a 10 minutos e velocidades de 1100 a 1500 rpm. Como pode ser observado na Figura 12b, no intervalo de 3 a 5 minutos, houve um aumento na eficiência de extração e, após 5 minutos, inicia-se um processo observado de dessorção reversível, levando à uma redução significativa da adsorção dos analitos

em 10 minutos de extração. O tempo de dessorção foi avaliado no intervalo de 3-7 minutos e, como no tempo de extração, a maior eficiência do processo foi alcançada em 5 minutos (Figura 12c). Quando o adsorvente entra em contato com o adsorvente líquido, a adsorção ocorre até atingir o equilíbrio, com os analitos fluindo do meio aquoso para a superfície do material e a concentração na fase aquosa torna-se constante. Portanto, a velocidade de agitação do sistema é um fator muito importante, influenciando no tempo de contato entre as partes e a quantidade de analito adsorvido.⁸⁴ Foram avaliadas três velocidades (1100, 1250 e 1500 rpm), sendo que em 1250 rpm a eficiência de extração foi acentuadamente maior entre elas, como pode ser observado na Figura 12d.

A velocidade ótima de 1250 e o solvente adequado (Figura 12e), demonstram serem fatores significantes para uma dessorção eficiente e rápida dos compostos fenólicos. A dessorção pode ser facilitada pelo próprio processo e força de agitação, somando-se a contribuição da força de eluição de um solvente de polaridade média, superando, assim, as interações adsorvente-adsorbato.

Figura 12: Resultados da otimização dos parâmetros : (a) massa de adsorvente, GO-Fe₃O₄.; (b) tempo de extração; (c) tempo de dessorção; (d) velocidade de agitação e (e) solvente para dessorção.

Na Tabela 4, são apresentados os valores ótimos dos parâmetros avaliados para a microextração dos gingeróis.

Tabela 4: Valores selecionados obtidos pela otimização univariada do método de extração.

Parâmetros	Valores
Massa / mg	10
Extração / min	5
Dessorção / min	5
Solvente	Acetonitrila
Velocidade de agitação / rpm	1250

5.3.3 Otimização de parâmetros para o método LC-MS

Após a avaliação dos parâmetros envolvidos no processo de extração, realizou-se a otimização do método LC-MS, utilizando as condições descritas no item 4.10.

Tabela 5, são apresentadas as condições do espectrômetro de massas otimizadas experimentalmente, indicando para cada analito os íons fragmento utilizados para detecção e quantificação, assim como, as energias do cone e de colisão, e *dwell-time*. Os íons fragmento foram encontrados na literatura e experimentalmente testados.

Tabela 5: Parâmetros otimizados para a detecção dos gingeróis pela espectrometria de massas sequencial.

Analitos	Íon precursor [M + H] ⁺ (m/z)	Íon fragmento (m/z) ^a	Energia do cone (V)	Energia de colisão (V)	Dwell-time (s)
6 – gingerol	293	99,2, 178	20	20	0,077
8 - gingerol	321	127, 193,1	20	20	0,077
10 - gingerol	349	155, 193,1	20	20	0,077

^a Os íons fragmento são apresentados na ordem de sua abundância relativa, sendo o primeiro o mais abundante e o que foi utilizado para a quantificação.

Fonte: Autoria própria.

A Figura 13 mostra o cromatograma do íon total de uma amostra dos padrões analíticos 6 – gingerol, 8 – gingerol e 10 – gingerol na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$, após o procedimento de preparo de amostra. O perfil cromatográfico obtido utilizando-se os parâmetros otimizados para a detecção no espectrômetro de massas sequencial, mostra picos bem definidos e com resolução de linha de base entre eles.

Figura 13: Cromatograma do íon total (TIC) na análise de padrões dos três gingeróis na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Figura 14, apresenta-se os cromatogramas das transições MRM monitoradas para cada analito. Foram monitoradas 6 transições, sendo duas para cada analito, permitindo a escolha da transição para a quantificação mediante a melhor resolução e maior intensidade dos picos. São estas: para o 6 gingerol, $m/z \rightarrow 99,2$; para o 8-gingerol, $m/z \rightarrow 127$, e para 10-gingerol, $m/z \rightarrow 155$.

Figura 14: Cromatogramas obtidos para as transições de quantificação dos gingeróis.

5.3.4 Avaliação das Figuras de mérito do método desenvolvido

A seletividade do método foi avaliada mediante a comparação entre os cromatogramas obtidos para análise dos padrões analíticos na concentração de $10 \mu\text{g L}^{-1}$ e as amostras alimentares selecionadas, apresentados na Figura 15. Pode-se observar que os perfis cromatográficos são muito semelhantes; as análises das amostras mostram os picos bem definidos, com boa separação entre os três compostos e nenhum indício de interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos. A cromatografia líquida aliada à detecção no MS/MS garante a seletividade do método, visto que a técnica de espectrometria de massas em tandem nesse sistema consegue aumentar a detectabilidade e reduzir a interferência de outros compostos presentes na matriz⁸⁵.

Figura 15: Comparação entre os cromatogramas de água pura fortificada com os padrões analíticos na concentração de $10\ \mu\text{g L}^{-1}$ e os cromatogramas das amostras reais: (a) padrões analíticos; (b) chá Y; (c) chá X; (d) bala de gengibre; (e) suplemento termogênico; (f) bebida gaseificada e (g) extrato de gengibre.

O limite de detecção e o limite de quantificação foram determinados de acordo com a relação S/N descrita na parte experimental. Os valores de LOD e LOQ obtidos para os gingeróis estão apresentados na Tabela 6.

Tabela 6: Resultados dos limites de detecção e quantificação

	LOD $\mu\text{g L}^{-1}$	LOQ $\mu\text{g L}^{-1}$
6 - gingerol	2	5
8 - gingerol	3	5
10 - gingerol	3	5

Para determinar a linearidade do método avaliou-se qual a faixa de trabalho usada para os analitos, que apresenta uma resposta linear. Qualquer metodologia que envolva técnicas instrumentais, e resultem em relações lineares como a apresentada na Equação 1, só tem validade no intervalo de concentração medida para o analito. As perdas de linearidade são intrínsecas e características de cada técnica.⁸⁶

O coeficiente de determinação, R^2 , foi utilizado para estimar se os modelos matemáticos apresentados, em forma de equação de reta, estavam adequados em cada uma das curvas analíticas obtidas. Quanto mais próximo de 1,0 for o valor de R^2 , menor será a dispersão dos pontos obtidos experimentalmente, também, será menor a incerteza em relação aos coeficientes de regressão.

