



**DANIELA TEIXEIRA RODRIGUES**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA  
COMPOSTOS FENÓLICOS EM MATRIZ AQUOSA COM DIFERENTES  
SORBENTES**

Uruguaiana, RS  
2017

**DANIELA TEIXEIRA RODRIGUES**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA  
COMPOSTOS FENÓLICOS E MATRIZ AQUOSA COM DIFERENTES  
SORBENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Ciências da Natureza - Licenciatura da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do Título de Licenciada em Ciências da Natureza.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Roehrs

Uruguaiana, RS.  
2017

**DANIELA TEIXEIRA RODRIGUES**

**DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA  
COMPOSTOS FENÓLICOS EM MATRIZ AQUOSA COM DIFERENTES  
SORBENTES**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Ciências da  
Natureza - Licenciatura da Universidade  
Federal do Pampa, como requisito  
parcial para obtenção do Título de  
Licenciada em Ciências da Natureza.

Trabalho de Conclusão de Curso defendido e aprovado em: 09 /11/2017

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Rafael Roehrs  
Orientador

Curso de Ciências da Natureza – Licenciatura - UNIPAMPA

---

Me. Bruna Piaia Ramborger

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA- Campus Uruguaiiana

---

LiCN. Andressa Rossini Goulart

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica – UNIPAMPA- Campus Uruguaiiana

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	02
2. Materiais e métodos.....	03
2.1 Reagentes e materiais.....	03
2.2 Preparo das soluções estoque .....	03
2.3 Preparo de amostra.....	03
2.4 Método de Extração em Fase Sólida.....	04
2.5 Análise dos compostos fenólicos por HPLC.....	04
2.6 Curva de Calibração.....	05
3. Resultados.....	05
3.1 Condições de extração.....	06
3.2 Recuperação dos Cartuchos .....	06
4. Discussão.....	07
5. Considerações finais.....	08
6. Referências.....	08
Tabelas.....	10
Figuras.....	11
Anexos.....	14
Anexo 1- Normas de submissão da revista .....	14

## DESENVOLVIMENTO DE MÉTODO DE EXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA PARA COMPOSTOS FENÓLICOS EM MATRIZ AQUOSA COM DIFERENTES SORBENTES<sup>1</sup>

Daniela Teixeira Rodrigues<sup>1,3</sup>, Mateus Cristofari Gayer<sup>1,4</sup>, Murilo Sigal Carriço<sup>1,5</sup>, Elton Luis Gasparoto Denardin<sup>2,6</sup>, Rafael Roehrs<sup>1,7</sup>;

<sup>1</sup>Grupo Interdisciplinar de Pesquisas em Práticas de Ensino. Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>2</sup>Laboratório de Estudos Físico-químico e Produtos Naturais. Universidade Federal do Pampa, campus Uruguaiana, Rio Grande do Sul, Brasil.

<sup>3</sup> danielateixeiraster@gmail.com, +5555 99620-9355;

<sup>4</sup>mateus\_cristofari@hotmail.com, +5555 9675-6116;

<sup>5</sup>murilocarrico@gmail.com, +5555 9190-9797;

<sup>6</sup>eltondenardin@gmail.com, +5555 8115-4427;

<sup>7</sup>rafaelroehrs@gmail.com, +5555 9952-4367;

*Abstract:* A extração em fase sólida (EFS ou SPE - em inglês, Solid Phase Extraction) é um método de preparo de amostras que visa a limpeza, concentração e extração dos analitos de interesse. A fim de detectar e quantificar substâncias alvo como os compostos fenólicos, a extração em fase sólida vem sendo aplicada em diversas matrizes, como por exemplo, extrato de plantas em água. Nesta perspectiva, este trabalho tem como objetivo comparar três cartuchos de SPE no desenvolvimento de um método de extração que seja capaz de reter nove compostos fenólicos. Foi utilizada uma simulação de infusão como amostra ácido gálico, ácido benzóico, ácido cafeico, rutina, ácido vanílico, ácido sirínico, ácido cumárico, ácido ferúlico e quercetina, que foram percolados pelos cartuchos Strata C18-E, Strata X (Phenomenex, Estados Unidos) e InertSep C18 (GL Sciences, Japão). O Strata-X foi o que apresentou melhores recuperações, retendo oito dos nove compostos e todos com percentuais acima de 77%. O cartucho Strata C18-E, recuperou apenas quatro compostos acima de 70% e o cartucho InertSept C18 apresentou as recuperações mais baixas, apresentando apenas três compostos com valores acima de 70%. O método de extração em fase sólida desenvolvido se mostrou efetivo e o sorbente que apresentou o melhor desempenho dentre os três recheios foi o Strata-X, apresentando maior quantidade de compostos detectáveis e valores significativos de recuperação.

*Keywords:* Extração em fase sólida, Compostos fenólicos, Preparo de amostras, Matriz Aquosa.

---

<sup>1</sup> Este manuscrito depois de corrigido e aprovado, será traduzido para inglês e submetido a revista Food Analytical Methods.

## 1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe que inclui uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático, em que ao menos um hidrogênio é substituído por um agrupamento hidroxila. Estes compostos são sintetizados através do metabolismo secundário dos vegetais, que podem apresentar um papel essencial no metabolismo vegetal (SILVA et al., 2013), tipicamente durante o desenvolvimento da planta.

Estes compostos apresentam a função de proteção contra infecções e agressões de microrganismos, servindo também como filtros de radiação UV (NACZK e SHAHIDI, 2004; SILVA, 2012), além de contribuir com o aroma, adstringência, cor e estabilidade oxidativa (SIMÕES et al., 2007). Devido a suas características antibacterianas, antivirais e antioxidantes esses compostos têm chamado muita atenção nos últimos anos na indústria farmacêutica e na indústria de alimentos, como chás e temperos. Os extratos de plantas, assim como os chás, são considerados uma das fontes significativas de compostos fenólicos, e para fins de análise de sua constituição, estes extratos estão sendo submetidos à métodos de avaliação quantitativa e qualitativa. (ASOLINI et al., 2006; MILANI et al., 2012).

Com essa importância para a saúde humana, faz-se necessária a quantificação desses compostos. Mas, segundo Queiroz et al (2001), análises de substâncias em matrizes biológicas requerem um pré-tratamento devido à alta complexidade da mesmas a concentração destas substâncias que se apresentam a nível de traços nestas amostras.

Introduzida em 1976, com o propósito de reduzir o uso de solventes orgânicos em pré-tratamento de amostras, a SPE é considerada uma das mais importantes e populares técnicas de preparo de amostras. (FONTANALS et al., 2004; GILART et al., 2014; HENNION, 1999; JARDIM, 2010; LEÓN-GONZÁLEZ e PÉREZ-ARRIBAS, 2000; PAVLOVIĆ et al., 2010; ZWIR-FERENC e BIZIUK, 2006). Essa técnica tem como objetivo principal a remoção de interferentes, limpeza e concentração dos analitos de interesse de uma maneira versátil, apresentando diversos formatos e tipos de sorbentes. (GILART et. al, 2014; HENNION, 1999; ZWIR-FERENC e BIZIUK, 2006).

