

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**APLICAÇÃO DE NOVAS METODOLOGIAS
ANALÍTICAS NO ESTUDO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES**

Rute Carina Pereira Sequeiros

MESTRADO EM QUÍMICA

2009

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**APLICAÇÃO DE NOVAS METODOLOGIAS
ANALÍTICAS NO ESTUDO DE COMPOSTOS
FENÓLICOS EM MATRIZES ALIMENTARES**

Rute Carina Pereira Sequeiros

MESTRADO EM QUÍMICA

Dissertação orientada pelo
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira

2009

Agradecimentos

Ao Prof. Doutor José M. F. Nogueira agradeço a oportunidade de fazer parte do seu grupo de investigação e de poder desenvolver este trabalho com autonomia. Agradeço-lhe ainda pela paciência e pela sinceridade nas críticas e nos conselhos.

À Prof. Doutora Maria de Deus Carvalho agradeço os comentários e sugestões úteis mas sobretudo a amizade demonstrada.

O meu profundo agradecimento vai para a preciosa ajuda do meu colega e amigo Nuno Neng, o seu apoio e encorajamento constantes, a sua infindável disponibilidade assim como os seus valiosos conhecimentos foram determinantes na realização deste trabalho.

Um enorme obrigado aos meus colegas, Ana Rita Mendão, Fátima Portugal, Ana Mestre, Marta Andrade e Paulo Madeira, pela constante partilha de experiências e pelos fantásticos momentos de convívio.

Um agradecimento especial é também devido às amigas, Violeta Girão e Ana Luísa Castro por toda a força e boa disposição que me transmitiram e pela permanente disponibilidade em ajudar.

Igualmente importante para a escrita desta dissertação foi o constante apoio e incentivo das minhas amigas Ana Rita Madeira, Carina Silveira e Susana Borges.

Um agradecimento muito especial a dois amigos incansáveis, Catarina Pinto e Paulo Coutinho, por todo o apoio, carinho, compreensão e pela generosa e inestimável amizade.

A minha mais profunda gratidão vai para os meus pais e irmão. Aos meus pais agradeço tudo aquilo que abdicaram por mim e ainda o seu amor incondicional. Ao meu irmão, o apoio, a paciência, os conselhos e a valiosa ajuda no ultimar desta dissertação.

A todos os que foram aqui citados, desejo expressar a minha enorme e sincera gratidão.

Resumo

O crescente interesse no estudo dos compostos fenólicos, particularmente os ácidos fenólicos, deve-se às propriedades antioxidantes que evidenciam, acreditando-se que possam desempenhar um importante papel na prevenção de doenças cardiovasculares e do cancro. Neste sentido, é de todo o interesse o desenvolvimento de métodos analíticos capazes de determinar e quantificar os compostos fenólicos numa vasta gama de alimentos.

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, optimização, validação e aplicação de um novo método para a determinação de ácidos fenólicos (clorogénico, ferúlico, *p*-cumárico e cafeico) em produtos alimentares, recorrendo à micro-extracção adsorptiva em barra com dessorção líquida, seguida de análise por electroforese capilar com detecção por rede de díodos (BA μ E-LD/CE-DAD).

Numa primeira abordagem, seleccionou-se o material adsorvente mais adequado para a extracção dos ácidos fenólicos, nomeadamente carvão activado, polidimetilsiloxano, co-polímero de divenilbenzeno e alguns dos seus derivados, tendo o derivado de co-polímero de divenilbenzeno com propriedades de troca aniónica e fase reversa (Oásis[®] MAX Sorbent) demonstrado ser o mais eficaz.

Para optimização da metodologia desenvolvida (BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD), foram efectuados estudos sistemáticos a diversos parâmetros, tendo 3 h de extracção (1000 rpm; pH 6) e o uso de solução metanol/ácido fórmico (2 %) durante 15 min para retro-extracção, permitido obter recuperações compreendidas entre 35 e 40 %. O método revelou ainda, excelente linearidade ($r^2 > 0,99$) na gama compreendida entre 0,8 e 8,0 mg/L, tendo-se alcançado limites de detecção e de quantificação entre 18 - 82 μ g/L e 61 - 273 μ g/L, respectivamente.

Com recurso ao método da adição de padrão, a aplicação da presente metodologia a matrizes alimentares, nomeadamente chá verde, mel e sumo de frutos vermelhos, demonstrou bom desempenho analítico tendo-se verificado a ocorrência de níveis de alguns dos ácidos fenólicos estudados.

A metodologia proposta (BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD), apresentou como principais vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra e solventes, tempo analítico reduzido e fácil manipulação, associada à rapidez, simplicidade e bom desempenho analítico.

Abstract

The increasing interest in the study of phenolic compounds, particularly the phenolic acids, is due to their antioxidant properties as they play a very important role in the prevention of cardiovascular diseases and in cancer. Therefore, it is very important the development of analytical methods for the determination and quantification of phenolic compounds in a wide range of food products.

The present work consisted in the development, optimization, validation and application of a new method for the determination of four phenolic acids (chlorogenic, ferulic, *p*-coumaric and caffeic) in food stuffs, using bar adsorptive micro-extraction and liquid desorption, followed by capillary electrophoresis with diode array detection (BA μ E-LD/CE-DAD).

In a first approach, several adsorbent materials more suitable for the extraction of the studied compounds were selected, namely activated carbon, polydimethylsiloxane, divinylbenzene co-polymer and its derivatives, where the anionic exchange and reverse-phase divinylbenzene co-polymer derivative (Oásis[®] MAX Sorbent) showed much better efficacy.

To optimize the developed methodology (BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD), systematic studies were carried out for the different experimental variables, in which 3 h of extraction (1000 rpm; pH 6) and a solution of methanol/formic acid (2 %) for back-extraction during 15 min, allowing recovery yields of the studied compounds in between 35 and 40 %. This method also presented excellent linearity ($r^2 > 0.99$) ranging from 0.8 to 8.0 mg/L, reaching limits of detection and quantification in between 18 - 82 μ g/L and 61 - 273 μ g/L, respectively.

By using the standard addition methodology, the application of the method to food matrices, in particular green tea, honey and red fruit juices, demonstrated good performance leading to the quantification of levels of the studied compounds.

The proposed methodology (BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD), presented several advantages, namely small amounts of sample and solvents used, reduced analytical time and easy manipulation, associated to a fast, simple and remarkable analytical performance.