As curvas analíticas foram construídas para os três analitos de interesse em 6 níveis diferentes de concentração (5,0, 10, 25, 50, 100 e 200 µg L⁻¹).

Pela análise visual dos valores experimentais, observou-se valores de variâncias diferentes; condição designada de heterocedasticidade. Foi aplicado o Teste de Cochran ⁸⁷, avaliando a variância dos pontos ao longo da curva analítica. Em um experimento balanceado, com o número de medidas iguais para todos os níveis de concentração, o teste compara o maior valor de variância com os demais. Para calcular os valores de C, utilizou-se a Equação 4.⁸⁸

$$C = \frac{S_{máx}^2}{\sum_{i=1}^k S_i^2}$$

Equação 4

Sendo:

- C, o valor obtido da comparação entre a maior variância e a soma das variâncias da amostra;
- k, o número de níveis de concentração;
- n, o número de medidas de cada nível de concentração;
- $S_{máx}^2$, a maior variância da amostra;
- S_i^2 , a variância amostral: $S_i^2 = \frac{1}{n-1} \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$

Os valores de C obtidos para os analitos 6-gingerol, 8- gingerol e 10-gingerol foram de 0,74665, 0,8945 e 0,93657, respectivamente. Como os valores calculados são maiores que o tabelado de acordo com os valores do Teste de Cochran (Anexo 1)⁸⁹, as variâncias experimentais obtidas para cada analito não são homogêneas. Para dados heterocedásticos, pode ser observado que o desvio padrão aumenta com o aumento da concentração, portanto, foram feitos ajustes do modelo linear aplicando a regressão ponderada, priorizando os dados com baixa variância e dando menor importância para os dados de variâncias altas.⁹⁰ A ponderação mais comumente empregada envolve o ajuste dos dados por um fator determinado como a uma função inversa da concentração. Fatores como, $1 / x^0$, $1 / x^{0,5}$, $1 / x$ e $1 / x^2$ podem ser aplicados.⁹¹

Na Tabela 7, estão apresentados, para cada analito, os valores de R^2 e a somatória dos resíduos relativos obtidos pelas ponderações com os fatores $1/x^0$, $1/x$, $1/x^2$ e $1/x^3$. Geralmente, a escolha do fator de ponderação é determinada pelo menor valor de somatória de resíduos relativos encontrado. Para o analito 6-gingerol e 8-gingerol, foram definidos os fatores de ponderação $1/x^2$ e $1/x$, respectivamente. Os resíduos relativos foram inferiores a 20%, e seus somatórios os menores encontrados. Os resultados referentes ao analito 10-gingerol, determinaram o fator de ponderação $1/x^3$ com o menor valor de somatória de resíduos relativos. No entanto, comparando-se os gráficos de resíduos obtidos para cada ponderação, observa-se que a mais adequada é a obtida pelo fator $1/x^2$, por ser a mais ajustada à reta.

As curvas analíticas dos compostos 6-gingerol, 8-gingerol e 10-gingerol e os respectivos gráficos de resíduos relativos ponderados são apresentados nas Figuras 16 a 21.

Tabela 7: Valores da somatória de resíduos relativos obtidos pela regressão linear ponderada.

W	6 - gingerol		8 - gingerol		10 – gingerol	
	R^2	Σ	R^2	Σ	R^2	Σ
$1/x^0$	0,9978	133,4	0,9883	158,8	0,9812	164,9
$1/x$	0,9957	105,2	0,9906	150,9	0,9875	163,3
$1/x^2$	0,9886	102,2	0,9805	152	0,9806	158,1
$1/x^3$	0,9768	129,9	0,955	161,3	0,961	149,4

Figura 16: Curva analítica do composto 6 – gingerol.

Figura 17: Curva analítica do composto 8 - gingerol.

Figura 18: Curva analítica do composto 10 - gingerol.

Figura 19: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x^2$ para o composto 6-gingerol.

Figura 20: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x$ para o composto 8-gingerol.

Figura 21: Gráfico de resíduos relativos com fator de ponderação $1/x^2$ para o composto 10-gingerol.

Os parâmetros de precisão foram avaliados em três níveis diferentes de concentração no mesmo dia e comparando-se os resultados para dias diferentes. Como é apresentado na Tabela 8, os resultados obtidos para a precisão do método mostram que os desvios são inferiores a 15%, tanto para os experimentos realizados no mesmo dia, quanto para dias diferentes. O guia do ICH não apresenta um limite de aceitação para este parâmetro. No entanto, para o Manual de Qualidade Analítica (MAPA), são aceitáveis desvios inferiores ou iguais a 20%.

Tabela 8: Resultados obtidos para a avaliação da precisão do método.

	Intra dia (% RSD)			Inter dia (% RSD)		
	(n=3)			(n=6)		
	5 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	200 µg L ⁻¹	5 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	200 µg L ⁻¹
6 - gingerol	2,9	2,3	1,7	5,4	6,8	5,0
8 - gingerol	7,1	0,69	10,3	4,1	2,4	8,6
10 - gingerol	4,7	1,8	13,4	9,9	0,4	10,9

A exatidão (Tabela 9) foi avaliada de forma semelhante à precisão, obtendo resultados de análises para três níveis diferentes de fortificação (5, 100 e 200 µg L⁻¹). Assim, como a precisão, esse parâmetro não apresenta limite de aceitação pelo guia ICH e, portanto, a faixa de aceitação estipulado pelo MAPA foi utilizado como referência (70 – 120%).

Tabela 9: Resultados obtidos para a avaliação da exatidão do método.

	Exatidão (%)		
	(n=3)		
	5 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹	200 µg L ⁻¹
6 – gingerol	94,6	81,3	118,3
8 – gingerol	106,5	91	112,2
10 - gingerol	107,3	82,8	117,1

Os resultados mostrados na Tabela 10, mostram que os fatores de enriquecimento foram satisfatórios quando comparados com valores de referência do MAPA, já que para estes parâmetros o ICH também não possui limites definidos. Os fatores de enriquecimento foram superiores a 1, demonstrando uma boa capacidade de concentração da fase extratora em relação aos analitos.

Tabela 10: Resultados obtidos para a avaliação do fator de enriquecimento do método.

	Fator de enriquecimento (n=3)		
	25 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
6 - gingerol	7,0	9,9	9,9
8 - gingerol	19,8	24,9	25,7
10 - gingerol	25,5	27,1	30,8

5.4 Aplicação do método na análise de gingeróis em produtos alimentares.

O método desenvolvido e validado, foi aplicado na análise de amostras de duas variedades de chá, um tipo de suplemento alimentar termogênico, uma bala e uma bebida gaseificada. Todas as amostras foram diluídas a fim de minimizar os efeitos dos possíveis interferentes.