Segundo Lanças (2016), devido a semelhança da cromatografia líquida em coluna com a SPE, os sorbentes utilizados em ambas as técnicas são similares, assim como, seus mecanismos de separação. Atualmente existem diversos tipos de recheios disponíveis no mercado, porém os mais comuns, segundo Jardim (2010), são as fases poliméricas e as quimicamente ligadas à sílica, como cianopropil, aminopropil, fenil, cicloexil, C18, C8, C2.

A grande maioria dessas fases é baseada em sílica quimicamente ligada a grupamentos que auxiliam na extração, principalmente de compostos apolares, pois quanto maior for a cadeia desses grupamentos, mais compostos apolares ele retêm, chamadas de C18. Essas fases apresentam características particulares, que servem para melhor se adaptar e reter o analito de interesse, porém, por mais que apresentem constituição semelhante, não serão equivalentes em uma mesma amostra. (FONTANALS et al., 2004; HENNION, 1999). Lanças (2004) afirma que as característica destes materiais de fases quimicamente ligadas, ou seja, a sílica, diferem de empresa para empresa, geralmente essas variações ocorrem na seleção do tamanho da partícula, tamanho do poro, área

superficial, além de variar também o grau de funcionalização e a presença ou não de *endcapping*, tornando mais difícil substituir uma fase estacionária de uma determinada empresa por outra equivalente.

Os fatores que determinam qual fase sólida é mais apropriada para o preparo de amostra no desenvolvimento de um método analítico são: a natureza do analito e a matriz na qual ele se encontra, determinando também qual o mecanismo de separação será adequado para reter os compostos de interesse (BERRUETA et al., 1995; HENNION, 1999). Nesta perspectiva, este trabalho tem como objetivo comparar três cartuchos de SPE no desenvolvimento de um método de extração que seja capaz de reter nove compostos fenólicos.

## 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1 Materiais e Reagentes

Para o preparo da curva analítica e o ensaio de recuperação foram utilizados os padrões (fig.1) de ácido gálico, ácido 3-4 dihidroxidobenzóico, rutina, ácido caféico, ácido vanílico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido siríngico e quercetina, obtidos através da Sigma-Aldrich (Estados Unidos).

O sistema cromatográfico utilizado foi Young Lin (YL) 9100 (Anyang, Korea) equipado com um desgaseificador a vácuo (YL90) bomba quaternária (YL9110), auto injetor (YL9150), forno de coluna (YL9131) e detector de arranjo de diodos (DAD) (YL9160). O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram feitos através do software YL-Clarity.

Para as extrações em fase sólida foram utilizados os cartuchos Strata C18-E 55µm (500 mg/3 mL, 70 Å), Strata X 33µm (500 mg/3 mL) (Phenomenex, Estados Unidos) e InertSep C18 (500 mg/6mL) (GL Sciences, Japão).

O metanol e a acetonitrila utilizados nas análises cromatográficas eram grau HPLC (J. T. Baker, Holanda), a água ultrapura foi adquirida a partir de um sistema Milli-Q (Millipore, Estados Unidos).

### 2.2 Preparo das soluções de estoque

Pesou-se 10 mg do padrão de cada composto fenólico separadamente, solubilizando-os em balões volumétricos de 10 mL completado até o menisco com metanol, obtendo uma solução estoque na concentração de 1000 mg/L. A partir destas soluções, foi retirado 1 mL de cada solução mãe dos padrões individuais dos compostos fenólicos e transferido para um balão volumétrico de 10 mL, preparando uma mistura dos compostos com concentração de 100 mg/L. A partir dessa solução as demais soluções e diluições da curva foram feitas.

### 2.3 Preparo da amostra

A amostra consistia na adição de 150 µL da solução padrão da mistura dos compostos fenólicos de concentração 100 mg/L em 100 mL de água da torneira aquecida até a temperatura de 85°C, simulando uma infusão.

Logo após o resfriamento da amostra, foi adicionado ácido fosfórico na concentração de 1:1 até pH3 e levado ao agitador vortex por 10 minutos á 150 rpm.

#### *2.4 Método de extração em fase sólida*

O condicionamento dos cartuchos foi realizado com 6 mL de metanol, 6 mL de água ultrapura e 6 mL de água acidificada com uma solução de ácido fosfórico 1:1 até pH3, e então a amostra foi percolada. A limpeza da amostra após a percolação foi realizada com a passagem de 6 mL de água pH3 pelo recheio dos cartuchos.

Para a eluição dos analitos foram utilizados 3 mL de metanol e 3 mL de acetonitrila. O volume final foi evaporado em um rotaevaporador com o banho na temperatura de 40°C, 20 rotações por minuto, com pressão mínima de 30 mbar até a secura e ressuspendido em 1,5 ml de metanol, para um melhor controle do volume e concentração da amostra. As amostras foram filtradas em filtro de seringa PTFE 0,22 µm e analisadas. Todo o procedimento de extração em fase sólida foi feito em um sistema com vácuo controlado.

O condicionamento, a percolação, limpeza de amostra e eluição dos analitos foram realizados da mesma maneira para os três diferentes tipos de cartuchos (tabela 1). O cartucho Strata-X é composto por um recheio polimérico que realiza retenções básicas, ácidas, neutras e interações hidrofóbicas, dependendo do solvente orgânico de ativação escolhido. (PAVLOVIĆ et al., 2010; PHENOMENEX, 2017). Os Strata C18-E e o InertSep são cartuchos baseados em sílica, quimicamente ligados a grupamentos octadecil (C18) e ambos possuem “*end-capped*”, porém o primeiro realiza fortes retenções hidrofóbicas com interações polares secundárias e o segundo realiza apenas interações hidrofóbicas, atribuídas ao seu “*end-capped*”, que elimina qualquer interação secundária. (PHENOMENEX, 2015; SCIENCES, 2012).

#### *2.5 Análise dos compostos fenólicos por HPLC*

As condições cromatográficas empregadas para o desenvolvimento do trabalho foram embasadas em TAMBORENA et al. (2015). O método cromatográfico consistia em água ultrapura (pH = 3) acetonitrila (95/5, v/v), até os 35 minutos a fase móvel em modo gradiente até chegar em 100% de acetonitrila, quando nos 38 minutos volta a porcentagem inicial e fica estável, em modo isocrático, até os 50 minutos. As análises das amostras obtidas foram realizadas com a coluna cromatográfica Synergi 4µ Fusion-RP 80Å (250 x 4,6 mm) e pré-coluna Fusion-RP (4 x 3,0 mm) (Phenomenex, Estados Unidos).

