

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA**

LUÍS CLAUDIO MARTINS

**Procedimentos analíticos baseados em imagens digitais e
microextração líquido-líquido para a determinação
de flavonóis em frutas**

Piracicaba

2023

LUÍS CLAUDIO MARTINS

**Procedimentos analíticos baseados em imagens digitais e
microextração líquido-líquido para a determinação
de flavonóis em frutas**

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

**Dissertação apresentada ao Centro de
Energia Nuclear na Agricultura da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Mestre em Ciências**

**Área de Concentração: Química na
Agricultura e no Ambiente**

**Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo
Piovezani Rocha**

Piracicaba

2023

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Martins, Luís Claudio

Procedimentos analíticos baseados em imagens digitais e microextração líquido-líquido para a determinação de flavonóis em frutas / Luís Claudio Martins; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2023.

103 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Fotometria 2. Frutas de clima temperado 3. Imagem digital
4. Química analítica verde 5. Separação líquido-líquido I. Título

CDU 543.06 : 634.1

Elaborada por:

Marília Ribeiro Garcia Henyei

CRB-8/3631

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

Dedico este trabalho à minha mãe, por me ensinar que, para alcançar aquilo que se deseja, é necessário muito esforço, empenho e compreensão.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Ao meu orientador, Prof. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha, por todos os ensinamentos compartilhados, paciência, conversas e conselhos ao longo desta caminhada. Por ajudar-me a enxergar que a ciência não é apenas uma peça, mas a chave para abrir portas com diversos caminhos.

À minha mãe (Sílvia) e meus irmãos (Paula e João), por me apoiarem em toda esta trajetória, que não acaba aqui, e me incentivarem a continuar nos momentos difíceis. À minha sobrinha (Isabella) pelos abraços carregados de carinho e felicidade ao me ver chegar.

Aos Professores Boaventura Reis, Alex Virgílio (CENA/USP), Wanessa Mattos (ESALQ/USP), Joaquim Nobrega (UFSCar), Severino Alencar (ESALQ/USP), Anna Flávia (Van Hall Larenstein, Holanda) pelos conhecimentos transmitidos, confiança e motivação durante a qualificação ou mesmo conversas descontraídas (virtuais ou presenciais) durante os cafés no CENA ou em eventos científicos.

À Samara Soares, pela amizade e companheirismo, por sempre buscar me ouvir e estar ao meu lado nos momentos em que precisei. Admiro seu trabalho e a cientista que é.

À Rita, Isabela, Gabriel e Raissa, pela amizade, risadas e momentos de descontração.

À Cláudia, Fátima, Liz e Sheila, pela amizade, conversas, apoio, sugestões e palavras de encorajamento, motivação e conforto ao longo deste tempo.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA-USP) e ao Laboratório de Química Analítica "*Henrique Bergamin Filho*", por toda a infraestrutura disponibilizada para o desenvolvimento deste trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pela concessão da bolsa no país, processo 2021/02309-5, e ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - Código de Financiamento 001.

**Enfim, a todos que participaram direta ou indiretamente deste trabalho,
os meus mais sinceros agradecimentos!**

“A vida é um eterno ensinar, por onde passastes sempre deixarás partes de ti espalhadas, para se um dia precisar voltar, perceberá que não perdestes nada, apenas ganhou”

Luís Claudio Martins

RESUMO^{1 2}

MARTINS, L.C. **Procedimentos analíticos baseados em imagens digitais e microextração líquido-líquido para a determinação de flavonóis em frutas.** 2023. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Os flavonoides são metabólitos secundários encontrados em plantas, responsáveis por sua defesa e sinalização sob condições de estresse. Os flavonóis são uma das classes mais representativas, devido às propriedades antioxidantes e benefícios à saúde, sendo amplamente encontrados em frutas e vegetais. *Berries* são fontes de compostos bioativos, dentre eles antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos. Procedimentos analíticos para a quantificação destas espécies geralmente exploram a espectrofotometria de absorção molecular no UV-vis, após a formação de complexos com Al(III) (flavonoides totais) ou a quantificação individual por cromatografia líquida acoplada a detectores espectrofotométricos ou espectrômetros de massa. Embora usuais, procedimentos espectrofotométricos carecem de seletividade, enquanto os cromatográficos demandam de equipamentos de alto custo e consomem elevadas quantidades de solventes orgânicos. Visando alternativas mais acessíveis, práticas, seletivas e baseadas na química verde, a presente dissertação apresenta o desenvolvimento de dois métodos analíticos para a determinação de flavonóis totais em *berries* (amora-preta, framboesa, mirtilo e morango) baseados em microextração por efeito *salting-out* (SALLME) e fotometria por imagens digitais. O método I baseou-se na extração dos flavonóis com acetonitrila, com simultânea separação de espécies mais polares (e.g. antocianinas) e posterior microextração em fase aquosa dos complexos formados com Al(III) para a separação de espécies menos polares. O método II consistiu na extração com etanol e posterior SALLME dos flavonóis com acetato de etila para a separação das antocianinas. Em ambos os procedimentos foi utilizada a câmera de um *smartphone* e software/aplicativos de acesso livre para a aquisição e conversão das imagens digitais no sistema RGB. As medidas foram baseadas na intensidade da radiação refletida medida no canal B, que corresponde à cor complementar do produto de medida. Para o método I, o método de calibração por adição de padrão foi aplicado para contornar efeito de matriz, sendo que respostas lineares foram obtidas de 1,7 a 10,0 mg L⁻¹ equivalente em quercetina (EQ). O coeficiente de variação (CV, n = 10) e o limite de detecção (LOD, 95% de confiança) foram estimados em 3,1% e 0,5 mg L⁻¹ EQ. O procedimento requer apenas 105 µg de Al(III), 14,6 mg NaCl e 1,2 mL acetonitrila e gera ca. 1,5 mL de resíduo por determinação. No método II, as recuperações de quercetina (1,0 a 2,0 mg L⁻¹) variaram de 90±3% a 125±2%. Resposta linear foi obtida de 0,3 a 5,0 mg L⁻¹ EQ, com CV (n = 10) de 3,9% e LOD de 0,1 mg L⁻¹ EQ. Neste procedimento,

¹ MARTINS, L. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Digital-image photometry and salting-out assisted liquid-liquid microextraction for determination of flavonols in berries. **J. Food Compost. Anal.**, v. 123, p. 105515, 2023.

² MARTINS, L. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Digital-image eco-friendly spot test with liquid-liquid microextraction for selective determination of flavonols in berries. **Microchem. J.**, v. 193, p. 109207, 2023.

foram consumidos 70 µg de Al(III), 142 mg de Na₂SO₄, 9,2 µL de HCl e 2 mL de acetato de etila por determinação, gerando ca. 15 mL de resíduo, composto por água e etanol. Os resultados obtidos pelos procedimentos propostos foram concordantes ao nível de 95% de confiança com o procedimento espectrofotométrico de referência. As propostas apresentam-se como alternativas eficientes, de baixo custo e ambientalmente amigáveis para a determinação de flavonóis em *berries*.

Palavras-chave: *Berries*. Flavonóis. *Salting-out*. Fotometria. Compostos bioativos.

ABSTRACT^{1 2}

MARTINS, L.C. **Analytical procedures based on digital images and liquid-liquid microextraction for the determination of flavonols in fruits.** 2023. 103 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2023.

Flavonoids are secondary plant metabolites, responsible for their defense and signaling under stress conditions. The flavonols are one of the most representative classes, due to their antioxidant properties and health benefits, which are widely found in fruits and vegetables. Berries are source of bioactive compounds, including anthocyanins, flavonols, and phenolic acids. Analytical procedures for quantification of these species are generally based on UV-vis absorption spectrophotometry after formation of Al(III) complexes (total flavonoids) or individual quantification by liquid chromatography coupled with either spectrophotometric or mass spectrometric detectors. The spectrophotometric procedures lack selectivity, whereas the chromatographic ones demand high-cost equipment and consume high amounts of organic solvents. Aiming at more accessible, practical, selective, and greener alternatives, this Dissertation deals with the development of two analytical methods for the determination of total flavonols in berries (blackberry, raspberry, blueberry, and strawberry) based on salt-assisted liquid-liquid microextraction (SALLME) and digital-image photometry. The first method was based on flavonol extraction with acetonitrile for the separation of more polar species (e.g. anthocyanins), followed by SALLME of the Al(III) complexes to the aqueous phase, thus separating the analytes from less polar species. Method II exploited extraction with ethanol and subsequent SALLME with ethyl acetate for separation of the flavonols from anthocyanins. In both procedures, a smartphone camera and free software/applications were used for the acquisition and conversion of digital images into the RGB color system. Measurements were based on the intensities of the reflected radiation taken as channel B values, which corresponds to the complementary color of the measurement product. For method I, the standard addition calibration method was applied to circumvent the matrix effect, a linear responses were obtained within 1.7-10.0 mg L⁻¹ quercetin equivalent (QE). Coefficient of variation (CV, n = 10) and detection limit (LOD, 95% confidence level) were estimated at 3.1% and 0.5 mg L⁻¹ QE, respectively. The procedure requires as low as 105 µg Al(III), 14.6 mg NaCl, 1,2 mL acetonitrile and generates ca. 1.5 mL residue per determination. Method II yielded quercetin recoveries (1.0 to 2.0 mg L⁻¹) ranging from 90±3% to 125±2%, linear response from 0.3 to 5.0 mg L⁻¹ QE, CV (n = 10) of 3.9% and LOD of 0.1 mg L⁻¹ QE. In this procedure, 70 µg Al(III), 142 mg Na₂SO₄, ca. 9.2 µL of HCl, and 2 mL of ethyl acetate were consumed, generating ca. 15 mL of waste per determination, composed of water and ethanol. The results obtained by the proposed approaches agreed with the spectrophotometric reference procedure at the 95% confidence level. Both approaches are efficient, cost-

¹ MARTINS, L. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Digital-image photometry and salting-out assisted liquid-liquid microextraction for determination of flavonols in berries. **J. Food Compost. Anal.**, v. 123, p. 105515, 2023.

² MARTINS, L. C.; SOARES, S.; ROCHA, F. R. P. Digital-image eco-friendly spot test with liquid-liquid microextraction for selective determination of flavonols in berries. **Microchem. J.**, v. 193, p. 109207, 2023.

effective, and environmental friendly alternatives for the determination of flavonols in berries.

Keywords: Berries. Flavonols. Salting-out. Photometry. Bioactive compounds.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos fenólicos e concentrações em <i>berries</i>	27
Tabela 2. Exemplos de aplicações de métodos espectrofotométricos e fluorimétrico para a determinação de flavonoides.	37
Tabela 3. Exemplos de aplicações de métodos cromatográficos para a determinação de flavonoides.	40
Tabela 4. Planejamento fatorial completo para a avaliação do procedimento de microextração do complexo Al(III)-QE.....	58
Tabela 5. ANOVA para avaliação do procedimento de microextração.....	59
Tabela 6. Recuperações de quercetina adicionada em extratos de <i>berries</i>	67
Tabela 7. Flavonóis totais em <i>berries</i> determinados pelo procedimento proposto e de referência.	67
Tabela 8. Efeito do tempo de reação sob a resposta analítica.....	78
Tabela 9. Recuperações de quercetina em amostras de <i>berries</i>	80
Tabela 10. Determinação de flavonóis totais em amostras de <i>berries</i> pelos procedimentos proposto e de referência, com e sem o <i>clean-up</i> de amostra com acetato de etila.	81
Tabela 11. Características analíticas de procedimentos para a determinação de flavonoides em alimentos e bebidas.	84
Tabela 12. Parâmetros considerados no índice de procedimento analítico verde (GAPI).	86

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Principais compostos bioativos produzidos através da via do ácido chiquímico.	23
Figura 2. Estruturas químicas dos flavonoides.....	24
Figura 3. Possíveis sítios de ligação da quercetina a íons metálicos.....	25
Figura 4. Bandas de absorção da quercetina.....	35
Figura 5. Representação dos sistemas de cores RGB e CMY.....	42
Figura 6. Etapas do procedimento de determinação de flavonóis pelo método de microextração por efeito <i>salting-out</i>	48
Figura 7. Etapas do procedimento de microextração de flavonóis com acetato de etila	51
Figura 8. Espectros de absorção no UV-Vis de quercetina, mirecetina, morina e canferol e os respectivos complexos com Al(III).	53
Figura 9. Separação de fases utilizando com solução de quercetina em ACN e Al(III) com NaCl; Mg ₂ SO ₄ e NaCl + Mg ₂ SO ₄	54
Figura 10. Método de Job para a determinação da estequiometria do complexo Al(III)-QE.....	55
Figura 11. Imagens do extrato etanólico de amora-preta (a) e extrato após SALLME realizado sem e com a adição de Al(III) para avaliar a formação do complexo com antocianinas.	56
Figura 12. Extratos de amostras liofilizadas de amora-preta obtidos por sonicação utilizando diferentes solventes: etanol, metanol, acetonitrila e acetona.	57
Figura 13. Extratos de amora-preta (amostra <i>in natura</i>) obtidos por sonicação utilizando diferentes solventes: etanol, metanol, acetonitrila e acetona.	57
Figura 14. Extratos em ACN obtidos de <i>berries</i> liofilizadas.....	58
Figura 15. Gráfico de contorno para os volumes de acetonitrila e de solução reagente.	60
Figura 16. Efeito do volume de extrato em ACN sob o sinal analítico.....	62
Figura 17. Efeito de ACG na inclinação das curvas de calibração de quercetina.	63
Figura 18. Efeito do pH da solução tampão sobre a formação de complexos de Al(III) com ácido clorogênico e quercetina.	64

Figura 19. Efeito do volume de solução reagente/extratora sobre o sinal analítico..	65
Figura 20. Estruturas das antocianinas em diferentes valores de pH.	69
Figura 21. Efeito do volume de água na partição dos flavonóis usando extrato de amora-preta adicionado de quercetina; Imagem após secagem do sobrenadante e reação com Al(III) em tampão acetato e sinais analíticos referentes à formação de complexo Al(III)-QE e na presença de antocianinas.	71
Figura 22. Efeito dos volumes de solução de Na ₂ SO ₄ e HCl na partição dos flavonóis no sistema água-etanol/acetato de etila.	73
Figura 23. Efeito do volume de solução padrão de quercetina na resposta analítica.	75
Figura 24. Efeito da concentração do tampão na resposta analítica.	76
Figura 25. Efeito da concentração de Al(III) na formação do complexo com quercetina.	77
Figura 26. Efeito do tempo de reação para formação do complexo Al(III)-QE.....	78
Figura 27. Cromatogramas do extrato etanólico de amora-preta obtido sem e com o procedimento de preparo de amostra.	82
Figura 28. GAPI dos procedimentos explorando a extração com acetonitrila e acetato de etila.	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	–	Acetonitrila
ATPS	–	Sistema aquoso bifásico, do inglês <i>Aqueous two-phase system</i>
CMF	–	Complexo metal-flavonoide
CMY	–	Ciano, magenta e amarelo, do inglês <i>Cyan, Magenta and Yellow</i>
DLLME	–	Microextração líquido-líquido dispersiva, do inglês <i>Dispersive liquid-liquid microextraction</i>
dSPE	–	Extração com fase sólida dispersiva, do inglês <i>Dispersive solid phase extraction</i>
FE	–	Fase estacionária
FM	–	Fase móvel
FT-NIR	–	Espectroscopia no infravermelho próximo com transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier transform near infra-red spectroscopy</i>
GC	–	Cromatografia gasosa, do inglês <i>Gas chromatography</i>
HPLC	–	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
HSL	–	Matiz, Saturação e Luminosidade, do inglês <i>Hue, Saturation and Lightness</i>
HSV	–	Matiz, Saturação e Valor, do inglês <i>Hue, Saturation and Value</i>
LED	–	Diodo emissor de luz, do inglês <i>Light emitting diode</i>
LOD	–	Limite de detecção, do inglês <i>Limit of detection</i>
LLE	–	Extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-liquid extraction</i>
LLME	–	Microextração líquido-líquido, do inglês <i>liquid-liquid microextraction</i>
LTP-LLE	–	Extração por partição líquido-líquido a baixa temperatura, do inglês <i>Low temperature partitioning liquid-liquid extraction</i>
MAE	–	Extração assistida por micro-ondas, do inglês <i>Microwave assisted extraction</i>
MEPS	–	Microextração por sorvente imobilizado, do inglês <i>Microextraction packet sorbent</i>
MS	–	Espectrômetro de massa, do inglês <i>Mass spectrometry</i>
MSPD	–	Dispersão de matriz em fase sólida, do inglês <i>Matrix solid-phase dispersion</i>
PDA	–	Detector de arranjo de diodos, do inglês <i>Photodiode array detector</i>

- QuEChERS – Rápido, fácil, barato, eficaz, robusto e seguro, do inglês *Quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*
- RGB – Vermelho, Verde e Azul, do inglês *Red-Green-Blue*
- ROI – Região de interesse, do inglês *Region of interest*
- SALLE – Extração líquido-líquido assistida por sal, do inglês *Salt assisted liquid-liquid extraction*
- SALLME – Microextração líquido-líquido assistida por sal, do inglês *Salt assisted liquid-liquid microextraction*
- SFE – Extração por fluido supercrítico, do inglês *Supercritical fluid extraction*
- SPE – Extração em fase sólida, do inglês *Solid phase extraction*
- SPME – Microextração em fase sólida, do inglês *Solid phase microextraction*
- t_R – Tempo de retenção
- UAE – Extração assistida por ultrassom, do inglês *Ultrasound assisted extraction*

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
1.1.	Compostos bioativos	21
1.1.1.	<i>Os flavonoides</i>	23
1.2.	<i>Berries</i> como fontes de compostos bioativos	26
1.3.	Métodos de extração de compostos bioativos	29
1.3.1.	<i>Microextração</i>	31
1.4.	Métodos analíticos para a quantificação de flavonoides	33
1.4.1.	<i>Procedimentos espectrofotométricos e fluorimétricos</i>	34
1.4.2.	<i>Procedimentos cromatográficos</i>	38
1.5.	Fotometria por imagens digitais	41
2.	OBJETIVOS	45
3.	PARTE EXPERIMENTAL.....	46
3.1.	Procedimento analítico explorando extração em acetonitrila e SALLME do complexo metal-flavonol.....	46
3.1.1.	<i>Equipamentos e acessórios</i>	46
3.1.2.	<i>Amostras, reagentes e soluções</i>	46
3.1.3.	<i>Determinação da estequiometria do complexo</i>	47
3.1.4.	<i>Procedimento</i>	47
3.1.5.	<i>Otimização multivariada</i>	48
3.1.6.	<i>Procedimento de referência</i>	49
3.2.	Procedimento ambientalmente amigável para a determinação seletiva de flavonóis	49
3.2.1.	<i>Equipamentos e acessórios</i>	49
3.2.2.	<i>Amostras, reagentes e soluções</i>	49
3.2.3.	<i>Procedimento</i>	50

4.	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4.1.	Procedimento analítico explorando extração em acetonitrila e SALLME do complexo metal-flavonol	52
4.1.1.	<i>Aspectos gerais</i>	52
4.1.2.	<i>Avaliação da extração de flavonóis</i>	55
4.1.3.	<i>Otimização</i>	58
4.1.4.	<i>Características analíticas</i>	65
4.2.	Procedimento ambientalmente amigável para a determinação seletiva de flavonóis.....	68
4.2.1.	<i>Aspectos gerais</i>	68
4.2.2.	<i>Otimização</i>	70
4.2.3.	<i>Características analíticas</i>	79
4.3.	Comparação dos procedimentos analíticos desenvolvidos	83
5.	CONCLUSÕES.....	89
	REFERÊNCIAS	90

1. INTRODUÇÃO

1.1. Compostos bioativos

Compostos bioativos, também chamados de fitoquímicos, são substâncias capazes de provocar alterações fisiológicas no organismo, podendo ser classificadas como nutracêuticas, que promovem benefícios à saúde humana, e.g. prevenção contra doenças crônicas, ou tóxicas, induzindo processos adversos, e.g. alergia e intoxicações alimentares (1).

As plantas são capazes de sintetizar uma diversidade de compostos bioativos que são responsáveis pela manutenção de suas funções vitais, adaptativas e de reprodução no meio ambiente (2). Através de diferentes vias, metabólitos primários e secundários são produzidos para atender às necessidades desses organismos. Embora a biossíntese destes compostos não esteja completamente elucidada, o metabolismo primário é responsável pela formação das reservas energéticas, aminoácidos, nucleotídeos e lipídios, ou seja, substâncias essenciais para o funcionamento do organismo. Essas são produzidas geralmente de modo similar por animais, bactérias e plantas (3). Já os compostos provindos do metabolismo secundário são caracterizados principalmente por conferir proteção contra infecções (virais, bacterianas e fúngicas), resistência às condições adversas do meio ambiente (e.g. alta incidência de radiação ultravioleta) e para atrair animais e insetos polinizadores. Os compostos provindos do metabolismo secundário podem ser divididos em três grupos: os alcaloides e glucosinolatos; terpenoides ou isoprenoides e os compostos fenólicos (3).

Os alcaloides são compostos nitrogenados sintetizados a partir de aminoácidos como a tirosina e o triptofano (4). Esses compostos são formados por um anel heterocíclico contendo átomos de nitrogênio e oxigênio, com exceção da nicotina, que não apresenta oxigênio em sua estrutura (5). Os alcaloides apresentam efeito tóxico para alguns animais, porém são utilizados na medicina chinesa, indiana e islâmica devido às suas propriedades sedativas, analgésicas, antissépticas e antimaláricas (5,6).

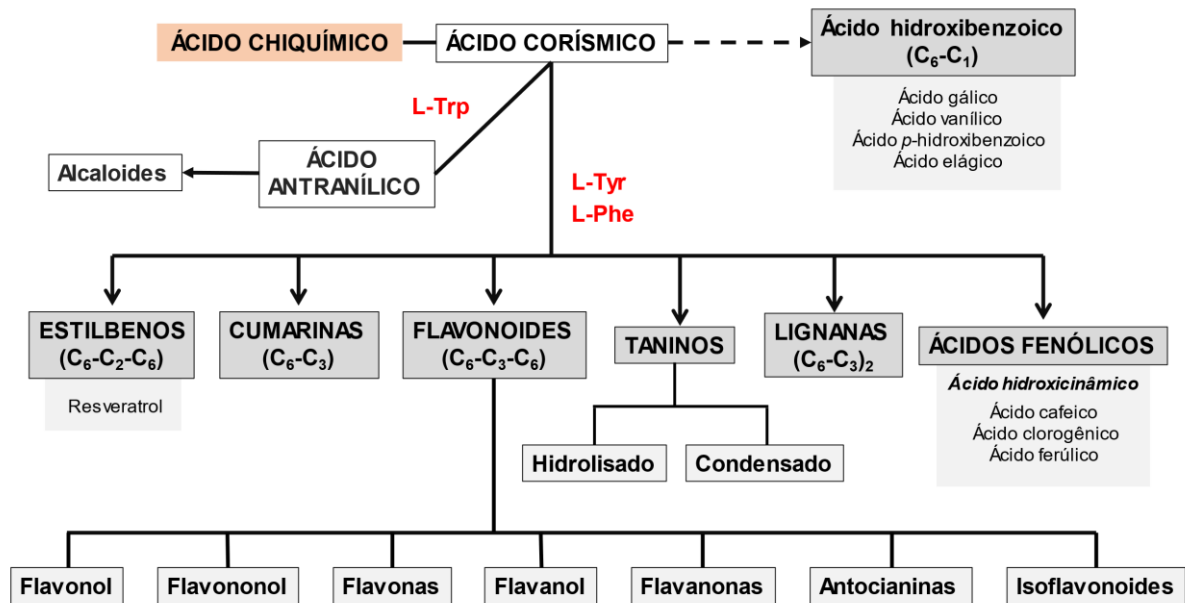
Glicosinolatos são compostos aniônicos naturais encontrados principalmente em plantas da ordem Brassicales (e.g. repolho, couve e brócolis), como também em rabanete e agrião, sendo responsáveis pelo sabor amargo e odor pungente destes vegetais (7). Assim como os alcaloides, estes compostos são sintetizados por meio

da conversão de aminoácidos (e.g. fenilalanina, valina e isoleucina) (7). Estruturalmente, são caracterizados por um núcleo sulfatado de isotiocianato, conjugado com açúcares (e.g. glicose) e ligado a um grupamento que pode conter ligações duplas, ligações oxo-, hidroxila-, metoxi-, carbonila- ou dissulfeto- e originar diversas moléculas (8). Nos alimentos, com a liberação da enzima mirosinase, provocada pelo rompimento da parede celular durante o cozimento, ocorre a formação de diferentes produtos como nitrilos, tiocianatos e, principalmente, os isotiocianatos ($R-N=C=O$), que estão associados a efeitos benéficos ao organismo, como melhoria de transtornos cardiometabólicos, neurológicos, psiquiátricos e musculares (9,10).

Os terpenos, também chamados de terpenoides e isoprenos, constituem uma ampla classe de compostos bioativos que são sintetizados pelas plantas. Esses compostos são classificados como metabólitos primários ou, quando sua produção é limitada a determinada linhagem ou espécie, como metabólitos secundários (11). Os terpenoides podem variar de uma (hemiterpenoide) até mais que oito unidades de isoprenos (C_5H_8), nos politerpenoides (12). Dentre os terpenoides mais conhecidos estão o D-limoneno (monoterpenoide), encontrado em óleos essenciais de frutas cítricas e utilizado na prevenção de câncer de fígado e mama, e os carotenoides e xantofilas (tetraterpenoides), como o licopeno e astaxantina, que apresentam alta atividade antioxidante (ca. 10 vezes maior que a vitamina E) (13–15).

Os compostos fenólicos são produzidos por plantas e fungos e compreendem um dos maiores grupos de metabólitos secundários, com ampla diversidade estrutural e funcional. Compostos fenólicos simples até moléculas altamente polimerizadas (massa molar > 1000 Da) são encontrados abundantemente em frutas e vegetais (16). Nestes organismos, os compostos fenólicos são biossintetizados pelo metabolismo dos fenilpropanoides pela via do ácido chiquímico, responsável pela produção de moléculas aromáticas, como os aminoácidos L-fenilalanina e L-tirosina, dos precursores dos ácidos fenólicos (e.g. ácidos hidroxicinâmicos (C_6-C_3) e hidroxibenzóicos (C_6-C_1)), flavonoides, estilbenos, cumarinas, lignanas e taninos, conforme ilustrado na Figura 1 (17,18).

Figura 1. Principais compostos bioativos produzidos através da via do ácido chiquímico. Na imagem, os aminoácidos triptofano (L-Trp), tirosina (L-Tyr) e fenilalanina (L-Phe) são destacados em vermelho.

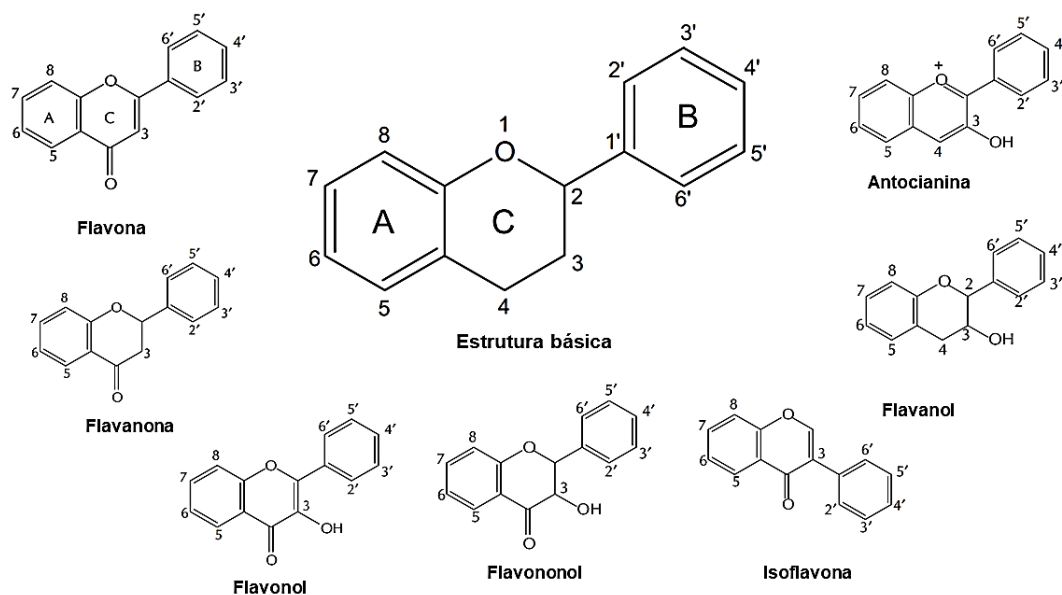


Adaptado de Santos-Sánchez *et al.* (18) e Shahidi e Ambigaipalan (19).

Dentre os compostos fenólicos, os ácidos fenólicos e flavonoides têm sido bastante estudados, devido ao potencial antioxidante e aplicação na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis (20,21). Além disso, os flavonoides podem ser aplicados nas indústrias alimentícia, como corantes naturais e na produção de embalagens inteligentes (antocianinas), e farmacêutica para a produção de suplementos e medicamentos (22,23).

1.1.1. Os flavonoides

Flavonoides são um grupo de metabólitos secundários de estrutura básica formada por 15 átomos de carbono, distribuídos em três anéis (A, B e C), onde A e B correspondem a anéis benzênicos ligados por um heterociclo benzo- γ -pirona (anel C) (Figura 2). Estes compostos se destacam pelas mais de 6000 espécies já identificadas, sendo sua produção afetada pelas condições ambientais, como a disponibilidade de água, a intensidade de radiação (UV e visível), a temperatura e pelo ataque de pragas (insetos, vírus e bactérias) (24–26).