O chá Y, encontrado em lojas de suplementos alimentares ou farmácias, contém uma mistura de ervas e plantas, como chá verde, carqueja, mate verde, hortelã, guaraná, gengibre, sálvia e alecrim. Nesta amostra foi possível quantificar o composto 6-gingerol, no teor de $4,63 \pm 0,09 \mu\text{g mg}^{-1}$.

O chá misto X é uma mistura de chá verde, gengibre, abacaxi e hortelã. A sua composição é mais simples quando comparada com a amostra de chá Y, permitindo a quantificação dos três compostos. Foram determinados: $2,40 \pm 0,03 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 6-gingerol, $0,64 \pm 0,05 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 8-gingerol e $0,46 \pm 0,04 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 10-gingerol. O perfil cromatográfico dos chás X e Y são apresentados na Figura 15b e 15c.

Na amostra de bala foram encontrados $0,20 \pm 0,02 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 6-gingerol, $0,03 \pm 0,00 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 8-gingerol e $0,04 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ de 10-gingerol. O cromatograma da amostra de bala na Figura 15d.

Em 2 mg do suplemento alimentar termogênico determinou-se quantidades de $0,72 \pm 0,05 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 6-gingerol, $0,11 \pm 0,01 \mu\text{g g}^{-1}$ de 8-gingerol e $0,09 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 10-gingerol. Perfil cromatográfico mostrado na Figura 15e.

Para a bebida gaseificada, ou água tônica, foi possível quantificar apenas o 6-gingerol em $4,63 \pm 0,07 \mu\text{g L}^{-1}$. Cromatograma apresentado na Figura 15f.

O extrato de gengibre bruto (Figura 15g) obtido em laboratório foi quantificado fazendo-se uma diluição de 50 μL em 500 mL. Foram quantificados $8,00 \pm 0,15 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 6-gingerol, $0,58 \pm 0,03 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 8-gingerol e $0,59 \pm 0,01 \mu\text{g mg}^{-1}$ de 10-gingerol.

Os cromatogramas obtidos para todas as amostras, mostram que o material utilizado para a extração e concentração dos analitos desempenhou um papel importante na eliminação dos interferentes presentes em cada amostra. É observado, então, a seletividade do método desenvolvido.

Na Tabela 11, são apresentados os resultados da análise e determinação dos gingeróis nas amostras.

Tabela 11: Concentrações dos analitos presentes em cada amostra analisada.

Amostra	6 - gingerol ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	8 – gingerol ($\mu\text{g mg}^{-1}$)	10 – gingerol ($\mu\text{g mg}^{-1}$)
Água tônica*	4,63	-	-
Extrato de gengibre fresco	8,00	0,58	0,59
Chá X	2,4	0.64	0.46
Chá Y	1,97	-	-
bala de gengibre	0,2	0,03	0,04
suplemento termogênico	0,72	0,11	0,09

* Concentração medida em $\mu\text{L mL}^{-1}$

5.5 Potencial aplicação *on-line* dos materiais preparados na microextração em fase sólida no tubo (*in-tube* SPME)

Os materiais que apresentaram melhor retenção ao gingerol, tiveram seu desempenho avaliado no sistema *on-line*, composto pelo acoplamento da coluna de extração com cromatografia líquida e a espectrometria de massas em tandem. Nesta etapa foi observado o aumento contínuo e considerável da pressão das colunas preparadas, possivelmente devido ao inchamento (ou intumescimento) do leito empacotado provocado pela acumulação de água entre as lâminas dos materiais baseados em GO quando descartada a possibilidade de entupimento dos *frits*.

Baseado em conhecimentos obtidos pela literatura, é possível compreender um pouco esse inchamento dos materiais que, na realidade, é relacionado ao comportamento do óxido de grafeno. Esse material apresenta uma característica hidrofílica marcante devido à presença abundante de grupos funcionais oxigenados como álcool, grupos carboxílicos, cetona em sua estrutura. Em condições aquosas, portanto, as folhas do óxido atraem as moléculas de água para o interior do espaço entre as camadas da membrana de GO, aumentando o espaçamento d , incrementando a resistência ao fluxo através da coluna, e afetando a eficiência da separação analítica.⁹² Em meio orgânico, também são relatados comportamentos similares de intumescimento.

O espaçamento d é definido como a distância entre os centros de dois planos de carbono adjacentes. Assim como o tamanho de poros em membranas tradicionais, a sua compreensão revela um aspecto importante que influencia nas propriedades de separação da membrana de GO. Muitos trabalhos com óxido de grafeno encontrados na literatura, abordam esse fenômeno de inchamento.⁹²⁻⁹⁵

Com o intuito de eliminar ou, ao menos, amenizar os efeitos do inchamento do material, propõe-se um procedimento de modificação da superfície do GO, para o qual não foi encontrado o mesmo material ou procedimento, e propósito idênticos. O recobrimento com o polímero poliestireno foi proposto como uma tentativa de diminuir a tensão superficial da água nas folhas de GO, enfraquecendo as forças intermoleculares entre os grupos funcionais hidrofílicos da membrana e a água.

A decisão de utilizar o poliestireno expandido (isopor) foi devido à sua facilidade de acesso e sua característica não contaminante do solo, água e ar, podendo ser reciclado também.

Adicionalmente, atendendo quando possível alguns dos princípios da química verde ⁹⁶, como a redução do emprego de solventes tóxicos e de seus resíduos, o *D*-limoneno foi usado como solvente para solubilização do polímero. Essa substância orgânica tem procedência natural, sendo encontrada em frutas cítricas.

O preparo do material envolveu etapa simples de mistura do polímero e óxido de grafeno. No entanto, comparou-se o modo de homogeneização da mistura, sendo uma feita manualmente com o auxílio de espátula, e a outra com agitação magnética. Os dois modos não apresentaram diferenças significativas em relação à retenção dos analitos, nem sobre a pressão interna da coluna. Devido a essa observação, o procedimento manual foi mantido, pelo menor consumo de solvente, rápida secagem e menor perda do polímero.

Para secagem e evaporação do solvente orgânico presente na amostra, o material foi colocado em estufa e, em seguida, armazenado em dessecador por dois dias. A presença do aroma cítrico indicou que o solvente *D*-limoneno não foi evaporado totalmente do material, mas não demonstrou ser um interferente nas análises cromatográficas após a extração e concentração dos analitos. Foram avaliadas diferentes proporções de polímero para o recobrimento do óxido de grafeno. Os materiais preparados foram avaliados quanto a capacidade de retenção por meio do mesmo procedimento descrito no item (avaliação da seletividade dos materiais).