As condições do método foram: taxa de fluxo de 0,8 ml/min, injeção de 20 µl de amostra, e a detecção por DAD foi feita em 220 nm para o ácido gálico, ácido benzoico, ácido siríngico, ácido



vanílico, 320 nm para o ácido ferúlico, ácido cumárico e ácido cafeico e 368 nm para a quercetina e rutina.

Os compostos foram detectados e quantificados de acordo com os picos e valores de área obtidos, comparados com os padrões de referência e espectros do DAD, assim como também o tempo de retenção e os dados espectrais contribuíram para a confirmação dos mesmos.

## 2.6 Curva de calibração

A curva de calibração continha sete pontos: 0,1; 0,5; 1; 2,5; 5; 7,5; 10 mg/L, os valores do limite de quantificação para o ácido siríngico, vanílico, cumárico e ferúlico foi de 0,5 mg/L, para o ácidos gálico, benzoico e ferúlico foi de 1 mg/L. Os limites de detecção foram de 0,1 mg/L para rutina, ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido ferúlico e quercetina e de 0,5 mg/L para o ácido gálico, ácido benzóico e ácido cafeico.

Os valores da curva de calibração para os compostos foram: ácido gálico ( $y = 398,99x - 19,135$ ), ácido 3-4 dihidroxidobenzóico ( $y = 288,86x + 19,45$ ), ácido cafeico ( $y = 233,11x + 18,53$ ), rutina ( $y = 60,043x - 2,1868$ ), ácido vanílico ( $y = 391,12x + 4,3674$ ), ácido siríngico ( $y = 391,66x + 49,261$ ), ácido cumárico ( $y = 347,96x + 27,739$ ), ácido ferúlico ( $y = 282,89x + 12,742$ ), quercetina ( $y = 140,76x - 36,956$ ).

## 3. RESULTADOS

A SPE é uma metodologia comumente empregada para a concentração e extração de analitos traços em diversos tipos de amostras. A fim de detectar e quantificar essas substâncias alvo como os compostos fenólicos, a extração em fase sólida vem sendo aplicada em diversas matrizes, como vinhos (CHILLA et al., 1996; MATTIVI, 1993; MATĚJČEK et al., 2003), mel (MICHALKIEWICZ et al., 2008; PYRZYNSKA & BIESAGA, 2009), arroz (IRAKLI et al., 2012), uvas (PALMA et al., 2002), óleo de oliva (MATEOS et al., 2001), flores (GŁOWNIAK; ZGÓRKA; KOZYRA, 1996) entre outras. Um dos principais mecanismos da SPE que auxilia neste processo é a partição, nela, a fase estacionária define se este mecanismo irá se apresentar em fase normal ou fase reversa, quando a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, denomina-se fase normal. Porém, quando ocorre ao contrário, ou seja, quando a fase estacionária é mais apolar que a fase móvel, denomina-se fase reversa (JARDIM, 2010). Buszewski e Szultka (2012) e Poole et al. (2000) afirmam que é comum a aplicação de sorbentes com este mecanismo para amostras aquosas e neutras, com analitos não polares ou com polaridade média. Porém, além da escolha adequada do sorbente, levando em consideração as características da matriz de análise e a natureza do analito, outro fator fundamental para a seletividade da separação que é o desenvolvimento do método a ser empregado. Segundo Castro et al. (2008) e Silva (2012) dentro do método de extração em fase sólida são estabelecidas uma série de interações físicas e químicas, permitindo a separação do analito de interesse dos demais componentes da amostra, tornando fundamental a escolha dos solventes adequados para uma máxima concentração do analito de interesse.

### 3.1 Condições de extração

Para avaliar a capacidade de extração dos diferentes sorbentes de cada cartucho, foi percolada uma amostra para simular uma infusão contendo 10 mg/L da solução contendo a mistura dos 9 compostos fenólicos.

A figura 2 **a)** representa a análise da solução padrão de 10 mg/L da mistura dos nove compostos fenólicos, esta análise foi usada como base para identificar o tempo de retenção de cada composto. Através da área dos analitos nos cromatogramas obteve-se uma média que possibilitou a comparação das extrações. Com isso foi possível verificar que o método de separação e identificação foi eficaz para os 9 compostos.

A figura 2 **b)**, correspondente ao resultado da análise da amostra extraída no cartucho Strata-X, no qual se obteve uma similaridade com o cromatograma da solução padrão, demonstrando que esta fase sólida apresenta capacidade de extração de oito dos nove compostos contidos na amostra.

A figura 2 **c)**, apresenta os resultados da análise da amostra extraída no cartucho Strata C18-E, e através dela é possível detectar oito dos nove compostos, porém com áreas inferiores para o ácido benzóico, ácido cafeico, ácido vanílico e quercetina quando comparado a figura 2 **a)**.

Por fim, a figura 2 **d)** mostra o resultado da análise da extração realizada pelo cartucho InertSep C18, onde é possível perceber que, o mesmo foi capaz de detectar o ácido cafeico, a rutina, o ácido vanílico, ácido siríngico, ácido cumárico, ácido ferúlico e a quercetina, presentes na amostra, mas com variações nas áreas quando comparado com a figura 2 **a)**.

Em todas as análises cromatográficas, não foram identificados interferentes provenientes da amostra que, de acordo com Jardim (2010) e Queiroz et al. (2001), por ser de matriz natural, poderia vir a apresentar, uma grande quantidade destas substâncias devido a sua origem. Demonstrando assim que o método foi eficaz em sua limpeza.

Apesar dos cartuchos apresentarem o mesmo mecanismo de separação, cada um possuía grupamentos e características distintas, como visto na tabela 1, o que acarretou na variação da quantidade de compostos extraídos e valores das áreas detectadas, alternando de sorbente para sorbente, independentemente do método de extração aplicado. A escolha dos cartuchos de fase reversa, assim como os solventes utilizados no método de preparo de amostra, foi fundamental para a concentração dos compostos. De acordo com as características de cada sorbente apresentados na tabela 1, existem poucas variações de um cartucho para outro.

### 3.2 Ensaio de Recuperações para os cartuchos

O método de extração em fase sólida desenvolvido proporcionou a limpeza e concentração da amostra, demonstrou também que os cartuchos possuem capacidades de extrações distintas e valores de áreas significantes de acordo com os picos expressos nos cromatogramas. Após o procedimento de extração se obteve um fator de concentração de 67 vezes.

Com o auxílio dos resultados das análises cromatográficas dos padrões dos compostos, foi possível calcular o percentual de recuperação (tabela 2), utilizando a relação da média das áreas da

amostra pela média da área da concentração do padrão, assim foi possível observar se os valores estavam na faixa de recuperação desejada (70 – 120%) de acordo com Ribani (2004).