Palavras-chave

- Micro-extracção adsortiva em barra (BA μ E)
- Ácidos fenólicos
- Electroforese capilar (CE)
- Chá verde
- Mel
- Sumo de frutos vermelhos

Keywords

- Bar adsorptive micro-extraction (BA μ E)
- Phenolic acids
- Capillary electrophoresis (CE)
- Green tea
- Honey
- Red fruit juice

Abreviaturas e Símbolos

%	Percentagem
°C	Graus Celsius
η	Viscosidade da solução
λ	Comprimento de onda
μg	Microgramas
μgL^{-1}	Micrograma por litro
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
μ_{EF}	Mobilidade electroforética
v_{EF}	Velocidade electroforética
σ	Desvio padrão
\bar{x}	Média
a	Declive
ác.	Ácido
A_i	Área do analito i
A_{IS}	Área do padrão interno
A_{obt}	Área obtida
A_{esp}	Área esperada
ACF	Ácido cafeico
ACL	Ácido clorogénico
ACM	Ácido cumárico
ACN	Acetonitrilo
AFR	Ácido ferúlico
b	Ordenada na origem
BA μ E	Micro-extracção adsortiva em barra
c_{PDMS}	Concentração do analito na fase de PDMS
c_{W}	Concentração do analito na fase aquosa
Cm	Centímetro
C_i	Concentração do analito i

CE	Electroforese capilar
CGE	Electroforese capilar em gel
CIEF	Focagem isoelectrica capilar
CITP	Isotacoforese capilar
CMBE	Electroforese capilar de fronteira móvel
CZE	Electroforese capilar de zona
DAD	Detector de rede de díodos
E	Diferença de potencial
EC	Electrocromatografia
EOF	Fluxo electroosmótico
g	Gramas
GC	Cromatografia gasosa
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
h	Horas
HCl	Ácido clorídrico
HCOOH	Ácido fórmico
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
ID	Diâmetro interno
IS	Padrão interno
$K_{\text{PDMS/W}}$	Coefficiente de distribuição PDMS-água
$K_{\text{O/W}}$	Coefficiente de distribuição octanol-água
k	Factor de retenção
kV	Kilovolt
L_{ef}	Comprimento efectivo do capilar
L_{tot}	Comprimento total do capilar
LC	Cromatografia líquida
LD	Dessorção líquida
LLE	Extracção líquido-líquido
LOD	Limite de detecção
LOQ	Limite de quantificação
mbar	Milibar
mM	Milimolar
M	Molar

MeOH	Metanol
MECK	Cromatografia micelar electrocinética
mg	Miligramas
mgL ⁻¹	Miligramas por litro
mgmL ⁻¹	Miligramas por mililitro
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m _{PDMS}	Massa do analito na fase de PDMS
m _w	Massa do analito na fase aquosa
m/v	Massa por volume
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
nm	Nanometros
PDMS	Polidimetilsiloxano
p/v	Peso por volume
Q	Número de carga
R	Raio do ião
R ²	Coefficiente de correlação
rpm	Rotações por minuto
RSD	Desvio padrão relativo
S	Segundo
SAM	Método da adição padrão
SBSE	Extracção sortiva em barra de agitação
SPE	Extracção em fase sólida
SPME	Micro-extracção em fase sólida
t _m	Tempo migração
UV/vis	Ultravioleta/visível
V _{PDMS}	Volume em PDMS
V _w	Volume de amostra aquosa
v/v	Volume por volume

Índice

Índice de Figuras	xi
Índice de Tabelas	xiii
1. Introdução	1
1.1. Compostos fenólicos	1
1.2. Metodologias analíticas	3
1.3. Técnicas de extracção sortiva	4
1.3.1. Extracção sortiva em barra de agitação (SBSE)	5
1.3.2. Micro-extracção adsortiva em barra (BA μ E)	8
1.4. Electroforese capilar (CE)	8
1.4.1. Migração electroforética	10
1.4.2. Fluxo electroosmótico	10
1.4.3. Electroforese capilar de zona (CZE)	13
1.5. Objectivo	14
2. Parte Experimental	15
2.1. Reagentes, materiais e amostras	15
2.2. Instrumentação	16
2.3. Método experimental	16
2.3.1. Preparação das soluções padrão e tampão	16
2.3.2. Condições instrumentais	16
2.3.3. Calibração instrumental	17
2.3.4. Preparação das barras de BA μ E	18
2.3.5. Ensaio de optimização e validação	19
2.3.6. Ensaio de aplicação a amostras reais	20
3. Discussão de Resultados	21
3.1. Condições instrumentais	21
3.2. Seleccção do adsorvente para BA μ E	24
3.3. Optimização do processo de BA μ E(MAX)-LD	25

3.3.1. Optimização da retro-extracção (LD).....	25
3.3.1.1. Efeito da evaporação	25
3.3.1.2. Efeito do tipo de solvente	25
3.3.1.3. Efeito do tempo	26
3.3.1.4. Efeito do "carry-over"	27
3.3.2. Optimização da BA μ E(MAX).....	28
3.3.2.1. Efeito da velocidade de agitação	28
3.3.2.2. Efeito do tempo de extracção	29
3.3.2.3. Efeito do pH da matriz	30
3.3.2.4. Efeito do modificador orgânico.....	32
3.3.2.5. Efeito da força iónica.....	33
3.4. Validação do método BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD	35
3.5. Amostras reais	37
3.5.1. Amostra de chá verde	37
3.5.2. Amostra de mel.....	39
3.5.3. Amostra de sumo de frutos vermelhos	41
4. Conclusões	43
5. Bibliografia.....	45
Anexos.....	I
I. Espectros de UV/vis	I
II. Dados obtidos pelo "SPARC" para o estudo do efeito de pH.....	III
III. Fórmulas utilizadas para o cálculo das recuperações.....	VII

Índice de Figuras

1. Introdução

Figura 1.1 – Estrutura química dos principais ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b) ..	2
Figura 1.2 – Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE	5
Figura 1.3 – Comparação da eficiência extractiva por SPME (PDMS: 0,5 μ L) e SBSE (PDMS: 47 μ L) em função do coeficiente de partição octanol-água, em idênticas condições experimentais	7
Figura 1.4 – Esquemática da instrumentação de CE	9
Figura 1.5 – Princípios do fluxo electroosmótico (EOF)	11
Figura 1.6 – Representação do perfil do fluxo electrósmotico (a) e do fluxo induzido por pressão (b)	11
Figura 1.7 – Dois tipos de células utilizadas para aumentar a sensibilidade da detecção por absorção: células em Z (a) e capilares com bolha (b)	13

2. Parte Experimental

Figura 2.1 – Barras de extracção (BA μ E) propostas para o estudo dos ácidos fenólicos	18
--	----

3. Discussão de Resultados

Figura 3.1 – Electroforegrama obtido por CE-DAD relativo à mistura dos quatro ácidos fenólicos em estudo e do IS, em condições experimentais optimizadas.....	22
Figura 3.2 – Interações de um ácido fenólico com o adsorvente seleccionado	24
Figura 3.3 – Efeito do solvente de retro-extracção na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção a 750 rpm e 30 min de retroextracção) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.	26
Figura 3.4 – Efeito do tempo de retro-extracção na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção a 750 rpm) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.	27