Figura 2. Estruturas químicas dos flavonoides.

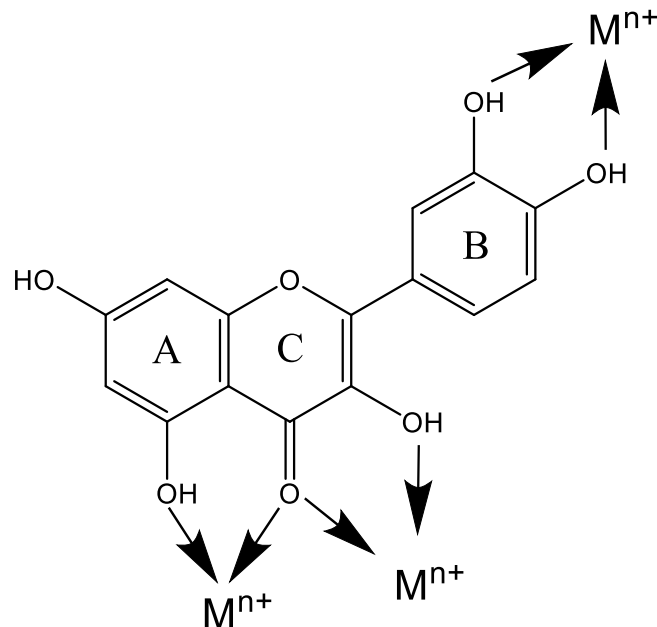
Adaptada de Parkin, Fennema e Damodaran (1).

Quimicamente, os flavonoides podem ocorrer na forma aglicona (não ligada a açúcar), glicosilada (ligada a açúcar) e derivados metilados, sendo encontrados nas plantas predominantemente na forma glicosilada (27). Dependendo de alterações estruturais, especialmente no anel C, os flavonoides podem ser subdivididos em diferentes grupos, como: isoflavona (anel B na posição 3 do anel C); flavona, flavonona, flavonol, flavonol, flavanol e antocianinas (grupos químicos e conformações diferentes na posição 3 e 4 do anel C) e chalcona (anel C aberto) (26,27).

Devido à diversidade estrutural e às diferentes características, os flavonoides têm sido aplicados como agentes antioxidantes, antimicrobianos e anti-inflamatórios, podendo auxiliar na prevenção de doenças cardiovasculares e agir como reguladores de sintomas da menopausa (26,28). Há também aplicações industriais, como na copigmentação de alimentos e bebidas (25). Dentre essas funcionalidades, a mais estudada é a ação antioxidante dos flavonoides, relacionada aos grupos hidroxila fenólicos que permitem eliminar diretamente os radicais livres e também quelar metais de transição, principalmente ferro, que contribuem para o processo de estresse oxidativo no organismo (28,29).

A habilidade dos flavonoides de complexar íons metálicos deve-se a três sítios quelantes - o 3-hidroxi-4-cetona localizado no anel C, o 5-hidroxi no anel A e o 4-carbonil no anel C ou o 3'-4'-dihidroxi no anel B (30), conforme ilustra a Figura 3, para a quercetina. A formação dos complexos metal-flavonoide (CMF) resulta em um novo composto com características que diferem do flavonoide livre, incluindo aumento da capacidade antioxidante, atividade antiproliferativa de células cancerígenas, maiores efeitos antimicrobianos e antivirais (31). Frequentemente, também se observam deslocamentos batocrômicos dos espectros de absorção e a formação de produtos coloridos (29,32,33).

Figura 3. Possíveis sítios de ligação da quercetina a íons metálicos (M).



Fonte: Kasprzak, Erxlebenc e Ochockia (30).

A disponibilidade de cada sítio de ligação e a estabilidade do CMF dependem do tipo de flavonoide e íon metálico, da relação estequiométrica metal-ligante, da polaridade do solvente, da força iônica e do pH, que está associado à desprotonação dos grupos hidroxila e refletem na constante de formação condicional (Kf) (30,33).

Quercetina e rutina, flavonoides usualmente encontrados em frutas e legumes como cítricos, *berries*, cebola, pimentas e outros temperos, são amplamente estudados e possuem capacidade de quelar diversos íons metálicos, como Al(III), Co(II), Cr(III), Cu(II), Fe(II), Fe(III) e Zn(II). Foi relatado que a capacidade antioxidante

dos complexos Fe(II)-quercetina e Zn(II)-rutina podem ser 32% e 25% superiores às dos correspondentes flavonóis livres (32,34,35).

1.2. **Berries como fontes de compostos bioativos**

Frutas e vegetais apresentam quantidades abundantes de nutrientes que auxiliam na manutenção e qualidade de vida dos seres humanos. Estudos epidemiológicos sugerem que dietas ricas nestes alimentos reduzem riscos de desenvolvimento de doenças crônicas como doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doença de Alzheimer, catarata e disfunções relacionadas à idade (36). Estes benefícios estão associados não apenas aos macronutrientes (carboidratos, proteínas, lipídios e fibras alimentares) e micronutrientes (vitaminas e sais minerais), mas também a numerosos fitoquímicos (e.g. flavonoides, ácidos fenólicos e carotenoides) que contribuem ativamente para as condições fisiológicas do organismo (37).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o consumo mínimo recomendado de frutas e vegetais é de 400 g por dia (38), no entanto, na maioria dos países, o consumo encontra-se abaixo do recomendado. Este fator é atribuído à indisponibilidade, inacessibilidade, cultura alimentar, competição com outras alternativas (e.g. alimentos processados e ultraprocessados), segurança alimentar e políticas nacionais (39). No entanto, mesmo abaixo do recomendado, a participação das frutas e legumes na dieta da população tem aumentado ano após ano. De acordo com Shahbandeh (40), em 2021, foram produzidos mais de 900 milhões de toneladas de frutas, quantidade 63% superior em comparação ao ano 2000. Neste cenário, além das grandes *commodities* (e.g. citros, banana e maçã), as *berries* têm ocupado uma parcela significativa da produção mundial, sendo esperado um crescimento de 3,5% no mercado norte americano no período 2022-2027 (41).

Berries são pseudofrutos pequenos e delicados, oriundos de regiões de clima temperado, reconhecidas pela alta quantidade de nutrientes e fitoquímicos, incluindo eficientes agentes antioxidantes e substâncias que protegem contra doenças degenerativas (42,43). Podem ser consumidas na forma fresca ou processada (e.g. sucos, geleias e desidratadas) e, dentre as variedades existentes, o morango (*Fragaria ananassa*, *strawberry*), mirtilo (*Vaccinium corymbosum*, *blueberry*), amora-preta (*Rubus* sp., *blackberry*) e framboesa (*R. ideaus*, *raspberry*) são as mais

produzidas (44). Elas apresentam uma ampla diversidade de polifenóis, como os flavonoides (e.g. antocianinas e flavonóis), estilbenos, taninos (condensados e hidrolisados) e ácidos fenólicos, que podem variar em decorrência do genótipo da planta, condições de crescimento, estágio de desenvolvimento, condições ambientais, e também pelas tensões bióticas e abióticas (45,46). Na Tabela 1 são apresentados os compostos fenólicos mais comuns e quantidades encontradas em *berries*.

Tabela 1. Compostos fenólicos e concentrações^a em *berries*.

Composto fenólico	Morango	Mirtilo	Amora-preta	Framboesa
	mg / 100 g de fruta fresca			
(-)-Epicatequina	0,008 - 0,02	1,11	2,7 - 18,1	0,3 - 8,3
(+)-Catequina	1,6 - 18,7	NI	0,7 - 0,8	0,6 - 1,0
Ácido 4-hidroxibenzoico-4-O-glicosídeo	0,6 - 3,4	0,5 - 0,6	0,5 - 2,1	NI
Ácido 4-hidroxibenzóico	7,50	NI	NI	2,60
Ácido cafeico	0,04 - 0,2	3,4 - 22,3	1,4 - 3,6	0,4 - 0,5
Cianidina 3-O-glicosídeo	0,63 - 6,67	0,4 - 3,7	85,2 - 190,6	14,9 - 30,5
Ácido elágico	37,0 - 58,6	2,2 - 6,7	30,0 - 33,8	33,1 - 160,0
Ácido trans-ferúlico	NI	2,04	3,0 - 3,5	NI
Ácido gálico	NI	2,0 - 4,8	4,1 - 6,4	NI
Canferol	0,6 - 1,6	1,5 - 3,2	0,09 - 0,3	0,01 - 0,03
Morina	0,06	NI	NI	NI
Mirecetina	3,4 - 99,4	2,7 - 7,0	5,9 - 63,6	NI
Ácido p-cumárico	0,7 - 4,1	3,3 - 7,2	0,4 - 2,1	0,006 - 1,6
Quercetina	0,3 - 1,0	1,7 - 14,6	0,87 - 3,5	0,93 - 1,8
Resveratrol	0,35	NI	NI	NI

^a De acordo com a base de dados Phenol-Explorer (47).

NI – Não informado.

No Brasil, o consumo de *berries* se popularizou como alimento funcional, sendo as áreas de clima tropical e subtropical do país destinadas ao cultivo, como o Rio Grande do Sul, Santa Catarina e, em menor proporção, São Paulo, Minas Gerais e Paraná (48). Devido às altas temperaturas, muitas cultivares tiveram que ser adaptadas como, por exemplo, o mirtilo. A maior parte das cultivares plantadas pertencem ao grupo *rabbiteye*, em relação à *highbush*, devido à maior resistência ao calor. No entanto, ao menos 200 h de baixas temperaturas/ano são necessárias para produção adequada (49).

O morango é a principal *berry* produzida no país (35,7 ton/ha), sendo sua produção principalmente relacionada aos pequenos produtores e à agricultura familiar (50). Esta fruta possui uma quantidade considerável de fitoquímicos com efeitos anti-inflamatórios, especialmente para indivíduos com diabetes tipo II e elevados níveis lipídicos no sangue (51).

O interesse pelos frutos da amoreira (*Rubus* spp.) tem aumentado nos últimos anos, devido à expressiva quantidade de compostos fenólicos, carotenoides e, principalmente, de antocianinas que podem servir como corantes naturais para produtos lácteos, geleias e doces em calda (52,53). No Brasil, a cultivar Tupi lançada pelo programa de melhoramento da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA), em 1988, é hoje considerada uma das mais importantes em termos produtivos e pela qualidade de seus frutos (52). Os teores de compostos bioativos produzidos pela cultivar Tupi são comparáveis com o de outras cultivares, como a Brazos e Guarini, podendo variar de 148-325 mg 100 g⁻¹, 60-95 mg 100 g⁻¹ e 310-371 mg 100 g⁻¹ de fenólicos totais, flavonoides e antocianinas, respectivamente (52).

As framboesas, assim como as demais *berries*, são ricas em fitoquímicos e principalmente em vitamina C: o consumo de apenas 123 g da fruta fornece 32% da necessidade diária de vitamina C (54). Devido às condições subtropicais do Brasil, a framboeseira possui dificuldades para adaptação. Entretanto, na região do sul de Minas Gerais, têm sido observados ganhos significativos de produção das cultivares framboesa-negra (*Rubus niveus* Thunberg) e amarela (*R. idaeus*) (55).

Embora as *berries* mencionadas sejam as mais conhecidas e sua produção represente uma parcela significativa do mercado nacional e internacional, o Brasil é um grande produtor de variedades nativas e exóticas com potencial econômico. Algumas representantes das *berries* brasileiras são o açaí (*Euterpe oleracea*), camu-camu (*Myrciaria dubia*), jabuticaba (*Myrciaria cauliflora*), pitanga (*Eugenia uniflora* L) e a uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess) (56,57). Essas espécies destacam-se em decorrência de suas características sensoriais, nutricionais e agroindustriais, especialmente por serem fontes de antioxidantes naturais (57).

1.3. Métodos de extração de compostos bioativos

A demanda por alimentos nutritivos que atendam às expectativas dos consumidores por saudabilidade, praticidade e palatabilidade tem aumentado (58). Os compostos polifenólicos, além de contribuir para os aspectos sensoriais nos alimentos e bebidas, podem também auxiliar no combate a microrganismos e na prevenção contra infecções respiratórias causadas por vírus, tal como o SARS-CoV-2 (COVID-19) (59,60). Para atender à demanda por produtos funcionais ou naturais, é necessária a incorporação dos alimentos (*in natura* ou processados) ou extratos que contenham os compostos de interesse na alimentação. Nesse segundo caso, os compostos bioativos podem ser extraídos de amostras líquidas utilizando solventes adequados. No entanto, para amostras sólidas, diversas etapas preliminares são necessárias, como secagem e moagem, para diminuir a umidade e o tamanho de partículas e, conseqüentemente, garantir a homogeneidade e aumentar a eficiência de extração (61). Além disso, quando estas etapas não são realizadas de modo controlado, e.g. com tempo e temperatura adequados, esses compostos podem ser facilmente degradados (62).

Para a extração sólido-líquido, diversos procedimentos podem ser utilizados, como a extração Soxhlet, maceração ou hidrodestilação (63). Estes procedimentos se baseiam na aplicação de diferentes tipos de solventes orgânicos ou água, podendo ou não serem realizados sob aquecimento (63). Entretanto, os maiores desafios destas técnicas são atrelados ao longo período de extração, utilização de solventes de alta pureza, baixa seletividade e riscos de decomposição térmica (64). Visando superar essas limitações, alternativas não-convencionais têm sido exploradas. Essas apresentam um potencial promissor para extração de compostos bioativos, pois permitem escalabilidade e se enquadram dentro dos preceitos da química verde (60,64). Dentre essas técnicas estão os procedimentos assistidos por ultrassom (em inglês, *Ultrasound Assisted Extraction*, UAE), por radiação micro-ondas (*Microwave Assisted Extraction*, MAE) e utilizando fluídos supercríticos (*Supercritical Fluid Extraction*, SFE).

A UAE explora ondas ultrassônicas (20 kHz a 100 kHz), que se propagam por um fluido, geralmente líquido, para aumentar a interação do solvente com o sólido. No processo, também são originadas bolhas de cavitação devido aos ciclos de compressão e rarefação que, ao longo do tempo, aumentam de tamanho até colapsar,

resultando em pequenas implosões altamente energéticas (500 atm e 5000 K), chamadas de *hot spots* (65). O colapso das bolhas de cavitação é capaz de promover a ruptura da parede celular do material e liberar os compostos da matriz para o solvente extrator. Parâmetros como temperatura e potência das ondas ultrassônicas podem favorecer a extração dos flavonoides, devido à diminuição da viscosidade e aumento na taxa de transferência de massa, além de resultar em colapsos mais energéticos com maior difusão para o solvente (66).

A extração assistida por radiação micro-ondas explora o efeito das ondas não ionizantes (de até 300 GHz) para a geração e transferência de calor, que são governadas pela rotação de dipolo e a condução iônica, provocadas pela mudança dos dipolos e deslocamento dos íons presentes no solvente em função da ação de um campo eletromagnético alternado (67). A frequência de 2,45 GHz, utilizada em equipamentos comerciais, provoca sucessivas alterações na direção desses dipolos da ordem de $4,9 \times 10^9$ vezes por segundo, produzindo calor ao se chocarem (67). Já a condução iônica está relacionada com a resistência da solução à migração dos íons presentes, resultando na liberação de energia térmica (68). Durante esses processos, a água do interior das células vegetais evapora, gerando elevadas pressões capazes de romper as paredes celulares e favorecer a extração para o solvente. A utilização de MAE tem como intuito promover extrações mais seletivas e com tempo reduzido em relação aos procedimentos convencionais (60). Além disso, devido aos efeitos não térmicos das micro-ondas, as extrações podem ser realizadas a menores temperaturas, minimizando a degradação de compostos termolábeis (69).

Os fluidos em estado supercrítico possuem propriedades físico-químicas distintas daqueles no estado normal, especialmente baixa viscosidade e alta difusividade, que favorecem a difusão através do material e extração dos compostos de interesse (70). Diversos solventes podem ser utilizados para SFE, no entanto, o dióxido de carbono (CO_2) é o mais aplicado por alcançar seu estado supercrítico em condições próximas à atmosférica (31,2 °C e 73 atm) e, assim, diminuir o gasto energético e evitar perdas de compostos por degradação térmica. Além disso, é um gás reconhecido como seguro e que favorece a associação com outras técnicas, como a cromatografia gasosa (71).

Adicionalmente, outros procedimentos têm procurado minimizar o consumo energético e substituir os solventes orgânicos por alternativas sustentáveis. A extração com água em estado subcrítico explora as alterações da constante dielétrica

do solvente, em função de mudanças na temperatura e pressão, favorecendo a maior extração dos compostos (72). Os solventes eutéticos profundos naturais (em inglês, *Natural Deep Eutectic Solvents*, NADES), são preparados a partir de componentes de fácil biodegradação e baixo custo como, por exemplo, o cloreto de colina e ácido cítrico, utilizados para a extração de antocianinas de bagaço de uva (60,73).

1.3.1. Microextração

As amostras de alimentos são complexas, visto que uma diversidade de compostos com características diferentes (e.g. polaridade e características ácido-base) podem ser encontrados. Neste sentido, para a quantificação de alguns compostos, particularmente para os polifenólicos, a etapa de preparo de amostras se faz necessária para a remoção ou minimização do efeito de interferentes que influenciem na exatidão analítica (74).

Extração líquido-líquido (do inglês, *Liquid-Liquid Extraction*, LLE), extração em fase sólida (*Solid Phase Extraction*, SPE) e suas variantes como extração em fase sólida dispersiva (*Dispersive Solid Phase Extraction*, dSPE) e por dispersão de matriz (*Matrix Solid Phase Dispersion*, MSPD), são usuais para a extração e pré-concentração na análise de alimentos. A LLE baseia-se na transferência de massa entre dois líquidos imiscíveis. Usualmente, os compostos de interesse, geralmente presentes em um solvente polar (e.g. água), são particionados para a fração orgânica, constituída por um solvente apolar ou moderadamente polar (e.g. clorofórmio, acetato de etila e éteres), devido à maior solubilidade nessa fase (75). Já a SPE incorpora um material adsorvente que proporciona a adsorção do analito ou mesmo dos potenciais interferentes, eluindo-os posteriormente com um solvente orgânico (61). Embora estas técnicas sejam usuais, tipicamente requerem elevado consumo de solventes, além de serem morosas sendo, em alguns casos, necessário repetir sucessivas vezes para alcançar o máximo de extração (76).

No intuito de simplificar e tornar mais sustentável o preparo de amostras, alternativas analíticas que minimizam o consumo de solvente e substituam solventes potencialmente tóxicos têm sido propostas (61,77). Dentre as abordagens miniaturizadas, a microextração em fase sólida (do inglês, *Solid Phase Microextraction*, SPME) é uma das mais populares, com ampla aplicação à análise de alimentos (61). Os princípios que governam a SPME são os mesmos da SPE e a

eficiência de extração está associada às características do material adsorvente e a sua afinidade com o analito, além do solvente e das condições para dessorção da fase sólida (78). Diversos tipos de materiais adsorventes podem ser utilizados, como a sílica funcionalizada, polímeros, carbono grafitizado ou poroso e os polímeros molecularmente impressos (78,79). Algumas variações da SPME podem incluir a fase sólida dispersa (QuEChERS) na amostra ou em cartucho (MEPS™). A extração usando QuEChERS (acrônimo em inglês para *quick, easy, cheap, effective, rugged and safe*) envolve a partição dos analitos para fração orgânica após adição de sais (e.g. NaCl e/ou MgCl₂) e posterior remoção de espécies interferentes com a adição de material adsorvente (e.g. C₁₈ ou amina primária secundária) (80). Já o MEPS™ (do inglês, *Microextraction Packet Sorbent*), utiliza o adsorvente imobilizado em um cartucho, similar à SPE, porém em menor quantidade (1 a 4 mg de material) para o pré-tratamento de volumes reduzidos (de 10 a 250 µL) de amostra (81).

As técnicas de microextração líquido-líquido (do inglês, *Liquid-liquid Microextraction*, LLME) exploram diversas estratégias para maximizar a extração do analito, reduzir o consumo de solvente extrator, e são compatíveis com diversos equipamentos analíticos (e.g. cromatógrafos). Por exemplo, a microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês, *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*, DLLME) incorpora um terceiro solvente, miscível em ambas as frações, para favorecer a dispersão e aumentar a área de contato do solvente extrator com a amostra, favorecendo a transferência dos analitos para a fração orgânica (61). Esta técnica foi utilizada para a extração e quantificação por cromatografia líquida de dez ácidos fenólicos e dois flavonoides de amostras de vinhos, com recuperações variando de 76,56% a 137,74%, utilizando acetato de etila (extrator) e acetonitrila (dispersor) (82).

Sistemas aquosos bifásicos (do inglês, *Aqueous Two-Phase System*, ATPS), ou seja, que exploram fases imiscíveis predominantemente compostas por água, têm sido empregados no preparo de amostras para análises biológicas (83,84) e de alimentos, como na determinação de pesticidas em leite e mel (85,86) e 5-hidrometilfurfural em mel (87). Nessas aplicações, foram usados ATPS compostos por água:acetonitrila e acetato de etila:acetonitrila.

Sistemas bifásicos que exploram o efeito da adição de sais (*Salt-Assisted Liquid-Liquid Extraction*, SALLE) e utilização de baixas temperaturas (*Low Temperature Partitioning Liquid-Liquid Extraction*, LTP-LLE) para induzir a separação de fases são usualmente compostos por um solvente orgânico (e.g. acetonitrila, álcool

isopropílico e acetona) e água. Esses sistemas oferecem uma alternativa para separação de compostos polares daqueles ligeiramente polares.

Na SALLE, a separação de fases é induzida pelo aumento da força iônica na fase aquosa (efeito *salting-out*), provocando a diminuição da miscibilidade do solvente orgânico no meio e alterações na distribuição dos compostos entre as duas fases (84). Nesse sistema, o álcool isopropílico, acetona e acetonitrila (ACN) podem ser utilizados para a extração de amostras aquosas, entretanto, devido à melhor recuperação de espécies hidrofílicas e hidrofóbicas, menor volume de solvente orgânico e possibilidade de análise direta da fração orgânica por cromatografia, a ACN é preferencialmente utilizada (84). A seleção do sal é importante para partição da espécie de interesse, entretanto, a escolha depende do tipo de amostra e da natureza dos analitos e do solvente orgânico. Além disso, a instrumentação analítica também deve ser considerada pois, para algumas técnicas hífenadas à espectrometria de massa (e.g. LC-MS ou LC-MS/MS), os sais inorgânicos (e.g. NaCl) podem formar indesejados adutos de sódio, sendo mais indicada a utilização de sais orgânicos de NH_4^+ (e.g. $\text{CH}_3\text{COONH}_4$) (88). A escolha do sal pode ser baseada na série de Hofmeister ($\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$), que define os ânions com maior efeito sob a separação das fases e efeito *salting-out* (89).

Explorando a extração com ACN, foi proposto, em 1994, um procedimento para purificação de proteínas baseado na separação de fases induzida pela diminuição da temperatura a $-17\text{ }^\circ\text{C}$ (LTP-LLE) (90). Nessa técnica de microextração, com a diminuição da temperatura, a fração aquosa se separa da fase orgânica, permanecendo na fração inferior ($\rho_{\text{H}_2\text{O}} = 0,993\text{ g cm}^{-3}$ e $\rho_{\text{ACN}} = 0,786\text{ g cm}^{-3}$ a $-20\text{ }^\circ\text{C}$). Os analitos podem ser extraídos na fração rica em ACN e separados de interferentes mais polares, que permanecem na fase aquosa (91). Entre as vantagens da LTP-LLE estão a alta capacidade de extração, baixo consumo de solvente orgânico e a não necessidade de usar sais para promover a separação. Além disso, as baixas temperaturas evitam que componentes termolábeis sejam degradados (92).

1.4. Métodos analíticos para a quantificação de flavonoides

Após a extração e pré-tratamento dos extratos, diversas técnicas analíticas podem ser aplicadas para a identificação e quantificação de flavonoides. Nesse

sentido, destacam-se procedimentos espectrofotométricos e cromatográficos, especialmente com detecção espectrofotométrica (93), espectrofluorimétrica (94) ou por espectrometria de massa (95).

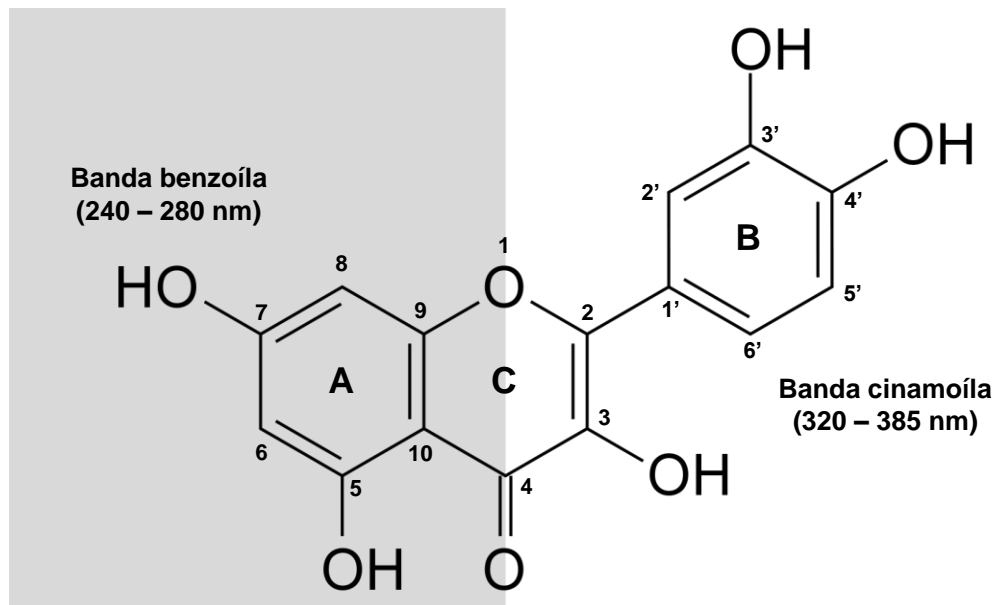
1.4.1. Procedimentos espectrofotométricos e fluorimétricos

A espectrofotometria é uma técnica analítica baseada na medida da radiação absorvida, nas regiões ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, por espécies químicas (moléculas ou íons) em solução. A concentração destas espécies é determinada pela lei de Beer (Eq. 1), a partir da relação diretamente proporcional com a absorvância (A). As constantes de proporcionalidade são o caminho óptico da cela de medida (b , mantido constante durante as medições) e a absorvidade molar (ϵ), que depende da espécie absorvente e do comprimento de onda de medida, sendo determinada indiretamente na etapa de calibração (96).

$$A = \epsilon bc = \log \frac{I_0}{I_t} \quad (\text{Eq. 1})$$

A determinação espectrofotométrica de flavonoides é amplamente aplicada nas avaliações iniciais do potencial bioativo dos extratos. Através de duas importantes bandas de absorção, benzoíla (240 – 280 nm) e cinamoíla (320 – 385 nm) (Figura 4), é possível monitorar esses compostos por meio de medidas diretas na região UV. Adicionalmente, é possível o monitoramento no visível (e.g. após reação com Al(III)) ou por fluorescência (e.g. após formação de complexos com Al(III) ou Cu(II)) (97). Entretanto, diferentemente dos procedimentos cromatográficos, não é possível quantificar os compostos individualmente, sendo a resposta expressa na forma do conteúdo total em relação à massa de amostra ou volume de extrato, considerando um composto modelo, usualmente a quercetina (98).

Figura 4. Bandas de absorção da quercetina.



Adaptada de Kasprzak, Erxleben e Ochocki (99).

A medida espectrofotométrica no UV, diretamente nos extratos, é um procedimento simples e rápido, porém pouco seletivo, devido à interferência de diversos componentes que absorvem nesta região espectral. Como exemplo pode ser citada a interferência dos ácidos fenilcarboxílicos na quantificação de isoflavonas (100). Além disso, a sensibilidade é limitada, dificultando a aplicação a extratos com baixas concentrações de flavonoides (97).

Para aumento da sensibilidade analítica, métodos espectrofluorimétricos podem ser empregados para quantificação de flavonoides, entretanto, as espécies fluorescentes são limitadas, e.g. isoflavonas, catequinas e flavonas com substituição na posição 3 (anel C) e 6 (anel A), formando 3-hidroxi-flavonas e metilflavonas, respectivamente (101). Para as espécies que não fluorescem, a derivatização química com íons metálicos (e.g. Al^{3+} , Cu^{2+} e Tb^{3+}) pode ser explorada para a formação de espécies fluorescentes (97). Alternativamente, os flavonoides podem ser quantificados de modo indireto, através da supressão da fluorescência de outras espécies (e.g. aminoácidos e proteínas) (102).

A complexação de flavonoides com íons Al(III) e posterior monitoramento na região do visível, proposta por Christ e Müller (103), é um dos protocolos mais amplamente utilizados. Este método foi sucessivamente modificado para aplicação em diferentes matrizes, sendo utilizado com solução de AlCl_3 em concentrações

variando de 2 – 10% (m/v) em meio aquoso ou metanólico, podendo ou não ser acidificado (104). Após reação em meio ácido, as medidas espectrofotométricas para a determinação de flavonóis são realizadas em diferentes comprimentos de onda (404 – 430 nm), utilizando quercetina, morina ou rutina como composto modelo para expressar os resultados. Em meio alcalino, na presença de nitrito de sódio (NaNO_2) para nitritação da porção catecol, forma-se um complexo avermelhado (medidas em 510 nm), sendo a catequina preferencialmente utilizada como padrão analítico (104).