Dentre os três cartuchos utilizados, apenas o Strata-X foi o que apresentou melhores recuperações, conseguindo reter oito dos nove compostos presentes na amostra e todos com percentuais acima de 77%. O cartucho Strata C18-E, segundo a tabela 2, recuperou apenas quatro compostos acima de 70%, sendo possível a detecção de oito dos nove presentes na amostra, porém sem apresentar o percentual de recuperação significativa para quantificação, segundo Ribani (2004). Em contrapartida, o cartucho InertSept C18 foi o que apresentou as recuperações mais baixas em relação aos restantes, apresentando apenas três compostos com valores acima de 70% e permitindo a detecção de um total de sete compostos no método cromatográfico.

#### 4. DISCUSSÕES

Dentro da tabela 2, é possível perceber também que a quercetina não foi detectada nos resultados das análises das extrações do cartucho Strata-X, porém apresentou percentuais de recuperação acima de 70% no cartucho InertSep C18 e, acima de 60% no Strata C18-E. Na figura 1, onde estão dispostas as estruturas químicas, também temos respectivamente os coeficientes de partição de cada composto. Como descrito por Skoog et al. (2005), o coeficiente de partição é a relação da tendência de distribuição de um soluto em duas fases líquidas imiscíveis, gerando uma constante de equilíbrio. Segundo Canto (2016), em estudos biológicos se é muito utilizado o coeficiente octanol/água ( $K_{ow}$ ), este coeficiente é representado pelo logaritmo de  $P$  ( $\log P$ ), informando a tendência do analito a se dissolver em uma das fases. É afirmado também que a grandeza obtida é utilizada como parâmetro informativo, sendo a tendência do soluto se distribuir entre fases polares e apolares. Então esta relação se dá da seguinte forma: se  $\log P > 0$  a afinidade do soluto será pela fase orgânica, ou seja, ele terá caráter apolar, por outro lado, se  $\log P < 0$  o soluto terá mais afinidade com a fase aquosa, ou seja, terá perfil polar. Porém, quando  $\log P = 0$  o soluto irá ter a mesma afinidade por ambas as fases.

De acordo com o coeficiente de partição ( $\log P$   $K_{ow}$ ) da quercetina e as relações estabelecidas por Canto (2016), o composto apresenta um perfil apolar, já que o logaritmo de seu coeficiente é 1.48, atribuindo a não detecção e recuperação do composto a estrutura do sorbente do Strata-X. Pois entre os sorbentes utilizados, o Strata-X é o que permite mais interações polares, podendo vir a não realizar interações apolares suficientes para reter compostos, como a quercetina, fazendo com que o analito não seja percolado neste sorbente.

É possível comprovar este fenômeno pelos resultados dos cartuchos, o Strata C18-E, por exemplo, apresenta um perfil apolar devido a presença do seu grupamento C18, e mesmo possuindo interações polares secundárias, consegue percentuais de 60% de recuperação da quercetina. Já o InertSep realiza apenas interações apolares e tem recuperações do composto acima de 70%.

Entretanto, apesar de não recuperar a quercetina entre os compostos presentes na amostra, o cartucho Strata-X apresentou o melhor desempenho entre os demais cartuchos de SPE utilizados neste trabalho (figura 3), adequando-se ao método de extração desenvolvido. Assim foi possível permitir a

detecção e quantificação dos mesmos pelo método cromatográfico aplicado acima e do percentual de referência adotado.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O método de extração em fase sólida desenvolvido se mostrou efetivo, auxiliando na quantificação da maioria dos compostos utilizados neste trabalho. O sorbente que apresentou o melhor desempenho dentre os três recheios que foram submetidos ao método foi o Strata-X, apresentando maior quantidade de compostos detectáveis e valores significativos de recuperação.

## REFERÊNCIAS

- ASOLINI, F. C. et al. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. *Brazilian Journal of Food Technology Serie*, n. 252, 2006.
- BERRUETA, L. A.; GALLO, B.; VICENTE, F. A review of solid phase extraction: Basic principles and new developments. *Chromatographia*, [s.l.], v. 40, n. 7-8, p.474-483, abr. 1995.
- BUSZEWSKI, Boguslaw; SZULTKA, Małgorzata. Past, Present, and Future of Solid Phase Extraction: A Review. *Critical Reviews In Analytical Chemistry*, London, v. 42, n. 3, p.198-213, jul. 2012. Informa UK Limited.
- CANTO, Eduardo Leite do. O que é coeficiente de partição? 2016. Disponível em: <[http://www.professorcanto.com.br/boletins\\_qui/055.pdf](http://www.professorcanto.com.br/boletins_qui/055.pdf)>. Acesso em: 05 nov. 2017.
- CASTRO, Remedios et al. Application of solid phase extraction techniques to analyse volatile compounds in wines and other enological products. *European Food Research And Technology*, Cádiz, v. 228, n. 1, p.1-18, 12 jun. 2008.
- CHILLA, C. et al. Automated on-line-solid-phase extraction—high-performance liquid chromatography-diode array detection of phenolic compounds in sherry wine. *Journal Of Chromatography A*, v. 750, n. 1-2, p.209-214, out. 1996.
- EPI Suite v4.1, Novembro 2017.
- FONTANALS, N. et al. Comparison of Hydrophilic Polymeric Sorbents for On-Line Solid-Phase Extraction of Polar Compounds from Aqueous Samples. *Chromatographia*, Tarragona, v. 60, n. 9-10, p.511-515, 17 set. 2004.
- GILART, Núria et al. Selective materials for solid-phase extraction in environmental analysis. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, Tarragona, v. 1, p.8-18, fev. 2014.
- GIŃOWIAK, Kazimierz; ZGÓRKA, Grażyna; KOZYRA, Małgorzata. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some Echinacea species. *Journal Of Chromatography A*, v. 730, n. 1-2, p.25-29, abr. 1996.
- HENNION, Marie-claire. Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, [s.l.], v. 856, n. 1-2, p.3-54, set. 1999.
- IRAKLI, Maria N. et al. Simultaneous determination of phenolic acids and flavonoids in rice using solid-phase extraction and RP-HPLC with photodiode array detection. *Journal Of Separation Science*, v. 35, n. 13, p.1603-1611, jul. 2012.

JARDIM, I. F. S. C. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. *ScientiaChromatográfica*, 2,13-25, 2010.

LANÇAS, Fernando Mauro. Extração em Fase Sólida (SPE). São Carlos: Rima, 2004. 96 p.

LANÇAS, Fernando M. Cromatografia Líquida Moderna: HPLC/CLAE. 2. ed. São Paulo: Átomo, 2016.

LEÓN-GONZÁLEZ, M.e; PÉREZ-ARRIBAS, L.v. Chemically modified polymeric sorbents for sample preconcentration. *Journal of Chromatography A*, Madrid, v. 902, n. 1, p.3-16, nov. 2000.