Figura 3.5 – Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção e 15 min de retroextracção com MeOH + 2% ác. fórmico) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.....	29
Figura 3.6 – Efeito do tempo de extracção na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (1000 rpm e 15 min de retroextracção com MeOH + 2% ác. fórmico) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.	30
Figura 3.7 – Efeito do pH na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h de extracção a 1000 rpm e 15 min de retroextracção com MeOH + 2% ác. fórmico) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.	31
Figura 3.8 – Gráfico da capacidade de retenção do adsorvente para analitos acídicos.....	31
Figura 3.9 – Efeito do modificador orgânico (MeOH) na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h de extracção a 1000 rpm e 15 min de retroextracção com MeOH + 2% ác. fórmico) obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.....	33
Figura 3.10– Curvas de calibração do ACL, AFR, ACM e ACF obtidas por SAM. ...	36
Figura 3.11–Curvas de regressão do AFR, ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de chá verde	38
Figura 3.12–Electroforegramas relativos a uma amostra de chá verde, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.....	39
Figura 3.13–Curvas de regressão do ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de mel	40
Figura 3.14–Electroforegramas relativos a uma amostra de mel, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.....	40
Figura 3.15–Curvas de regressão do ACL, ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de sumo de frutos vermelhos	41
Figura 3.16–Electroforegramas relativos a uma amostra de sumo de frutos vermelhos, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.....	42

Índice de Tabelas

2. Parte Experimental

Tabela 2.1 – Condições instrumentais utilizadas nos estudos por CE-DAD	17
--	----

3. Discussão de Resultados

Tabela 3.1 – Tempo de migração (t_m), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), gama linear e coeficientes de correlação obtidos por CE-DAD.	23
Tabela 3.2 – Valores de pK_a dos ácidos fenólicos em estudo obtidos com recurso ao programa SPARC “on-line”	32
Tabela 3.3 – Resumo das condições optimizadas para o método desenvolvido por $BA_{\mu}E(MAX)$ -LD/CE-DAD	34
Tabela 3.4 – Recuperações médias dos analitos nas condições optimizadas obtidas por $BA_{\mu}E(MAX)$ -LD/CE-DAD.....	35
Tabela 3.5 – LODs e LOQs para os analitos em estudo obtidos na validação do método $BA_{\mu}E(MAX)$ -LD/CE-DAD	35
Tabela 3.6 – Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia	36
Tabela 3.7 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de chá verde	38
Tabela 3.8 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de mel.....	40
Tabela 3.9 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de sumo de frutos vermelhos	41

1. Introdução

1.1. Compostos fenólicos

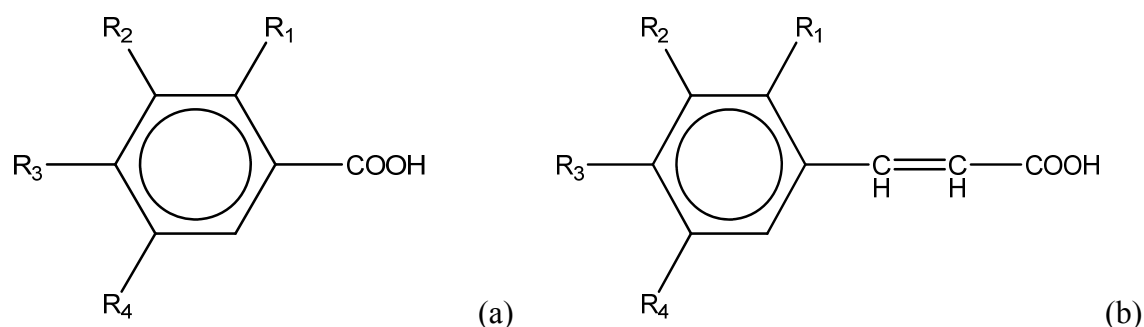
Os compostos fenólicos encontram-se naturalmente em muitos alimentos e bebidas derivados de plantas e contribuem para as características de cor, aroma e sabor [1,2]. Nos últimos anos, tem-se dado particular importância a este tipo de compostos por estarem associados às propriedades antioxidantes. Com efeito, o consumo regular de compostos fenólicos através da dieta alimentar tem sido associado a efeitos benéficos para a saúde humana [2 - 4].

Os processos oxidativos podem ser evitados através da modificação das condições ambientais ou pela utilização de substâncias antioxidantes com a propriedade de impedir ou diminuir o desencadeamento das reacções oxidativas. Neste sentido, os antioxidantes são capazes de inibir a oxidação de diversos substratos, de moléculas simples a polímeros e biosistemas complexos, por meio de dois mecanismos. O primeiro envolve a inibição da formação de radicais livres que possibilitam a etapa de iniciação; o segundo abrange a eliminação de radicais importantes na etapa de propagação, como alcoxílo e peroxílo, através da doação de átomos de hidrogénio a estas moléculas, interrompendo a reacção em cadeia [3,5].

Os antioxidantes fenólicos funcionam como neutralizadores de radicais e algumas vezes como quelantes de metais, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os produtos intermediários, formados pela acção destes antioxidantes, são relativamente estáveis devido à ressonância do anel aromático evidenciada por estas substâncias. Os compostos fenólicos e alguns dos seus derivados são, portanto, eficazes para prevenir a oxidação lipídica, embora poucos sejam permitidos para o uso em alimentos, devido principalmente à sua toxicidade. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, a investigação têm-se dirigido no sentido de encontrar produtos naturais com actividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir o seu teor nos alimentos [3,5].

Entre a grande diversidade de compostos fenólicos, destacam-se os flavonóides, ácidos fenólicos, taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes com origem natural [6].

Os ácidos fenólicos, em particular, caracterizam-se por possuir um anel aromático, um grupo carboxilo e um ou mais grupos hidroxilo e/ou metoxilo na estrutura da molécula, conferindo propriedades antioxidantes aos vegetais. Os ácidos fenólicos são constituídos por dois grupos, derivados do ácido hidroxibenzóico e do ácido hidroxicinâmico. Os ácidos hidroxibenzóicos (figura 1.1 (a)) incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico, protocatecuico, vanílico, siríngico, que têm uma estrutura comum (C6-C1), enquanto os ácidos hidroxicinâmicos (figura 1.1 (b)), são compostos aromáticos com três carbonos que formam uma cadeia lateral (C6-C3), destacando-se os ácidos cafeico, ferúlico, *p*-cumárico e sináptico, como os mais comuns [6].



$R_1 = \text{OH} \rightarrow$ ácido salicílico; $R_1 = R_4 = \text{OH} \rightarrow$ ácido gentísico; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido *p*-hidroxibenzóico; $R_2 = R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido protocatequínico; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido vanílico; $R_2 = R_3 = R_4 = \text{OH} \rightarrow$ ácido gálico; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido siríngico

$R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H} \rightarrow$ ácido cinâmico; $R_1 = \text{OH} \rightarrow$ ácido *o*-cumárico; $R_2 = \text{OH} \rightarrow$ ácido *m*-cumárico; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido *p*-cumárico; $R_2 = R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido cafeico; $R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido ferúlico; $R_2 = R_4 = \text{OCH}_3$; $R_3 = \text{OH} \rightarrow$ ácido sináptico

Figura 1.1 - Estrutura química dos principais ácidos benzóicos (a) e cinâmicos (b).