A depender do método espectrofotométrico escolhido, com derivatização em meio ácido ou alcalino, diferentes grupos de flavonoides podem ser quantificados. No método baseado na reação com NaNO_2 em meio alcalino, a ausência do grupamento *o*-difenoil (porção catecol, anel B) em alguns flavonoides, *e.g.* hesperidina, diosmina e naringenina (flavanonas), impede sua quantificação sendo, portanto, inadequado para a aplicação em citrus (105). Além disso, a glicosilação ou metilação dos grupos -OH nas posições 3 e 5 (anel C e A) e 3' e 4' (anel B) pode afetar a reação com Al(III) , sendo necessário diminuir o pH (105,106). A interferência por espécies não-flavonoides, *e.g.* ácidos fenólicos, também deve ser considerada. Por exemplo, os ácidos hidroxicinâmicos, como os ácidos cafeico e clorogênico, que apresentam grupamentos *o*-difenoil, podem se complexar com Al(III) e absorver em 420 nm, superestimando a real quantidade de flavonoides nas amostras (104,105,107).

Os procedimentos supramencionados são simples e facilmente aplicáveis a análises de rotina. Entretanto, além da baixa sensibilidade e seletividade, há limitações como a falta de padronização no tipo de solvente orgânico utilizado, que impede a comparação entre os resultados, devido à variação na eficiência de extração dos compostos da matriz (98). Essas diferentes características podem ser observadas na Tabela 2. Para superar as limitações de seletividade, as técnicas cromatográficas são usualmente exploradas.

Tabela 2. Exemplos de aplicações de métodos espectrofotométricos e fluorimétrico para a determinação de flavonoides.

Amostra	Solvente extrator	Reagente derivatizante	Meio	Deteção, λ_{max} (nm)	Flavonoide padrão	Concentração (mg 100 g ⁻¹)	Referência
Morango	80% metanol	10% AlCl ₃	KCH ₃ COO	SP, 510	Catequina	50	(108)
Goji berry	70% etanol	10% AlCl ₃	NaNO ₂ + NaOH	SP, 510	Rutina	450	(109)
Mirtilo	70% metanol	6,5% AlCl ₃	NaNO ₂ + NaOH	SP, 510	Catequina	85,7	(110)
Suco de laranja	—	2% AlCl ₃	—	SP, 430	Hesperidina	3,0	(111)
Romã	50% acetona	10% AlCl ₃	NaNO ₂ + NaOH	SP, 510	Quercetina	8721	(112)
Própolis	80% etanol	2% AlCl ₃	CH ₃ COOH	SP, 415	Galangina	290–913	(113)
Extrato de ervas medicinais	40% etanol (pH 10,3)	0,01 mol L ⁻¹ Tb ³⁺	Tampão tris-hidroximetil-aminometano-HCl (pH 7,0)	FL, Excitação: 310 Emissão: 545	Quercetina	20–1350	(114)

FL: Fluorimetria; SP: Espectrofotometria UV-vis.

1.4.2. Procedimentos cromatográficos

A cromatografia é uma técnica analítica utilizada para separação, identificação e purificação de compostos presentes em matrizes complexas. A separação baseia-se na distribuição diferencial das espécies entre duas fases, uma estacionária (FE) e a outra móvel (FM). De acordo com a natureza da FM utilizada, tem-se a cromatografia líquida (em inglês, *High Performance Liquid Chromatography*, HPLC), gasosa (*Gas Chromatography*, GC) ou por fluido supercrítico (*Supercritical Fluid Chromatography*, SFC). Em relação à forma da FE, tem-se a cromatografia em papel ou em camada delgada e a cromatografia em coluna (115).

Para as quantificações de compostos bioativos, HPLC é a técnica cromatográfica mais empregada, visto a praticidade e capacidade de separação. A HPLC tem sido aplicada para a quantificação de flavonoides em diversas matrizes (e.g. alimentos, bebidas, amostras biológicas e farmacêuticas), sendo primeiramente aplicada em 1976 por Fisher e Wheaton na análise de citros (116). Exemplos de aplicações a amostras de alimentos e bebidas são mostrados na Tabela 3. As análises por GC são pouco usuais devido ao alto ponto de ebulição dos flavonoides (maior que 300 °C) e a necessidade de derivatização para torná-los voláteis (97,117).

Devido à polaridade dos flavonoides, a cromatografia em fase reversa utilizando colunas de sílica funcionalizada (e.g. C₈ e C₁₈) é mais usual (97). As FM tipicamente utilizadas compreendem soluções aquosas acidificadas com ácido fosfórico ou ácidos orgânicos (e.g. ácido acético, ácido fórmico ou ácido trifluoroacético) em mistura com um solvente orgânico, sendo o metanol e a ACN os mais usuais. Geralmente, o modo de eluição por gradiente alcança separações melhores de flavonoides, permitindo separar os compostos com diferentes graus de saturação, hidroxilação, metilação e glicosilação (97,118).

Uma vez separados, a detecção pode ser realizada por detector espectrofotométrico (e.g. detector de arranjo de diodos, do inglês, *Photodiode Array Detector*, PDA), detector de fluorescência, ou acoplado a espectrômetros de massa (*Mass Spectrometry*, MS) (119). Devido à maior disponibilidade, fácil manutenção e custo relativamente menor, o PDA é o detector mais utilizado, pois fornece informação a respeito do espectro UV-Vis dos compostos individualmente permitindo a rápida identificação dos flavonoides quando comparado ao espectro da solução padrão (119). Por outro lado, os detectores de fluorescência são menos usuais devido à

limitação de fluorescência dos flavonoides, necessitando de derivatização e tempo adicional para o preparo de amostra e quantificação (97,120).

Desde a descoberta de uma interface capaz de ionizar os analitos após as separações cromatográficas, o acoplamento de espectrômetros de massa à cromatografia (HPLC-MS) tem se tornado a técnica mais popular para a determinação de flavonoides (121). Para a detecção por MS, os íons gerados são fragmentados sob atmosfera controlada e separados em relação à razão massa/carga (m/z), característica de cada composto (122). Adicionalmente, para as determinações é necessário atentar-se à composição da FM utilizada para eluição cromatográfica, devendo ser considerado o pH e a natureza dos componentes do tampão. De acordo com Cuyckens e Claeys (121), os ácidos fórmico, acético e trifluoracético e tampões constituídos de acetato de amônio são compatíveis aos sistemas HPLC-MS por serem facilmente volatilizados.

Apesar das diversas vantagens associadas, as técnicas cromatográficas têm custo elevado de manutenção, alto consumo de solvente e são laboriosas, tanto para o preparo de amostra, quanto para a determinação (123). Sendo assim, é necessário o desenvolvimento de procedimentos alternativos para a quantificação de flavonoides e outros compostos bioativos.

Tabela 3. Exemplos de aplicações de métodos cromatográficos para a determinação de flavonoides.

Amostra	Solvente extrator	Preparo de amostra	FM	Detector	Tempo de corrida (min)	Espécies monitoradas	Referência
<i>Lingonberry</i> Morango Mirtilo Framboesa	Metanol	Secagem (Rotaevaporador - 43 °C) e Filtração	Fase A: 3% Ácido fórmico; Fase B: Acetonitrila/metanol/água	PDA	55	Flavan-3-óis, flavonóis e antocianinas	(124)
<i>Haskap berry</i>	Metanol acidificado (0,1% ácido fórmico)	Filtração	Fase A: Metanol/Água; Fase B: Metanol. Ambos com 0,1% ácido fórmico	PDA	40	Antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos	(125)
Mel	Água (pH 2)	DLLME (CHCl ₃ (extrator) e metanol (dispersor)	Fase A: 0,1% Ácido acético; Fase B: Metanol (0,1% ácido acético)	PDA	38	Flavanóis, flavonóis e ácidos fenólicos	(126)
Tomate Cebola Uva	Metanol acidificado	SPME (Resina Carbowax)	Fase A: 0,001 mol L ⁻¹ citrato de sódio; Fase B: acetonitrila	PDA	40	Mirecetina e quercetina	(127)
Vinho tinto	Diluição em água (100 x)	-	Fase A: Água/Metanol e ácido fosfórico Fase B: Tetraidrofurano/metanol/ácido fosfórico	Fluorescência	20	Resveratrol	(128)
Mirtilo Morango	Etanol/Água (1,5% HCl)	Filtração	Fase A: Água Fase B: Metanol (ambos com 0,1% ácido fórmico)	MS/MS	32	Antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos	(129)

Outras técnicas complementares têm sido exploradas para identificar/quantificar flavonoides em alimentos e bebidas, como as espectroscopias Raman (130,131) e no infravermelho próximo com transformada de Fourier (em inglês, *Fourier Transform Near Infra-Red*, FT-NIR) (132), além da ressonância magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*, NMR) (133). Esses procedimentos apresentam limitações devido ao custo (Raman e NMR) e baixa sensibilidade/seletividade (FT-IR).

Diante do exposto, observa-se a necessidade de desenvolvimento de alternativas analíticas capazes de superar as limitações dos procedimentos supramencionados, como a falta de seletividade das técnicas espectrofotométricas, o alto custo de equipamentos e solventes de elevada pureza, além da geração de resíduos nas técnicas cromatográficas. A fotometria por imagens digitais aliada a procedimentos de preparo de amostra mais sustentáveis apresenta-se como uma alternativa promissora devido ao baixo custo, praticidade e aderência à química verde. Os procedimentos explorando a fotometria por imagens digitais têm sido explorados para fins qualitativos e quantitativos em diversas áreas (134–136), inclusive para quantificação de compostos bioativos em alimentos (137,138).

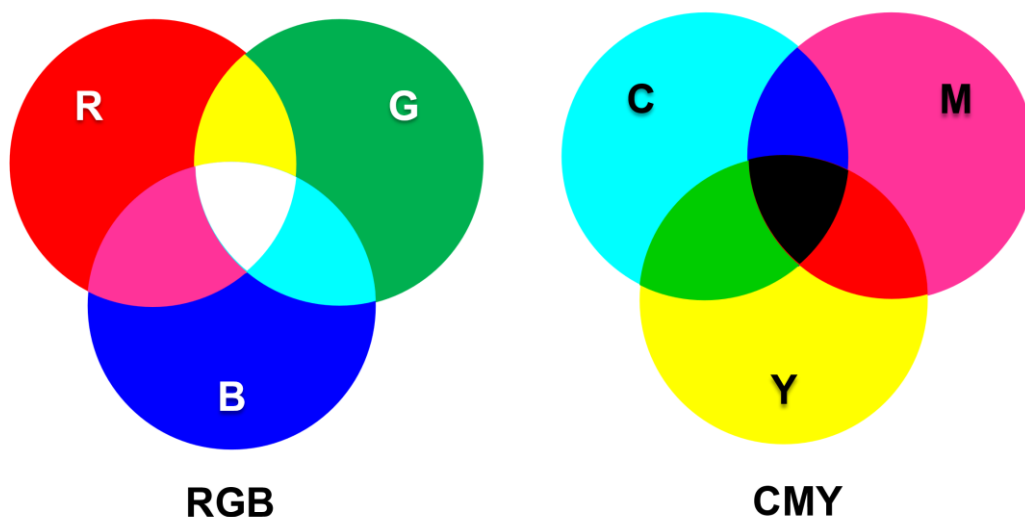
1.5. Fotometria por imagens digitais

A popularização dos *smartphones* como dispositivos de alto desempenho e capacidade de processamento comparável aos microcomputadores, tem proporcionado significativos avanços em diversas áreas, incluindo em Química Analítica, como instrumentos de medida e análise de dados (139). Os *smartphones* se destacam pela acessibilidade, custo relativamente baixo, interface amigável ao usuário, possibilidade de rápida aquisição de dados e de análises *in situ* (140). A câmera dos *smartphones*, assim como câmeras digitais, *webcams* e *scanners* são utilizadas para a captura de imagens, podendo ser aplicada à detecção colorimétrica ou baseada em fluorescência (141).

A fotometria por imagens digitais baseia-se na captura de imagens, sob iluminação constante e controlada, geralmente utilizando luz branca ou em uma faixa estreita de comprimentos de onda, proveniente de diodos emissores de luz (do inglês, *Light Emitting Diode*, LED), e posterior conversão da intensidade de radiação refletida em valores mensuráveis utilizando sistemas de cores adequados. A maioria das

aplicações analíticas é baseada no sistema RGB (do inglês, *Red-Green-Blue*), classificado com um sistema de cores como aditivo (Figura 5), sendo que a combinação dos 3 canais reproduz um amplo espectro de diferentes cores (ca. 16,7 milhões de cores, 256^3). O valor 256 deve-se aos valores na escala RGB variarem de 0 a 255 (8 bits) em cada um dos canais. Nessa escala, total absorção refere-se a (0, 0, 0, cor preta) enquanto a total reflexão corresponde a (255, 255, 255, cor branca) (142). Para fins analíticos, são de interesse as situações intermediárias (absorção parcial de radiação), normalmente mensuradas no canal correspondente à maior atenuação (no sistema RGB, canal de cor complementar à cor da solução ou amostra).

Figura 5. Representação dos sistemas de cores RGB e CMY.



Enquanto o sistema de cores RGB mimetiza a visão humana, pois as medidas se referem a cor complementar, ou seja, a cor refletida, o sistema CMY (do inglês, *Cyan-Magenta-Yellow*) restringe-se à cor observada, ou absorvida, como parâmetro de medida (Figura 5). Este sistema é classificado como subtrativo com escala que varia entre 0 e 1, indicando a total reflexão (0, 0, 0) ou absorção (1, 1, 1). Algumas das aplicações colorimétricas destes sistemas na análise de alimentos incluem a determinação do índice de peróxido utilizando o canal M do CMY (143) e a quantificação de esteróis totais em azeites e óleos vegetais com medidas no canal B do sistema RGB (144).

Além do RGB e CMY, outros sistemas de cores podem ser utilizados para aplicações analíticas, incluindo o HSV (*Hue-Saturation-Value*) ou HSL (*Hue-Saturation-Lightness*), CIELab e XYZ. Adicionalmente, aplicações envolvendo a escala de cinza (do inglês, *Grayscale*), são amplamente utilizadas (145). Esta escala correlaciona a intensidade da cor entre preto (0) e branco (255) utilizando o sistema RGB como componente para conversão nos tons de cinza.

Para a quantificação por fotometria por imagens digitais, é necessária a conversão das imagens em valores mensuráveis dentro do sistema de cor definido. Com essa finalidade, são disponíveis alguns aplicativos de acesso livre como o ColorGrab® (146,147) e Photometrix® (148) disponíveis para dispositivos móveis, e software públicos baseado em Java, como o ImageJ® (149) para computadores. Além disso, para garantir medidas reproduzíveis e alcançar respostas adequadas, o controle/ajuste de alguns parâmetros, *e.g.* iluminação, distância entre a câmera e o objeto de medida, a região de interesse (do inglês, *Region of interest*, ROI) e a abertura de lente é essencial (145). A iluminação controlada permite a aquisição de dados reproduzíveis, entretanto excesso de luminosidade pode prejudicar a detecção de diferentes nuances de cor e reduzir a sensibilidade. A distância entre câmera e o objeto está relacionada ao foco da câmera e o ROI pode influenciar na faixa linear e precisão do procedimento analítico (145,150,151). A abertura de lente, que geralmente varia entre os modelos de *smartphones*, pode afetar a linearidade e a sensibilidade, uma vez que quanto maior for a abertura, maior será a quantidade de luz refletida que passará através da lente (151).

Uma vez atendidos os requisitos para aquisição das imagens, o processamento dos dados depende do sistema de cores escolhido. Considerando o sistema RGB, que foi explorado nesta Dissertação, para obter-se respostas analíticas proporcionais à concentração das espécies absorventes é necessário subtrair o valor do canal medido (152) do valor correspondente à reflexão total de radiação no sistema (255), Eq. 2, ou do valor referente ao branco analítico (Eq. 3) (153). Além disso, o processamento pode também envolver a conversão dos dados em reflectância (Eq. 4), conforme previsto pela lei de Beer, visando obter ajustes mais lineares em função da concentração da espécie absorvente (154).

$$\text{Sinal analítico} = R_b - R_s \text{ ou } G_b - G_s \text{ ou } B_b - B_s \quad \text{Eq. 2}$$

$$\text{Sinal analítico} = 255 - R_s \text{ ou } 255 - G_s \text{ ou } 255 - B_s \quad \text{Eq. 3}$$

$$\text{Sinal analítico} = -\log \frac{R_b}{R_s} \text{ ou } -\log \frac{G_b}{G_s} \text{ ou } -\log \frac{B_b}{B_s} \quad \text{Eq. 4}$$

Onde:

R_b , G_b e B_b são as respostas referentes ao branco;

R_s , G_s e B_s são as respostas referentes à amostra ou solução padrão.

Métodos baseados em imagens digitais têm sido aplicados em diversas áreas, incluindo análises clínicas (155), agricultura (156), meio ambiente (157) e biocombustíveis (151,153). Na área de alimentos, o uso destes dispositivos colabora com a segurança dos alimentos (158), por exemplo, para a identificação de fraudes e adulterações em leite pela adição de peróxido de hidrogênio (159), formaldeído (160), surfactantes (161) ou diluições (162). Além disso, recentes aplicações têm sido propostas na área de compostos bioativos, para avaliação da capacidade antioxidante (163), compostos fenólicos (164) e antocianinas (165,166).

Adicionalmente, a fotometria por imagens digitais é atrativa para a combinação com estratégias de microextração, por possibilitar a medição analítica com pequenos volumes de extrator e sem o isolamento das fases (167). Essa possibilidade foi demonstrada para a DLLME, com clorofórmio (extrator) e acetonitrila (dispersor), para a extração e determinação de surfactantes em leite, explorando a formação do par iônico com azul de metileno e extração em ponto nuvem do produto da oxidação da N,N-dietil-*p*-fenilenodiamina pelo cloro livre.

2. OBJETIVOS

Visando à maior seletividade, simplicidade e sustentabilidade para a determinação de compostos flavonoides, a presente Dissertação teve como objetivo geral o desenvolvimento de procedimentos analíticos baseados na microextração líquido-líquido por efeito *salting-out* (SALLME) e quantificação de flavonóis totais em amostras de *berries*, explorando a complexação com Al(III) e fotometria por imagens digitais.

Os objetivos específicos foram:

- ❖ Explorar a extração dos flavonóis em acetonitrila e SALLME dos complexos com Al(III) para a determinação por fotometria por imagens digitais obtidas por *smartphone*.
- ❖ Explorar o preparo de amostra ambientalmente amigável baseado em extração de flavonoides em etanol e SALLME dos flavonóis para a determinação por fotometria por imagens digitais obtidas por *smartphone*.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Procedimento analítico explorando extração em acetonitrila e SALLME do complexo metal-flavonol

3.1.1. Equipamentos e acessórios

Um banho ultrassônico (Quimis, Q3350, Brasil), operando com frequência de 50 – 60 Hz, centrífuga (Quimis, Q222T1, Brasil), um moinho criogênico (SPEX, 6870 Freezer/Mill, Estados Unidos), um vórtex (Biosan, MSV-3500, Letônia) foram utilizados para o preparo das amostras. Um espectrofotômetro (Agilent, Cary 60 UV-Vis, Malásia) foi utilizado para determinar a estequiometria do complexo e exatidão com o procedimento de referência.

Para as medidas analíticas, foi utilizado um telefone celular (Xiaomi, Mi A3, Brasil) com sistema operacional Android versão 11 e equipado com uma câmera de 48 megapixels, com abertura de lente de $f/1,79$. A captura das imagens foi realizada sob iluminação controlada utilizando uma caixa de isopor (190 x 210 x 125 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente) revestida internamente com papel branco e com uma lâmpada LED (30 unidades de LEDs SMD SLIM, 50 lx) posicionada na parte inferior. Um suporte para uso automotivo foi utilizado para a fixação do telefone celular a 10 cm de distância para garantia do foco da câmera dos tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, contendo a fase aquosa com os complexos (fase inferior) e ACN na fração superior.

3.1.2. Amostras, reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos, utilizando reagentes e solventes de grau analítico e água deionizada (resistividade $> 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$).

Solução estoque de quercetina, morina, canferol, mirecetina e ácido clorogênico 500 mg L^{-1} foram preparadas dissolvendo 0,0050 g de cada composto (Sigma-Aldrich, Alemanha) em 10 mL de ACN e armazenada em refrigeração ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) sob proteção de luz. Solução de Al(III) 13 mmol L^{-1} foi preparada pela diluição da solução padrão de ICP 10000 mg L^{-1} (SpecSol, Brasil) em tampão acetato de sódio/ácido acético ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 3,5). Uma solução de NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada pela dissolução de 14,61 g de NaCl (Merck, Alemanha) e avolumando para 50 mL com água.

As amostras (amora-preta, mirtilo, morango e framboesa) foram adquiridas diretamente de produtores da região de Piracicaba/SP, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 200 mg L^{-1} , secas, congeladas, liofilizadas e moídas criogenicamente.

Os extratos da *berries* foram preparados em tubos tipo Falcon de 15 mL utilizando 500 mg de amostra liofilizada e 5,0 mL de ACN (Merck, Alemanha), em banho ultrassônico por 15 min. Após centrifugação (10 min, 10000 rpm), os sobrenadantes foram filtrados com filtros Whatman™ n° 42 ($\varnothing = 2,5 \mu\text{m}$) e armazenados protegido da luz em freezer ($-20 \text{ }^\circ\text{C}$).

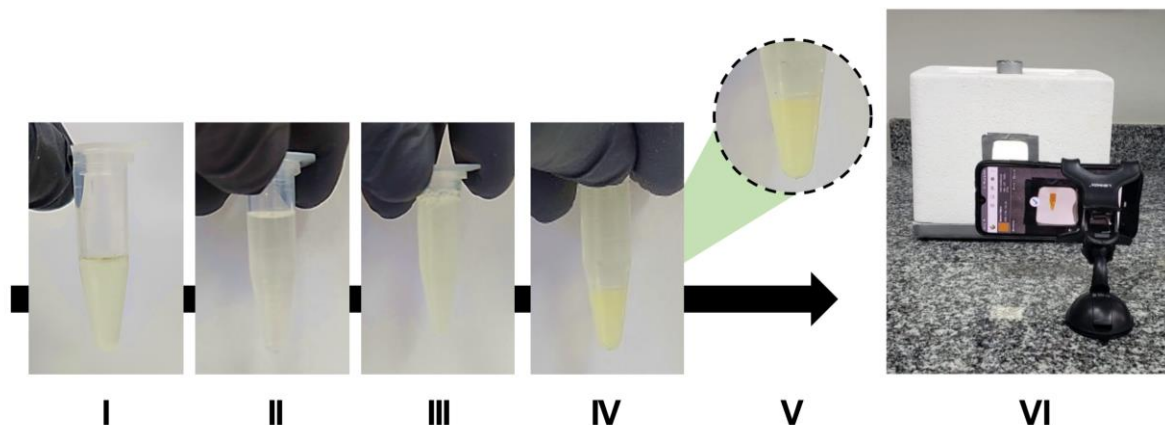
3.1.3. Determinação da estequiometria do complexo

O método das variações contínuas (método de Job) (168) foi aplicado para determinar a estequiometria do complexo Al(III)-QE. Os volumes de soluções equimolares de $0,2 \text{ mmol L}^{-1}$ foram variados para atingir proporções volumétricas de Al(III)/Quercetina de 1:9 a 9:1. Após 30 min de reação, medidas espectrofotométricas foram realizadas em 425 nm.

3.1.4. Procedimento

A quantificação dos flavonóis foi realizada pelo método das adições de padrão. O procedimento foi realizado em tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL, adicionando 600 μL do extrato (etapa I, Figura 6), diferentes volumes de solução de quercetina 50 mg L^{-1} (0, 48, 96, 144, 192 e 240 μL) e avolumando com ACN até 1,2 mL (II). Em seguida foram adicionados, 300 μL de solução de Al(III) 13 mmol L^{-1} em tampão acetato (pH 3,5) e 50 μL de NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ (III). Posteriormente, as misturas foram homogeneizadas em vórtex (3000 rpm), por 1 min, para favorecer a interação do Al(III) com os analitos para formação do complexo (IV). Os tubos foram mantidos em repouso por 30 min para a separação de fases, sendo a fração superior (rica em ACN) e a inferior (aquosa) contendo o complexo de medida (V). As imagens digitais foram capturadas na fração inferior do tubo tipo Eppendorf, nas condições descritas no item 3.1.1 (VI).

Figura 6. Etapas do procedimento de determinação de flavonóis pelo método de microextração por efeito *salting-out*. Imagens referem-se a (I) extrato de morango preparado em ACN, (II) extrato de morango + 0 a 240 μL de solução padrão de quercetina (50 mg L^{-1}) + ACN (volume final de 1,2 mL), (III) mistura com adição de Al(III) e NaCl, (IV) separação de fases após homogeneização e (V) complexo Al(III)-QE medido no sistema de detecção (VI).



As medidas fotométricas foram baseadas na intensidade da radiação refletida, utilizando o aplicativo ColorGrab (Loomatix®, versão 3.9.2, 2021) para conversão das imagens nos valores RGB. Os valores do canal B foram subtraídos dos valores obtidos do branco analítico (amostra sem a adição de Al(III), que variaram entre 144 e 161, nas diferentes condições experimentais avaliadas) para gerar respostas proporcionais à intensidade de cor e, portanto, à concentração do analito.

3.1.5. Otimização multivariada

Um planejamento fatorial completo ($2^k + \text{PC}$) foi utilizado para otimizar as condições experimentais para a microextração do complexo Al(III)-QE em tampão acetato de sódio/ácido acético ($2,0 \text{ mol L}^{-1}$, pH 4,7). Os fatores (k) e os níveis estudados foram: concentração de Al(III) (X_1 , 6 a 20 mmol L^{-1}), volume de reagente (tampão contendo a concentração de Al(III) definida em X_1) (X_2 , 150 a $450 \mu\text{L}$), e volume de ACN (X_3 , 600 a $1200 \mu\text{L}$). O planejamento incluiu três repetições do ponto central (PC), totalizando 11 condições em experimentos realizados aleatoriamente, conforme apresentado na Tabela 4. Em substituição ao extrato da amostra, foi utilizada uma solução de quercetina $7,5 \text{ mg L}^{-1}$ em ACN (volume fixado em $150 \mu\text{L}$). O tempo de reação foi fixado em 30 min. A resposta analítica foi obtida subtraindo de 255 (total reflexão no sistema) a resposta medida no canal B.

3.1.6. Procedimento de referência

Para a avaliação da exatidão, o conteúdo de flavonóis em amostras de *berries* foi determinado pelo método espectrofotométrico proposto por Papoti e colaboradores (107), com modificações. Em tubos Falcon® de 15 mL, foram adicionados 1,0 mL de extrato ou solução padrão (0,05 a 6,0 mg L⁻¹ de quercetina) em ACN, seguido de 100 µL de solução AlCl₃ 2,0% m/v em metanol e 1,4 mL de metanol acidificado com 5,0 %v/v de ácido acético. Após homogeneização as medições analíticas foram realizadas em 425 nm.

3.2. Procedimento ambientalmente amigável para a determinação seletiva de flavonóis

3.2.1. Equipamentos e acessórios

No procedimento de extração, foi utilizado um banho ultrassônico (Quimis, Q3350, Brasil), operado com frequência de 50 – 60 Hz, e uma centrífuga (Quimis, Q222T1, Brasil) para auxiliar no processo de separação de fases. A formação do produto de medida e as medições fotométricas foram realizadas em placas de toque de porcelana (4 x 3 poços, Chiarotti®). Uma chapa aquecedora (Tecnal, TE-0853/1, Brasil) foi utilizada para evaporação do acetato de etila dos extratos diretamente nas placas de toque.

Para as medidas analíticas, foi utilizado um telefone celular (Xiaomi, Mi A3, Brasil) com sistema operacional Android versão 11, e equipado com uma câmera de 48 megapixels (abertura de lente de f/1,79). A captura das imagens foi realizada sob iluminação controlada, utilizando uma câmara feita em caixa de isopor (155 x 275 x 190 mm de altura, comprimento e largura, respectivamente), com 60 LEDs distribuídos internamente. A câmera do telefone celular foi posicionada a distância de 17,5 cm para garantir o foco da câmera com a placa de toque.

3.2.2. Amostras, reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas em balões volumétricos, utilizando reagentes e solventes de grau analítico e água deionizada (resistividade > 18 MΩ cm). Solução de sulfato de sódio 2,0 mol L⁻¹ foi preparada pela dissolução de 14,204 g do

sal (Merck) e 5,1 mL de solução 6,0 mol L⁻¹ de HCl (Merck) e água e avolumando para 50 mL também com água deionizada ($C_f = 0,61$ mol L⁻¹ de HCl).

Solução estoque de quercetina 500 mg L⁻¹ foi preparada dissolvendo 0,0050 g do flavonoide (Sigma-Aldrich) em 10 mL de etanol anidro e mantida sob proteção de luz e refrigeração (4 °C). Solução de Al(III) 13 mmol L⁻¹ foi preparada pela diluição da solução padrão de ICP 10000 mg L⁻¹ (SpecSol) em tampão acetato de sódio/ácido acético (0,25 mol L⁻¹, pH 3,5).