MATEOS, Raquel et al. Determination of Phenols, Flavones, and Lignans in Virgin Olive Oils by Solid-Phase Extraction and High-Performance Liquid Chromatography with Diode Array Ultraviolet Detection. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, v. 49, n. 5, p.2185-2192, maio 2001.

MATTIVI, Fulvio. Solid phase extraction of trans-resveratrol from wines for HPLC analysis. *Z Lebensm Unters Forsch*, v. 196, n. 6, p.522-525, jun. 1993. Springer Nature.

MATĚJČEK, D. et al. Application of solid-phase extraction for determination of phenolic compounds in barrique wines. *Analytical And Bioanalytical Chemistry*, v. 377, n. 2, p.340-345, 16 ago. 2003. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00216-003-2097-5>

MICHALKIEWICZ, Anna et al. Solid-phase extraction procedure for determination of phenolic acids and some flavonols in honey. *Journal Of Chromatography A*, v. 1187, n. 1-2, p.18-24, abr. 2008

MILANI, Liana Inês Guidolin et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de extratos de caqui (*Diospyros kaki* L.) cultivar Rama Forte. *Brazilian Journal Of Food Technology*, Campinas, v. 15, n. 2, p.118-124, jun. 2012.

NACZK, Marian; SHAHIDI, Fereidoon. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, [s.l.], v. 1054, n. 1-2, p.95-111, out. 2004.

PALMA, Miguel et al. In-line pressurized-fluid extraction–solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. *Journal Of Chromatography A*, v. 968, n. 1-2, p.1-6, ago. 2002.

PAVLOVIĆ, Dragana Mutavdžić et al. Development and optimization of the SPE procedure for determination of pharmaceuticals in water samples by HPLC-diode array detection. *Journal of Separation Science*, Zagreb, v. 33, n. 2, p.258-267, fev. 2010.

PHENOMENEX. X, Polymeric Reversed Phase Phase Detail. 2017. Disponível em: <<https://www.phenomenex.com/Products/SPDetail/Strata-X>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

PHENOMENEX, Sample Preparation Selection and Users Guide.2015. Disponível em:<<https://www.phenomenex.com/ViewDocument?id=sample+preparation+selection+and+users+guide>>. Acesso em:02 Nov. 2017

POOLE, Colin F et al. Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *Journal Of Chromatography A*, Detroit, v. 885, n. 1-2, p.17-39, jul. 2000.

PYRZYNSKA, Krystyna; BIESAGA, Magdalena. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. *Trac Trends In Analytical Chemistry*, v. 28, n. 7, p.893-902, ago. 2009.

QUEIROZ, S. C. N.; COLLINS, C. H. e JARDIM, I. C. S. F. (2001). Methods of extraction and/or concentration of compounds found in biological fluids for subsequent chromatographic determination. *Química Nova*, São Paulo, v. 24, p. 68-76.

RIBANI, Marcelo et al. Validação em Métodos Cromatográficos e Eletroforéticos. Química Nova, Campinas, v. 27, n. 5, p.171-178, jun. 2004.

SCIENCES, Gl. InertSep C18. 2012. Disponível em: <<https://www.glsciences.com/c-product/sample/solid/inertsep-c18/>>. Acesso em: 02 nov. 2017.

SILVA, Patrícia Damasceno. Determinação de compostos fenólicos por HPLC. 2012. 136 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Química Industrial, Universidade da Beira Interior, Covilhã, 2012

SILVA, Celia Eliane de Lara da et al. Avaliação da atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos em extrato metanólico obtido de folhas da Commiphora Myrrha. Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas, Dourados, v. 34, n. 1, p.117-124, 30 jun. 2013. Universidade Estadual de Londrina.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira et al. Farmacognosiada planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC, 2007. 1104 p.

SKOOG, Douglas A. et al. Fundamentos da Química Analítica.8. ed. São Paulo: Thomson, 2005.

TAMBORENA, Tatiana et al. Antioxidant Activity of some Medicinal Plant Extracts: Implications for Neuroprotection. Pharmacologia, Uruguiana, v. 6, n. 7, p.282-292, 1 jul. 2015.

ZWIR-FERENC, A.; BIZIUK, M. Solid Phase Extraction Technique: Trends, Opportunities and Applications. Polish Journal Of Environmental Studies, Gdańsk, v. 15, n. 5, p.677-690, 2006.

#### TABELAS

**Tabela 1:** Características dos cartuchos. **a)** Os cartuchos Strata são da marca Phenomenex e suas características estão de acordo com Phenomenex (2015); O cartucho InertSep C18 é da marca GL Sciences e suas características estão de acordo com Science (2012). **b)** Característica não divulgada.

Fase Sólida <sup>a)</sup>	Superfície	Área de superfície (m <sup>2</sup> /g)	Varição de tamanho de partícula e poro	Mecanismo de separação
Strata-X	Polar	800	33µm	Fase Reversa
Strata C18-E	Octadecil	500	55µm	Fase Reversa
InertSep C18	Octadecil	500	n.d. <sup>b)</sup>	Fase Reversa

**Fonte:** Elaborado pelo autor.

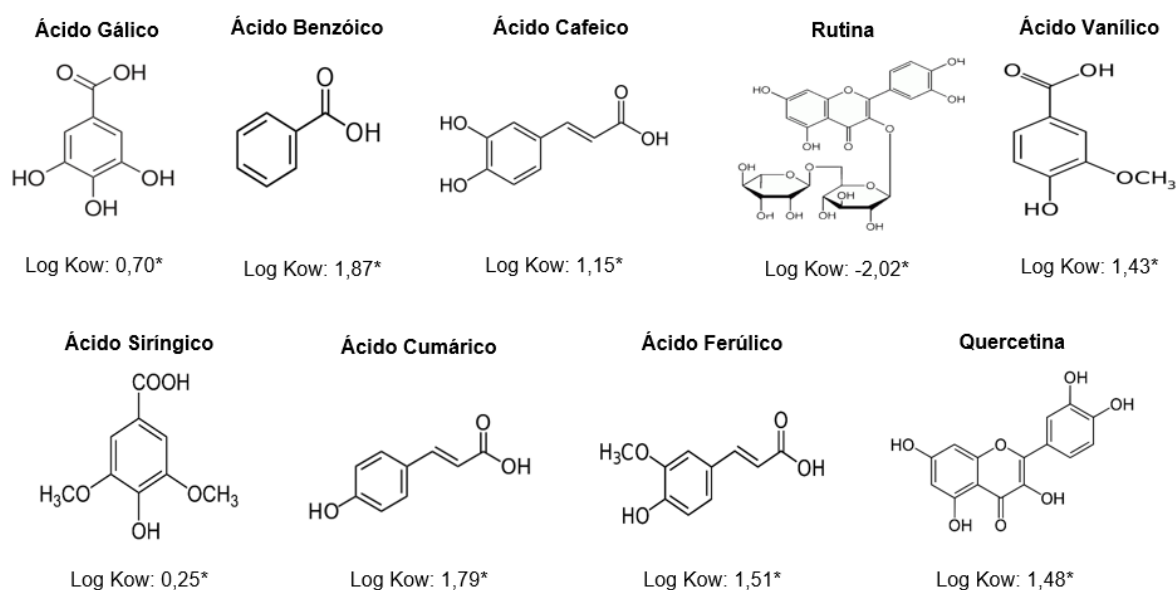
**Tabela 2:** Percentual de recuperação e desvio padrão dos compostos por cada cartucho. **n.d:** não detectado.