Os derivados do ácido hidroxicinâmico são antioxidantes mais activos do que os derivados do ácido hidroxibenzóico. Isto deve-se à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa na estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do electrão desemparelhado, enquanto que os derivados do ácido benzóico não apresentam essa característica [6].

Os ácidos fenólicos, além de se apresentarem sob a sua forma natural, podem ligar-se entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido cafeico, o qual, associado ao ácido quínico, origina o ácido clorogénico [5].

1.2. Metodologias analíticas

Diversos investigadores têm desenvolvido métodos para separar, identificar e quantificar os compostos fenólicos em alimentos, enfrentando muitos problemas analíticos, uma vez que para além de englobarem uma gama enorme de substâncias, apresentam na maioria das vezes elevada polaridade, sendo ainda muito reactivos e susceptíveis à acção enzimática [6].

Até ao momento, ainda não se desenvolveu um método satisfatório para a extracção selectiva de todos ou de uma classe específica de compostos fenólicos presentes nos alimentos. A solubilidade dos fenólicos varia de acordo com a polaridade do solvente utilizado, o grau de polimerização e das interações com outros constituintes dos alimentos. Os solventes mais utilizados para a extracção destes compostos são metanol, etanol, acetona, água, acetato de etilo, propanol, dimetilformaldeído e em diversas combinações [6].

Diversos métodos espectrofotométricos para quantificação de compostos fenólicos em alimentos têm sido desenvolvidos, baseados em diferentes princípios e usados para quantificar a sua totalidade, determinar um composto fenólico em específico ou ainda uma classe em particular. Os métodos electroquímicos também têm sido muito úteis na análise dos compostos fenólicos em alimentos. Estes métodos podem ser utilizados para determinar o potencial redutor dos compostos fenólicos, identificar mecanismos de oxidação, flavonóides através da comparação com padrões. No entanto, quer a cromatografia gasosa (GC) quer a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), têm sido as técnicas mais usadas na determinação de compostos fenólicos, podendo a informação estrutural ser obtida através da hifenação com espectrometria de massa (MS) [6]. Mais recentemente, a electroforese capilar (CE) tem sido proposta na análise de compostos fenólicos em produtos alimentares, tornando-se numa alternativa que evidencia diversas vantagens face às técnicas cromatográficas [1,7,8].

Porém antes da análise, as amostras são sujeitas à extracção dos analitos tendo a extracção líquido-líquido (LLE) convencional sido largamente utilizada nas últimas décadas. No entanto, esta técnica recorre ao uso de quantidades apreciáveis de solventes orgânicos tóxicos, o que conduziu inevitavelmente ao desenvolvimento de alternativas mais “amigas do ambiente” [9]. Por outro lado, a extracção em fase sólida (SPE) que

actualmente é amplamente utilizada na análise de compostos fenólicos, vulgarizada para enriquecimento, concentração e remoção de potenciais interferentes em diversos tipos de matrizes, encontra-se na actualidade muito referenciada na literatura associada geralmente a GC, HPLC e ainda a CE [10 - 12]. Apesar da abrangência e eficiência demonstradas, estas metodologias de preparação de amostras já não se coadunam com as actuais exigências de redução do tempo despendido e automatização, necessárias à maior eficácia do trabalho de rotina nos laboratórios analíticos. Por seu turno, na actual era da “química verde” já não é admissível o consumo excessivo de solventes orgânicos tóxicos, devido ao impacto ambiental que isso acarreta [9]. Nesta perspectiva, têm surgido novos conceitos aliados a metodologias que conseguem conjugar a miniaturização analítica com redução ou mesmo eliminação do consumo de solventes orgânicos, para enriquecimento de compostos alvo em diversos tipos de matrizes. Destacam-se neste contexto, a técnica de micro-extracção em fase sólida (SPME) e mais recentemente, a extracção sortiva em barra de agitação (SBSE), que para além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa sensibilidade na recuperação de analitos alvo, elevada reprodutibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização [9, 13].

1.3. Técnicas de extracção sortiva

A crescente preocupação no desenvolvimento de técnicas de preparação de amostras mais “amigas do ambiente” levou ao surgimento das técnicas de extracção sortiva, nomeadamente da SPME e SBSE. Na extracção sortiva, os analitos são extraídos de uma matriz aquosa para um polímero líquido imiscível, e contrariamente à SPE, no qual os analitos são retidos à superfície do enchimento, a quantidade total de fase polimérica participa de forma decisiva no fenómeno de enriquecimento [13 - 16]. O processo de enriquecimento é controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra, sendo por isso um fenómeno de equilíbrio. Ambas as técnicas de extracção sortiva podem ser utilizadas directamente na matriz da amostra assim como no espaço cabeça (“headspace”), podendo ser usadas várias vezes consecutivas sem demonstrar sinais evidentes de deterioração do material polimérico. A fase extractiva mais comum nestas técnicas é o polidimetilsiloxano (PDMS), muito

conhecido das fases estacionárias usadas nas colunas de GC, sendo termicamente estável e mais inerte que os materiais adsorventes convencionais, possuindo excelentes propriedades de difusão e tolerando uma vasta gama de temperaturas de operação (220-320°C).

1.3.1. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A SBSE é uma técnica de preparação de amostras, inicialmente proposta por P. Sandra e colaboradores no final dos anos noventa, para enriquecimento de compostos orgânicos de matrizes aquosas [13 - 16]. Uma barra de agitação, constituída por um ímã envolto numa fina película de vidro revestido por um filme em PDMS, como é ilustrado na figura 1.2, é colocada na amostra sob agitação, por forma a promover o movimento de rotação na matriz líquida e simultaneamente a extração dos analitos para a camada polimérica em condições experimentais optimizadas.

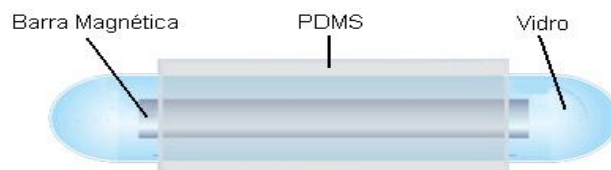


Figura 1.2 – Representação esquemática dos constituintes de uma barra de agitação usada na SBSE.

A película de vidro previne a decomposição do PDMS, que pode ser catalisado por metais do cilindro metálico, impedindo também a contaminação da amostra com produtos que se possam formar.

Em analogia com outras técnicas de extração, as condições experimentais da SBSE têm de ser optimizadas para cada tipo específico de aplicação. Para além das características de polaridade dos analitos e da fase de revestimento, a eficiência de recuperação é igualmente influenciada por parâmetros como o tempo de extração, a velocidade de agitação, temperatura, força iónica, pH e características de polaridade do

meio, no sentido do analito com interesse atingir o equilíbrio de distribuição entre a matriz da amostra e o revestimento polimérico [13].