O óxido de grafeno utilizado no preparo dos materiais pode ser recuperado retirando-se o recobrimento polimérico com a utilização de solventes como acetato de etila e éter etílico, ou o *D*-limoneno. Para o conhecimento do comportamento do polímero quando submetido aos solventes utilizados para a fase móvel e evitar qualquer dano ao sistema cromatográfico, foi estudado experimentalmente e com auxílio de literatura informações de solventes adequados para solubilização do polímero, e que não causem inchamento do mesmo.

A Figura 22 mostra um gráfico apresentado no trabalho de PAZZINI (2015)⁹⁷ sobre os parâmetros de solubilidade de Hansen⁹⁸ do poliestireno em diferentes solventes. Pode-se verificar os solventes mais apropriados para a solubilização do polímero destacados pelo círculo azul. Na Tabela 12, no mesmo trabalho, são

expostos os resultados obtidos para os polímeros em presença de solventes como a acetona, acetato de etila, etanol, isopropanol e água, confirma o que foi interpretado pela representação dos parâmetros de Hansen apresentados.

A partir desses dados, pode-se determinar que o acetato de etila é o solvente mais adequado para retirar o polímero da superfície das folhas de GO. Em água, solvente utilizado na etapa de carregamento no sistema *online in-tube* SPME e componente da fase móvel do sistema cromatográfico em questão, não foi observado o inchamento do polímero. O comportamento inerte do polímero na presença de água é fator importante e determinante do seu uso para a modificação superficial de GO.

Tabela 12: Solubilidade de dois polímeros em 5 solventes diferentes.

Solvente (Tempo de Experimento = 3h30min), T = 25°C					
Polímero	Acetona	Acetato de Etila	Etanol	Isopropanol	Água
PCL (10 kDa)	Solubilizou	Solubilizou	Inerte	Inerte	Inerte
PCL (80 kDa)	Solubilizou	Solubilizou	Inchou ↓	Inerte	Inerte
PS (192 kDa)	Inchou ↑	Solubilizou	Inerte	Inerte	Inerte
PS (280 kDa)	Inchou ↑	Solubilizou	Inerte	Inerte	Inerte
PS (350 kDa)	Inchou ↑	Solubilizou	Inerte	Inerte	Inerte

↑ - muito
↓ - pouco

Fonte: Adaptado de PAZZINI, C. E.⁹⁷

Figura 22: Representação dos parâmetros de solubilidade de Hansen.

Fonte: Adaptado de PAZZINI, C. E.⁹⁷

5.5.1 Caracterização de GO e redGO com recobrimento polimérico.

A imagem de MEV da Figura 23 apresenta a morfologia da superfície dos materiais após a sua modificação com o recobrimento polimérico. O óxido de grafeno e óxido de grafeno reduzido foram designados como GOPS e redGO-PS.

Pode-se fazer uma comparação entre as micrografias da Figura 7 e Figura 23, e observa-se as diferenças de superfície que após a modificação ficaram mais lisas e com menos dobras.

Figura 23: Micrografia dos materiais modificados: (A) GOPS na escala de 1:10 μm e (B) redGO-PS na escala de 1:1 μm .

Fonte: Autoria própria.

5.5.2 Avaliação da capacidade de retenção dos materiais em relação aos gingeróis.

O segundo teste foi realizado para avaliar a capacidade de retenção que todos os materiais preparados, e um comercial, possuem em relação a cada um dos três gingeróis, como mostra o gráfico na Figura 24.

Os materiais apresentaram, de modo geral, bom desempenho como adsorventes dos gingeróis, indicando capacidades de retenção acima de 50%. De acordo com os dados, pode-se inferir que o material óxido de grafeno mesmo após o recobrimento polimérico, ainda apresentou resultados satisfatórios em relação a retenção dos três gingeróis.

Além disso, mostra que o preparo do material foi bem-sucedido, de modo que o recobrimento não interferisse na interação do GO com os analitos. Com os experimentos durante o desenvolvimento do material, foi observado que o polímero não apresentou capacidade de retenção dos analitos e, portanto, notou-se a necessidade de que o recobrimento fosse não total e/ou que a proporção de polímero fosse suficiente para permitir a interação entre analitos e GO, não depositando camadas espessas do poliestireno.

Figura 24: Avaliação da capacidade de retenção dos materiais com e sem recobrimento polimérico para os gingeróis empregados no estudo.

6 CONCLUSÃO

O método desenvolvido, DSPME-LC-ESI-MS/MS, empregando GO-Fe₃O₄ apresenta um bom desempenho para a determinação dos analitos de interesse. O estudo dos parâmetros que influenciam a extração ajudou a melhorar o desempenho e eficiência da microextração. Com a avaliação de algumas figuras de mérito, o método pode ser considerado seletivo e significativamente preciso em suas análises.

Amostras reais foram submetidas ao preparo de amostra e análise cromatográfica para a quantificação dos gingeróis. Com a extração e concentração dos analitos, os dados experimentais obtidos pela análise das amostras, evidenciou a boa extração e fator de concentração apresentados na validação. Algumas amostras avaliadas, evidenciaram a presença de apenas 6-gingerol, nas condições analíticas apresentadas. Isto provavelmente é devido ao fato de os outros compostos serem menos abundantes no gengibre, além da própria degradação promovida pelas condições de armazenamento e tempo de estoque anteriores à pesquisa. Pode-se inferir a partir dos resultados apresentados, que o desenvolvimento do método de extração empregando o material GO-Fe₃O₄ cumpriu com todos os objetivos propostos.