Compostos Fenólicos	Percentual de Recuperação (%)		
	Cartuchos		
	Strata X	Strata C18-E	InertSept C18
Ácido Gálico	85.5 (±1.12)	n.d	n.d.

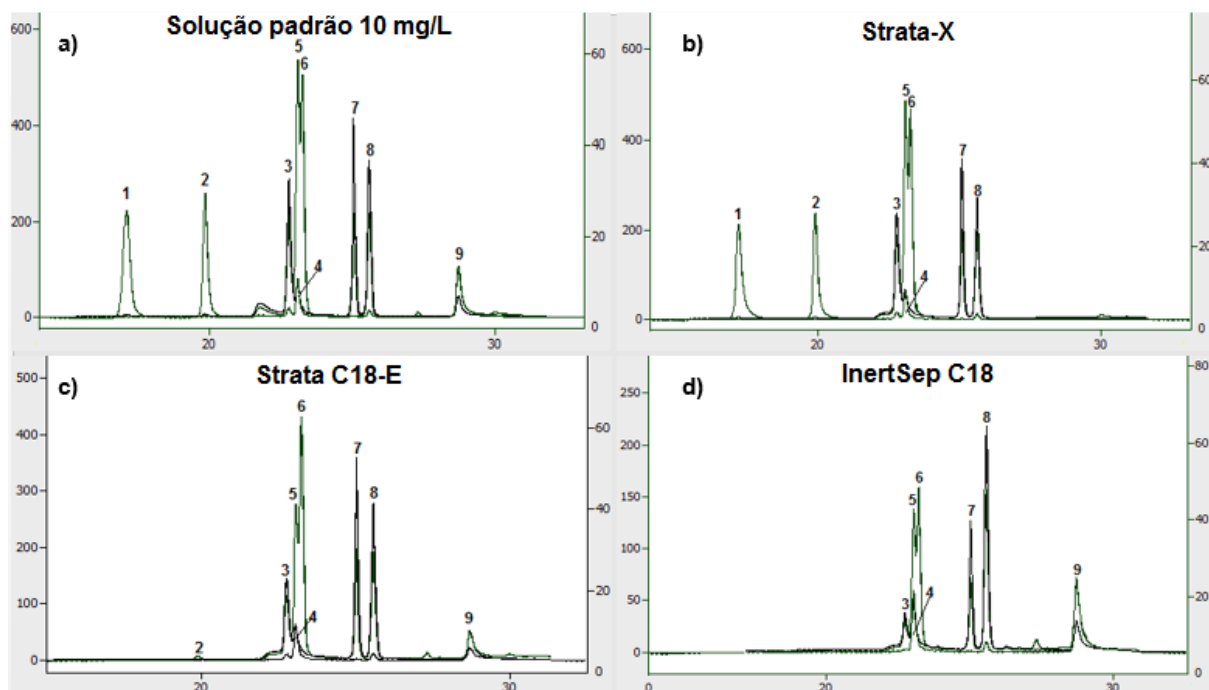
<b>Ácido Benzoico</b>	91.8 ( $\pm 1.40$ )	2.44 ( $\pm 0.03$ )	n.d.
<b>Ácido Cafeico</b>	77.3 ( $\pm 2.04$ )	43.9 ( $\pm 1.23$ )	8.83 ( $\pm 0.51$ )
<b>Rutina</b>	78.8 ( $\pm 2.56$ )	80.6 ( $\pm 3.44$ )	83.2 ( $\pm 3.86$ )
<b>Ácido Vanílico</b>	87.9 ( $\pm 1.61$ )	46.9 ( $\pm 1.39$ )	24.8 ( $\pm 0.73$ )
<b>Ácido Siríngico</b>	90.8 ( $\pm 2.42$ )	91.2 ( $\pm 1.54$ )	31.6 ( $\pm 0.24$ )
<b>Ácido Cumárico</b>	88.8 ( $\pm 0.20$ )	86.4 ( $\pm 2.12$ )	31.2 ( $\pm 0.56$ )
<b>Ácido Ferúlico</b>	84 ( $\pm 1.96$ )	84.4 ( $\pm 2.32$ )	70 ( $\pm 1.85$ )
<b>Quercetina</b>	n.d.	66.2 ( $\pm 1.43$ )	70.5 ( $\pm 0.93$ )

Fonte: Elaborado pelo autor.