A SBSE baseia-se nos mesmos princípios de equilíbrio da SPME. Estudos recentes, demonstraram que existe uma notável correlação entre os coeficientes de partição, relativos à distribuição dos analitos entre a fase de PDMS e a matriz aquosa ($K_{\text{PDMS/W}}$) e os coeficientes de distribuição octanol-água ($K_{\text{O/W}}$), o qual constitui uma medida da polaridade dos compostos orgânicos e fornece uma boa indicação da eficiência de extracção para cada soluto. Ainda que, de uma forma grosseira, analitos apolares possam ser caracterizados por valores de $\log K_{\text{O/W}}$ superiores a 3,5, analitos polares possuem normalmente valores inferiores a 2.

O coeficiente $K_{\text{PDMS/W}}$ é por definição a razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (c_{PDMS}) e na fase aquosa (c_{W}), após o equilíbrio ser atingido, podendo ser expresso pela equação 1.1:

$$K_{\text{O/W}} \approx K_{\text{PDMS/W}} = \frac{c_{\text{PDMS}}}{c_{\text{W}}} = \left(\frac{m_{\text{PDMS}}}{m_{\text{W}}} \right) \times \left(\frac{V_{\text{W}}}{V_{\text{PDMS}}} \right) \quad (1.1)$$

onde m_{PDMS} é a massa do analito na fase de PDMS, m_{W} a massa do analito na fase aquosa, V_{W} o volume de amostra aquosa e V_{PDMS} o volume em PDMS [13 - 16].

Dependendo do $K_{\text{O/W}}$, os compostos são extraídos em maior ou menor extensão e quanto maior for a quantidade de PDMS, menor é a relação de fase e conseqüentemente, mais elevada será a eficiência de extracção. Conforme pode ser demonstrado, na SBSE a eficiência de extracção dos analitos é genericamente descrita no equilíbrio pelos coeficientes $K_{\text{O/W}}$, incrementando substancialmente a sensibilidade analítica relativamente à SPME, devido ao maior conteúdo em PDMS envolvido, permitindo assim diminuir os limites de detecção e proporcionar todas as vantagens analíticas, particularmente em análise vestigial. A figura 1.3, reproduz justamente este comportamento, ilustrando a eficiência obtida por SBSE comparativamente à SPME em função do $\log K_{\text{O/W}}$, demonstrando que a primeira é bem descrita pelos coeficientes, sendo a recuperação extractiva quantitativamente superior em idênticas condições experimentais. De acordo com a literatura, para analitos com valores de $\log K_{\text{O/W}}$

superiores a 3, são normalmente obtidas recuperações quantitativas por SBSE. No entanto, no caso de extracção incompleta, que genericamente pode ocorrer para compostos com $\log K_{OW}$ inferior a 3 ou ainda em situações de não equilíbrio, a calibração continua a ser válida em SBSE [13].

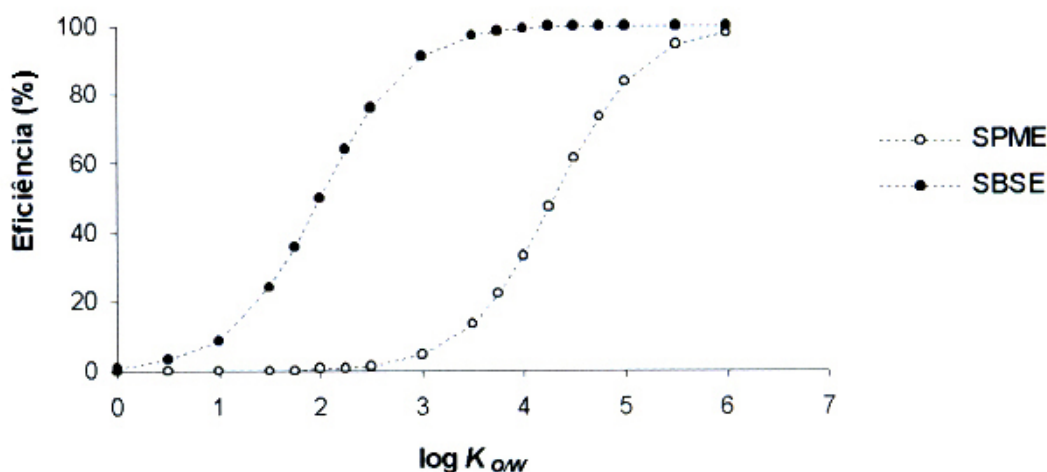


Figura 1.3 – Comparação da eficiência extractiva por SPME (PDMS: 0,5 μ L) e SBSE (PDMS: 47 μ L) em função do coeficiente de partição octanol-água, em idênticas condições experimentais (retirado de [13]).

Contrariamente à SPME, para a qual já existem no mercado diversos tipos de revestimentos poliméricos, na SBSE apenas se encontram comercializadas barras de agitação revestidas com PDMS contendo um volume compreendido entre 24 e 126 μ L, apresentando no entanto, uma quantidade substancialmente superior à disponibilizada na fibra de SPME mais comum (0,5 μ L). A maior relação de fase, entre a matriz da amostra e o PDMS, proporciona desta forma um aumento da capacidade extractiva e, conseqüentemente, sensibilidade da técnica de SBSE para uma ordem de grandeza compreendida entre 50 e 250, comparativamente à SPME [14 - 16].

Uma das principais limitações da SBSE é o facto de responder de forma ineficiente a analitos polares ($\log K_{OW} < 2$) ou termolábeis. Neste contexto, é de extrema importância o desenvolvimento de metodologias alternativas com recurso a diferentes materiais, que apresentem uma maior capacidade extractiva para compostos com elevada polaridade. Os materiais que apresentem propriedades adsorventes,

nomeadamente carvões activados, sílica gel, zeólitos, argilas, poliuretanos, podem ser excelentes alternativas ao PDMS.

1.3.2. Micro-extracção adsortiva em barra (BA μ E)

Tendo em conta as limitações do PDMS referidas anteriormente, têm-se efectuado estudos no sentido de desenvolver métodos de extracção analítica alternativos. Neste sentido, surgiu um processo inovador de extracção analítica, designado por micro-extracção adsortiva em barra (BA μ E) [17]. O processo consiste na suspensão do dispositivo na matriz a analisar, constituído por um suporte plástico revestido externamente com materiais adsorventes (ex. carvões activados, zeólitos, copolímero de divinilbenzeno/estireno, etc) finamente divididos e fixados de forma simples, mantendo-se o meio sob agitação convencional até se estabelecer o equilíbrio. Os suportes contendo adsorventes adequados, podem ser aplicados a matrizes reais, particularmente a amostras aquosas com origem ambiental ou biológica, no sentido de extrair compostos com interesse para posterior análise com recurso a técnicas cromatográficas, hifenadas e até electroforese capilar.