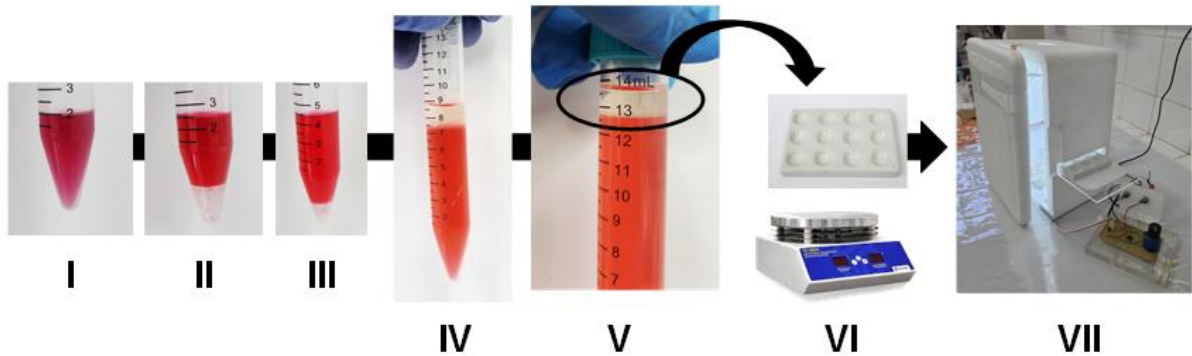
As amostras (amora-preta, mirtilo, morango e framboesa) foram adquiridas diretamente de produtores da região de Piracicaba/SP, higienizadas em solução de hipoclorito de sódio 200 mg L⁻¹, secas e moídas em almofariz com pistilo com auxílio de nitrogênio líquido.

3.2.3. Procedimento

Os extratos foram preparados adicionando 2,5 g de amostra e 5,0 mL de etanol anidro (Merck) em tubos tipo Falcon® de 15 mL. Após a extração em banho ultrassônico por 15 min, os extratos foram centrifugados por 5 min (5000 rpm), os sobrenadantes foram retirados com auxílio de uma pipeta, filtrados com filtros Whatman™ n° 42 ($\varnothing = 2,5$ μ m) e armazenados em freezer (-20 °C).

O procedimento de preparo de amostras foi realizado em tubos Falcon® de 15 mL, adicionando 2,0 mL de extrato etanólico de cada *berrie* (etapa I, Figura 7), 500 μ L de Na₂SO₄ 2,0 mol L⁻¹ em 0,61 mol L⁻¹ de HCl (etapa II) e 2,0 mL de acetato de etila (etapa III), seguido de agitação manual. Posteriormente, 10 mL de água deionizada foi adicionado e os tubos foram agitados manualmente (ca. 1 min) para a formação do sistema bifásico (etapas IV e V). Em seguida, os tubos foram centrifugados por 2 min (5000 rpm) para a separação de fases e 500 μ L do sobrenadante (fração orgânica) foi transferido para a placa de toque para evaporação do solvente (35 °C, ca. 5 min, etapa VI).

Figura 7. Etapas do procedimento de microextração de flavonóis com acetato de etila. Imagens referem-se a (I) extrato etanólico de amora-preta; (II) extrato + Na₂SO₄ em HCl; (III) mistura com adição de acetato de etila e (IV e V) após adição de 5 e 10 mL de água para separação de fases, respectivamente; (VI) Fração orgânica depositada na placa de toque para secagem em chapa aquecedora e posterior complexação com Al(III) e (VII) aquisição das imagens sob condições controladas de iluminação.



Após a evaporação do acetato de etila, o analito aderido às paredes das placas foi dissolvido em 150 μ L de etanol 70 %v/v e, em seguida, foi adicionado 200 μ L de solução de Al(III) 13 mmol L⁻¹ em tampão acetato, pH 3,5. Após 30 min de reação, as imagens foram adquiridas com a câmera do celular nas condições descritas no item 3.2.1. As medidas analíticas foram baseadas na intensidade da radiação refletida e os valores RGB foram extraídos utilizando o software ImageJ[®] (versão 1.8.0, *National Institute of Health*, USA). Os valores do canal B foram subtraídos de 255 (valor de máxima reflexão de radiação no sistema RGB) para gerar respostas proporcionais à intensidade de cor e, portanto, à concentração do analito.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Procedimento analítico explorando extração em acetonitrila e SALLME do complexo metal-flavonol

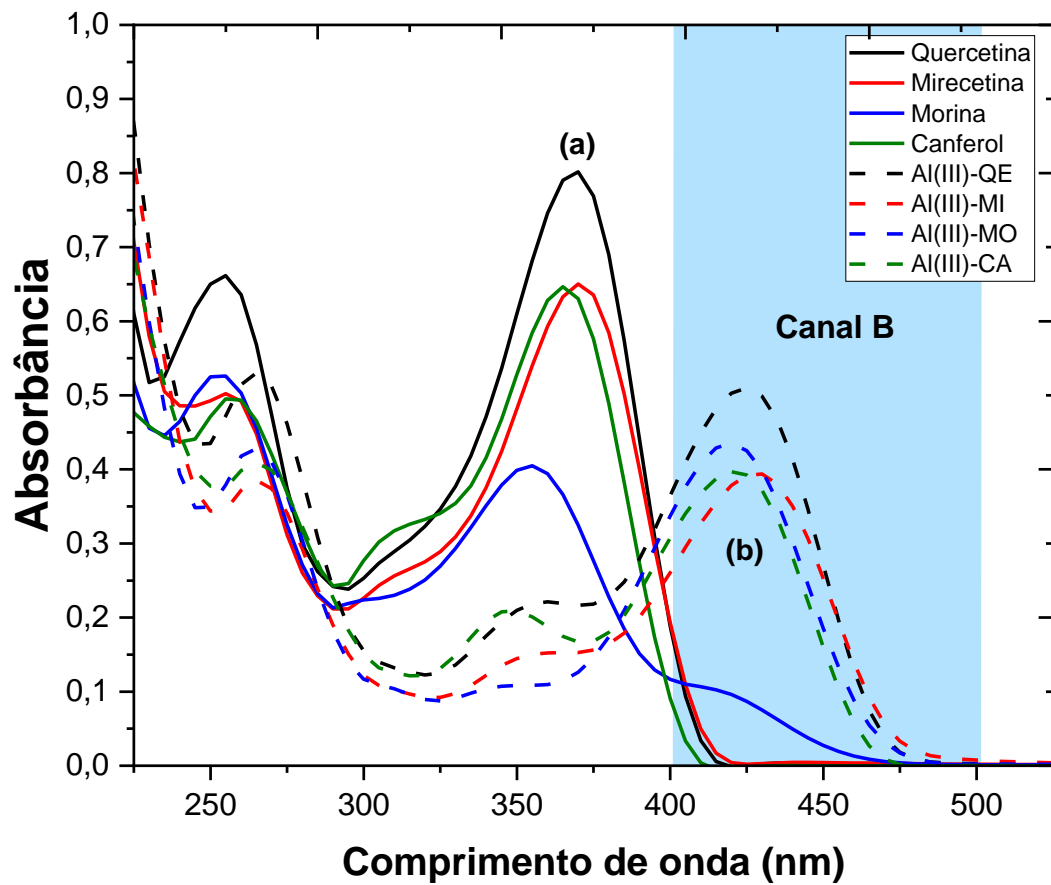
4.1.1. Aspectos gerais

A determinação do teor de flavonóis em extratos de *berries* baseou-se na formação de complexos de Al(III), o que simultaneamente favorece a separação de espécies potencialmente interferentes menos polares e torna possível a detecção por fotometria por imagens digitais. O primeiro aspecto é devido à formação de complexos carregados que tendem a ser extraídos da ACN para a fase aquosa, enquanto a detecção fotométrica é favorecida pelo deslocamento da banda de absorção para o visível. Para diferentes flavonóis, como quercetina, mirecetina, morina e canferol, observa-se o deslocamento do máximo de absorção entre 350 e 375 nm para 425 nm com a formação do complexo (Figura 8).

Os complexos com Al(III) são formados devido a três diferentes sítios quelantes na estrutura do flavonóis: grupo 3-hidroxila e 4-carbonila do anel C, o sítio 4-carbonil-5-hidroxila dos anéis A e C e a porção catecol do anel B, conforme indicado para a quercetina na Figura 3 (30).

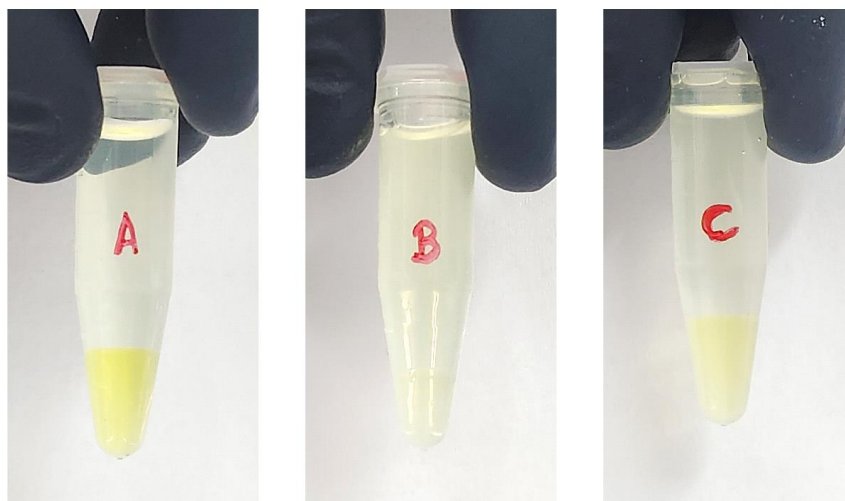
Os espectros de absorção dos complexos Al(III)-flavonóis se sobrepõem à faixa espectral coberta pelo canal B do sistema de cores RGB (400 – 500 nm). Assim, a resposta analítica neste canal corresponde a 99% da variação total do sinal no sistema RGB. Além disso, os valores de B variaram linearmente com a concentração de quercetina ($r > 0,994$), demonstrando a viabilidade de explorar esse canal para as medidas analíticas.

Figura 8. Espectros de absorção no UV-Vis de soluções 10 mg L^{-1} de quercetina (QE), mirecetina (MI), morina (MO) e canferol (CA) (a) e dos respectivos complexos com Al(III) (b). A região em azul correspondente à faixa espectral coberta pelo canal B do sistema RGB.



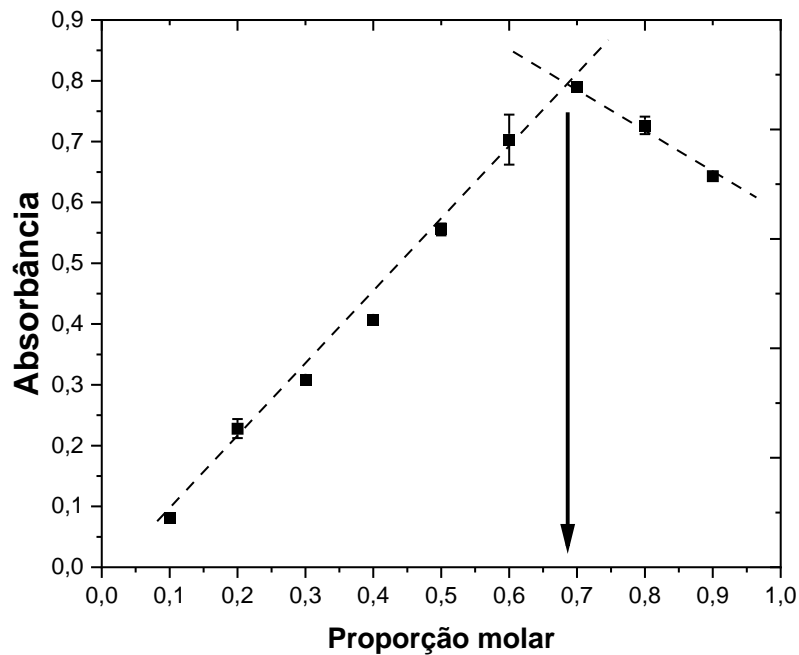
A separação de fases e microextração líquido-líquido dos flavonóis é induzida pelo aumento da força iônica (efeito *salting-out*), que requer que o sal não seja solúvel no solvente orgânico. O efeito salino aumenta de acordo com a série de Hofmeister: $\text{CO}_3^{2-} > \text{SO}_4^{2-} > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{H}_2\text{PO}_4^- > \text{F}^- > \text{Cl}^- > \text{Br}^- > \text{NO}_3^- > \text{I}^- > \text{ClO}_4^- > \text{SCN}^-$ (89,169). O NaCl foi selecionado por atender a esses requisitos e ser ambientalmente amigável. A solução de NaCl proporcionou uma fase aquosa (fração inferior) bem definida e favoreceu a extração do complexo em comparação com soluções de Mg_2SO_4 e $\text{Mg}_2\text{SO}_4 + \text{NaCl}$ (Figura 9).

Figura 9. Separação de fases demonstrada com solução de quercetina (17 mg L^{-1}) em ACN e Al(III) (13 mmol L^{-1}) com $50 \mu\text{L}$ de (A) NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$; (B) Mg_2SO_4 $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ e (C) NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$ + Mg_2SO_4 $5,0 \text{ mol L}^{-1}$.



Nas condições experimentais adotadas, o método das variações contínuas (método de Job) indicou que o complexo possui estequiometria de 1:2 Al(III):quercetina (Figura 10), o que concorda com resultados relatados anteriormente (168,170,171). Um comportamento semelhante é esperado para os outros flavonóis devido às semelhanças estruturais. Essa estequiometria corresponde à formação de complexos positivamente carregados, o que favorece sua extração para a fase aquosa e separação de espécies potencialmente interferentes menos polares, que devem permanecer na fase orgânica. O esquema de extração proposto explora a separação de flavonóis de espécies mais polares (e.g. antocianinas) utilizando ACN como solvente extrator (etapa 1), e de espécies menos polares na SALLME (etapa 2), melhorando significativamente a seletividade para a determinação de flavonóis.

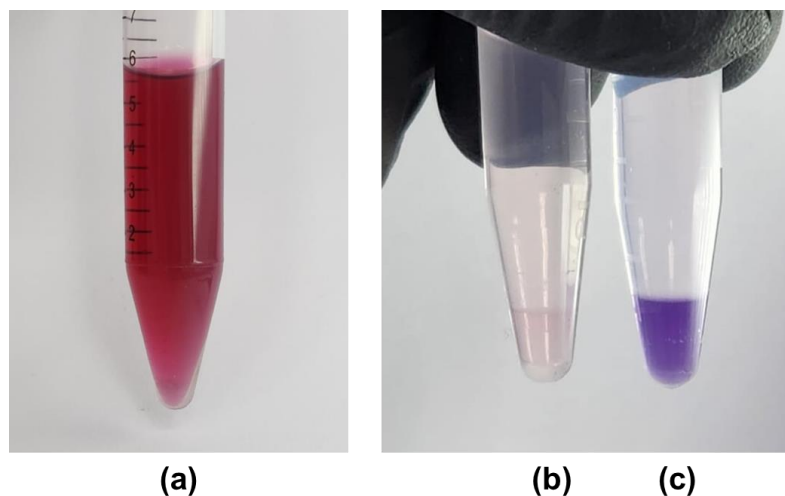
Figura 10. Método de Job para a determinação da estequiometria do complexo Al(III)-QE. Valores de absorbância medidos em 425 nm, referentes a diferentes proporções molares de Al(III) e quercetina.



4.1.2. Avaliação da extração de flavonóis

As *berries* são conhecidas pelo alto teor de antocianinas que são responsáveis pela coloração (vermelho, azul e roxo) dessas frutas. Quantidades de antocianinas de 94,76, 89,54 e 79,55 mg 100 g⁻¹ foram reportadas em amora, framboesa e mirtilo, respectivamente (172). Na presença de íons metálicos, *e.g.* Al(III), antocianinas formam complexos de coloração roxo/azulada (Figura 11) (173), sendo potenciais interferentes na determinação dos flavonóis por fotometria.

Figura 11. Imagens do extrato etanólico de amora-preta (a) e extrato após SALLME realizado sem (b) e com (c) a adição de Al(III) para avaliar a formação do complexo com antocianinas.



Visando minimizar a extração e evitar a interferência das antocianinas, álcoois (etanol e metanol), acetona e ACN foram avaliados como solventes para extração mais seletiva de flavonóis das berries. Como observado na Figura 12, os álcoois promoveram a extração de um alto conteúdo de antocianinas. O uso destes solventes permite a extração de diversas espécies de flavonoides (glicosilada ou aglicona), entretanto outros compostos indesejados também estão sujeitos a serem extraídos (e.g. açúcares, aminoácidos, proteínas e pigmentos) (174). Na extração com acetona (Figura 12d), embora a diminuição da coloração do extrato indique a baixa extração de antocianinas, após a adição de Al(III) o complexo azul/roxo característico foi formado. A utilização de ACN como extrator permitiu obter um extrato límpido, sem indícios de antocianinas. Além disso, o uso deste solvente favorece a extração de flavonóis devido à alta solubilidade, por exemplo, para a quercetina $1,63 \text{ g L}^{-1}$ em ACN e $0,06 \text{ g L}^{-1}$ em água (175,176). Assim, utilização de amostra liofilizada é essencial para garantir a extração mais seletiva dos flavonóis, visto que a elevada quantidade de água presente nas amostras pode favorecer a extração de antocianinas (Figura 13).

Figura 12. Extratos de amostras liofilizadas de amora-preta obtidos por sonicação utilizando diferentes solventes: (A) etanol, (B) metanol, (C) acetonitrila e (D) acetona.

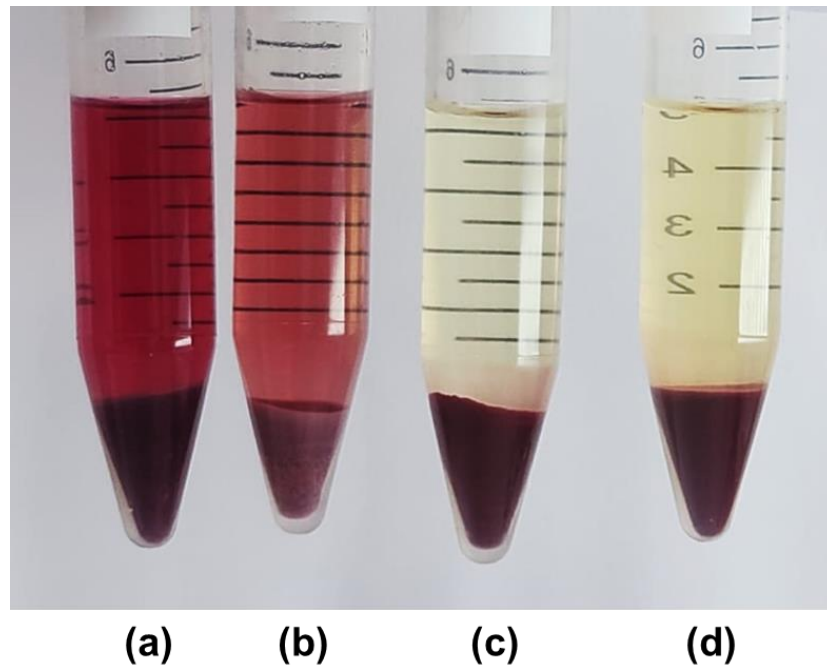
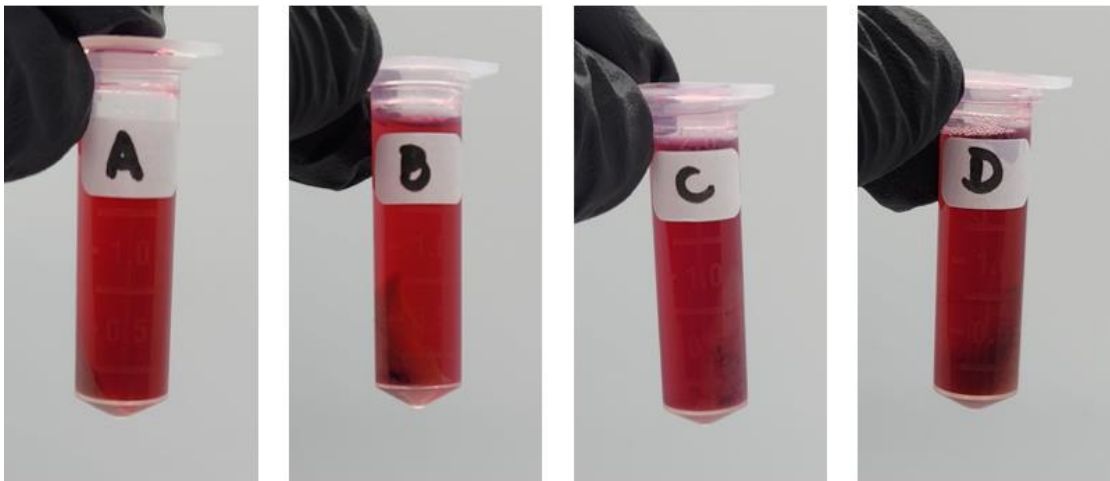
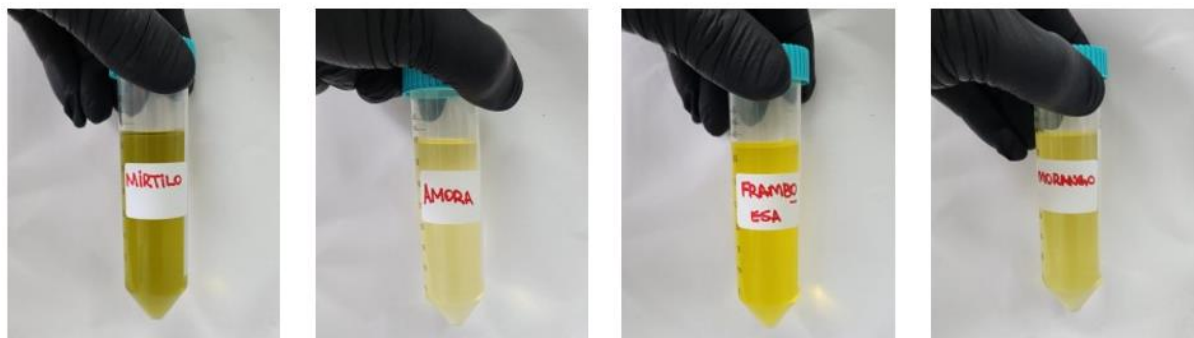


Figura 13. Extratos de amora-preta (amostra *in natura*) obtidos por sonicação utilizando diferentes solventes: (A) etanol, (B) metanol, (C) acetonitrila e (D) acetona.



A diminuição da extração de antocianinas foi observada com ACN como solvente e amostras de berries liofilizadas (Figura 14).

Figura 14. Extratos em ACN obtidos de berries liofilizadas.

4.1.3. Otimização

Visando maximizar a resposta analítica, tendo em vista a maior sensibilidade, foi aplicado um planejamento fatorial completo ($2^k + PC$) para a otimização do procedimento. Com base em experimentos preliminares, o efeito de três variáveis ($k = 3$) foi investigado: concentração de Al(III) na solução reagente, o volume da solução reagente (Al(III) em tampão pH 4,7) e volume de ACN. A quercetina foi utilizada como flavonol modelo. Os níveis experimentais (-1, 0 e 1) e os respectivos valores reais em cada experimento são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Planejamento fatorial completo com valores reais, codificados e resposta analítica para a avaliação do procedimento de microextração do complexo Al(III)-QE.

Experimentos	Alumínio (mmol L ⁻¹ , X ₁)	Solução reagente (Al(III), pH 4,7) (μL, X ₂)	Acetonitrila (μL, X ₃)	Resposta analítica (255-B)
1	6 (-1)	150 (-1)	600 (-1)	169
2	20 (1)	150 (-1)	600 (-1)	139
3	6 (-1)	450 (1)	600 (-1)	131
4	20 (1)	450 (1)	600 (-1)	130
5	6 (-1)	150 (-1)	1200 (1)	188
6	20 (1)	150 (-1)	1200 (1)	196
7	6 (-1)	450 (1)	1200 (1)	137
8	20 (1)	450 (1)	1200 (1)	134
9 – 11 ^a	13 (0)	300 (0)	900 (0)	150, 155, 159

^a Ponto central.

A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para identificar as variáveis significativas e seus coeficientes para ajuste do modelo matemático de predição (Tabela 5). O modelo não apresentou falta de ajuste (p -valor $> 0,05$) e a regressão foi significativa com coeficiente de determinação de 95,4%, demonstrando que apenas 4,6% da variabilidade das respostas não são explicadas pelo modelo de regressão.

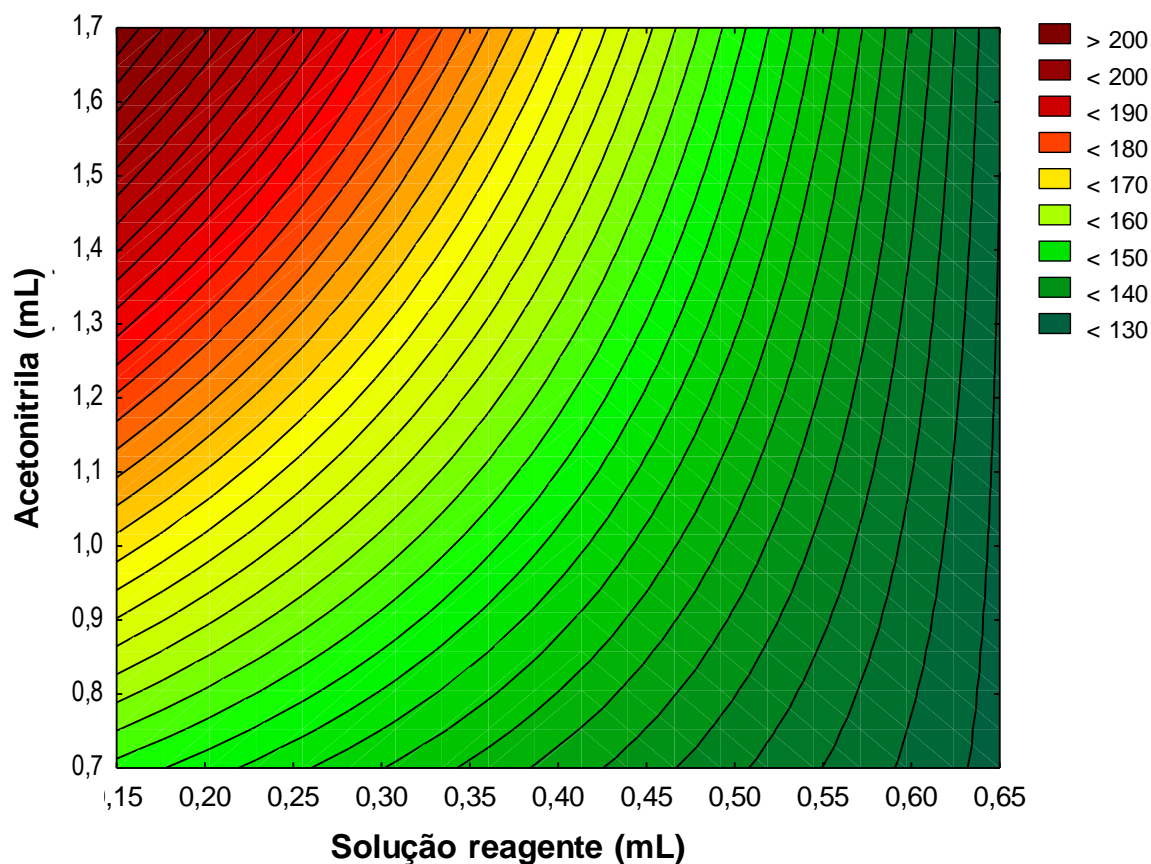
Tabela 5. ANOVA para avaliação do procedimento de microextração.

Parâmetros	Efeito do coeficiente	SQ	GL	MQ	F_{calc}	p -valor
Média/intercepto	154,67					
Al(III) (X_1)	-6,50	84,50	1	84,50	4,16	0,178
Al(III) (X_1X_1)	-3,33	6,06	1	6,06	0,30	0,640
Solução tampão (pH 4,7) (X_2)	-40,00	3200,00	1	3200,00	157,38	0,006
ACN (X_3)	21,50	924,50	1	924,50	45,47	0,021
X_1X_2	4,50	40,50	1	40,50	1,99	0,294
X_1X_3	9,00	162,00	1	162,00	7,97	0,106
X_2X_3	-16,50	544,50	1	544,50	26,78	0,035
Falta de ajuste		200,00	1	200,00	9,84	0,088
Erro puro		40,67	2	20,33		
Total		5202,73	10			

SQ – Soma quadrática; GL – Graus de liberdade; MQ – Média quadrática.
 $F_{\text{tab}} = 18,51$.

Dois parâmetros foram significativos: os volumes de solução tampão contendo Al(III) e de ACN, além da interação entre esses fatores. O efeito dessas variáveis sob o modelo ajustado é descrito pela Eq. (5) com erros padrão entre parênteses. A superfície de resposta (Figura 15) indica a região de resposta máxima. O efeito da concentração de Al(III) não foi significativo, indicando que qualquer concentração no intervalo avaliado (6 e 20 mmol L⁻¹) pode ser utilizada. Portanto, a concentração avaliada no ponto central do planejamento (13 mmol L⁻¹) foi escolhida.