## FIGURAS

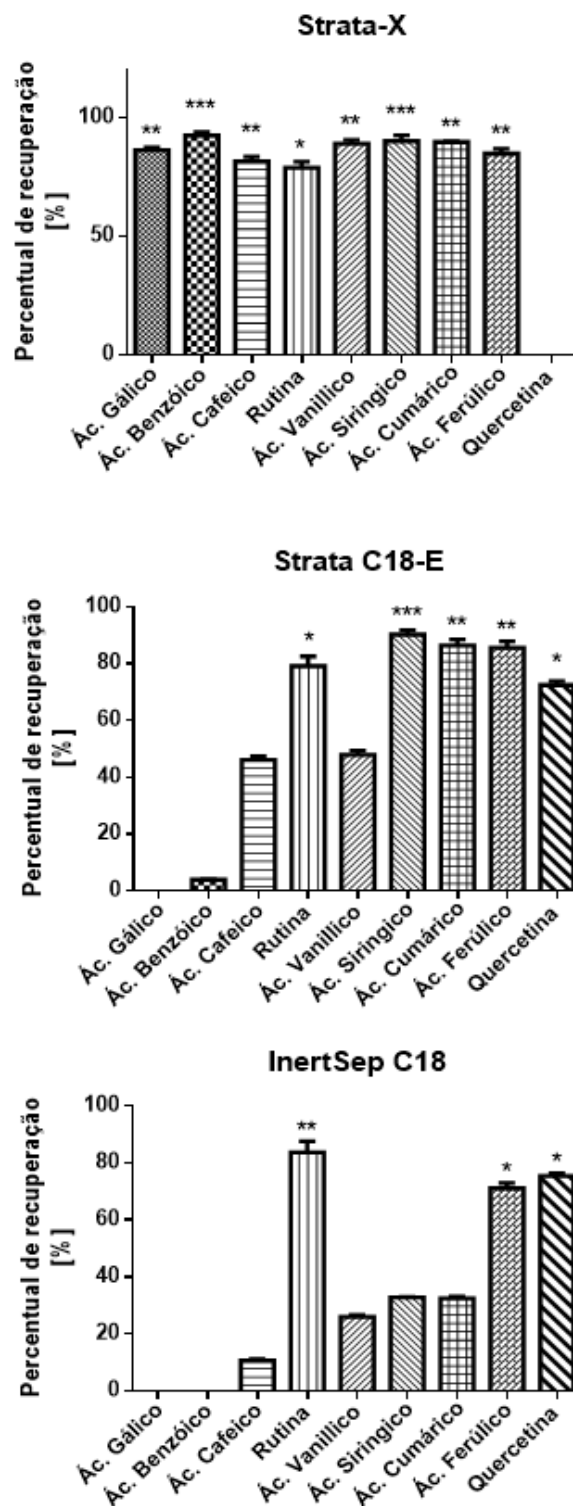


**Fig. 1:** Estrutura molecular dos compostos fenólicos utilizados neste trabalho e seus respectivos logaritmos de coeficientes de partição. \*: coeficientes descritos por EPI Suite v4.1, Novembro 2017.



**Figura 2:** Cromatogramas dos resultados das análises dos compostos fenólicos e extrações. **a)** Solução padrão de 10mg/L da mistura dos 9 compostos fenólicos. **b)** Amostra concentrada e extraída pelo cartucho Strata-X. **c)** Amostra concentrada e extraída pelo cartuchos Strata C18-E. **d)** Amostra concentrada e extraída pelo cartucho InertSep C18. Legenda de identificação de cada pico: **1,** Ácido Gálico; **2,** Ácido Benzoico; **3,** Ácido Cafeico; **4,** Rutina; **5,** Ácido Vanílico; **6,** Ácido Siringico; **7,** Ácido Cumárico; **8,** Ácido Ferúlico; **9,** Quercetina.





**Figura 3:** Percentual de recuperação dos compostos fenólicos nos respectivos sorbentes. \*: Composto recuperado acima de 70%. \*\*: Composto recuperado acima de 80%. \*\*\*: Composto recuperado acima de 90%.

## ANEXOS

### ANEXO 1:

#### *1 Manuscript Submission*

Submission of a manuscript implies that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

#### *1.2 Permissions*

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

#### *1.3 Online Submission*

Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

You may upload your manuscript as a single PDF file with all tables and figures inserted/imported.

Please note that PDF files cannot be used for production of the accepted manuscript and source files are required at that stage.

Also, please follow these guidelines for your submissions:

Each paper should have a separate “Conclusions” section, and any citations (such as reference citations, table or figures) is not allowed in this section.

A complete sentence should not be used as the title of the paper.

Manuscripts should be in 1.5 or double line spaces, and tables and figures should not be embedded within the text, instead they should be at the end of the manuscript.

Reference citation should be in (Authors, Year) format.

Manuscripts should be clear from any track-editing or comments.

Manuscripts should not contain any supplementary materials.

Manuscripts should not contain specific sections that are required by other journals (but not for this journal), such as “highlights”, “Practical Applications”.

#### *1.4 Title Page*

The title page should include:

The name(s) of the author(s)

A concise and informative title

The affiliation(s) and address(es) of the author(s)

The e-mail address, and telephone number(s) of the corresponding author

If available, the 16-digit ORCID of the author(s)

#### *1.5 Abstract*

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

#### *1.6 Keywords*

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## *2 TEXT*

### *2.1 Text Formatting*

Manuscripts should be submitted in Word.

Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.

Use italics for emphasis.

Use the automatic page numbering function to number the pages.

Do not use field functions.

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.

Use the table function, not spreadsheets, to make tables.

Use the equation editor or MathType for equations.

Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

LaTeX macro package (zip, 182 kB)

### *2.2 Headings*

Please use no more than three levels of displayed headings.

### *2.3 Abbreviations*

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## *2.4 Footnotes*

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## *2.5 Acknowledgments*

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section on the title page. The names of funding organizations should be written in full.

## 3 Manuscript organization

The text should be double spaced and page numbered to facilitate the reviewing process and should be structured as follows:

### 3.1 Main text

Introduction;

Materials and methods, including if appropriate an area description, quality assurances etc.;

Results;

Discussion;

Conclusions;

Acknowledgements (if appropriate);

References;

Tables;

Figure Captions;

### 3.2 Text formatting

Use a normal plain font (e.g. 10 point Arial or Times Roman);

Use Italics for emphasis;

Use automatic page numbering;

Use tab stops or other commands for indents, not the space bar;

### 3.3 *Formulae*

Use the equation editor for equations. Note: If you use Word 2007, do not create the equations with the default equation editor but use the Microsoft equation editor instead.

### 3.4 *Footnotes*

We discourage the use of footnotes. In most cases they can be incorporated in the main text. Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data).

### 3.5 *Language*

If English is not your native language you may want to have your manuscript edited by a native speaker prior to submission. A clear and concise language will help editors and reviewers concentrate on the scientific content of your paper and thus smooth the peer review process.

The following editing service provides language editing for scientific articles in all areas Springer publishes in. Use of an editing service is neither a requirement nor a guarantee of acceptance for publication. Please contact the editing service directly to make arrangements for editing and payment. Springer authors get special rates.

## 4 *References*

### 4.1 *Citation*

Cite references in the text by name and year in parentheses. Some examples:

Negotiation research spans many disciplines (Thompson 1990).

This result was later contradicted by Becker and Seligman (1996).

This effect has been widely studied (Abbott 1991; Barakat et al. 1995a, b; Kelso and Smith 1998; Medvec et al. 1999, 2000).

### 4.2 *Reference list*

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

Reference list entries should be alphabetized by the last names of the first author of each work. Order multi-author publications of the same first author alphabetically

with respect to second, third, etc. author. Publications of exactly the same author(s) must be ordered chronologically.

#### *4.3 Journal article*

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. <https://doi.org/10.1007/s00421-008-0955-8>

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 965:325–329

#### *4.4 Article by DOI*

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. <https://doi.org/10.1007/s001090000086>

#### *4.5 Book*

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

#### *4.6 Book chapter*

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

#### *4.7 Online document*

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. IOP Publishing PhysicsWeb. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

#### *4.8 Dissertation*

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

#### *4.9 Electronic Figure Submission*

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

## **5 ARTWORK AND ILLUSTRATIONS GUIDELINES**

### *5.1 Electronic Figure Submission*

Supply all figures electronically.

Indicate what graphics program was used to create the artwork.