1.4. Electroforese capilar (CE)

O conceito de electroforese tem por base o princípio de que sob influência de um campo eléctrico, partículas carregadas em solução migram com diferentes velocidades e em diferentes direcções. Estes princípios já são conhecidos há mais de 100 anos, tendo as suas bases teóricas sido formuladas por Kohlrausch em 1987 [18, 19]. No entanto, a introdução da electroforese como técnica de separação deve-se a Tiselius na década de trinta do séc. XX. Devido ao desenvolvimento desta técnica foi-lhe atribuído o prémio Nobel em 1948 [20]. Baseando-se nos mesmos princípios, foram surgindo variantes à técnica, entre as quais, o recurso a suportes capilares, passando a ser denominada por electroforese capilar (CE). A grande vantagem do uso de capilares é o facto de possibilitar uma maior dissipação do calor produzido por efeito de Joule, por forma a que as separações possam ser realizadas com altas tensões sem perda da qualidade dos resultados analíticos, tanto em termos de largura de banda como em estabilidade térmica

da amostra [19]. A afirmação da CE como técnica separativa deu-se com o trabalho desenvolvido por Jorgenson e Lukacs em 1981 [19, 21].

A instrumentação de CE consiste num tubo capilar (diâmetro interno compreendido entre 25 e 100 μm) que faz de ponte entre dois vials contendo solução tampão (electrólito de suporte), conforme é exemplificado na figura 1.4.

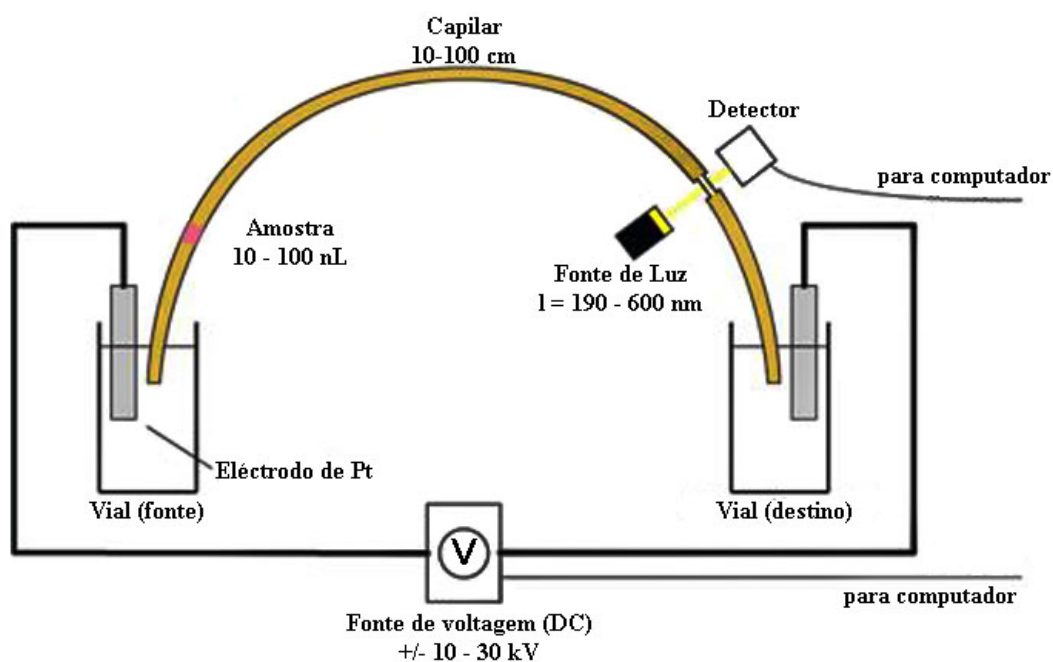


Figura 1.4 – Esquemática da instrumentação de CE.

A amostra é introduzida geralmente na extremidade oposta ao detector (normalmente o ânodo), substituindo-se o vial com tampão por outro com uma pequena quantidade de amostra. A migração da amostra é induzida pela aplicação de uma diferença de potencial nos extremos do capilar. As espécies presentes na amostra ao passarem no detector originam um sinal que em função do tempo é denominado de electroforegrama. A migração electroforética é sempre acompanhada por um fluxo electrosmótico (EOF) de determinada amplitude, e que contribui de forma passiva para o transporte das espécies da amostra, não ajudando na sua separação [19].

1.4.1. Migração electroforética

Quando se aplica uma diferença de potencial (E) a uma solução de iões, estes vão-se mover com uma velocidade v_{EF} que lhe é directamente proporcional:

$$v_{EF} = \mu_{EF} E \quad (1.2)$$

em que μ_{EF} é a mobilidade electroforética do ião.

Os iões migram para o eléctrodo de carga oposta passando pelo detector e a sua mobilidade depende principalmente do seu tamanho e da carga. Um ião menor irá migrar mais rapidamente do que um ião maior com a mesma carga, enquanto que no caso de dois iões do mesmo tamanho, o que irá migrar mais rapidamente será o que tiver maior carga. A mobilidade electroforética está então relacionada com a razão massa/carga da seguinte forma:

$$\mu_{EF} = q / 6\pi\eta r \quad (1.3)$$

em que q é o número de carga, η a viscosidade da solução e r o raio do ião.

1.4.2. Fluxo electroosmótico

Em CE é muito comum o uso de capilares em sílica sem revestimento interno, sendo importante a interacção do solvente com a parede do capilar. Os capilares de sílica fundida, tipicamente utilizados nas separações por CE possuem grupos silanol ionizáveis em contacto com a solução tampão existente no interior do capilar. À medida que se usam tampões com pH mais elevado vai haver uma maior dissociação de grupos silanol à superfície do capilar, tornando-a mais carregada negativamente. Na ausência de um campo eléctrico exterior há a formação de uma dupla camada em que a zona positiva é constituída por uma parte imóvel fortemente ligada à superfície do capilar e por uma parte móvel. Quando se aplica um campo eléctrico ao longo do capilar, a fase móvel vai começar a mover-se na direcção do eléctrodo carregado negativamente e os iões serão arrastados pelo solvente [18 – 21]. Este fluxo é designado por fluxo electroosmótico (figura 1.5).