Foram sintetizados materiais compósitos baseados em grafeno e óxido de grafeno e avaliados quanto a capacidade de retenção. As fases selecionadas foram empacotadas em tubos capilares de aço inoxidável (500 µm i.d. x 50 mm) e avaliadas quanto ao seu acoplamento à cromatografia líquida, tendo como resultados observações importantes sobre o comportamento a base de óxido de grafeno. A característica hidrofílica do GO leva ao inchamento das membranas aumentando o espaçamento entre as folhas de GO. Nesse contexto, o desenvolvimento e preparo do material modificado superficialmente apresentou, ao final, resultados interessantes quanto ao seu comportamento quando empacotado e sob fluxo de solventes, como no caso de *'in-tube'* SPME. Acredita-se que essa modificação possa levar a uma melhora da vida útil do material para a aplicação cromatográfica proposta. Os materiais GOPS e GOC apresentaram boa capacidade de retenção dos analitos, concluindo que o recobrimento com o polímero não afetou o seu desempenho quanto a separação e retenção dos analitos. Estudos futuros devem ser conduzidos, de forma a entender melhor o papel dos polímeros no inchamento de materiais derivados de grafeno.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- 2 PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.
- 3 BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Biodiversidade: Fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- 4 PLETSCBI, M. Compostos naturais biologicamente ativos. A aplicação da biotecnologia à produção de compostos naturais biologicamente ativos. **Revista Biotecnologia Ciencia e Desenvolvimento**, v. 1, n. 4, p.12-15, 1998.
- 5 ALVES, H. M.; A diversidade química das plantas como fontes de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, v. 3, p.12-15, 2001.
- 6 NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.
- 7 FILHO, V. C.; YUNES, R. A.; Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p.99-105, 1998.
- 8 CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios. **Revista virtual de química**, v. 9, n. 2, p. 575-595, 2017.
- 9 PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S; BOLZANI, V.S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, 2002.
10. YEH, H.; CHUANG, C.; CHEN, H.; WAN, C.; CHEN, T.; LIN, L. Bioactive antioxidant analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. **WT – Food Science and Technology**, v. 55, p. 329-334, 2014.
- 11 PARK, J.S.; JUNG, M. Y.; Development of High-Performance Liquid Chromatography–Time of-Flight Mass Spectrometry for the Simultaneous Characterization and Quantitative Analysis of Gingerol-Related Compounds in Ginger Products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 40 p. 10015–10026, 2012.

- 12 ASHRAF, K.; MUJEEB, M.; AHMAD, A.; AHMAD, S.; AHMAD, N.; AMIR, M. Determination of gingerols in ginger by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical Letters**, v. 47, n. 12, p. 2120-2128, 2014.
- 13 CORRADINI, C.; MONDELLO, M.; LEWIS, A. C.; BARTLE, K. D. Coupled-column liquid chromatography. Multidimensional Chromatography. New York: Wiley, 2001, p. 231-234.
- 14 LANÇAS, F. M.; TOFFOLI, A. L. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias. **Scientia Chromatographica**, v. 7, n. 4, p. 297-315, 2015.
- 15 DIONÍSIO, A. G. G.; BATISTÃO, M. B.; SANTOS, V. B.; ICERI, T. M.; CASSIANO, N. M.; CASS, Q. B. Novas Tendências em Preparo de Amostras para Cromatografia Líquida. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 3, p. 19-29, 2010.
- 16 QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluidos biológicos para posterior determinação cromatográfica. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 68-76, 2001.
- 17 HAVLÍKOVÁ, L. C.; URBANOVÁ, M.; CHOCHOLOUŠ, P.; SOLICH, P. Novel Dispersed Sorbent Sorptive Extraction Method for the Chromatography Profiling of Active Substances in Ginger. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 4, p. 1016-1023, 2017.
- 18 ARTHUR, C. AND PAWLISZYN, J. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.
- 19 OCAÑA-GONZÁLEZ, J. A.; FERNÁNDEZ-TORREZ, R.; BELLO-LÓPEZ, M. A.; RAMOS-PAYÁN, M. New developments in microextraction techniques in bioanalysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 905, p. 8–23, 2016.
- 20 ANASTASSIADES, M.; LEHOTAY, S.J.; STAJNBAHER, D.; SCHENCK, F.J. Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and dispersive solid-phase extraction for the determination of pesticide residues in produce. **Journal AOAC International**, v.86, n. 2, p. 412-413, 2003.
- 21 KHEZELI, T; DANESHFAR, A. Development of dispersive micro-solid phase extraction based on micro and nano sorbents. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 89, p. 99-118, 2017.
- 22 KHAZEMI, E.; DADFARNIA, S.; SHABANI, A. M. H. Dispersive solid phase microextraction with magnetic graphene oxide as the sorbent for separation and preconcentration of ultra-trace amounts of gold ions. **Talanta**, v. 141, p. 273 – 278, 2015

- 23 KOCOT, K.; ZAWISA, B.; MARGUÍ, E.; QUERALT, I.; HIDALGO, M.; SITKO, R. Dispersive microsolid-phase extraction using multiwalled carbon nanotubes combined with portable total reflection X-ray fluorescence spectrometry for the determination of trace amounts of Pb and Cd in water samples. **Journal of Analytical Atomic Spectrometry**, v. 28, p. 736-742, 2013.
- 24 MEHL, H.; MATOS, C. F.; NEIVA, E. G. C.; DOMINGUES, S. H.; ZARBIN, J. G. Efeito da variação de parâmetros reacionais na preparação de grafeno via oxidação e redução do grafite. **Química Nova**, v. 37, n. 10, p. 1639-1645, 2014.
- 25 ZARBIN, A. J. G.; OLIVEIRA, M. M. Nanoestruturas de carbono (nanotubos, grafeno): *Quo vadis?* **Química Nova**, v. 36, n. 10, p. 1533-1539, 2013.
- 26 ZHANG, X.; CHEN, S.; HAN, Q.; DING, M. Preparation and retention mechanism study of graphene and graphene oxide bonded silica microspheres as stationary phases for high performance liquid chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 1307, p. 135-143, 2013.
- 27 LIANG, X.; WANG, S.; LIU, S.; LIU, X.; JIANG, S.; A novel octadecylsilane functionalized graphene oxide/silica composite stationary phase for high performance liquid chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 2003–2009, 2012.
- 28 YIN, P. T.; SHAH, S.; CHHOWALLA, M.; LEE, K. Design, Synthesis, and Characterization of Graphene-Nanoparticle Hybrid Materials for Bioapplications. **Chemical Reviews**, v. 115, n. 7, p. 2483-2531, 2015.
- 29 ZHU, Y.; MURALI, S.; CAI, W.; LI, X.; SUK, J. W.; POTTS, J. R.; RUOFF, R. S. Graphene and Graphene Oxide: Synthesis, Properties, and Applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 35, p. 3906–3924, 2010.
- 30 BRODIE, B. C. On the atomic weight of graphite. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: mathematical, physical and engineering Sciences**, v. 149, p. 249-259, 1859.
- 31 STAUDENMAIER, L. Verfahren zur darstellung der draphitsaure. **Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft**, v.31, p. 1481-1487, 1898.
- 32 HUMMERS JUNIOR, W. S. Preparation of graphitic oxide. **Journal of the American Chemical Society**, v. 80, n. 60, p. 1339, 1958.
- 33 SANTANA, G. P.; RAMOS, A. M.; FABRIS, J. D. Uma estratégia adaptada para síntese de magnetita. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 430-432, 2008.
- 34 OLIVEIRA et al.; Óxidos de ferro e suas aplicações em processos catalíticos: uma revisão. **Química Nova**, v. 36, n. 1, p. 123-130, 2013.
- 35 Zhang, Y.; CHEN, B.; ZHANG, L.; HUANG, J.; CHEN, F.; YANG, Z.; YAO, J.; ZHANG, Z. Controlled assembly of Fe₃O₄ magnetic nanoparticles on graphene oxide, **Nanoscale**, v. 3, n. 4, p. 1446–1450, 2011.