For vector graphics, the preferred format is EPS; for halftones, please use TIFF format. MSOffice files are also acceptable.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

Name your figure files with "Fig" and the figure number, e.g., Fig1.eps.

### *5.2 Line Art*

Definition: Black and white graphic with no shading.

Do not use faint lines and/or lettering and check that all lines and lettering within the figures are legible at final size.

All lines should be at least 0.1 mm (0.3 pt) wide.

Scanned line drawings and line drawings in bitmap format should have a minimum resolution of 1200 dpi.

Vector graphics containing fonts must have the fonts embedded in the files.

### *5.3 Halftone Art*

halftone-gray-color

Definition: Photographs, drawings, or paintings with fine shading, etc.

If any magnification is used in the photographs, indicate this by using scale bars within the figures themselves.

Halftones should have a minimum resolution of 300 dpi.

### *5.4 Combination Art*

combined

Definition: a combination of halftone and line art, e.g., halftones containing line drawing, extensive lettering, color diagrams, etc.

Combination artwork should have a minimum resolution of 600 dpi.

### *5.5 Color Art*

Color art is free of charge for online publication.

If black and white will be shown in the print version, make sure that the main information will still be visible. Many colors are not distinguishable from one another when converted to black and white. A simple way to check this is to make a xerographic copy to see if the necessary distinctions between the different colors are still apparent.

If the figures will be printed in black and white, do not refer to color in the captions. Color illustrations should be submitted as RGB (8 bits per channel).

### *5.6 Figure Lettering*

To add lettering, it is best to use Helvetica or Arial (sans serif fonts).

Keep lettering consistently sized throughout your final-sized artwork, usually about 2–3 mm (8–12 pt).

Variance of type size within an illustration should be minimal, e.g., do not use 8-pt type on an axis and 20-pt type for the axis label.

Avoid effects such as shading, outline letters, etc.

Do not include titles or captions within your illustrations.

### *5.7 Figure Numbering*

All figures are to be numbered using Arabic numerals.

Figures should always be cited in text in consecutive numerical order.

Figure parts should be denoted by lowercase letters (a, b, c, etc.).

If an appendix appears in your article and it contains one or more figures, continue the consecutive numbering of the main text. Do not number the appendix figures, "A1, A2, A3, etc." Figures in online appendices (Electronic Supplementary Material) should, however, be numbered separately.

### *5.8 Figure Captions*

Each figure should have a concise caption describing accurately what the figure depicts. Include the captions in the text file of the manuscript, not in the figure file.

Figure captions begin with the term Fig. in bold type, followed by the figure number, also in bold type.

No punctuation is to be included after the number, nor is any punctuation to be placed at the end of the caption.

Identify all elements found in the figure in the figure caption; and use boxes, circles, etc., as coordinate points in graphs.

Identify previously published material by giving the original source in the form of a reference citation at the end of the figure caption.

### *5.9 Figure Placement and Size*

Figures should be submitted separately from the text, if possible.

When preparing your figures, size figures to fit in the column width.



For most journals the figures should be 39 mm, 84 mm, 129 mm, or 174 mm wide and not higher than 234 mm.

For books and book-sized journals, the figures should be 80 mm or 122 mm wide and not higher than 198 mm.

#### *5.10 Permissions*

If you include figures that have already been published elsewhere, you must obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format. Please be aware that some publishers do not grant electronic rights for free and that Springer will not be able to refund any costs that may have occurred to receive these permissions. In such cases, material from other sources should be used.

#### *5.11 Accessibility*

In order to give people of all abilities and disabilities access to the content of your figures, please make sure that

All figures have descriptive captions (blind users could then use a text-to-speech software or a text-to-Braille hardware)

Patterns are used instead of or in addition to colors for conveying information (colorblind users would then be able to distinguish the visual elements)

Any figure lettering has a contrast ratio of at least 4.5:1

### *6 ETHICAL RESPONSIBILITIES OF AUTHORS*

This journal is committed to upholding the integrity of the scientific record. As a member of the Committee on Publication Ethics (COPE) the journal will follow the COPE guidelines on how to deal with potential acts of misconduct.

Authors should refrain from misrepresenting research results which could damage the trust in the journal, the professionalism of scientific authorship, and ultimately the entire scientific endeavour. Maintaining integrity of the research and its presentation can be achieved by following the rules of good scientific practice, which include:

The manuscript has not been submitted to more than one journal for simultaneous consideration.

The manuscript has not been published previously (partly or in full), unless the new work concerns an expansion of previous work (please provide transparency on the re-use of material to avoid the hint of text-recycling (“self-plagiarism”).

A single study is not split up into several parts to increase the quantity of submissions and submitted to various journals or to one journal over time (e.g. “salami-publishing”).

No data have been fabricated or manipulated (including images) to support your conclusions

No data, text, or theories by others are presented as if they were the author’s own (“plagiarism”). Proper acknowledgements to other works must be given (this includes material that is closely copied (near verbatim), summarized and/or paraphrased), quotation marks are used for verbatim copying of material, and permissions are secured for material that is copyrighted.

Important note: the journal may use software to screen for plagiarism.

Consent to submit has been received explicitly from all co-authors, as well as from the responsible authorities - tacitly or explicitly - at the institute/organization where the work has been carried out, before the work is submitted.

Authors whose names appear on the submission have contributed sufficiently to the scientific work and therefore share collective responsibility and accountability for the results.

Authors are strongly advised to ensure the correct author group, corresponding author, and order of authors at submission. Changes of authorship or in the order of authors are not accepted after acceptance of a manuscript.

Adding and/or deleting authors and/or changing the order of authors at revision stage may be justifiably warranted. A letter must accompany the revised manuscript to explain the reason for the change(s) and the contribution role(s) of the added and/or deleted author(s). Further documentation may be required to support your request.

Requests for addition or removal of authors as a result of authorship disputes after acceptance are honored after formal notification by the institute or independent body and/or when there is agreement between all authors.

Upon request authors should be prepared to send relevant documentation or data in order to verify the validity of the results. This could be in the form of raw data, samples, records, etc. Sensitive information in the form of confidential proprietary data is excluded.

If there is a suspicion of misconduct, the journal will carry out an investigation following the COPE guidelines. If, after investigation, the allegation seems to raise valid concerns, the accused author will be contacted and given an opportunity to address the issue. If misconduct has been established beyond reasonable doubt, this may result in the Editor-in-Chief's implementation of the following measures, including, but not limited to:

If the article is still under consideration, it may be rejected and returned to the author.

If the article has already been published online, depending on the nature and severity of the infraction, either an erratum will be placed with the article or in severe cases complete retraction of the article will occur. The reason must be given in the published erratum or retraction note. Please note that retraction means that the paper is maintained on the platform, watermarked "retracted" and explanation for t

The author's institution may be informed.