Figura 15. Gráfico de contorno (255-B) para os volumes de acetonitrila e de solução reagente.



$$\text{Canal B} = 153,45 - 40,0(\pm 1,6)X_2 + 21,5(\pm 1,6)X_3 - 16,5(\pm 1,6)X_2X_3 \quad \text{Eq. (5)}$$

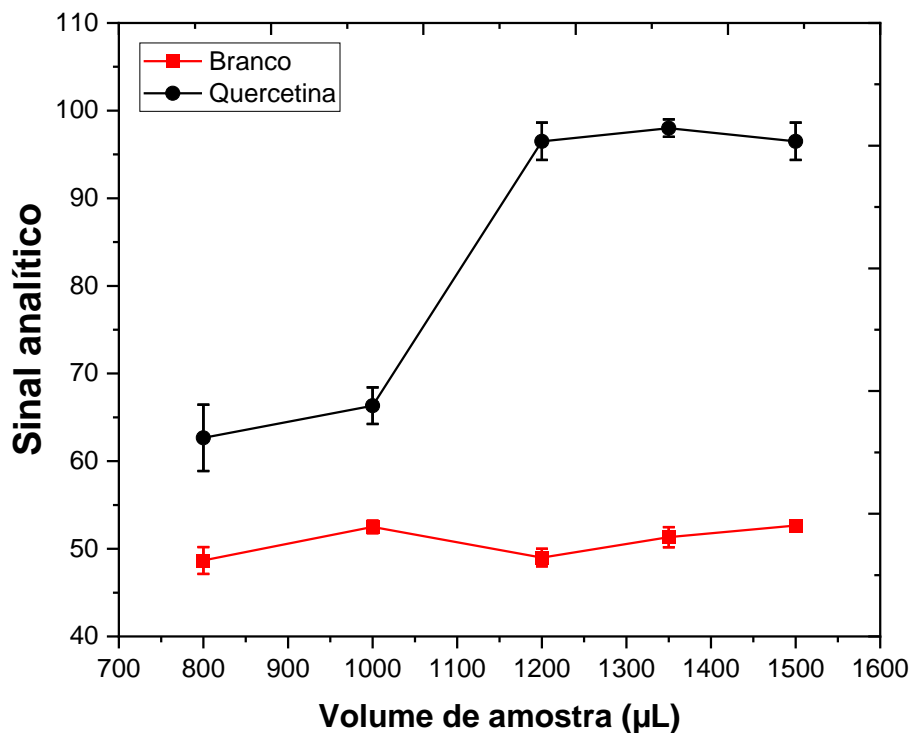
De acordo com a equação 5, para maximizar a resposta analítica, o volume de solução reagente (X_2) deve ser reduzido (coeficiente negativo) e o volume de ACN (X_3) aumentado (coeficiente positivo). Esta condição favorece a separação de fases, a extração do complexo para a fase aquosa e o aumento do fator de pré-concentração (razão volumétrica fase aquosa/fase orgânica). Este efeito pode ser observado pela comparação das condições experimentais 2, 4 e 6 (Tabela 4). A resposta analítica aumentou 7% quando o volume de reagente foi três vezes menor (condição 2 e 4) e 41% e 51%, quando a proporção de solução reagente:ACN diminuiu de 1:4 (condição 2) e 3:4 (condição 4) para 1:8 (condição 6). Efeitos similares para a separação de fase e eficiência de extração foram obtidos para a extração de carbamatos em bebidas (177) e amostras de águas (178). Considerando o coeficiente negativo da interação entre X_2 e X_3 , os melhores resultados devem ser obtidos quando os volumes de solução tampão e ACN estão em posições opostas, resultado concordante com a

discussão anterior, quando os coeficientes de solução reagente (X_2) e ACN (X_3) foram avaliados separadamente.

De acordo com a Eq.5, a maior resposta analítica prevista pelo modelo é 232 (valor teórico), que deve ser obtida usando 150 μL de amostra/solução padrão (preparada em ACN), 150 μL de solução reagente (13 mmol L^{-1} de Al(III)), preparada em tampão pH 4,7) e 1200 μL de ACN. No entanto, nessa condição, a resposta experimental obtida foi de 209 ± 4 . Embora este valor seja ligeiramente inferior ao previsto, ele é superior aos obtidos em qualquer condição experimental avaliada no planejamento fatorial.

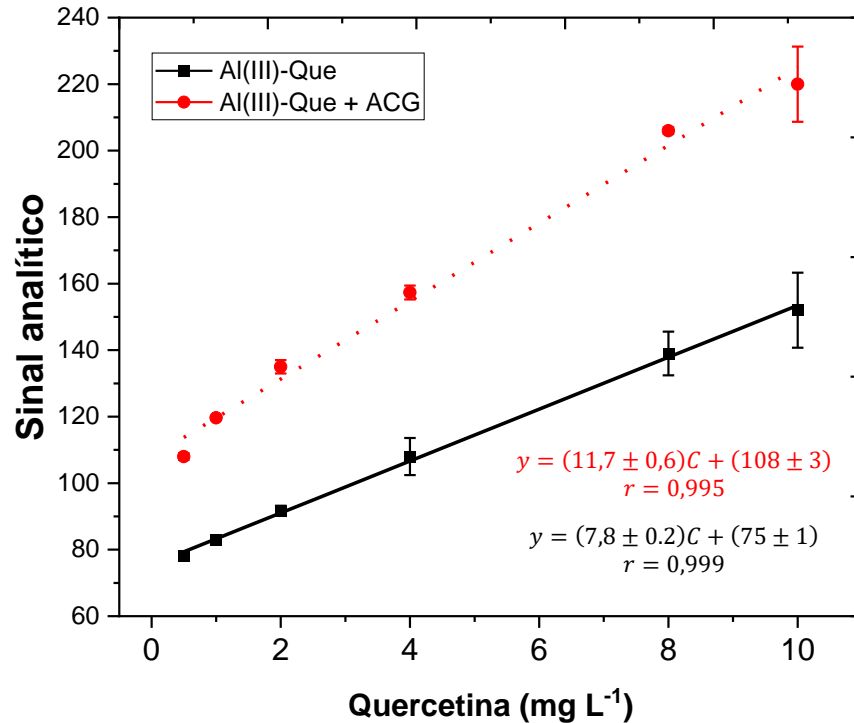
Com o intuito de simplificar o procedimento e aumentar a resposta analítica, o volume de ACN adicionado para promover a separação de fases foi substituído pelo extrato da amostra preparada neste mesmo solvente. Na Figura 16, é apresentada a variação do sinal analítico com o aumento do volume de amostra, neste caso, substituída por uma solução padrão de quercetina. Como é possível observar, 1200 μL de extrato apresentou maior diferença em relação ao branco. Além disso, a resposta analítica permanece aproximadamente constante em volumes maiores e observou-se que uma pequena quantidade de quercetina permaneceu na fração orgânica, indicando que o limite de extração de 150 μL de fase aquosa foi alcançado.

Figura 16. Efeito do volume de extrato em ACN sob o sinal analítico. Condições experimentais: solução padrão de quercetina ($7,5 \text{ mg L}^{-1}$) + $150 \text{ }\mu\text{L}$ de solução reagente (13 mmol L^{-1} de Al(III)) + $50 \text{ }\mu\text{L}$ de $\text{NaCl } 5,0 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de reação de 30 min. Os sinais analíticos referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



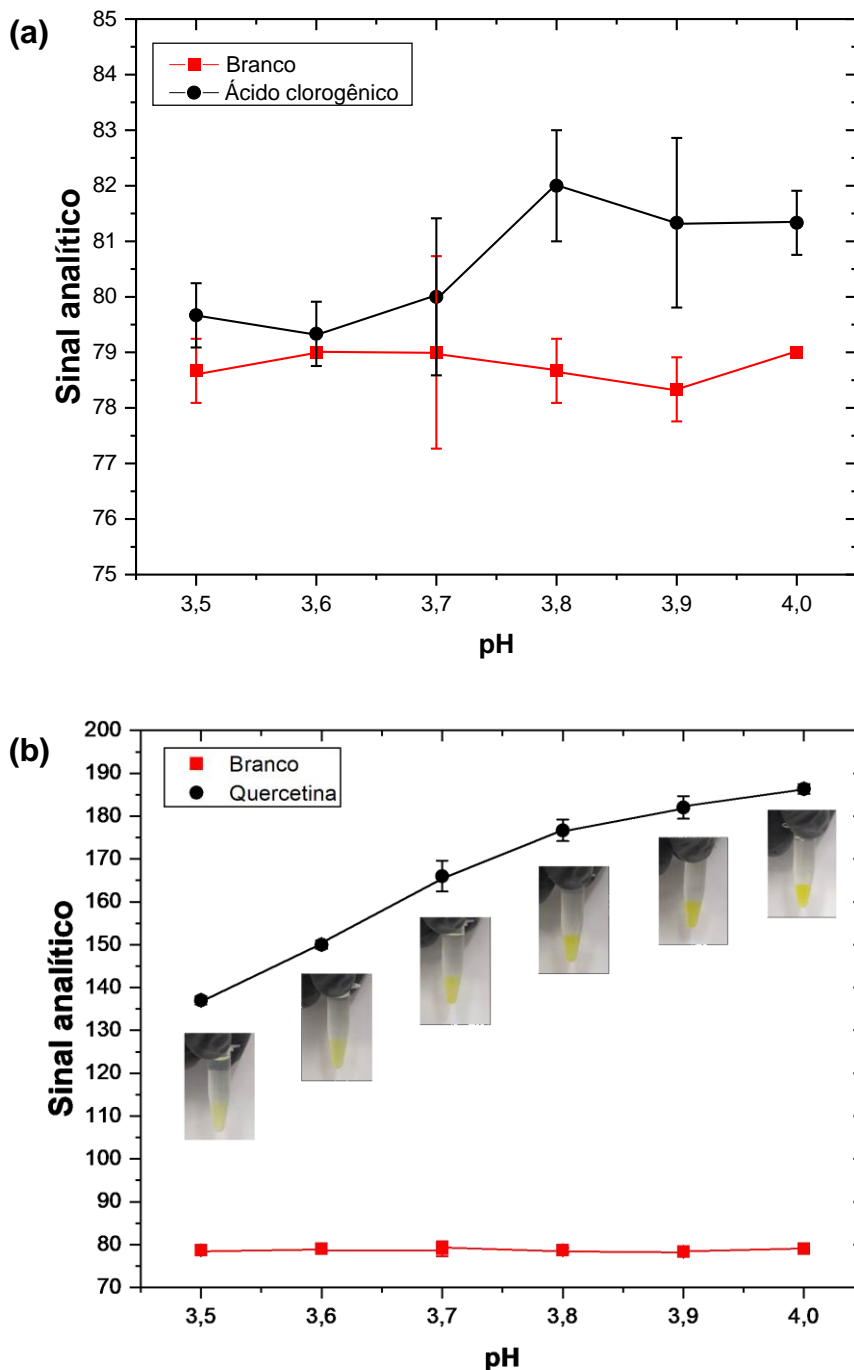
O ácido clorogênico (ACG), um dos ácidos fenólicos mais comuns encontrados em berries, também forma complexos coloridos com metais (45,179). Nesse sentido, avaliou-se o efeito do ACG comparando-se as inclinações de curvas de calibração de quercetina com e sem adição de ACG 40 mg L^{-1} , que corresponde ao teor encontrado em mirtilo (180). A interferência foi constatada pelo aumento de 50% na inclinação na presença de ACG (Figura 17), indicando que o complexo formado entre Al(III) e ACG absorve radiação na mesma região espectral (canal B) do complexo Al(III)-QE .

Figura 17. Efeito de ACG (40 mg L^{-1}) na inclinação das curvas de calibração de quercetina. Condições experimentais: $1200 \text{ }\mu\text{L}$ de solução padrão de quercetina + $150 \text{ }\mu\text{L}$ de solução reagente (13 mmol L^{-1} de Al(III), tampão pH 4,7) + $50 \text{ }\mu\text{L}$ de NaCl $5,0 \text{ mol L}^{-1}$. Tempo de reação 30 min. Os sinais analíticos referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



Com o objetivo de minimizar a interferência do ACG, foi avaliado o efeito do pH da solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III) em tampão), visando desfavorecer a formação do complexo Al(III)-ACG (Figura 18). Também foi avaliado o efeito do volume desta solução para melhorar a separação de fases e a definição da região de interesse para as medidas por fotometria por imagens digitais.

Figura 18. Efeito do pH da solução tampão sobre a formação de complexos de Al(III) com (a) ácido clorogênico e (b) quercetina. Condição experimental: 1200 μL de solução padrão de quercetina ou ACG ($33 \mu\text{mol L}^{-1}$) + 150 μL solução reagente (13mmol L^{-1} de Al(III), tampão pH 3,5 – 4,0) + 50 μL de NaCl $5,0 \text{mol L}^{-1}$. Os sinais analíticos referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).

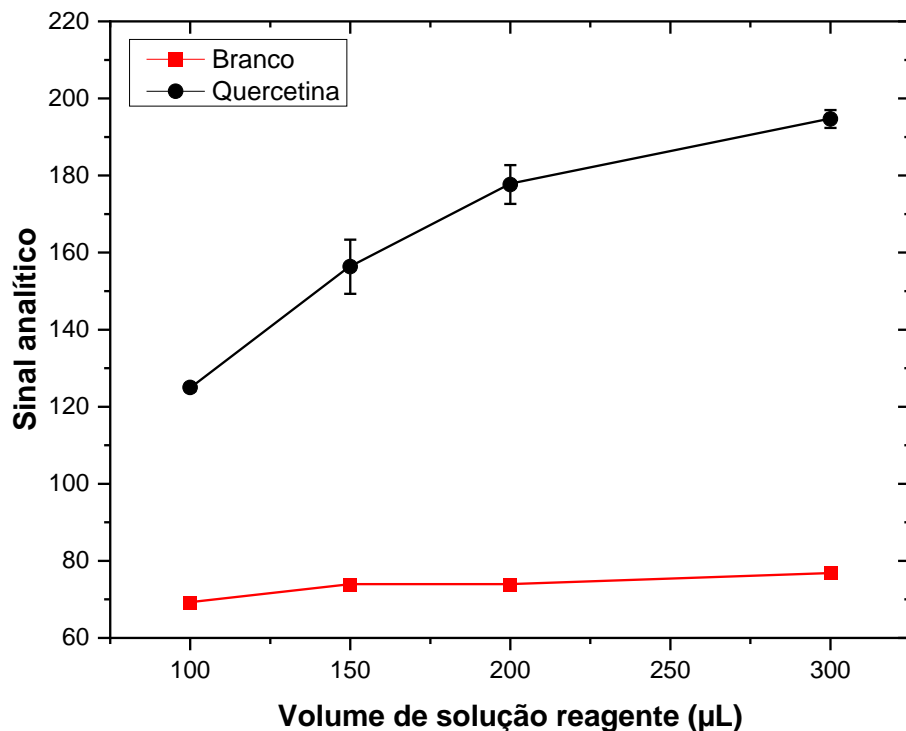


Conforme mostrado na Figura 18a, a resposta analítica para ACG diminuiu com o aumento da acidez ($pK_a = 3,5$ (181)), tornando-se a resposta semelhante ao branco em pH menor que 3,6, indicando formação negligenciável do complexo com Al(III). Para a solução equimolar de quercetina (Figura 18b), também se observou a

diminuição da resposta analítica com a diminuição do pH, porém de forma menos acentuada. Deste modo, embora a resposta analítica para o complexo Al(III)-QE seja menor, o pH da solução reagente foi fixado em 3,5 para evitar a interferência de ACG.

O volume da solução reagente/extratora (Al(III) 13 mmol L⁻¹, em tampão pH 3,5) foi otimizado para maximizar a resposta analítica (Figura 19) e a maior resposta foi obtida utilizando 300 µL. O aumento do volume da solução favorece a partição do complexo Al(III)-QE para a fase inferior

Figura 19. Efeito do volume de solução reagente/extratora sobre o sinal analítico. Condições experimentais: 1200 µL solução padrão de quercetina (10 mg L⁻¹) + solução reagente (13 mmol L⁻¹ de Al(III)) + 50 µL de NaCl 5,0 mol L⁻¹. Tempo de reação 30 min. Os sinais analíticos referem-se à média ± desvio padrão (n = 3).



4.1.4. Características analíticas

O efeito de matriz foi constatado pela comparação dos coeficientes angulares de curvas analíticas obtidas por adição de padrão (entre 4,7±0,2 e 8,1±0,3) e calibração externa ($S = (28 \pm 1)C + (62 \pm 5)$, $r = 0,995$). Sendo assim, nas condições otimizadas, a linearidade foi determinada pela adição de quercetina de 5,6 a 33 µmol L⁻¹ (1,7 a 10 mg L⁻¹) aos extratos de *berries*, sendo obtidas as equações: $S = (6,6 \pm 0,1)C + (15 \pm 1)$, $r = 0,999$ (amora-preta); $S = (8,1 \pm 0,3)C + (31 \pm 2)$, $r = 0,998$ (mirtilo); $S = (4,7 \pm 0,2)C + (16 \pm 1)$, $r = 0,996$ (morango) e $S = (6,5 \pm 0,3)C + (22 \pm 2)$,

$r = 0,995$ (framboesa), onde S corresponde ao sinal analítico (canal B) descontado do branco analítico e C é a concentração de flavonol expressa em equivalente a quercetina (mg L^{-1} EQ). As respostas lineares foram confirmadas pelo teste de falta de ajuste (*lack-of-fit*) para cada curva analítica a um nível de confiança de 95% ($F_{\text{tab}} = 3,26$), resultando em F_{calc} de 0,46; 1,83; 1,00 e 2,27 para amora-preta, mirtilo, morango e framboesa, respectivamente (182). O coeficiente de variação ($n = 10$) foi estimado em 3,1% utilizando o extrato de amora-preta com adição de $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ quercetina. O limite de detecção (LOD) foi estimado como a menor concentração de quercetina que gera uma resposta analítica diferente do branco analítico a 95% de significância. O resultado de $1,7 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ é próximo ao estimado pelo método de propagação de erro ($2,2 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$) (183) que corresponde a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ de quercetina. O procedimento consome apenas $105 \text{ } \mu\text{g}$ de Al(III), $14,6 \text{ mg}$ de NaCl, 60 mg de amostra e gera $1,55 \text{ mL}$ de resíduo por determinação.

Em complemento aos resultados anteriores, recuperações de quercetina adicionada aos extratos de *berries* foram estimadas para avaliar a incidência de efeitos de matriz (Tabela 6). Foram comparados dois métodos de calibração, a calibração externa (do inglês, *External standard calibration*, EC), com soluções de referência de quercetina preparadas em ACN, e o método de adição padrão (*Standard Addition Method*, SAM). As recuperações com EC para amora-preta (56 ± 2 a 65 ± 8), mirtilo (37 ± 5 a 44 ± 1), morango (39 ± 3 a 55 ± 4) e framboesa (62 ± 3 a 72 ± 5) indicam que o método é suscetível a efeitos de matriz, que foram contornados por SAM, com recuperações de 78 ± 5 a 95 ± 23 para amora-preta, 90 ± 9 a 116 ± 10 para mirtilo, 94 ± 23 a 97 ± 7 para morango e 90 ± 5 a 121 ± 27 para framboesa.

Tabela 6. Recuperações de quercetina adicionada em extratos de *berries*.

Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Flavonóis totais (mg L ⁻¹ EQ) ^a			
		SAM		EC	
		Encontrado	Recuperado (%)	Encontrado	Recuperado (%)
Amora-preta	2,0	1,6 ± 0,1	80 ± 5	1,3 ± 0,2	65 ± 8
	4,0	3,8 ± 0,9	95 ± 23	2,4 ± 0,3	56 ± 2
	6,0	5,03 ± 0,04	84 ± 1	3,7 ± 0,1	62 ± 1
Mirtilo	2,0	1,8 ± 0,2	90 ± 9	0,7 ± 0,1	37 ± 5
	4,0	4,2 ± 0,4	105 ± 11	1,6 ± 0,2	40 ± 4
	6,0	6,9 ± 0,6	115 ± 10	2,7 ± 0,1	44 ± 1
Morango	2,0	1,9 ± 0,1	95 ± 7	1,0 ± 0,2	55 ± 4
	4,0	3,8 ± 0,4	95 ± 10	1,5 ± 0,1	39 ± 3
	6,0	5,6 ± 1,4	94 ± 23	2,7 ± 0,3	46 ± 5
Framboesa	2,0	1,8 ± 0,1	90 ± 5	1,4 ± 0,1	72 ± 5
	4,0	4,2 ± 0,7	106 ± 16	2,5 ± 0,1	62 ± 3
	6,0	7 ± 2	117 ± 33	4,1 ± 0,1	69 ± 2

^a Valores médios e incertezas (n = 3).

Para a avaliação da exatidão, amostras de *berries* (amora-preta, mirtilo, morango e framboesa) foram analisadas pelo procedimento proposto e de referência (espectrofotometria UV-vis) (107) e os resultados (Tabela 7) foram concordantes ao nível de confiança de 95% ($t_{calc} = 1,44$ e $t_{tab} = 2,13$, n = 4). Os resultados apresentaram variâncias comparáveis ao nível de 95% de confiança de acordo com o teste F.

Tabela 7. Flavonóis totais em *berries* determinados pelo procedimento proposto e de referência.

Amostra	Flavonóis totais (mg L ⁻¹ EQ) ^a		F-value ^b
	Proposto	Referência	
Amora-preta	3,9 ± 0,3	4,2 ± 0,2	2,3
Mirtilo	3,4 ± 0,6	3,1 ± 0,5	1,4
Morango	2,2 ± 0,1	1,8 ± 0,1	1,0
Framboesa	3,4 ± 0,2	2,6 ± 0,2	1,0

^a Valores médios e incertezas, n = 3.

^b F_{tab} = 19,0.

O procedimento proposto usa instrumentação simples e acessível, requer baixo consumo de reagentes e, conseqüentemente, proporciona baixa geração de resíduos. Além disso, é um procedimento prático e ambientalmente amigável para determinação de flavonóis em amostras de *berries*.

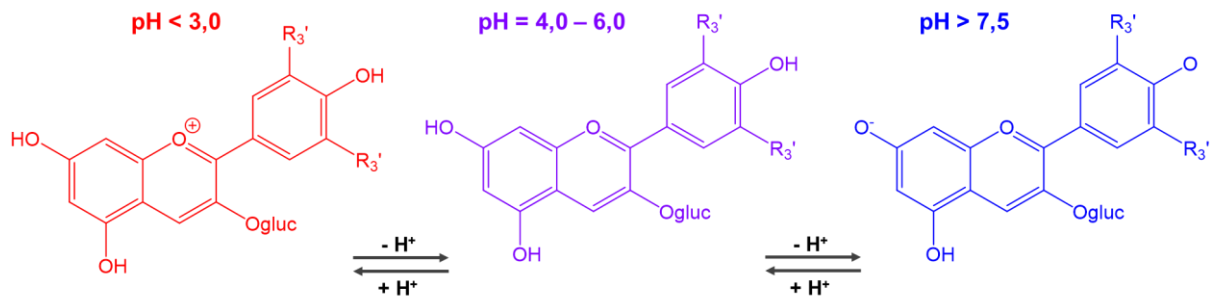
4.2. Procedimento ambientalmente amigável para a determinação seletiva de flavonóis

4.2.1. Aspectos gerais

Visando contornar os inconvenientes do procedimento anterior (extração dos flavonóis com ACN e necessidade de amostras liofilizadas), foi desenvolvido um procedimento ambientalmente amigável explorando etanol para a extração dos flavonóis de *berries* frescas. A SALLME foi explorada para a separação das antocianinas (principais interferentes no método descrito em 4.1) dos flavonóis pela diferença em suas propriedades ácido-base e de solubilidade em água e acetato de etila. Esse solvente foi selecionado para evitar a extração de antocianinas (insolúveis no meio) e viabilizar a partição dos flavonóis (e.g. solubilidade da mirecetina em acetato de etila: 4,25 g L⁻¹ (184) e de quercetina em água: 0,06 g L⁻¹ (176)). Assim, no processo de extração líquido-líquido, os flavonóis são particionados para o acetato de etila, processo governado pela maior solubilidade nesse solvente e favorecido pela adição de sais.

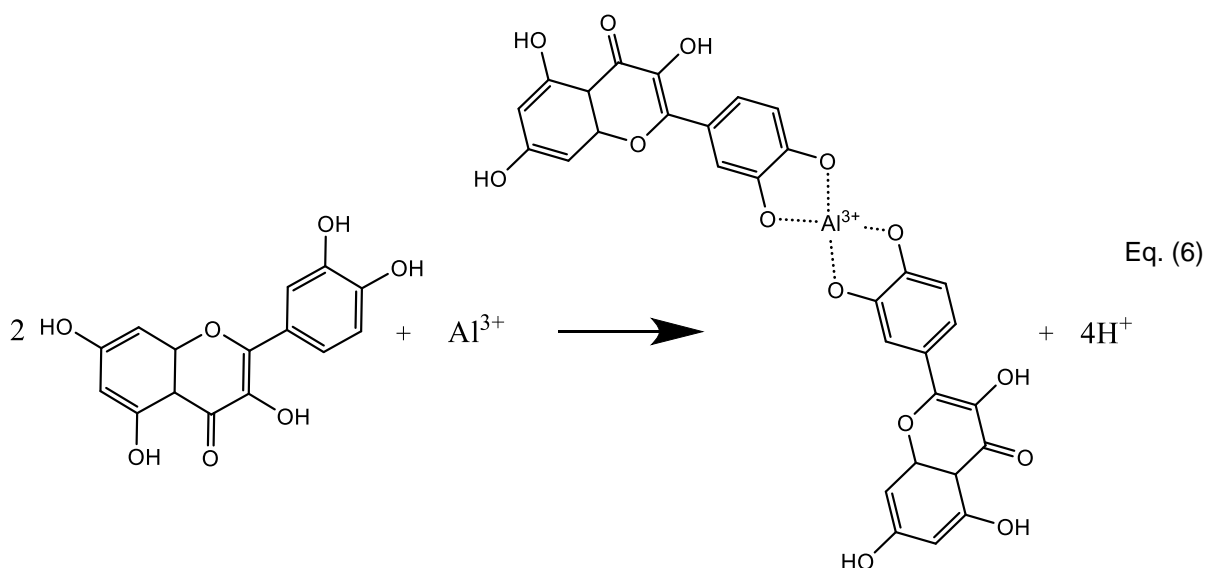
A extração foi realizada em meio ácido para favorecer a protonação das antocianinas e a sua permanência na fase aquosa, na forma do cátion flavílio (Figura 20), uma espécie mais estável e muito solúvel em meio aquoso. No entanto, em pH acima de 7,5 ocorre a desprotonação da molécula e formação da base aniônica quinoidal (185).

Figura 20. Estruturas das antocianinas em diferentes valores de pH.



A seleção do sal para o processo de microextração foi também baseada nos ânions da série de Hofmeister, prevê que os ânions CO_3^{2-} e o SO_4^{2-} devem apresentar o maior efeito *salting-out* (89,186). Deste modo, considerando que o processo é conduzido em meio ácido, o que inviabiliza o uso de sais de carbonato, foi escolhido o Na_2SO_4 para a esta etapa.

Assim como no procedimento anterior, a determinação do conteúdo de flavonóis nas *berries* foi realizada através da formação dos complexos com Al(III) em meio tamponado. A formação do complexo foi investigada utilizando quercetina como composto modelo. Conforme discutido anteriormente (item 4.1.1), o complexo apresenta relação estequiométrica de 1:2 Al(III): quercetina, conforme apresentado Eq. 6. Em meio etanólico, o máximo de absorção do complexo é deslocado para comprimento de onda ligeiramente maior (432 nm). Dessa forma, o canal B do sistema RGB foi também selecionado para a determinação de flavonóis.



Visando à formação do complexo com Al(III), o extrato em acetato de etila foi evaporado, previamente à adição da solução aquosa do íon metálico. A evaporação do solvente, complexação do analito e aquisição das imagens foram feitas diretamente em uma placa de toque de porcelana.

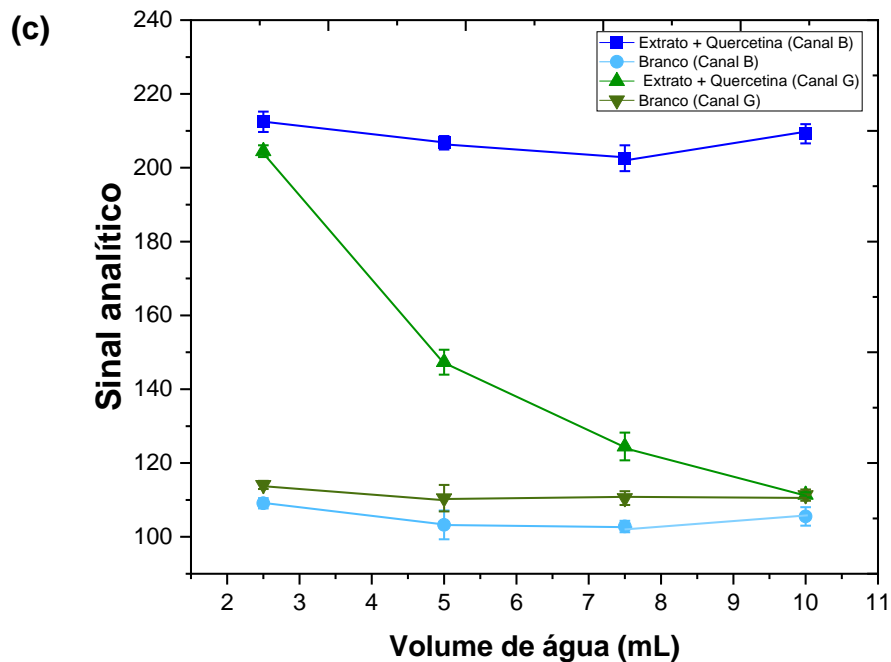
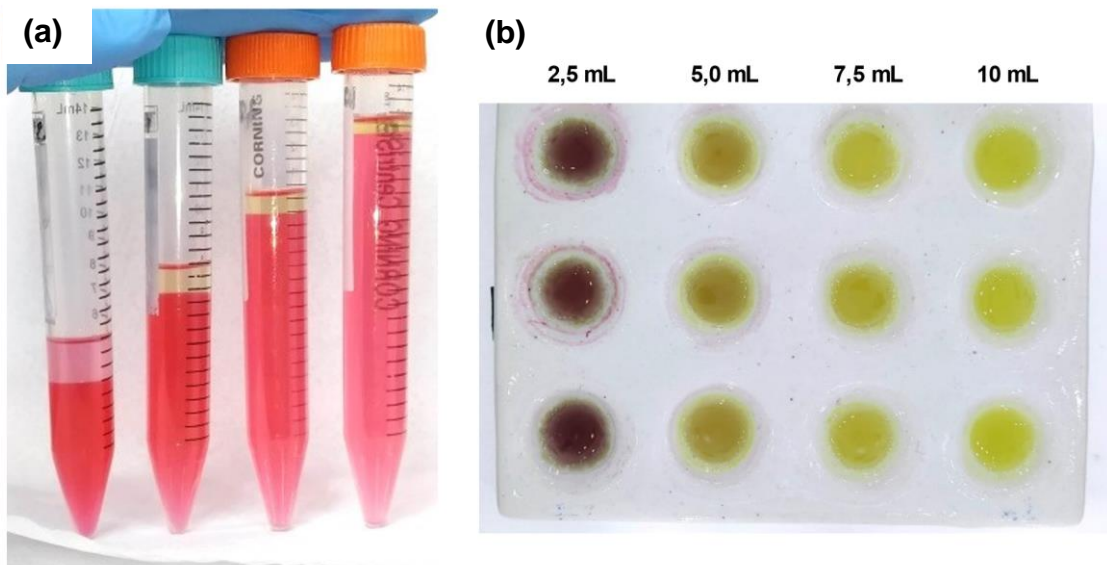
4.2.2. Otimização

Com o objetivo de maximizar a resposta analítica, minimizar a influência das antocianinas e reduzir o consumo de reagentes e, conseqüentemente, a geração de resíduos, o procedimento proposto foi otimizado pelo método univariado. Foram avaliados os efeitos dos volumes de água, solução de Na₂SO₄, amostra e HCl, além da concentração da solução tampão. Com base em experimentos preliminares, foi selecionada a condição inicial: 500 µL de solução de Na₂SO₄ 2,0 mol L⁻¹, 300 µL de solução de HCl 1,0 mol L⁻¹, 1,0 mL de amostra em etanol e 1,5 mL de acetato de etila. Todas as etapas de otimização foram realizadas utilizando solução de quercetina ou extrato de amora-preta dopado com quercetina, ambos preparados em etanol.