- 36 VIERA, N. A.; TOMIOTTO, F. N.; MELO, G. P.; MELO, G. P.; MANCHOPE, M. F.; LIMA, N. R.; OLIVEIRA, G. G. O.; WATANABE, M. A. E. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. *In: Semina: ciências biológicas e da saúde*, v. 35, n. 1, p. 149-162, 2014.
- 37 ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.; *Zingiber officinale* ROSCOE: Aspectos botânicos e ecológicos. *Visão Acadêmica*, v. 5, n. 1, p. 27-32, 2004.
- 38 ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.; RÜCKER, N. G. A. Produção de gengibre no município de Morretes, PR. *Scientia Agraria*, v. 9, n. 2, p. 211-217, 2008.
- 39 PORTAL DO NEGÓCIO: É tempo de colher gengibre na região serrana do Espírito Santo. Rio de Janeiro, 23 de setembro de 2015.
Disponível em: <https://www.portaldoagronegocio.com.br/noticia/e-tempo-de-colher-gengibre-na-regiao-serrana-do-espírito-santo-134929>. Acesso em: 20 de outubro de 2018.
- 40 MAGALHÃES, M. T.; KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; CORNEJO, F. E. P.; MARQUES, L. M. R.; Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) brasileiro: aspectos gerais, óleo essencial e oleoresina. Parte 2 – secagem, óleo essencial e oleoresina. *Ciência Tecnologia Alimentos*, v. 17, n. 2, p. 132-136, 1997.
- 41 GAZETA ONLINE. **Do Espírito Santo para o mundo**. Vitória, 11 de maio de 2017.
Disponível em:
https://www.gazetaonline.com.br/especiais/estado_de_valor/2017/05/do-espírito-santo-para-o-mundo-1014053501.html. Acesso em: 25 de novembro de 2018.
- 42 SAFRA ES. **Gengibre: nova alternativa dos produtores**. Vitória 08 de agosto de 2017.
Disponível em: <https://www.safras.com.br/geral/gengibre-nova-alternativa-dos-produtores-1>. Acesso em: 25 de novembro de 2018.
- 43 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. (2017) FAOSTAT. Roma, 2018.
Disponível em: http://www.fao.org/faostat/en/#rankings/countries_by_commodity. Acesso em: 20 de outubro de 2019.
- 44 SRINIVASAN, K. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *PharmaNutrition*, v. 5, p. 18–28, 2017.
- 45 RAVINDRAN, P. N.; BABU, K. N. **Ginger, the genus *Zingiber***: Medicinal and Aromatic Plants – Industrial Profiles. Flórida, Estados Unidos: CRC Press, 2005, p. 576.
- 46 PRATO, Tiago Sartorelli. **Influência da secagem sobre compostos medicinais e de pungência do gengibre**. Orientador: Roger Darros Barbosa.: 2010. 84 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos) – Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, Universidade Estadual Paulista, São José do Rio Preto, 2010.

- 47 MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V.; HARBORNE, J. B. *Natural Products: their chemistry and biological significance*. 1. ed. Harlow: Longman Scientific & Technical, 1994. 455 p.
- 48 ANGELO, P. M., JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- 49 REIS GIADA, M. L. **Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power**. IntechOpen: Open access peer-reviewed chapter. Disponível em: <https://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/food-phenolic-compounds-main-classes-sources-and-their-antioxidant-power>. Acesso em: 16 de setembro de 2018.
- 50 NACZK, M., SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1–2, p. 95-111, 2004.
- 51 LAMPE, W. J. Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 70, n.4, p. 475–490, 1999.
- 52 GHASEMZADEH, A., JAAFAR, H. Z. E., RAHMAT, A.; Optimization protocol for the extraction of 6-gingerol and 6-shogaol from *Zingiber officinale* var. Rubrum Theilade and improving antioxidant and anticancer activity using response surface methodology. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 258, p. 1-10, 2015.
- 53 RAI, S., MUKHERJEE, K., MAL, M., WAHILE, A., SAHA, B. P., MUKHERJEE, P. K. Determination of 6-gingerol in ginger (*Zingiber officinale*) using high-performance thin-layer chromatography. **Journal of Separation Science**, v. 29, n. 15, 2292 – 2295, 2006.
- 54 WANG, X.; ZHENG, Z.; GUO, X.; YUAN, J.; ZHENG, C. Preparative separation of gingerols from *Zingiber officinale* by high-speed counter-current chromatography using stepwise elution. **Food Chemistry**, v.125, n. 4, p. 1476–1480, 2011.
- 55 YOU, H. IRELAND, B.; MOESZINGER, M.; ZHANG, H.; SNOW, L.; KREPICH, S.; TAKAGAWA, V. Determination of Select Nonvolatile Ginger Constituents in Dietary Ingredients and Finished Dosage Forms. **Journal of AOAC International**, v. 103, n. 1, p. 124-131, 2020.
- 56 CHENG, X. L. QI, L. W.; WANG, Q.; LIU, X. G.; BOUBERTAKH, B.; WAN, J. Y.; LIU, E. H.; LI, P. Highly efficient sample preparation and quantification of constituents from traditional Chinese herbal medicines using matrix solid-phase dispersion extraction and UPLC-MS/MS. **Analyst**, v. 138, n. 8, p. 2270-2288, 2013.
- 57 JI, W.; MA, X.; ZHANG, J.; XIE, H.; LIU, F.; WANG, X. Preparation of the high purity gingerols from ginger by dummy molecularly imprinted polymers. **Journal of Chromatography A**, v. 1387, p. 24-31, 2015.

58 GROSS, J. H. **Mass spectrometry: A Textbook**. 2. ed. Berlin: Springer, 2011. p. 1-66.

59 ANALYTICA. A técnica de ionização por Electrospray na espectrometria de massas. Campinas, 6 de maio de 2019.

Disponível em: <https://revistaanalytica.com.br/a-tecnica-de-ionizacao-por-electrospray-na-espectrometria-de-massas/>. Acesso em: 25 de novembro de 2019.

60 HOFFMANN, E.; STROOBANT, V. **Mass Spectrometry: Principles and Applications**. 3 ed. Chichester: Wiley, 2007. p. 46-54.

61 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Brasília: MAPA/ACS, p. 19-21, 2015.

62 INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION (ICH). Validation of analytical procedures: text and methodology – Q2 (R1). Geneva, Suíça. 2005.