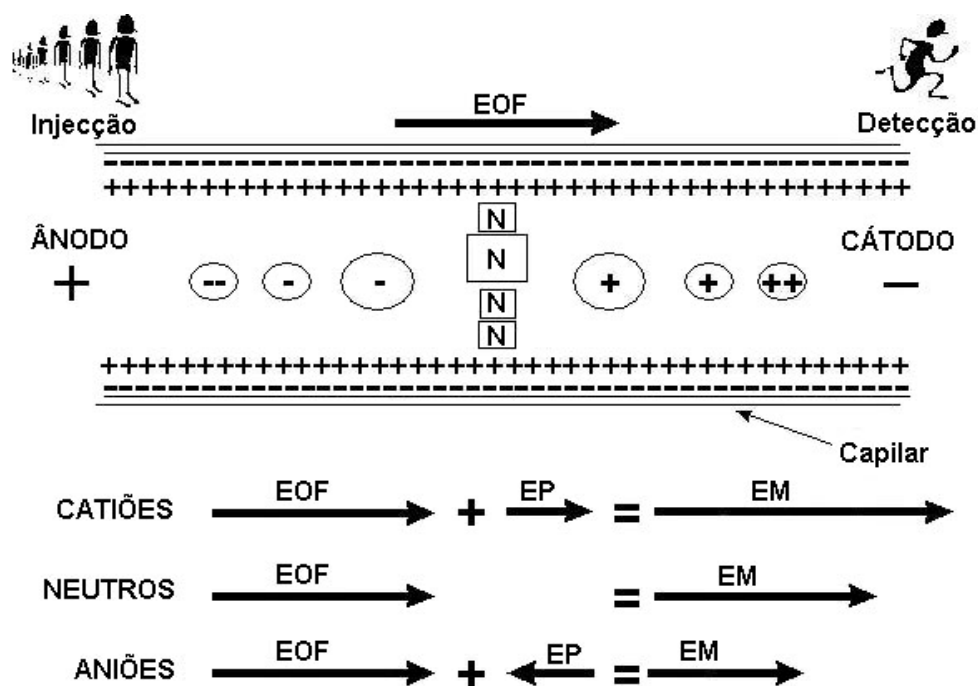


Figura 1.5 – Princípios do fluxo electrosmótico (EOF).

Uma característica particular do EOF é o perfil que este origina no interior do capilar, gerando um fluxo uniforme que atenua o alargamento das bandas que ocorre por exemplo em técnicas cromatográficas, como é o caso da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), na qual é aplicada pressão na coluna, originando um fluxo parabólico devido à interação do eluente com a parede da coluna, resultando numa maior dispersão das bandas (figura 1.6) [18 – 21].

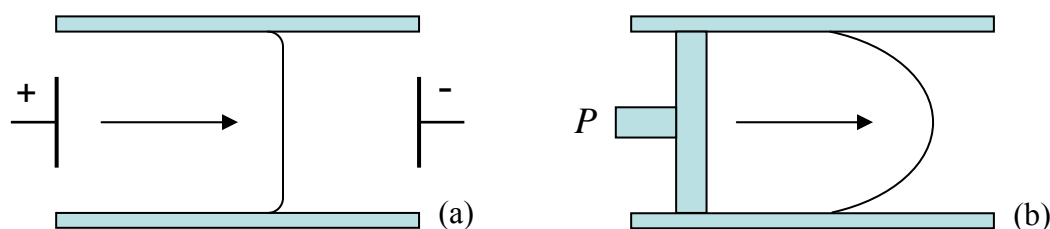


Figura 1.6 – Representação do perfil do fluxo electrosmótico (a) e do fluxo induzido por pressão (b).

A introdução reprodutível da amostra é um dos problemas da CE, principalmente em ensaios quantitativos. Os volumes de injeção em CE são muito pequenos, entre os 5 e 50 nL, sendo que volumes de amostra excessivos podem originar distorção do pico e perda de resolução. A fim de melhorar este aspecto desenvolveu-se a miniaturização e automatização da introdução da amostra. Os modos mais comuns são a injeção hidrodinâmica e a injeção electrocinética. Na injeção hidrodinâmica, a introdução da amostra ocorre através de uma diferença de pressão que conduz a amostra para o interior do capilar, sendo provocada pela aplicação de vácuo ou de pressão no frasco da amostra. O tempo de injeção é de poucos segundos e a diferença de pressão deve ser da ordem dos mbar. Na injeção electrocinética, a introdução da amostra ocorre por aplicação de um campo eléctrico, num curto intervalo de tempo, sendo os analitos transportados para o capilar através da combinação do EOF e da mobilidade electroforética. A quantidade de amostra injectada por este modo depende do potencial aplicado mas também da concentração e mobilidade dos componentes da amostra [18 – 20].

Os detectores mais amplamente utilizados em CE são o de absorção no UV/vis e também o de rede de díodos (DAD). O facto do funcionamento destes detectores obedecer à lei de Lambert-Beer, e sendo o percurso óptico em CE muito estreito, implica uma diminuição significativa da sensibilidade. Para contornar esta limitação tem-se desenvolvido dispositivos para aumentar o percurso óptico, através da utilização de células em Z ou de capilares com bolha (figura 1.7) [19, 20]. Os detectores de fluorescência também têm sido bastante utilizados devido ao aumento da sensibilidade e selectividade para analitos fluorescentes ou derivados fluorescentes. Outra opção são os detectores electroquímicos (condutividade, potenciométricos e amperométricos) que possuem a vantagem das medições não serem influenciadas pelo tamanho da célula, apresentando no entanto como desvantagem o difícil isolamento dos eléctrodos do detector do elevado potencial necessário à separação dos analitos. O acoplamento da CE à MS é ainda uma possibilidade, embora a interface seja de difícil operacionalidade devido aos baixos fluxos aplicados em CE. Contudo, o aparecimento de novas técnicas de ionização em MS e a necessidade de informação estrutural adicional dos analitos, tem originado enormes desenvolvimentos na instrumentação sendo uma hifenação muito promissora [19, 20].

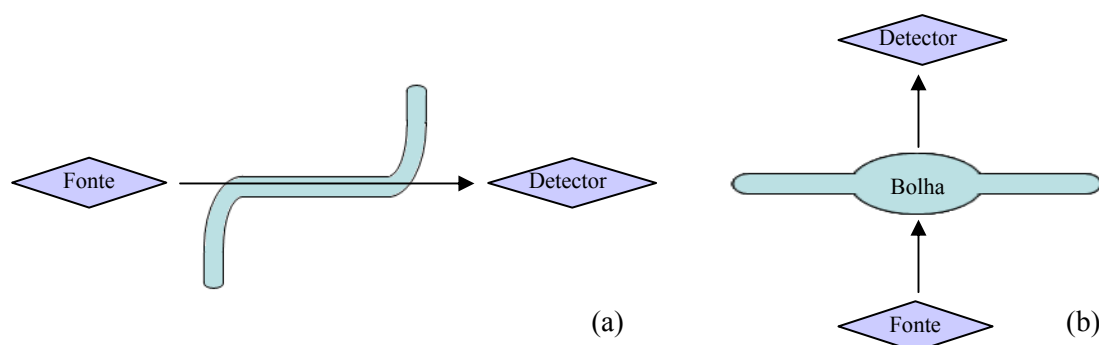


Figura 1.7 – Dois tipos de células utilizadas para aumentar a sensibilidade da detecção por absorção: células em Z (a) e capilares com bolha (b).