No processo de partição líquido-líquido, a adição de água é necessária para favorecer a separação das fases, visto que o acetato de etila é mais solúvel em etanol (solvente dos extratos de frutas) do que em água. Entretanto, como a solubilidade do acetato de etila em água é significativa (64 g L⁻¹ (187)), foi observado que o volume da fase orgânica diminuiu com o aumento na quantidade de água. Com a adição de 1,5 mL de acetato de etila em 1,0 mL de extrato etanólico de amora-preta, após extração, foram observados os seguintes volumes de fase orgânica: 1,5 mL (2,5 mL de água), 1,0 mL (5,0 mL de água), 0,75 mL (7,5 mL de água) e 0,5 mL (10 mL de água). Paralelamente à redução de volume, com o aumento do volume de água, foi observado que a fase orgânica se tornou mais límpida, sem evidência da extração de antocianinas (Figura 21a). A ausência de antocianinas foi confirmada pelo teste negativo após a adição de Al(III) (Figura 21b), conforme discutido no item 4.1.2. Com a adição de 2,5 mL de água, a formação do complexo roxo indica a presença de antocianinas na fração orgânica, o que se torna menos evidente à medida que aumenta o volume de água. Na Figura 21c, é possível observar a diminuição do sinal analítico no canal G, que corresponde à cor complementar do complexo de Al(III) com antocianinas, com o aumento do volume de água. A resposta no canal G se iguala

àquela do branco com a adição de 10 mL de água. Deste modo, esse volume foi escolhido por melhorar a separação das antocianinas.

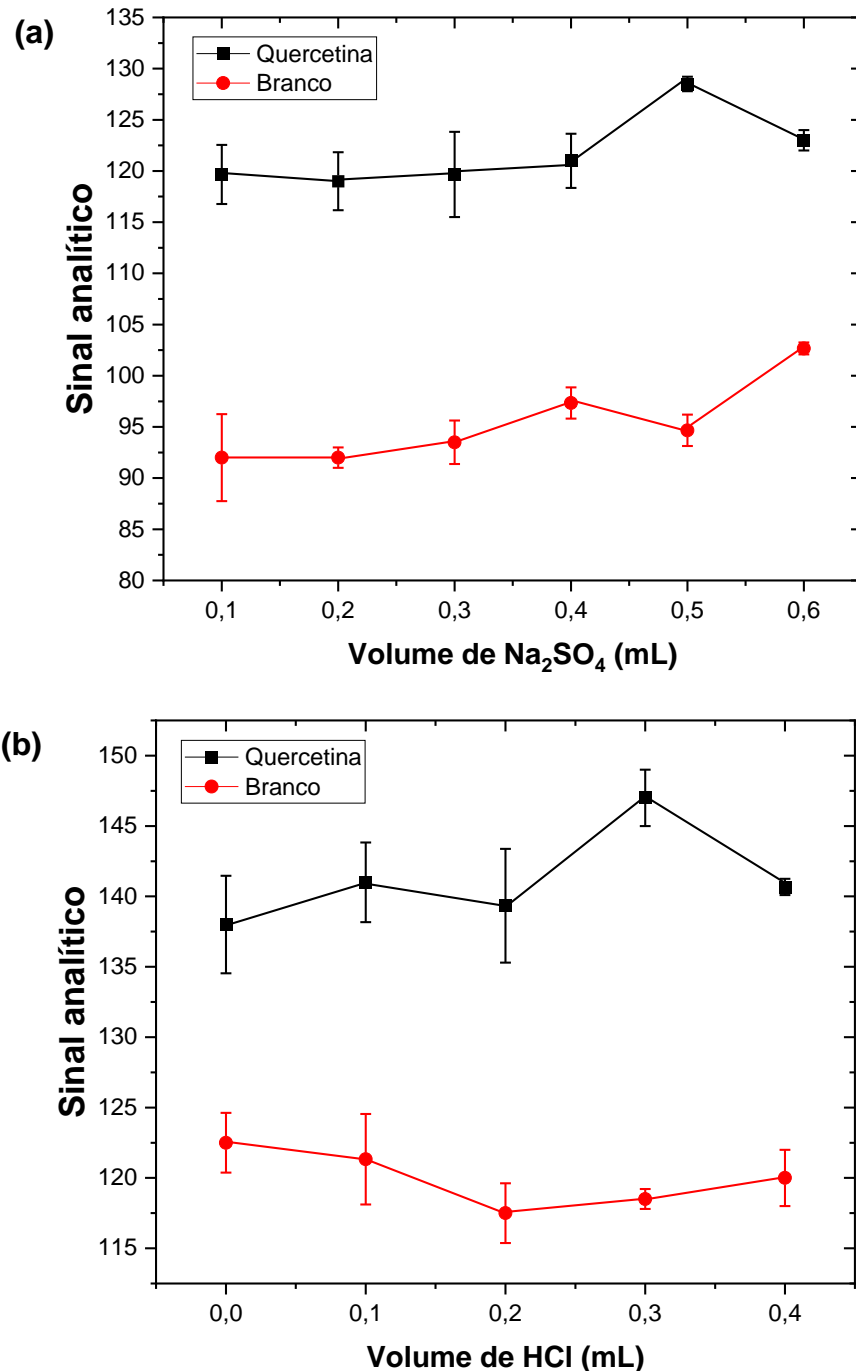
Figura 21. Efeito do volume de água na partição dos flavonóis usando extrato de amora-preta adicionado de quercetina $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ (a); (b) Imagem após secagem de $300 \mu\text{L}$ do sobrenadante ($35 \text{ }^\circ\text{C}$) e reação com $300 \mu\text{L}$ de Al(III) 13 mmol L^{-1} em tampão acetato ($\text{pH } 3,5$) e (c) sinais analíticos referentes à formação de complexo Al(III)-QE (em azul, Canal B) e na presença de antocianinas (em verde, Canal G). Condições experimentais: $1,0 \text{ mL}$ de extrato de amora-preta, $0,3 \text{ mL}$ de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$, $0,1 \text{ mL}$ de HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$, $1,5 \text{ mL}$ de acetato de etila, $0,2 \text{ mL}$ de solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III)) em tampão ($\text{pH } 3,5$). Tempo de reação de 20 min . Em (c), os valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



Devido ao baixo volume da fração orgânica possível de ser recuperado após a adição de 10 mL de água (ca. 300 μL), optou-se por trabalhar com adições maiores do solvente orgânico (2,0 mL) para garantir que ao menos 500 μL pudessem ser transferidos para a placa de toque e utilizado para quantificação. Além disso, o maior volume de acetato de etila permitiu assegurar que a fração aquosa não fosse coletada e assim garantir resultados mais reprodutíveis e sem interferência de antocianinas.

O sulfato de sódio favorece a partição dos flavonóis para o solvente orgânico por efeito *salting-out*, sendo o seu efeito sob o sinal analítico apresentado na Figura 22a. A maior diferença em relação ao branco foi observada quando 0,5 mL de solução salina (2,0 mol L^{-1}) foi utilizada. Conforme a Figura 22b, na ausência de ácido a menor diferença em relação ao branco foi observada. Em meio ácido, flavonóis e flavonas permanecem em sua forma neutra particionando para a fração acetato de etila, enquanto cátions flavílio (antocianinas) permanecem na fração aquosa (185). Sendo assim, com 0,3 mL de HCl, maior quantidade de quercetina é particionada para a fração orgânica.

Figura 22. Efeito dos volumes de solução de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ (a) e HCl $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ (b) na partição dos flavonóis no sistema água-etanol/acetato de etila. Condições experimentais: $1,0 \text{ mL}$ de extrato de amora-preta dopado com quercetina $5,0 \text{ mg L}^{-1}$, $2,0 \text{ mL}$ de acetato de etila, 10 mL de água, $0,2 \text{ mL}$ de solução reagente ($13 \text{ mmol L}^{-1} \text{ Al(III)}$, $\text{pH } 3,5$). Tempo de reação de 20 min . Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



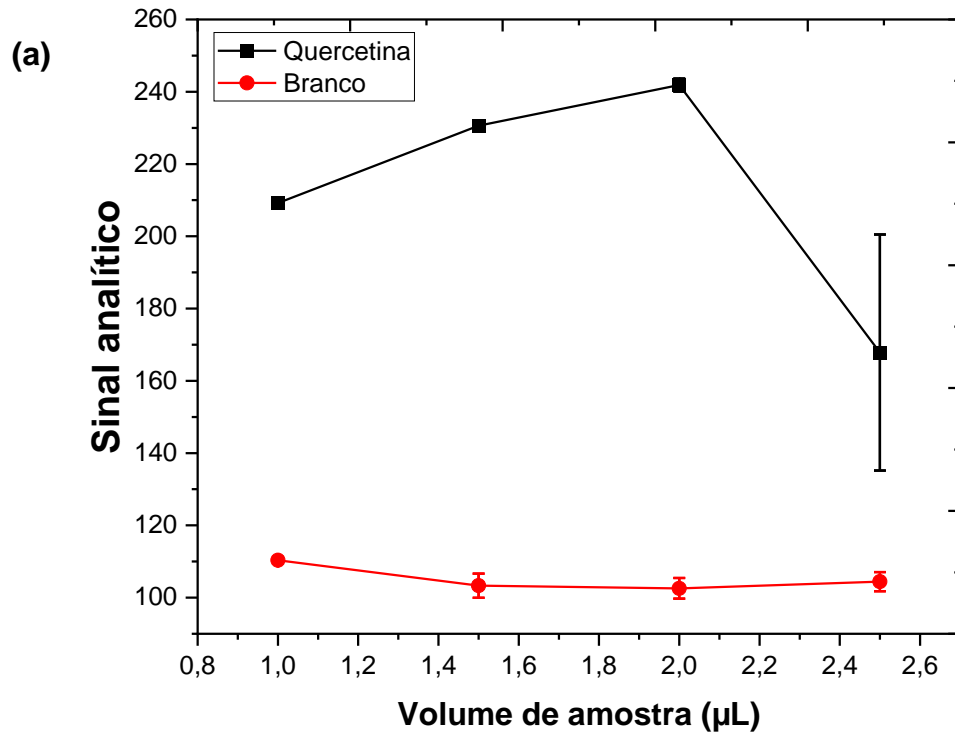
Com o objetivo de reduzir o número de etapas do procedimento proposto, foi avaliado o efeito da solução salina preparada em meio ácido sob a partição dos flavonóis. Considerando as condições otimizadas, solução de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ foi preparada em HCl $0,6 \text{ mol L}^{-1}$, sendo $0,5 \text{ mL}$ desta solução utilizada na etapa de

microextração. A concentração da solução salina foi mantida para garantir a quantidade suficiente do ânion SO_4^{2-} responsável por auxiliar na partição dos analitos para fração orgânica. Os resultados obtidos nesta condição em extrato de amora-preta adicionado de 5 mg L^{-1} de quercetina (sinal analítico = 210 ± 1), não diferiram estatisticamente dos encontrados utilizando as soluções separadas (sinal analítico = 209 ± 3). Além disso, a adição de ácido favorece a solubilização do Na_2SO_4 (solubilidade de 445 g L^{-1} em pH 5,2 versus 281 g L^{-1} em água) (188).

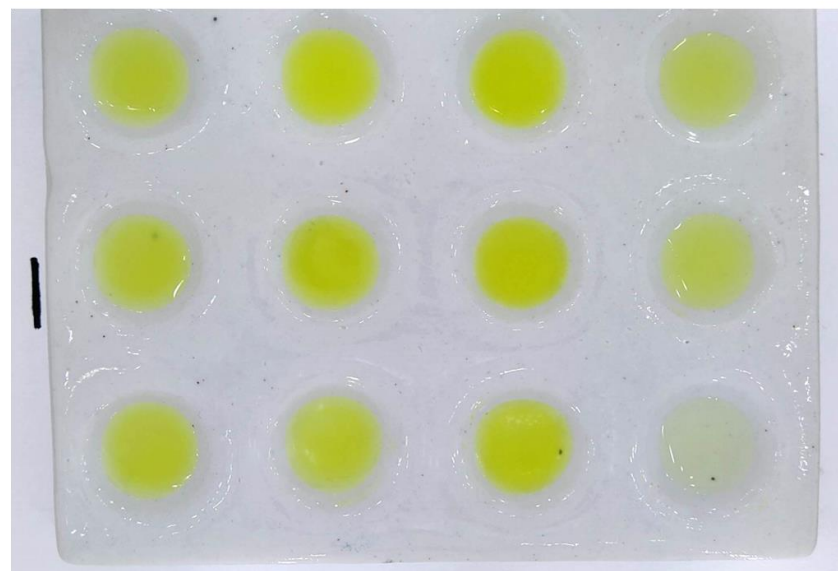
Observou-se que, após a secagem do extrato, ocorria a deposição de um sólido, principalmente nas laterais dos poços da placa, que não solubilizava totalmente apenas com a adição da solução aquosa de Al(III) em tampão. Além disso, ensaios de recuperação mostraram que apenas $50 \pm 8\%$ (extratos de amora-preta) a $65 \pm 2\%$ de quercetina (extratos de mirtilo) eram recuperados sob estas condições. Sendo assim, optou-se pela adição de $150 \mu\text{L}$ de etanol 70 \%v/v , para solubilização do soluto e, posteriormente, $200 \mu\text{L}$ da solução tamponada de Al(III) . A adição de etanol aumentou a sensibilidade em 26% quando comparados os coeficientes angulares das curvas analíticas construídas com e sem a adição do solvente e possibilitou melhores recuperações: $88 \pm 2\%$ a $110 \pm 4\%$ de quercetina nos extratos de mirtilo e amora-preta, respectivamente.

O efeito do volume de amostra ($1,0$ a $2,5 \text{ mL}$) foi avaliado usando solução etanólica de quercetina 5 mg L^{-1} , visando maximizar a resposta analítica. Conforme a Figura 23a, até $2,0 \text{ mL}$ de solução houve aumento do sinal analítico. Com $2,5 \text{ mL}$ a diminuição da resposta analítica e aumento do desvio padrão estão relacionados com o aumento da concentração de etanol que favoreceu a miscibilidade do acetato de etila e dificultou a coleta da fração orgânica para secagem na placa. As imagens são mostradas na Figura 23b. Sendo assim, o volume de $2,0 \text{ mL}$ foi definido como a quantidade ótima de amostra.

Figura 23. Efeito do volume de solução padrão de quercetina $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ na resposta analítica (a) e imagens obtidas na placa de toque (b). Condições experimentais: $0,5 \text{ mL}$ de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl , $2,0 \text{ mL}$ de acetato de etila, 10 mL de água destilada, $0,2 \text{ mL}$ de solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III) , $\text{pH } 3,5$). Tempo de reação de 20 min . Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



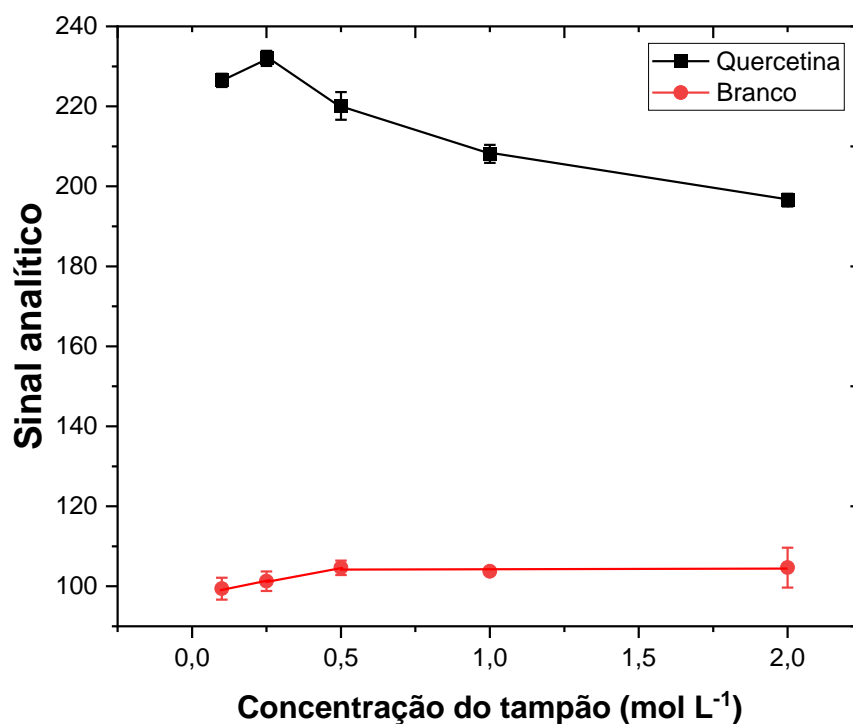
(b)



O efeito da concentração do tampão foi avaliado mantendo a concentração de Al(III) em 13 mmol L^{-1} . Na Figura 24, é possível observar o aumento de sinal analítico com a diminuição da concentração dos componentes do tampão. A presença de

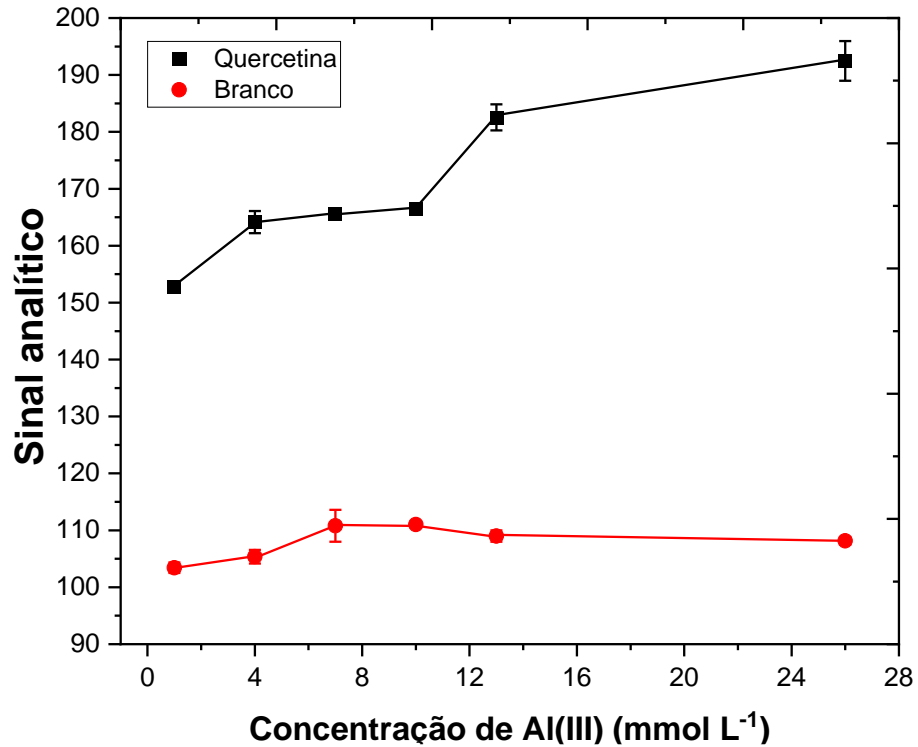
acetato de sódio em altas concentrações favorece a formação de acetato de alumínio ($K_f = 10^8$), diminuindo a concentração do íon livre para a formação do complexo com quercetina (106). Entretanto, o controle do pH em 3,5 é necessário para a determinação seletiva dos flavonóis, evitando a interferência de ACG. Deste modo, a concentração de $0,25 \text{ mol L}^{-1}$ foi definida para compor o tampão (pH 3,5) contendo Al(III).

Figura 24. Efeito da concentração do tampão na resposta analítica. Condições experimentais: 2,0 mL de solução de quercetina ($2,5 \text{ mg L}^{-1}$), 0,5 mL de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, 2,0 mL de acetato de etila, 10 mL de água destilada, 0,2 mL de solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III), pH 3,5). Tempo de reação de 20 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



Como mostra a Figura 25, o sinal analítico é favorecido com o aumento da concentração de Al(III). Entretanto, não foi observada diferença significativa das respostas obtidas utilizando 13 e 26 mmol L^{-1} . Sendo assim, a concentração já utilizada inicialmente (13 mmol L^{-1} , ca. 200 vezes em excesso em relação à maior concentração avaliada de quercetina) foi definida como ótima.

Figura 25. Efeito da concentração de Al(III) na formação do complexo com quercetina ($1,5 \text{ mg L}^{-1}$). Condições experimentais: 2,0 mL de solução de quercetina, 0,5 mL de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, 2,0 mL de acetato de etila, 10 mL de água destilada, 0,2 mL de solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III), pH 3,5). Tempo de reação de 20 min. Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).



Considerando as condições definidas, o efeito do tempo de reação (Figura 26) foi avaliado para assegurar que as medidas analíticas fossem realizadas no estado estacionário, minimizando assim erros sistemáticos. O tempo de 30 min foi fixado para aquisição das imagens, devido a tempo maiores não proporcionarem diferença significativa na resposta analítica - o coeficiente angular de curvas analíticas obtidas entre 20 e 90 min (Tabela 8) apresentaram baixa variação (CV de 4,8%).

Figura 26. Efeito do tempo de reação para formação do complexo Al(III)-QE. Condições experimentais: 2,0 mL de solução de quercetina ($2,0 \text{ mg L}^{-1}$), 0,5 mL de Na_2SO_4 $2,0 \text{ mol L}^{-1}$ em $0,6 \text{ mol L}^{-1}$ de HCl, 2,0 mL de acetato de etila, 10 mL de água destilada, 0,2 mL de solução reagente (13 mmol L^{-1} Al(III), pH 3,5). Valores referem-se à média \pm desvio padrão ($n = 3$).

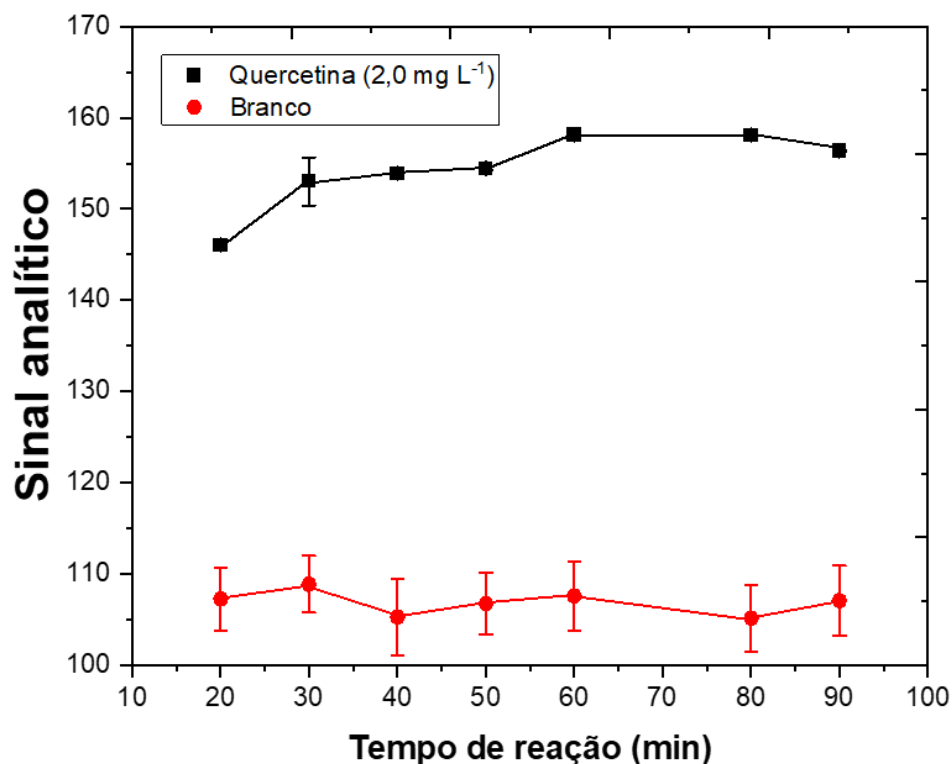


Tabela 8. Efeito do tempo de reação sob a resposta analítica.

Tempo (min)	Equação da reta	r
20	$S = (22 \pm 1)C + (104 \pm 1)$	0,996
30	$S = (23 \pm 1)C + (105 \pm 2)$	0,995
40	$S = (24 \pm 1)C + (102 \pm 2)$	0,995
50	$S = (24 \pm 1)C + (103 \pm 2)$	0,996
60	$S = (25 \pm 1)C + (104 \pm 2)$	0,995
80	$S = (25 \pm 2)C + (102 \pm 2)$	0,993
90	$S = (25 \pm 1)C + (103 \pm 2)$	0,994

Sendo assim, nas condições otimizadas o procedimento proposto de microextração utiliza de 2,0 mL de extrato etanólico ou solução padrão em etanol, 0,5 mL de Na_2SO_4 2,0 mol L^{-1} preparado em HCl 0,6 mol L^{-1} , 2,0 mL de acetato de etila e 10 mL de água deionizada para promover a partição dos flavonóis para a fração orgânica. Para a determinação por fotometria por imagens digitais, 0,5 mL da fração superior é evaporada e ressuspensa com 150 μL de etanol 70 %v/v e 200 μL de solução reagente (tampão 0,25 mol L^{-1} acetato de sódio/ácido acético, pH 3,5, contendo 13 mmol L^{-1} de Al(III)) para formação do complexo monitorado.

4.2.3. Características analíticas

Nas condições otimizadas, o coeficiente de variação e LOD foram estimados em 3,9% (quercetina 4 mg L^{-1} , n = 10) e 0,1 mg L^{-1} QE (0,3 $\mu\text{mol L}^{-1}$), respectivamente. O LOD foi estimado como a menor concentração de quercetina gera resposta significativamente diferente da resposta na ausência do analito ao nível de 95% de confiança. O procedimento apresentou resposta linear na faixa 0,33 – 5,00 mg L^{-1} (equivalente a 1 a 17 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de quercetina), descrita pela equação $S = (24 \pm 1)C + (108 \pm 2)$, $r = 0,997$, onde S corresponde ao sinal analítico (255 - B) e C é a concentração de flavonóis expressa em equivalente a quercetina (mg L^{-1} EQ). A linearidade da curva de calibração foi confirmada ao nível de 95% de confiança pelo teste de *lack-of-fit* (182), que resultou em um $F_{\text{calc}} = 1,92$ ($F_{\text{tab}} = 3,11$). A reprodutibilidade do procedimento foi avaliada a partir do coeficiente angular de curvas de calibração obtidas em diferentes dias (n = 5), resultando em CV = 8,8%. O procedimento proposto consome apenas 70 μg de Al(III), 142 mg de Na_2SO_4 , equivalente a 9,2 μL de HCl concentrado e 2 mL de acetato de etila e gera ca. 15 mL de resíduo por determinação, sendo majoritariamente água (10,5 mL) e etanol (2,0 mL).

Recuperações de quercetina em diferentes extratos etanólicos de *berries* (mirtilo, framboesa, amora-preta e morango) foram determinadas para avaliar a ocorrência de efeito de matriz e a efetividade da microextração líquido-líquido (Tabela 9). As dopagens de quercetina (1,0 a 2,0 mg L^{-1}) foram realizadas anteriormente ao preparo de amostra. Recuperações entre 90 \pm 3% e 125 \pm 2% foram obtidas para as diferentes amostras de frutas avaliadas, demonstrando que o procedimento evita efeitos de matriz.

Tabela 9. Recuperações de quercetina em amostras de *berries*. Média \pm desvio padrão (n = 3).