Disponível em:

http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf Acesso em: 26 de novembro de 2019.

63 INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, QUALIDADE E TECNOLOGIA (INMETRO). Rio de Janeiro. 2016. Disponível em:

http://www.inmetro.gov.br/Sidoq/Arquivos/CGCRE/DOQ/DOQ-CGCRE-8_05.pdf.

Acesso em: 26 de novembro de 2019.

64 SERESHTI, H.; KHOSRAVIANI, M.; SAMADI, S.; AMINI-FAZL, M. S.

Simultaneous determination of theophylline, theobromine and caffeine in different tea beverages by graphene-oxide based ultrasonic assisted dispersive micro solid-phase extraction combined with HPLC-UV. **RSC Advances**, v.4, n.87, 47114-47120, 2014.

65 PARK, S.; AN, J.; POTTS, J.R.; VELAMAKANNI, A.; MURALI, S.; RUOFF, R.S.

Hydrazine-reduction of graphite- and graphene oxide. **Carbon**, v. 49, p. 3019–3023, 2011.

66 MONTESERÍN, C. BLANCO, M.; ARANZABE, E.; LAZA, J. M.; LARRAÑAGA-VARGA, A.; VILAS, J. L. Effects of Graphene Oxide and Chemically-Reduced Graphene Oxide on the Dynamic Mechanical Properties of Epoxy Amine Composites. **Polymers**, v. 9, n. 9, p. 449, 2017.

67 LIU, Q.; SHI, J.; SUN, J.; WANG, T.; ZENG, L.; JIANG, G. Graphene and graphene oxide sheets supported on silica as versatile and high-performance adsorbents for solid-phase extraction. **Angewandte Chemie**, v. 50, n. 26, p. 5913-5917, 2011.

68 CHEN, J.; ZHU, X. Ionic liquid coated magnetic core/shell Fe₃O₄@SiO₂

nanoparticles for separation/analysis of linuron in food samples. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**. v. 137 p. 456–462, 2015.

- 69 YAO, Y.; MIAO, S.; YU, S.; MA, L. P.; SUN, H.; WANG, S. Fabrication of Fe₃O₄/SiO₂ core/shell nanoparticles attached to graphene oxide and its use as an adsorbent. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 379, p. 20–26, 2012.
- 70 GADLY, T.; MOHAPATRA, P. K.; PATRE, D. K.; GUJAR, R. B.; GUPTA, A.; BALLAL, A.; GHOSH, S. K. Superparamagnetic graphene oxide–magnetite nanoparticle composites for uptake of actinide ions from mildly acidic feeds. **Journal of Chromatography A**, v. 1513, p. 18–26, 2017.
- 71 KIM, M., KANG, H., HYUN PARK, K. Pd nanoparticles supported on Fe₃O₄@amine-functionalized graphene composite and catalytic performance in Sonogashira cross-coupling reactions. **Catalysis Communications**, v. 72, p. 150–155, 2015.
- 72 LI, L.; LI, X.; DUAN, H.; WANG, X.; LUO, C. Removal of Congo Red by magnetic mesoporous titanium dioxide–graphene oxide core–shell microspheres for water purification. **Dalton Trans.**, v. 43, p. 8431–8438, 2014.
- 73 DEMORTIERE, P.; PANISSOD, P.; PICHON, B. P.; POURROY, G., GUILLON, D.; DONNIO, B. Size-dependent properties of magnetic iron oxide nanocrystals. **Nanoscale**, v.3, n. 1, p 225-232, 2011.
- 74 ANBARASU, M.; ANANDARAN, M.; CHINNASAMY, E.; GOPINATH, V.; BALAMURUGAN, K. Synthesis and characterization of polyethylene glycol (PEG) coated Fe₃O₄ nanoparticles by chemical co-precipitation method for biomedical applications. **Spectrochimica Acta Part A: molecular and biomolecular spectroscopy**, v. 135, p. 536-539, 2015.
- 75 SHUBAYEV, V. I., PISANIC II, T. R.; JIN, S. Magnetic nanoparticles for theragnostics. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 61, p. 467–477, 2009.
- 76 YANG, X.; ZHANG, X.; MA, Y.; HUANG, Y.; WANG, Y.; CHEN, Y. Superparamagnetic graphene oxide–Fe₃O₄ nanoparticles hybrid for controlled targeted drug carriers. **J. Mater. Chem.**, v. 19, p. 2710–2714, 2009.
- 77 YANG, H.; SUN, L.; ZHAI, J.; LI, H.; ZHAO, Y.; YU, H. In situ controllable synthesis of magnetic Prussian blue/graphene oxide nanocomposites for removal of radioactive cesium in water. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 2, n. 2, p. 326–332, 2014.
- 78 DIMIEV, A.M.; ALEMANY, L.B.; TOUR, J.M. Graphene oxide: origin of acidity, its instability in water, and a new dynamic structural model. **ACS Nano**, v. 7, n. 1, p. 576–588, 2013.
- 79 LIU, F.; WU, Z.; WANG, D.; YU, J.; JIANG, X.; CHEN, X. Magnetic porous silica-graphene oxide hybrid composite as a potential adsorbent for aqueous removal of p-nitrophenol. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 490, p. 207-214, 2016.

- 80 SHI, R.; YAN, L.; XU, T.; LIU, D.; ZHU, Y.; ZHOU, J. Graphene oxide bound silica for solid-phase extraction of 14 polycyclic aromatic hydrocarbons in mainstream cigarette smoke. **Journal of Chromatography A**, v. 1375, p. 1–7, 2015.
- 81 GAO, Y.; ZHANG, L.; HUANG, H.; HU, J.; SHAH, S. M.; SU, X. Adsorption and removal of tetracycline antibiotics from aqueous solution by graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 368, p. 540–546, 2012.
- 82 YANG, S.; CHEN, S.; CHANG, Y.; CAO, A.; LIU, Y.; WANG, H. Removal of methylene blue from aqueous solution by graphene oxide. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 359, p. 24–29, 2011.
- 83 CHANDRA, V.; PARK, J.; CHUN, Y.; LEE, J. W.; KIM, K. S. Water-dispersible magnetite - reduced graphene oxide composites for arsenic removal. **ACS Nano**, v. 4, p. 3979-3986, 2010.
- 84 NASCIMENTO, R. F.; LIMA, A. C. A.; MELO, D. Q.; RAULINO, G. S. C. **Adsorção: aspectos teóricos e aplicações ambientais**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2014. 256 p.
- 85 VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.
- 86 RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.
- 87 MILLER, J. N.; MILLER, J. C. **Statistics and chemometrics for analytical chemistry**. 6 ed. New York: Pearson Education Limited, 2010. 268 p.
- 88 PORTAL ACTION. Teste de igualdade das variâncias. São Carlos, 24 de novembro de 2013.
Disponível <<http://www.portalaction.com.br/anova/161-teste-de-igualdade-das-variâncias>>. Acesso em: 25 de novembro de 2019.
- 89 PROGRAMA DE INCENTIVO À PRODUÇÃO DE MATERIAL DIDÁTICO DO SIAE. Tabela de valores críticos de Cochran. Ribeirão Preto, 2 de abril de 2001.
Disponível em:
https://www.forp.usp.br/restauradora/gmc/gmc_livro/tabelas/cochran_95_100.htm?fbclid=IwAR0ZQ0xaJ8iBTeuUhodIM2xjflkAzx3n-GKd8O0wAGw9m6t5tvB6tFbmxNI.
Acesso em: 26 de novembro de 2019.
- 90 CASSIANO, N. M.; BARREIRO, J. C.; MARTINS, L. R. R.; OLIVEIRA, R. V.; CASS, Q. B. Validação em métodos cromatográficos para análises de pequenas moléculas em matrizes biológicas. **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 1021-1030, 2009.
- 91 KISE, M. M.; DOLAN, J. W.; Selecting the Best Curve Fit. **LCGC NORTH AMERICA** v. 22, n. 2, p. 112-117, 2004.

92 ZHENG, S.; TU, Q.; URBAN, J. J.; LI, S.; MI, B. Swelling of Graphene Oxide Membranes in Aqueous Solution: Characterization of Interlayer Spacing and Insight into Water Transport Mechanisms. **ACS Nano**, v. 11, n. 6, p. 6440–6450, 2017.

93 IAKUNKOV, A.; SUN, J.; REBRIKOVA, A.; KOROBOKOV, M.; KLECHIKOV, A.; VOROBIEV, A.; BOULANGER, N.; TALYZIN, A. V. Swelling of graphene oxide membranes in alcohols: effects of molecule size and air ageing. **Journal of Materials Chemistry A**, v. 7, 11331–11337, 2019.

94 PERREAULT, F.; DE FARIA, A. F.; ELIMELECH, M. Environmental applications of graphene-based nanomaterials. **Chemical Society Reviews**, v. 44, n. 16, 5861–5896. 2015.

95 ABRAHAM, J.; VASU, K. S.; WILLIAMS, C. D.; GOPINADHAN, K.; SU, Y.; CHERIAN, C. T.; DIX, J.; PRESTAT, E.; HAIGH, S. J.; GRIGORIEVA, I. V.; CARBONE, P.; GEIM, A. K.; NAIR, R. R. Tunable sieving of ions using graphene oxide membranes. **NATURE NANOTECHNOLOGY**, v. 12, n. 6, p. 546-550, 2017.

96 PRADO, A. G. S. Química Verde, os desafios da química do novo milênio. **Química Nova**, v. 26, n. 5, p. 738-744, 2003.

97 PAZZINI, Caio Eller. **Estudo da solubilidade do poliestireno (PS) e da policaprolactona (PCL) em diferentes solventes orgânicos**. Orientador: Jackson Araujo de Oliveira. 2015. 44f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Engenharia Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

98 HANSEN, C.M., **Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook**.: Boca Raton: CRC Press, 2002. 224 p.

ANEXO

Anexo: Tabela de valores críticos do teste de Cochran. Nível de significância de 5%.

$\begin{matrix} n \\ k \end{matrix}$	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	0,9985	0,9750	0,9392	0,9057	0,8772	0,8534	0,8332	0,8159	0,8010	0,7880	0,7341	0,6602	0,5813	0,5000
3	0,9669	0,8709	0,7977	0,7457	0,7071	0,6771	0,6530	0,6333	0,6167	0,6025	0,5466	0,4748	0,4031	0,3333
4	0,9065	0,7679	0,6841	0,6287	0,5895	0,5598	0,5365	0,5175	0,5017	0,4884	0,4366	0,3720	0,3093	0,2500
5	0,8413	0,6838	0,5931	0,5441	0,5065	0,4783	0,4564	0,4387	0,4241	0,4118	0,3645	0,3066	0,2513	0,2000
6	0,7808	0,6161	0,5321	0,4803	0,4447	0,4194	0,3980	0,3817	0,3682	0,3568	0,3135	0,2612	0,2119	0,1667
7	0,7271	0,5612	0,4800	0,4307	0,3974	0,3726	0,3535	0,3384	0,3299	0,3154	0,2756	0,2278	0,1833	0,1429
8	0,6798	0,5157	0,4377	0,3910	0,3595	0,3362	0,3185	0,3043	0,2926	0,2829	0,2462	0,2022	0,1616	0,1250
9	0,6385	0,4775	0,4027	0,3584	0,3286	0,3067	0,2901	0,2768	0,2659	0,2568	0,2226	0,1820	0,1446	0,1111
10	0,6020	0,4450	0,3733	0,3311	0,3029	0,2823	0,2666	0,2541	0,2439	0,2353	0,2032	0,1655	0,1308	0,1000
12	0,5410	0,3924	0,3264	0,2880	0,2624	0,2439	0,2299	0,2187	0,2098	0,2020	0,1737	0,1403	0,1100	0,0833
15	0,4709	0,3346	0,2758	0,2419	0,2195	0,2034	0,1911	0,1815	0,1736	0,1671	0,1429	0,1144	0,0889	0,0667
20	0,3894	0,2705	0,2205	0,1921	0,1735	0,1602	0,1501	0,1422	0,1357	0,1303	0,1108	0,0879	0,0675	0,0500
24	0,3434	0,2354	0,1907	0,1656	0,1493	0,1374	0,1246	0,1216	0,1160	0,1113	0,0942	0,0743	0,0567	0,0417
30	0,2929	0,1980	0,1593	0,1377	0,1237	0,1137	0,1061	0,1002	0,0958	0,0921	0,0771	0,0604	0,0457	0,0333
40	0,2370	0,1576	0,1259	0,1082	0,0968	0,0887	0,0827	0,0780	0,0745	0,0713	0,0595	0,0462	0,0347	0,0250
60	0,1737	0,1131	0,0895	0,0765	0,0682	0,0625	0,0583	0,0552	0,0520	0,0497	0,0411	0,0316	0,0234	0,0167
120	0,0998	0,0632	0,0495	0,0419	0,0371	0,0337	0,0312	0,0292	0,0279	0,0266	0,0218	0,0165	0,0120	0,0083
∞	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000

Fonte: Programa de incentivo à produção de material didático do SIAE.⁸⁹