Amostra	Adicionado (mg L ⁻¹)	Encontrado (mg L ⁻¹)	Recuperação (%)
Mirtilo	1,0	0,90 \pm 0,03	90 \pm 3
	1,5	1,57 \pm 0,07	104 \pm 5
	2,0	2,0 \pm 0,1	101 \pm 5
Framboesa	1,0	1,23 \pm 0,07	123 \pm 7
	1,5	1,87 \pm 0,03	125 \pm 2
	2,0	2,38 \pm 0,02	119 \pm 1
Amora-preta	1,0	0,94 \pm 0,09	94 \pm 9
	1,5	1,4 \pm 0,1	96 \pm 6
	2,0	1,9 \pm 0,1	96 \pm 6
Morango	1,0	1,12 \pm 0,09	112 \pm 9
	1,5	1,76 \pm 0,12	117 \pm 8
	2,0	2,42 \pm 0,06	121 \pm 3

Os resultados obtidos utilizando o procedimento proposto foram comparados com o procedimento espectrofotométrico de referência (item 3.1.6) (107). Para a avaliação da etapa de microextração desenvolvida, o método de referência foi aplicado nos extratos com e sem a etapa de *clean-up* com acetato de etila (Tabela 10).

Tabela 10. Determinação de flavonóis totais em amostras de *berries* pelos procedimentos proposto e de referência, com e sem o *clean-up* de amostra com acetato de etila. Média \pm desvio padrão (n = 3).

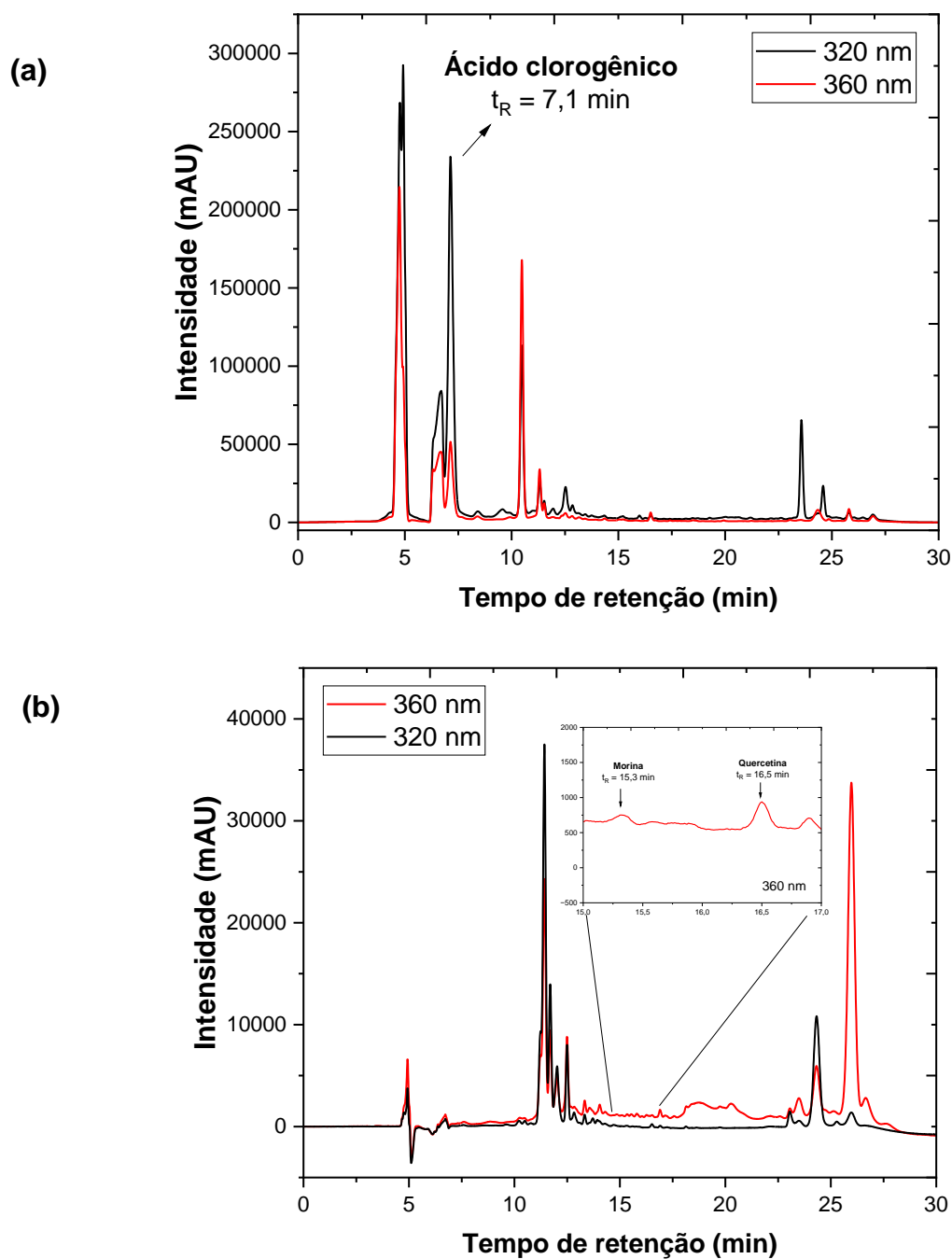
Amostra	Flavonóis totais (mg L ⁻¹ EQ)		
	Espectrofotometria		Proposto
	Sem pré-tratamento	Com pré-tratamento	
Mirtilo	52 \pm 2	11,2 \pm 0,2	14,78 \pm 0,05
Amora-preta	36 \pm 1	1,84 \pm 0,08	1,7 \pm 0,3
Framboesa	13,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2	2,4 \pm 0,3
Morango	12,2 \pm 0,3	1,2 \pm 0,1	1,25 \pm 0,09

Sem a etapa de microextração, as quantidades de flavonoides determinadas pelo método espectrofotométrico podem ser até ca. 20 vezes maiores. As antocianinas, um dos principais constituintes destes extratos, formam complexos com Al(III), como discutido anteriormente. Além disso, de acordo com Papoti e colaboradores (107), o método espectrofotométrico pode sofrer interferência de compostos com grupamento *o*-difenoil e catecólico, como ácido clorogênico. O procedimento de preparo de amostra proposto demonstrou-se adequado para a quantificação destas espécies nos extratos de *berries*, visto que os resultados não diferem estatisticamente ao nível de 95% de confiança ($t_{\text{calc}} = 1,11$ e $t_{\text{tab}} = 2,35$). As variâncias foram estatisticamente concordantes ao nível de confiança de 95%, conforme avaliado pelo teste F: $F_{\text{tab}} = 19,0$ e $F_{\text{calc}} = 16$ (mirtilo), 2 (amora-preta), 14 (framboesa) e 1 (morango).

Separações cromatográficas foram realizadas para avaliar as espécies monitoras e possíveis interferentes, comparando os respectivos t_R em extratos etanólicos de amora-preta. Na Figura 27, é possível observar que quando o preparo de amostra não foi aplicado, um dos principais compostos presentes no extrato é o ácido clorogênico ($t_R = 7,1$ min, 320 nm), Figura 27a. Entretanto, o ACG não particiona para a fração orgânica por ser mais solúvel em água (40 g L⁻¹ (189)) em relação ao acetato de etila (190). Sendo assim, apenas os analitos (morina ($t_R = 15,3$ min) e quercetina ($t_R = 16,5$ min) em 360 nm) particionam para a fase orgânica (Figura 27b), e apenas as antocianinas e ácido clorogênico permanecem na fração aquosa, confirmando a efetividade da etapa de microextração. Além disso, experimentos adicionais por cromatografia mostraram

que o preparo de amostra possibilita altas recuperações de quercetina e morina (ca. 92%) quando o preparo de amostra foi utilizado.

Figura 27. Cromatogramas (320 e 360 nm) do extrato etanólico de amora-preta sem (a) e com (b) o procedimento de preparo de amostra.



4.3. Comparação dos procedimentos analíticos desenvolvidos

Os procedimentos propostos baseados em microextração líquido-líquido para a determinação de flavonóis totais em *berries* apresentaram vantagens em relação aos métodos espectrofotométricos e cromatográficos descritos na Tabela 11.

Tabela 11. Características analíticas de procedimentos para a determinação de flavonoides em alimentos e bebidas.

Procedimento	Tipo de solvente extrator ^a	Volume de solvente (mL) ^{ab}	Faixa linear (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	Volume de resíduo ^b (mL)	Referência
HPLC-UV	Metanol	0,63	2 - 100	0,63	55	(124)
HPLC-UV	Metanol	1,0 (acetato de etila) 0,5 (acetonitrila)	0,16 - 160	0,13	62	(82)
HPLC-MS/MS	Etanol/água	10	0,05 - 10	0,0015	25,6	(129)
Espectrofotometria UV-Vis	Metanol/etanol/água	50 - 100	0,3 - 27	0,9	2,5	(107)
Espectrofotometria UV-Vis	Água	100	15 - 151	4,5	2	(104)
Fotometria por imagens digitais-SALLME (Procedimento I)	Acetonitrila	5	1,7 - 10	0,5	1,5	Este trabalho
Fotometria por imagens digitais-SALLME (Procedimento II)	Etanol	2	0,33 - 5,0	0,1	15	Este trabalho

^a utilizado no preparo de amostra; ^b por determinação.

Procedimentos baseados em cromatografia (82,124,129) requerem equipamentos de alto custo, com preparo de amostra laborioso, e geram um alto volume de resíduo por determinação (maior que 20 mL), pois requerem longos períodos para a separação dos compostos durante as corridas cromatográficas. Além disso, menores LOD foram obtidos pelos procedimentos propostos em comparação com os métodos espectrofotométricos (82,104,107,124). Entretanto, devido à maior sensibilidade e seletividade inerente aos detectores de espectrometria de massa (129), baixos LOD podem ser obtidos, *ca.* 300 e 60 vezes, em relação aos métodos usando ACN (Procedimento I) e acetato de etila (Procedimento II), respectivamente. Os métodos espectrofotométricos apresentam faixa linear mais ampla do que o método por fotometria por imagens digitais. Porém, esses métodos requerem alto consumo de solvente durante o preparo das amostras (de 20 a 50 vezes maiores que nos procedimentos propostos) e apresentam menor seletividade, pois os extratos são utilizados diretamente, permitindo que outros compostos formem complexos e superestimem a resposta final (104,107).

Em relação aos procedimentos desenvolvidos, é necessário destacar que o procedimento II apresenta vantagens em relação ao procedimento I, como por exemplo, a utilização de menor quantidade de solvente extrator (2,0 mL de etanol), que possui menor grau de toxicidade, permite que seja utilizada calibração externa, que evita o elevado consumo de amostra para compatibilizada e requer menor tempo de preparo. Entretanto, o Procedimento I permite a geração de menor quantidade de resíduos, utiliza menores quantidades de sal e menor quantidade de amostra. Embora diferentes estratégias de calibração sejam aplicadas, calibração por adição de padrão (Procedimento I) e externa (Procedimento II), as faixas lineares são adequadas para quantificações de flavonóis em *berries*.

Uma das tendências em diversas áreas da química é a substituição de métodos convencionais por alternativas mais sustentáveis, economicamente e energeticamente viáveis, que se baseiem nos 12 princípios da química verde (191,192). Uma das ferramentas de avaliação destes princípios é o índice de procedimento analítico verde (do inglês, *Green Analytical Procedure Index*, GAPI), que considera diversos parâmetros dentro de cinco grandes categorias, conforme a Tabela 12 (193).

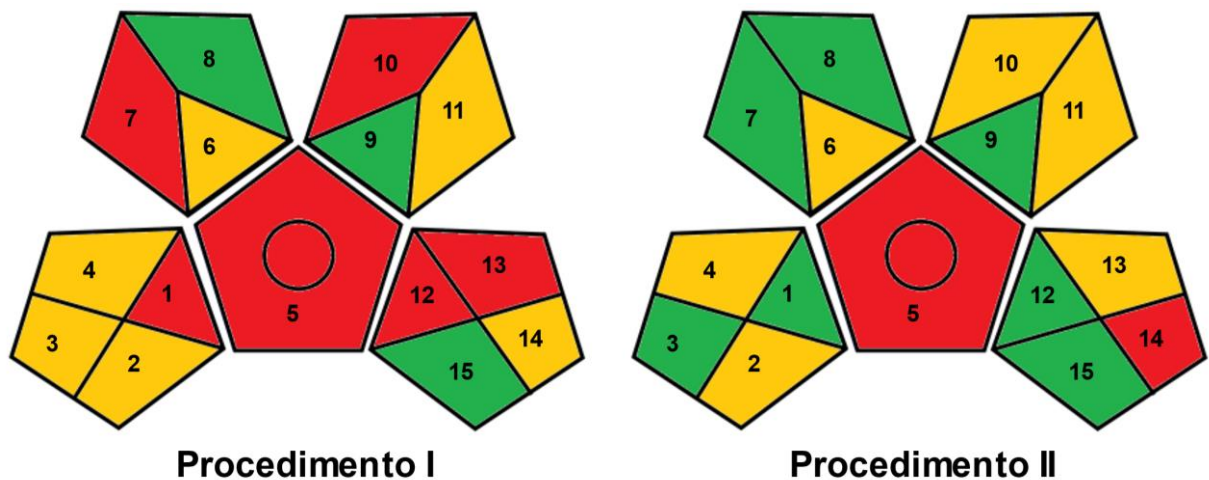
Tabela 12. Parâmetros considerados no índice de procedimento analítico verde (GAPI).

Parâmetro	Categoria
<i>Manuseio da amostra</i>	
1	Coleta de amostra
2	Preservação
3	Transporte
4	Armazenamento
<i>Tipo de método</i>	
5	Quantitativo ou qualitativo
<i>Preparo de amostra</i>	
6	Escala de extração
7	Solventes ou reagentes utilizados
8	Tratamento adicional
<i>Reagentes e solventes</i>	
9	Quantidade
10	Perigo à saúde (NFPA) ^a
11	Risco de segurança (NFPA)
<i>Instrumentação</i>	
12	Consumo de energia
13	Perigo ocupacional
14	Resíduo
15	Tratamento do resíduo

^a Associação Nacional de Proteção Contra Incêndios (do inglês, *National Fire Protection Association*, NFPA).

O GAPI foi aplicado para avaliar os procedimentos analíticos desenvolvidos quanto à aderência à química analítica verde. A escala de cor variando de verde, amarelo ou vermelho foi aplicada para indicar o baixo, médio ou alto impacto ambiental do método, respectivamente, utilizando um pictograma composto por cinco pentagramas (Figura 28), conforme proposto por Płotka-Wasyłka (193).

Figura 28. GAPI dos procedimentos desenvolvidos baseados em microextração. Os procedimentos I e II referem-se à extração com acetonitrila e acetato de etila, respectivamente.



Ao observar os procedimentos, é possível constatar similaridades na forma de manuseio das amostras, como na preservação e armazenamento das frutas sob temperatura de refrigeração ou congelamento. Em relação ao transporte, a necessidade de utilizar amostras liofilizadas (Procedimento I) requer que as amostras sejam transportadas para o local de análise para seu preparo. Para o Procedimento II, a utilização de amostras *in natura* possibilita que o procedimento seja realizado logo após a coleta das frutas e em locais próximos, pois requer apenas o uso de equipamento bancada (e.g. banho ultrassônico e chapa aquecedora).

Ambos os procedimentos utilizam de baixos volumes de solvente orgânico (microextração), entretanto, o emprego de ACN (Procedimento I) ($EC_{50} = 2695 \text{ mg L}^{-1}$) como solvente extrator torna o procedimento menos verde, quando comparado ao Procedimento II, que utiliza etanol ($EC_{50} = 8300 \text{ mg L}^{-1}$) para extração dos flavonoides das *berries* e pequenas quantidades de acetato de etila ($EC_{50} = 4900 \text{ mg L}^{-1}$) na etapa de microextração. Além disso, a ACN é considerada como prejudicial ao analista (NFPA = 4 – muito perigoso) por ser altamente tóxica se inalada e causar irritação na pele e nos olhos. O etanol (NFPA = 2 – perigo moderado) é um solvente reconhecido como seguro e amplamente aplicado na indústria farmacêutica e alimentícia. O acetato de etila, também classificado com NFPA = 2, é prejudicial ao sistema respiratório, porém apenas 2,0 mL são utilizados para o preparo de amostra, minimizando possíveis impactos ambientais e à saúde do analista, deste que realizado em capela.

Com respeito à instrumentação utilizada, é essencial considerar o elevado consumo de energia do Procedimento I (> 1,5 kWh) devido ao uso do liofilizador (ca. 72 horas) e moinho criogênico (ca. 15 min) para garantia de extração livre de antocianinas. Esta etapa não foi necessária para o Procedimento II, que utiliza frutas *in natura* e moagem em almofariz e pistilo, o que garante consumo mínimo de energia (1,0 kWh) apenas relacionado à centrifuga (2 min) e chapa de aquecimento (ca. 30 min).

Com relação a quantidade de resíduo por determinação, cerca de 1,5 e 15 mL são gerados nos Procedimentos I e II, respectivamente. Entretanto, os resíduos gerados no Procedimento I necessitam de tratamento adequado por ser prejudicial ao meio ambiente. Para ACN, a degradação térmica deve ser evitada devido à possibilidade de formação de cianeto, sendo uma alternativa submeter o resíduo de solvente à hidrólise básica e refluxo para geração de ácido acético e amônia (194). Já no Procedimento II, o resíduo gerado refere-se à água e etanol, com baixas concentrações de acetato de etila (removível por evaporação), tornando o resíduo reciclável e ambientalmente amigável.

5. CONCLUSÕES

Estratégias analíticas simples, econômicas e ambientalmente amigáveis para a determinação de flavonóis de *berries* baseadas em microextração líquido-líquido e fotometria por imagens digitais foram desenvolvidas. Ambos os procedimentos são alternativas viáveis aos procedimentos descritos na literatura, por utilizarem quantidades reduzidas de reagentes e solventes, demandarem menor tempo e evitarem interferências causadas pela presença de ácido clorogênico, devido ao controle de pH. Além disso, a aplicação de SALLME demonstrou-se como uma alternativa efetiva para a extração de flavonóis, por minimizar a presença de antocianinas e ácido clorogênico. O procedimento utilizando amostras liofilizadas e ACN destaca-se como uma alternativa promissora para a separação de espécies com diferentes polaridades. As características analíticas determinadas para ambos os procedimentos se demonstram adequadas para quantificação de flavonóis em *berries* e derivados, permitindo alcançar menores LOD que procedimentos espectrofotométricos e, em alguns casos, menor que os cromatográficos, porém utilizando equipamentos e acessórios de menor custo (*smartphone*, caixa de isopor, LED e suporte para celular). Os resultados obtidos comparando os procedimentos propostos com os de referência (espectrofotométrico) foram concordantes ao nível de 95% de confiança. Estas características analíticas demonstram que os procedimentos desenvolvidos são abordagens práticas, acessíveis e sustentáveis, permitindo que sejam implementadas em análises de rotina em laboratórios.

REFERÊNCIAS

1. Parkin KL, Fennema OR, Damodaran S. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 890 p.
2. Szajdek A, Borowska EJ. Bioactive Compounds and Health-Promoting Properties of Berry Fruits: A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 63, n. 4, p. 147–156, 2008.
3. Aharoni A, Galili G. Metabolic engineering of the plant primary–secondary metabolism interface. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 239–244, 2011.
4. Debnath B, Singh WS, Das M, Goswami S, Singh MK, Maiti D, et al. Role of plant alkaloids on human health: A review of biological activities. **Materials Today Chemistry**, v. 9, p. 56–72, 2018.
5. Brihi N. Pharmacological activity of Alkaloids: A Review. **Asian Journal of Botany**, v. 1, p. 1–5, 2018. DOI:10.63019/ajb.v1i2.467
6. Uzor PF. Alkaloids from Plants with Antimalarial Activity: A Review of Recent Studies. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, special issue, art. 8749083, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/8749083>
7. Blažević I, Montaut S, Burčul F, Olsen CE, Burow M, Rollin P, et al. Glucosinolate structural diversity, identification, chemical synthesis and metabolism in plants. **Phytochemistry**, v. 169, art. 112100, 2020.
8. Clarke DB. Glucosinolates, structures and analysis in food. **Analytical Methods**, v. 2, n. 4, p. 310–325, 2010.
9. Connolly EL, Sim M, Travica N, Marx W, Beasy G, Lynch GS, et al. Glucosinolates From Cruciferous Vegetables and Their Potential Role in Chronic Disease: Investigating the Preclinical and Clinical Evidence. **Frontiers in Pharmacology**, v. 12, art. 767975, 2021.
10. Suzuki H, Mutoh M, Kamoshida T, Kakinoki N, Yoshida S, Ebihara T, et al. Chemoprevention against colon cancer by dietary intake of sulforaphane. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 9, n. 6, p. 392–411, 2019.
11. Pichersky E, Raguso RA. Why do plants produce so many terpenoid compounds? **New Phytologist**, v. 220, n. 3, p. 692–702, 2018.
12. Ludwiczuk A, Skalicka-Woźniak K, Georgiev MI. Chapter 11 - Terpenoids. In: Badal S, Delgoda RBT-P, (eds.). **Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies**. Boston: Academic Press, 2017. p. 233–266.
13. Aneesh PA, Ajeeshkumar KK, Lekshmi RGK, Anandan R, Ravishankar CN, Mathew S. Bioactivities of astaxanthin from natural sources, augmenting its biomedical potential: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 125, p. 81–90, 2022.
14. Huang M, Lu JJ, Huang MQ, Bao JL, Chen XP, Wang YT. Terpenoids: Natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801–1818, 2012.

15. Liang X, Ma C, Yan X, Liu X, Liu F. Advances in research on bioactivity, metabolism, stability and delivery systems of lycopene. **Trends in Food Science and Technology**, v. 93, p. 185–196, 2019.
16. Rupasinghe HP V, Nair SVG, Robinson RA. Chapter 8 - Chemopreventive Properties of Fruit Phenolic Compounds and Their Possible Mode of Actions. In: Atta-ur-Rahman BT-S (ed.) **Studies in Natural Products Chemistry**. Amsterdam: Elsevier, 2014. p. 229–266.
17. Haminiuk CWI, Maciel GM, Plata-Oviedo MS V, Peralta RM. Phenolic compounds in fruits – an overview. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 10, p. 2023–2044, 2012.
18. Santos-Sánchez NF, Salas-Coronado R, Hernández-Carlos B, Villanueva-Cañongo C. Shikimic Acid Pathway in Biosynthesis of Phenolic Compounds. In: Soto-Hernández M, García-Mateos R, Palma-Tenango M, (eds.) **Plant Physiological Aspects of Phenolic Compounds**. London: IntenchenOpen, 2019.
19. Shahidi F, Ambigaipalan P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.
20. Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, et al. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76, n. 3, p. 560–568, 2002.
21. Ambriz-Pérez DL, Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Heredia JB. Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food and Agriculture**, v. 2, n. 1, art. 1131412, 2016.
22. Overdeest E, Wouters JA, Wolfs KHM, Van Leeuwen JJM, Possemiers S. Citrus flavonoid supplementation improves exercise performance in trained athletes. **Journal of Sports Science and Medicine**, v. 17, n. 1, p. 24–30, 2018.
23. Roy S, Rhim J-W. Anthocyanin food colorant and its application in pH-responsive color change indicator films. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 14, p. 2297–325, 2021.
24. Costa NMB, Rosa C de OB. **Alimentos funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio Editora, 2016. 504 p.
25. Guven H, Arici A, Simsek O. Flavonoids in Our Foods : A Short Review. **Journal of Basic and Clinical Health Sciences**, v. 3, p. 96–106, 2019.
26. Rana AC, Gulliya B. Chemistry and Pharmacology of Flavonoids- A Review. **Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research**, v. 53, n. 1, 2019. DOI: 10.5530/ijper.53.1.3
27. Karak P. Biological Activities of Flavonoids: an overview. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 10, n. 4, p. 1567–1574, 2019.
28. Nagula RL, Wairkar S. Recent advances in topical delivery of flavonoids: A review. **Journal of Controlled Release**, v. 296, p. 190–201. 2019.

29. Dušan M, Vesna K. Investigation of metal-flavonoid chelates and the determination of flavonoids via metal-flavonoid complexing reactions. **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 72, n. 10, p. 921–939, 2007.
30. Kasprzak MM, Erxlebenc A, Ochockia J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, v. 1, n. 3, p. 1–24, 2013.
31. Rodríguez-Arce E, Saldías M. Antioxidant properties of flavonoid metal complexes and their potential inclusion in the development of novel strategies for the treatment against neurodegenerative diseases. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 143, art. 112236, 2021.
32. Kejík Z, Kaplánek R, Masařík M, Babula P, Matkowski A, Filipenský P, et al. Iron Complexes of Flavonoids-Antioxidant Capacity and Beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, art. 646, 2021.
33. Khater M, Ravishankar D, Greco F, Osborn HMI. Metal complexes of flavonoids: Their synthesis, characterization and enhanced antioxidant and anticancer activities. **Future Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 2845–2867, 2019.
34. Castilho TS, Matias TB, Nicolini KP, Nicolini J. Study of interaction between metal ions and quercetin. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 3, p. 215–219, 2018
35. Ikeda NEA, Novak EM, Maria DA, Velosa AS, Pereira RMS. Synthesis, characterization and biological evaluation of Rutin-zinc(II) flavonoid -metal complex. **Chemico-Biological Interactions**, v. 239, p. 184–191, 2015.
36. Liu RH. Dietary Bioactive Compounds and Their Health Implications. *Journal of Food Science*, v. 78, n. s1, p. A18–A25, 2013.
37. Shashirekha MN, Mallikarjuna SE, Rajarathnam S. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324–1339, 2015.
38. WHO, FAO. **Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases**. Geneva, 2003. (Tech Rep Ser 916).
39. FAO. **Fruit and vegetables** – your dietary essentials. The International Year of Fruits and Vegetables, 2021. Rome, 2020.
40. Shahbandeh M. **Fresh fruit production worldwide 1990-2021** [Internet]. Statista. 2023 [cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.statista.com/statistics/262266/global-production-of-fresh-fruit/>
41. Mordor Intelligence. **Fresh berries market** - growth, trends, COVID-19 impact, and forecasts (2023 - 2028) [Internet]. Gachibowli Hyderabad, Telangana, India, 2023 [cited 2023 Feb 10]. Available from: <https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/fresh-berries-market>
42. Sobekova K, Thomsen MR, Ahrendsen BL. Market trends and consumer demand for fresh berries. **Applied Studies in Agribusiness and Commerce**, v. 7, n. 2-3, p. 11-14, 2013.

43. Chaves VC, Boff L, Vizzotto M, Calvete E, Reginatto FH, Simões CMO. Berries grown in Brazil: anthocyanin profiles and biological properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4331–4338, 2018.
44. Zorzi M, Gai F, Medana C, Aigotti R, Morello S, Peiretti PG. Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Small Berries. **Foods**, v. 9, n. 5, art. 623, 2020.
45. Paredes-López O, Cervantes-Ceja ML, Vigna-Pérez M, Hernández-Pérez T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life - A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 65, n. 3, p. 299–308, 2010.
46. Pap N, Fidelis M, Azevedo L, do Carmo MAV, Wang D, Mocan A, et al. Berry polyphenols and human health: evidence of antioxidant, anti-inflammatory, microbiota modulation, and cell-protecting effects. **Current Opinion in Food Science**, v. 42, p. 167–186, 2021.
47. Rothwell JA, Perez-Jimenez J, Neveu V, Medina-Remón A, M'Hiri N, García-Lobato P, et al. **Phenol-Explorer 3.0**: a major update of the Phenol-Explorer database to incorporate data on the effects of food processing on polyphenol content. **Database**, v. 2013, bat070, 2013.
48. Oliveira JR de, Silva JVG, Amourim MAA, Mayara Nascimento S, Batista AG. Production of small fruits in Brazil: a market in potential. **Enciclopédia Biosfera**, v. 17, n. 33, p. 362–379, 2020.
49. Cantuarias-Avilés T, Silva SR da, Medina RB, Moraes AFG, Alberti MF. Cultivo do mirtilo: atualizações e desempenho inicial de variedades de baixa exigência em frio no Estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 139-147, 2014.
50. Zeist AR, Resende JTV de. Strawberry breeding in Brazil: current momentum and perspectives. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 1, p. 7-16, 2019.
51. Miller K, Feucht W, Schmid M. Bioactive Compounds of Strawberry and Blueberry and Their Potential Health Effects Based on Human Intervention Studies: A Brief Overview. **Nutrients**, v. 11, n. 7, art. 1510, 2019.
52. Guedes MNS, Maro LAC, Abreu CMP de, Pio R, Patto LS. Composição química, compostos bioativos e dissimilaridade genética entre cultivares de amoreira (*Rubus* spp.) cultivadas no Sul de Minas Gerais. Vol. 36, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 206-213, 2014.
53. Antunes LEC, Pereira I dos S, Picolotto L, Vignolo GK, Gonçalves MA. Produção de amoreira-preta no Brasil. Vol. 36, **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 100-111, 2014.
54. Ponder A, Hallmann E. The nutritional value and vitamin C content of different raspberry cultivars from organic and conventional production. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 87, art. 103429, 2020.
55. Moura PHA, Campagnolo MA, Pio R, Curi PN, Assis CN de, Silva TC. Fenologia e produção de cultivares de framboesiras em regiões subtropicais no Brasil. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 12, p. 1714-1721, 2012.

56. Araújo FF, Neri-Numa IA, de Paulo Farias D, da Cunha GRMC, Pastore GM. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 2019.
57. Rufino M do SM, Alves RE, de Brito ES, Pérez-Jiménez J, Saura-Calixto F, Mancini-Filho J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 996–1002, 2010.
58. Iriundo-DeHond M, Miguel E, Del Castillo MD. Food Byproducts as Sustainable Ingredients for Innovative and Healthy Dairy Foods. **Nutrients**, v. 10, n. 10, art. 1358, 2018.
59. El-Missiry MA, Fekri A, Kesar LA, Othman AI. Polyphenols are potential nutritional adjuvants for targeting COVID-19. **Phytotherapy Research**, v. 35, n. 6, p. 2879–2889, 2021.
60. Sridhar A, Ponnuchamy M, Kumar PS, Kapoor A, Vo D-VN, Prabhakar S. Techniques and modeling of polyphenol extraction from food: a review. **Environmental Chemistry Letters**, v. 19, n. 4, p. 3409–3443, 2021.
61. Pereira JAM, Casado N, Porto-Figueira P, Câmara JS. The Potential of Microextraction Techniques for the Analysis of Bioactive Compounds in Food. **Frontiers in Nutrition**, v. 9, art. 825519, 2022.
62. Bustos MC, Rocha-Parra D, Sampedro I, de Pascual-Teresa S, León AE. The Influence of Different Air-Drying Conditions on Bioactive Compounds and Antioxidant Activity of Berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 11, p. 2714–2723, 2018.
63. Azmir J, Zaidul ISM, Rahman MM, Sharif KM, Mohamed A, Sahena F, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.
64. Belwal T, Chemat F, Venskutonis PR, Cravotto G, Jaiswal DK, Bhatt ID, et al. Recent advances in scaling-up of non-conventional extraction techniques: Learning from successes and failures. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 127, art. 115895, 2020.
65. Esclapez MD, García-Pérez J V, Mulet A, Cárcel JA. Ultrasound-Assisted Extraction of Natural Products. **Food Engineering Reviews**, v. 3, n. 2, p. 108–120, 2011.
66. Yusoff IM, Mat Taher Z, Rahmat Z, Chua LS. A review of ultrasound-assisted extraction for plant bioactive compounds: Phenolics, flavonoids, thymols, saponins and proteins. **Food Research International**, v. 157, art. 111268, 2022.
67. Delazar A, Nahar L, Hamedeyazdan S, Sarker SD. Microwave-Assisted Extraction in Natural Products Isolation. **Methods in Molecular Biology**, v. 864, p. 89–115, 2012.
68. Veggi PC, Martinez J, Meireles MAA. Fundamentals of Microwave Extraction. In: Chemat F, Cravotto G, eds. **Microwave-assisted Extraction for Bioactive Compounds: Theory and Practice**. New York, NY: Springer, 2013. p. 15–52.
69. Marques TL, Moraes LMB, Rocha FRP. Systematic evaluation of sample preparation for fractionation of phytohormone salicylic acid in fresh. **Talanta**, v. 208, art. 120352, 2020.

70. Uwineza PA, Waśkiewicz A. Recent Advances in Supercritical Fluid Extraction of Natural Bioactive Compounds from Natural Plant Materials. **Molecules**, v. 25, n. 17, art. 3847, 2020.
71. Silva RPF, Rocha-Santos TAP, Duarte AC. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 40–51, 2016.
72. Zhang J, Wen C, Zhang H, Duan Y, Ma H. Recent advances in the extraction of bioactive compounds with subcritical water: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 95, p. 183–195, 2020.
73. Panić M, Gunjević V, Cravotto G, Radojčić Redovniković I. Enabling technologies for the extraction of grape-pomace anthocyanins using natural deep eutectic solvents in up-to-half-litre batches extraction of grape-pomace anthocyanins using NADES. **Food Chemistry**, v. 300, art. 125185, 2019.
74. Casado N, Morante-Zarcelero S, Pérez-Quintanilla D, Cámara JS, Sierra I. Two novel strategies in food sample preparation for the analysis of dietary polyphenols: Micro-extraction techniques and new silica-based sorbent materials. **Trends in Food Science and Technology**, v. 98, p. 167–180, 2020.
75. Bokhary A, Leitch M, Liao BQ. Liquid–liquid extraction technology for resource recovery: Applications, potential, and perspectives. *J Water Process Eng.* 2021;40:101762.
76. González-Sálamo J, Socas-Rodríguez B, Hernández-Borges J, Rodríguez-Delgado MÁ. Nanomaterials as sorbents for food sample analysis. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 85, p. 203–220, 2016.
77. Armenta S, Garrigues S, Esteve-Turrillas FA, de la Guardia M. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 116, p. 248–253, 2019.
78. Buszewski B, Szultka M. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 198–213, 2012.
79. Herrero-Hernández E, Carabias-Martínez R, Rodríguez-Gonzalo E. Use of a bisphenol-A imprinted polymer as a selective sorbent for the determination of phenols and phenoxyacids in honey by liquid chromatography with diode array and tandem mass spectrometric detection. **Analytica Chimica Acta**, v. 650, n. 2, p. 195–201, 2009.
80. Tartaglia A, D'Ambrosio F, Ramundo P, Ferrone V, Ricci D, Locatelli M. Innovative approach to increase sensibility and selectivity in analytical chemistry: QuEChERS method. **Reviews in Separation Sciences**, v. 2, n. 1, p. 19-34, 2020.
81. Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, n. 2, p. 119–128, 2011.
82. Yang P, Li H, Wang H, Han F, Jing S, Yuan C, et al. Dispersive Liquid-Liquid Microextraction Method for HPLC Determination of Phenolic Compounds in Wine. **Food Analytical Methods**, v. 10, n. 7, p. 2383–2397, 2017.

83. Iqbal M, Tao Y, Xie S, Zhu Y, Chen D, Wang X, et al. Aqueous two-phase system (ATPS): an overview and advances in its applications. **Biological Procedures Online**, v. 18, n. 1, art. 18, 2016.
84. Valente IM, Rodrigues JA. Recent advances in salt-assisted LLE for analyzing biological samples. **Bioanalysis**, v. 7, n. 17, p. 2187–2193, 2015.
85. Goulart SM, de Queiroz MELR, Neves AA, de Queiroz JH. Low-temperature clean-up method for the determination of pyrethroids in milk using gas chromatography with electron capture detection. **Talanta**, v. 75, n. 5, p. 1320–3132, 2008.
86. Pinho GP, Neves AA, de Queiroz MELR, Silvério FO. Optimization of the liquid–liquid extraction method and low temperature purification (LLE–LTP) for pesticide residue analysis in honey samples by gas chromatography. **Food Control**, v. 21, n. 10, p. 1307–1311, 2010.
87. Chen W, Wu S, Zhang J, Yu F, Miao X, Tu X. Salting-out-assisted liquid–liquid extraction of 5-hydroxymethylfurfural from honey and the determination of 5-hydroxymethylfurfural by high-performance liquid chromatography. **Analytical Methods**, v. 11, n. 37, p. 4835–4841, 2019.
88. Tang YQ, Weng N. Salting-out assisted liquid-liquid extraction for bioanalysis. **Bioanalysis**, v. 5, n. 12, p. 1583–1598, 2013.
89. Kang B, Tang H, Zhao Z, Song S. Hofmeister Series: Insights of Ion Specificity from Amphiphilic Assembly and Interface Property. **ACS Omega**, v. 5, n. 12, p. 6229–6239, 2020.
90. Gu T, Gu Y, Zheng Y, Wiehl PE, Kopchick JJ. Phase separation of acetonitrile-water mixture in protein purification. **Separations Technology**, v. 4, n. 4, p. 258–260, 1994.
91. Goulart SM, Alves RD, Paula WX de, Queiroz JH de, Neves AA, Queiroz MELR de. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 6, p. 1154–1165, 2012.
92. Rudakov OB, Khorokhordina EA, Preobrazhenskii MA, Rudakova L V. Low-temperature liquid–liquid extraction of phenols from aqueous solutions with hydrophilic mixtures of extractants. **Russian Journal of Physical Chemistry A**, v. 90, n. 8, p. 1665–1668, 2016.
93. Jang D, Jung YS, Kim M-S, Oh SE, Nam TG, Kim D-O. Developing and Validating a Method for Separating Flavonoid Isomers in Common Buckwheat Sprouts Using HPLC-PDA. **Foods**, v. 8, n. 11, art. 549, 2019.
94. Pirogov A, Sokolova L, Sokerina E, Tataurova O, Shpigun O. Determination of flavonoids as complexes with Al³⁺ in microemulsion media by HPLC method with fluorescence detection. **Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies**, v. 39, n. 4, p. 220–224, 2016.
95. Cuyckens F, Claeys M. Optimization of a liquid chromatography method based on simultaneous electrospray ionization mass spectrometric and ultraviolet photodiode array detection for analysis of flavonoid glycosides. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 16, n. 24, p. 2341–2348, 2002.

96. Rocha FRP, Teixeira LSG. Estratégias para aumento de sensibilidade em espectrofotometria UV-VIS. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 807-812, 2004.
97. Sammani MS, Clavijo S, Cerdà V. Recent, advanced sample pretreatments and analytical methods for flavonoids determination in different samples. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 138, art. 116220, 2021.
98. Csepregi K, Kocsis M, Hideg É. On the spectrophotometric determination of total phenolic and flavonoid contents. **Acta Biologica Hungarica**, v. 64, n. 4, p. 500–509, 2013.
99. Kasprzak MM, Erxleben A, Ochocki J. Properties and applications of flavonoid metal complexes. **RSC Advances**, v. 5, p. 45853–45877, 2015.
100. Sampiev AM, Davitavyan NA. Assay of flavonoids, isoflavonoids, and phenolcarboxylic acids in the field restharrow. **Pharmaceutical Chemistry Journal**, v. 43, n. 7, p. 399–405, 2009.
101. Corradini E, Foglia P, Giansanti P, Gubbiotti R, Samperi R, Laganà A. Flavonoids: chemical properties and analytical methodologies of identification and quantitation in foods and plants. **Natural Product Research**, v. 25, n. 5, p. 469–495, 2011.
102. Dufour C, Dangles O. Flavonoid–serum albumin complexation: determination of binding constants and binding sites by fluorescence spectroscopy. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1721, n. 1, p. 164–173, 2005.
103. Christ B, Müller KH. Zur serienmäßigen Bestimmung des Gehaltes an Flavonol-Derivaten in Drogen. **Archiv der Pharmazie (Weinheim)**, v. 293, n. 12, p. 1033–1042, 1960.
104. Pełkal A, Pyrzynska K. Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776–1782, 2014.
105. Huang R, Wu W, Shen S, Fan J, Chang Y, Chen S, et al. Evaluation of colorimetric methods for quantification of citrus flavonoids to avoid misuse. **Analytical Methods**, v. 10, n. 22, p. 2575–2587, 2018.
106. Jurd L, Geissman TA. Absorption Spectra of Metal Complexes of Flavonoid Compounds. **Journal of Organic Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 1395–1401, 1956.
107. Papoti V., Xystouris S, Papagianni G, Tsimidou M. “Total flavonoid” content assessment via aluminum complexation reactions. What really measure? **Italian Journal of Food Science**, v. 23, p. 252–259, 2011.
108. Saeed A, Marwat MS, Shah AH, Naz R, Zain-UI-Abidin S, Akbar S, et al. Assessment of total phenolic and flavonoid contents of selected fruits and vegetables. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 18, n. 4, p. 686–693, 2019.
109. Tingting S, Xiaobo Z, Jiyong S, Zhihua L, Xiaowei H, Yiwei X, et al. Determination Geographical Origin and Flavonoids Content of Goji Berry Using Near-Infrared Spectroscopy and Chemometrics. **Food Analytical Methods**, v. 9, n. 1, p. 68–79, 2016.
110. Rossi G, Woods FM, Leisner CP. Quantification of Total Phenolic, Anthocyanin, and Flavonoid Content in a Diverse Panel of Blueberry Cultivars and Ecotypes. **HortScience**, v. 57, n. 8, p. 901–909, 2022.

111. Ghafar AMF, Prasad KN, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 3, p. 326–330, 2010.
112. Mashkooor IMAAL. Total phenol, total flavonoids and antioxidant activity of pomegranate peel. **International Journal of ChemTech Research**, v. 6, n. 11, p. 4656–4661, 2014.
113. Cvek J, Medić-Šarić M, Jasprica I, Zubčić S, Vitali D, Mornar A, et al. Optimisation of an extraction procedure and chemical characterisation of Croatian propolis tinctures. **Phytochemical Analysis**, v. 18, n. 5, p. 451–459, 2007.
114. Shaghghi M, Manzoori J., Afshar D., Jouyban A. Determination of flavonoids in pharmaceutical preparations using Terbium sensitized fluorescence method. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 2, p. 126–133, 2003.
115. Akash MSH, Rehman K. High Performance Liquid Chromatography. In: Akash MSH, Rehman K, eds. **Essentials of Pharmaceutical Analysis**. Singapore: Springer Nature Singapore, 2020. p. 175–184.
116. Hasewaga S, Berhow AM, Fong HC. Analysis of Bitter Principles in Citrus. In: Linskens HF, Jackson JF, eds. **Fruits analysis**. Berlin: Springer, 1996. p. 59-80. (Molecular Methods of Plant Analysis, 18).
117. Villiers A, Venter P, Pasch H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography–mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 16–78, 2016.
118. Bligh SWA, Ogegbo O, Wang Z-T. Flavonoids by HPLC. In: Ramawat KG, Mérillon J-M, eds. **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin: Springer, 2013. p. 2107–2144.
119. Stefova M, Stafilov T, Kulevanova S. HPLC Analysis of Flavonoids. In: Cazes J, ed. **Encyclopedia of Chromatography**. Boca Raton, FL: Taylor & Francis, 2004. p. 183–197.
120. Andreu-Navarro A, Fernández-Romero JM, Gómez-Hens A. Luminescent determination of flavonoids in orange juices by LC with post-column derivatization with aluminum and terbium. **Journal of Separation Science**, v. 33, n. 4-5, p. 509–515, 2010.
121. Cuyckens F, Claeys M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.
122. Pitt JJ. Principles and Applications of Liquid Chromatography- Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. **Clinical Biochemist Reviews**, v. 30, n. 1, p. 19–34, 2009.
123. Rijke E, Out P, Niessen WMA, Ariese F, Gooijer C, Brinkman UAT. Analytical separation and detection methods for flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1112, n. 1, p. 31–63, 2006.
124. Liu J, Hefni ME, Witthöft CM. Characterization of Flavonoid Compounds in Common Swedish Berry Species. **Foods**, v. 9, n.3, art. 358, 2020.

125. Khattab R, Brooks MS-L, Ghanem A. Phenolic Analyses of Haskap Berries (*Lonicera caerulea* L.): Spectrophotometry Versus High Performance Liquid Chromatography. **International Journal of Food Properties**, v. 19, n. 8, p. 1708–1725, 2016.
126. Campone L, Piccinelli AL, Pagano I, Carabetta S, Di Sanzo R, Russo M, et al. Determination of phenolic compounds in honey using dispersive liquid–liquid microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 2014;1334:9–15.
127. Kumar A, Malik AK, Tewary DK. A new method for determination of myricetin and quercetin using solid phase microextraction–high performance liquid chromatography–ultra violet/visible system in grapes, vegetables and red wine samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 631, n. 2, p. 177–181, 2009.
128. Stecher G, Huck CW, Popp M, Bonn GK. Determination of flavonoids and stilbenes in red wine and related biological products by HPLC and HPLC–ESI–MS–MS. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 371, n. 1, p. 73–80, 2001.
129. Mustafa AM, Angeloni S, Abouelenein D, Acquaticci L, Xiao J, Sagratini G, et al. A new HPLC-MS/MS method for the simultaneous determination of 36 polyphenols in blueberry, strawberry and their commercial products and determination of antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 367, art. 130743, 2022.
130. Mazurek S, Włodarczyk M, Pielorz S, Okińczyc P, Kuś PM, Długosz G, et al. Quantification of Salicylates and Flavonoids in Poplar Bark and Leaves Based on IR, NIR, and Raman Spectra. **Molecules**, v. 27, n. 12, art. 3954, 2022.
131. Abbas O, Dardenne P, Baeten V. Near-infrared, mid-infrared, and Raman spectroscopy. In: Pico Y, ed. **Chemical analysis of food: techniques and applications**. Amsterdam: Elsevier, 2012. pt. 1, p. 59-89.
132. Turco JF, do Nascimento CL, de Lima VA, Torres YR. Could antioxidant capacity and flavonoid content of ethanolic extracts of geopropolis from Brazilian native bees be estimated from digital photos and NIR Spectra? **Microchemical Journal**, v. 157, art. 105031, 2020.
133. Lund JA, Brown PN, Shipley PR. Quantification of North American and European *Crataegus* flavonoids by nuclear magnetic resonance spectrometry. **Fitoterapia**, v. 143, art. 104537, 2020.
134. Wu F, Wang M. A Portable Smartphone-Based Sensing System Using a 3D-Printed Chip for On-Site Biochemical Assays. Vol. 18, **Sensors**, v. 2018.
135. Xu Z, Zeng C, Zhao Y, Zhou M, Lv T, Song C, et al. Smartphone-based on-site detection of hydrogen peroxide in milk by using a portable ratiometric fluorescent probe. **Food Chemistry**, v. 410, art. 135381, 2023.
136. Kap Ö, Kılıç V, Hardy JG, Horzum N. Smartphone-based colorimetric detection systems for glucose monitoring in the diagnosis and management of diabetes. **Analyst**, . 2021;146(9):2784–806.
137. Minh-Huy D, Anh-Dao L-T, Thanh-Nho N, Nhon-Duc L, Cong-Hau N. Smartphone-based digital images as a low-cost and simple colorimetric approach for the assessment of total phenolic contents in several specific Vietnamese dried tea products and their liquors. **Food Chemistry**, v. 401, art. 134147, 2023.

138. Aguirre MÁ, Long KD, Canals A, Cunningham BT. Point-of-use detection of ascorbic acid using a spectrometric smartphone-based system. **Food Chemistry**, v. 272, p. 141–147, 2019.
139. Rezazadeh M, Seidi S, Lid M, Pedersen-Bjergaard S, Yamini Y. The modern role of smartphones in analytical chemistry. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 118, p. 548–555, 2019.
140. Marcinkowska R, Namieśnik J, Tobiszewski M. Green and equitable analytical chemistry. **Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry**, v. 19, p. 19–23, 2019.
141. Di Nonno S, Ulber R. Smartphone-based optical analysis systems. **Analyst**, v. 146, n. 9, p. 2749–2768, 2021.
142. Soares S, Donati GL, Rocha FRP. Digital-image photometry with multi-energy calibration. **Microchemical Journal**, v. 182, art. 107938, 2022.
143. Anconi ACSA, Brito NCS, Nunes CA. Determination of peroxide value in edible oils based on Digital Image Colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 113, art. 104724, 2022.
144. Resende LMB, Magalhães EJ, Nunes CA. Optimization and validation of a smartphone-based method for the determination of total sterols in selected vegetable oils by digital image colorimetry. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 117, art. 105111, 2023.
145. Fan Y, Li J, Guo Y, Xie L, Zhang G. Digital image colorimetry on smartphone for chemical analysis: A review. **Measurement**, v. 171, art. 108829, 2021.
146. Arunachalam V, Salgaonkar DC, Kevat NV, Walawalkar BV, Das B. Quantification of betacyanin content variation of amaranth varieties by an Android App, colorimeter, and infrared spectroscopy. **Chinese Journal of Analytical Chemistry**, v. 50, n. 10, art. 100145, 2022.
147. Shahvalinia M, Larki A, Ghanemi K. Smartphone-based colorimetric determination of triclosan in aqueoussamples after ultrasound assisted-dispersive liquid–liquid microextraction under optimized response surface method conditions. **Spectrochimica Acta Part A**, v. 278, art. 121323, 2022.
148. Almeida GA, Demuner AJ, Blank DE, Cerceau CI, Santos MH. An Alternative and Fast Method of Nitrite Determination in Meat Sausages Using the PhotoMetrix® Smartphone Applicative for Digitized Image Processing. **Open Access Library Journal**, v. 9, n. 5, 2022. DOI: 10.4236/oalib.1108689
149. Gallagher SR. Digital Image Processing and Analysis with ImageJ. **Current Protocols - Essential Laboratory Techniques**, v. 9, n. 1, p. A.3C.1-A.3C.29, 2014.
150. Caleb J, Alshana U, Ertaş N. Smartphone digital image colorimetry combined with solidification of floating organic drop-dispersive liquid-liquid microextraction for the determination of iodate in table salt. **Food Chemistry**, v. 336, art. 127708, 2021.

151. Soares S, Nunes LC, Melchert WR, Rocha FRP. Spot test exploiting smartphone-based digital images for determination of biodiesel in diesel blends. **Microchemical Journal**, v. 152, art. 104273, 2020.
152. Ballesteros JI, Caleja-Ballesteros HJR, Villena MC. Digital image-based method for iron detection using green tea (*Camellia sinensis*) extract as natural colorimetric reagent. **Microchemical Journal**, v. 160, art. 105652, 2021.
153. Soares S, Torres KG, Pimentel EL, Martelli PB, Rocha FRP. A novel spot test based on digital images for determination of methanol in biodiesel. **Talanta**, v. 195, p. 229–235, 2019.
154. Lima MJA, Sasaki MK, Marinho OR, Freitas TA, Faria RC, Reis BF, et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, 2020.
155. Banik S, Melanthota SK, Arbaaz, Vaz JM, Kadambalithaya VM, Hussain I, et al. Recent trends in smartphone-based detection for biomedical applications: a review. **Anal Bioanal Chem**. 2021;413(9):2389–406.
156. Mendes J, Pinho TM, Neves dos Santos F, Sousa JJ, Peres E, Boaventura-Cunha J, et al. Smartphone Applications Targeting Precision Agriculture Practices—A Systematic Review. Vol. 10, **Agronomy**. 2020.
157. Silva GM, Garcia JA, Garitta J de A, Cunha DGF, Finkler NR, Mendiondo EM, et al. Smartphone-based spectrometry system as a prescreening assessment of copper and iron for real time control of water pollution. **J Environ Manage**. 2022;323:116214.
158. Nelis JLD, Tsagkaris AS, Dillon MJ, Hajslova J, Elliott CT. Smartphone-based optical assays in the food safety field. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 129, art. 115934, 2020.
159. Lima MJA, Sasaki MK, Marinho OR, Freitas TA, Faria RC, Reis BF, et al. Spot test for fast determination of hydrogen peroxide as a milk adulterant by smartphone-based digital image colorimetry. **Microchemical Journal**, v. 157, art. 105042, 2020.
160. Silva AFS, Gonçalves IC, Rocha FRP. Smartphone-based digital images as a novel approach to determine formaldehyde as a milk adulterant. **Food Control**, . 2021 Jul 1;125:107956.
161. Acevedo MSMSF, Lima MJA, Nascimento CF, Rocha FRP. A green and cost-effective procedure for determination of anionic surfactants in milk with liquid-liquid microextraction and smartphone-based photometric detection. **Microchemical Journal**, v. 143, p. 259–263, 2018.
162. Silva AFS, Rocha FRP. A novel approach to detect milk adulteration based on the determination of protein content by smartphone-based digital image colorimetry. **Food Control**. 2020;115.
163. Vucane S, Sabovics M, Leitans L, Cinkmanis I. Smartphone-based colorimetric determination of DPPH free radical scavenging activity in vegetable oils. **Reserach Rural Dev**. 2020;35:106–11.

164. Martins LC, de Souza Silva AF, de Moraes LMB, Gonçalves IC, de Godoy BBR, Rocha FRP. A Greener and Faster Approach for Determination of Phenolic Compounds by Smartphone-Based Colorimetry. Vol. 70, Proceedings . 2021.
165. Salimi M, Sun BR, Tabunag JS, Li J, Yu H-Z. A Mobile Analytical Device for On-Site Quantitation of Anthocyanins in Fruit Beverages. Vol. 12, **Micromachines**. 2021.
166. Weston M, Phan MAT, Arcot J, Chandrawati R. Anthocyanin-based sensors derived from food waste as an active use-by date indicator for milk. **Food Chemistry**, v. 326, art. 127017, 2020.
167. Lima MJA, Nascimento CF, Rocha FRP. Feasible photometric measurements in liquid-liquid extraction by exploiting smartphone-based digital images. **Anal Methods**. 2017;9(14):2220–5.
168. Castilho TS, Matias TB, Nicolini KP, Nicolini J. Study of interaction between metal ions and quercetin. **Food Science and Human Wellness**, v. 7, n. 3, p. 215–219, 2018.
169. Valente IM, Gonçalves LM, Rodrigues JA. Another glimpse over the salting-out assisted liquid-liquid extraction in acetonitrile/water mixtures. **Journal of Chromatography A**, v. 2013;1308:58–62.
170. Cornard JP, Merlin JC. Spectroscopic and structural study of complexes of quercetin with Al(III). **J Inorg Biochem**. 2002;92(1):19–27.
171. Erdogan G., Karadag R., Dolen E. Potentiometric and Spectrophotometric Determination of the Stability Constants of Quercetin Complexes with Aluminium(III) and Iron(II). **Rev Anal Chem**. 2005;24(4):247–62.
172. Ponder A, Hallmann E, Kwolek M, Średnicka-Tober D, Kazimierczak R. Genetic Differentiation in Anthocyanin Content among Berry Fruits. Vol. 43, **Current Issues in Molecular Biology**. 2021. p. 36–51.
173. Kohno Y, Kinoshita R, Ikoma S, Yoda K, Shibata M, Matsushima R, et al. Stabilization of natural anthocyanin by intercalation into montmorillonite. *Appl Clay Sci*. 2009;42(3):519–23.
174. Navas MJ, Jiménez-Moreno AM, Bueno JM, Sáez-Plaza P, Asuero AG. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part IV: Extraction of Anthocyanins. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 42, n. 4, p. 313–342, 2012.
175. Chebil L, Humeau C, Anthoni J, Dehez F, Engasser J-M, Ghouil M. Solubility of Flavonoids in Organic Solvents. *J Chem Eng Data*. 2007 Sep 1;52(5):1552–6.
176. PubChem. Quercetin. National Library of Medicine. 2023.
177. Goulart SM, Alves RD, De Paula WX, De Queiroz JH, Neves AA, De Queiroz MELR. Determination of carbamates in beverages by liquid-liquid extraction with low temperature partitioning and liquid chromatography. *J Braz Chem Soc*. 2012;23(6):1154–65.
178. Goulart SM, Alves RD, Neves AA, de Queiroz JH, de Assis TC, de Queiroz MELR. Optimization and validation of liquid-liquid extraction with low temperature partitioning for determination of carbamates in water. **Analytica Chimica Acta**, v. 671, n. 1, p. 41–47, 2010.

179. Adams ML, O'Sullivan B, Downard AJ, Powell KJ. Stability Constants for Aluminum(III) Complexes with the 1,2-Dihydroxyaryl Ligands Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, DHB, and DASA in Aqueous Solution. **J Chem Eng Data**, v. 47, p. 289–296, 2002.
180. Bortolini DG, Maciel GM, Fernandes I de AA, Rossetto R, Brugnari T, Ribeiro VR, et al. Biological potential and technological applications of red fruits: An overview. **Food Chem Adv.** v. 1, art. 100014, 2022.
181. Maegawa Y, Sugino K, Sakurai H. Identification of free radical species derived from caffeic acid and related polyphenols. **Free Radical Research**, v. 41, p. 110–119, 2007.
182. Raposo F. Evaluation of analytical calibration based on least-squares linear regression for instrumental techniques: A tutorial review. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 77, p. 167–185, 2016.
183. Brown L, Mac Berthouex P. Limit of Detection. In: _____, **Statistical Environmental Engineering**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2002.
184. Yao Y, Lin G, Xie Y, Ma P, Li G, Meng Q, et al. Preformulation studies of myricetin : a natural antioxidant flavonoid. **Pharmazie**, v. 69, p. 19–26, 2014.
185. Sampaio CI, Sousa LF, Dias AM. Separation of Anthocyaninic and Nonanthocyaninic Flavonoids by Liquid–Liquid Extraction Based on Their Acid–Base Properties: A Green Chemistry Approach. **Journal of Chemical Education**, v. 97, p. 4533–4539.
186. Hyde AM, Zultanski SL, Waldman JH, Zhong Y-L, Shevlin M, Peng F. General Principles and Strategies for Salting-Out Informed by the Hofmeister Series. **Organic Process Research & Development**, v. 21, p. 1355–1370, 2017.
187. PubChem. Ethyl acetate [Internet]. Solubility. National Library of Medicine, 2022. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/8857#section=Solubility>
188. PubChem. Sodium sulphate. National Library of Medicine, 2023.
189. Pubchem. Chlorogenic Acid. National Library of Medicine, 2023.
190. Lu H-T, Jiang Y, Chen F. Application of preparative high-speed counter-current chromatography for separation of chlorogenic acid from Flos Lonicerae. **Journal of Chromatography A**, v. 2004;1026(1):185–90.
191. Anastas P, Eghbali N. Green Chemistry: Principles and Practice. **Chemical Society Reviews**, v. 39, p. 301–12, 2010.
192. Billiard KM, Dershem AR, Gionfriddo E. Implementing Green Analytical Methodologies Using Solid-Phase Microextraction: A Review. **Molecules**, v. 25, art. 5297, 2020.
193. Płotka-Wasyłka J. A new tool for the evaluation of the analytical procedure: Green Analytical Procedure Index. **Talanta**, v. 181, p. 204–209, 2018.
194. Lassali TAF. **Gerenciamento de resíduos químicos normas e procedimentos gerais**. Universidade de São Paulo [cited 2023 Feb 13]. Available: https://www.sorocaba.unesp.br/Home/CIPA/normas_gerenciamento.pdf/