O desenvolvimento da electroforese levou ao aparecimento de um sem número de variantes, todas elas baseadas nos mesmos princípios. Os diferentes modos de CE podem ser divididos em electroforese capilar de zona (CZE), electroforese capilar de fronteira móvel (CMBE), isotacoforese capilar (CITP) e focagem isoeléctrica capilar (CIEF). Existem ainda, outras técnicas híbridas destas que combinam o princípio electroforético com outros conceitos, nomeadamente, electroforese capilar em gel (CGE) que combina a CZE com os princípios da exclusão molecular, cromatografia micelar electrocinética (MEKC) que combina a CZE com a partição de fases com recurso a surfactantes em concentrações superiores à concentração micelar crítica e electrocromatografia (EC) que combina a CZE com cromatografia líquida, através do uso das fases estacionárias [18 - 21].

1.4.3. Electroforese capilar de zona (CZE)

A CZE é a variante mais simples e amadurecida da CE. O capilar é preenchido com um tampão conhecido, designado por electrólito de suporte. Posteriormente, introduz-se uma pequena quantidade de amostra nessa solução e aplica-se um campo eléctrico exterior ao sistema. Este procedimento leva ao movimento dos iões que se encontram no tampão, também em movimento. Cada um desses iões vai-se mover com diferentes velocidades (iões com diferentes mobilidades) de forma a poderem ser separados pela extensão temporal suficiente da aplicação desse campo eléctrico exterior.

Os diferentes iões originam diferentes zonas (razão da designação deste modo), indo algumas delas passar pelo detector “on-line”. Os aniões migram na direcção oposta dos catiões, e se o EOF não for suficientemente elevado só se irão detectar o tipo de iões que migram para o eléctrodo que se encontra na direcção do detector [18 - 21].

A CZE com capilares sem revestimento é uma técnica particularmente adequada à separação de moléculas pequenas com carga permanente. Assim, é possível separar, sem grandes problemas ácidos carboxílicos aromáticos e alifáticos, ácidos sulfónicos, aminoácidos, fenóis, nucleótidos, aminas e açúcares [18].

Algumas das vantagens atractivas da CZE são a elevada eficiência e os tempos de análise reduzidos, versatilidade e uso de pequenas quantidades de solvente e amostra. No entanto, tem como principal desvantagem os limites de detecção não serem por vezes os mais adequados [22].

1.5. Objectivo

O presente projecto tem como principal objectivo o desenvolvimento de uma nova metodologia para a análise de compostos fenólicos, tendo por base a técnica de micro-extracção adsortiva em barra seguida de dessorção líquida e análise por electroforese capilar com detecção por rede de díodos (BA μ E-LD/CE-DAD). Os compostos estudados, ácido clorogénico (ACL), ácido ferúlico (AFR), ácido cumárico (ACM) e ácido cafeico (ACF) apresentam valores de $\log K_{OW}$ muito baixos, para os quais se espera uma baixa eficiência com as barras comerciais revestidas com PDMS. Devido a este facto, um dos objectivos do presente trabalho visa o estudo de diversos materiais adsorventes, nomeadamente, carvão activado, polidivenilbenzeno e seus derivados entre outros, alternativos ao PDMS das barras comerciais.

Teve-se ainda como objectivo, a optimização e validação da metodologia desenvolvida, assim como a sua aplicação em matrizes alimentares, nomeadamente, amostras de chá verde, mel e sumo de frutos vermelhos.

2. Parte Experimental

2.1. Reagentes, materiais e amostras

O metanol (MeOH, 99,8%), acetonitrilo (ACN, 99,9%), ácido fórmico (HCOOH, 98 - 100%) e tetraborato de sódio ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 99,5%) foram obtidos pela Merck (Alemanha). O ácido clorídrico (HCl, 34 - 37%) foi fornecido pela Panreac (Madrid, Espanha). O cloreto de sódio (NaCl, 99,8%) e o hidróxido de sódio (NaOH, 98,0%) foram obtidos através da AnalaR (BDH Chemicals, Inglaterra). O ácido ferúlico (AFR, 99%), ácido cumárico (ACM, 98%), ácido cafeico (ACF, 97%) e ácido 3-hidroxibenzóico (IS, 99%) foram obtidos pela Aldrich (Alemanha). O ácido clorogénico (ACL, $\geq 95\%$) foi obtido pela Extrasynthese (França). O carvão activado foi fornecido pela Riedel-de-Haën (Alemanha), o octadecil (C18) pela Supelco (Alemanha), o copolímero de divinilbenzeno/poliestireno pela Merck (Alemanha) e um seu derivado (Oásis[®] MAX Sorbent) através da Waters Corporation. A água ultra-pura utilizada foi obtida por um sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Bedford, MA, EUA).

Todas as soluções foram filtradas com filtros de nylon com 25 mm de diâmetro/ 0,45 μm de tamanho de poro (VWR International, Portugal), à excepção das amostras, para as quais se utilizaram filtros de nylon com 3 mm de diâmetro/ 0,45 μm de tamanho de poro (Chromafil). Utilizaram-se seringas de 1 mL (Once), 10 mL (Braun, Orunifix) e microseringas de 50, 100 e 500 μL (Hamilton, EUA), vials de polipropileno com 300 μL e 1 mL (Agilent Technologies, Alemanha), vials de vidro de 2 mL e 25 mL (VWR International, Portugal) e respectivas tampas, encapsuladores (Agilent Technologies, Alemanha), barras de agitação de teflon e barras de agitação revestidas com 126 μL de PDMS (Twister; Gerstel, Alemanha).

As amostras de chá verde, mel e sumo de frutos vermelhos estudadas são de origem portuguesa e foram obtidas no mercado.

2.2. Instrumentação

Os estudos foram efectuados com recurso a um sistema de CE (Agilent Technologies, Alemanha), equipado com um detector de rede de díodos e capilares de sílica fundida com percurso óptico estendido (“bolha”), contendo 75 μm de diâmetro interno (ID), 53,4 cm de comprimento total (L_{tot}) e 45,1 cm de comprimento efectivo (L_{ef}). A recolha e análise dos dados e o controlo instrumental foram efectuados a partir do software $^{3\text{D}}$ CE Chemstation (Rev. A.08.03, G1601). Utilizou-se ainda uma balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça), uma placa de agitação múltipla com quinze posições (Variomag H+P Labortechnik AG Multipoint 15, Alemanha), um banho de ultrasons equipado com termóstato (Branson[®] 3510 E-DTH, EUA), um vortex (Velp, Itália), evaporadores (Sigma-Aldrich, Alemanha) e um medidor de pH (Metrohm 744, Suíça).

2.3. Método experimental

2.3.1. Preparação das soluções padrão e tampão

As soluções de padrões individuais foram preparadas com uma concentração de 10,0 mg/mL em MeOH e mantidas a uma temperatura de -5°C . A partir destas soluções individuais, foram preparadas todas as soluções de trabalho por meio de diluições adequadas em tampão borato (25 mM, pH 9,2).

A solução de tampão borato usada nas separações por CE foi preparada semanalmente dissolvendo-se 1,907 g de tetraborato de sódio em 200 mL de água ultra-pura, seguindo-se um tratamento ultrasónico durante 5 minutos.

2.3.2. Condições instrumentais

As condições instrumentais utilizadas durante os estudos por CE-DAD encontram-se resumidas na tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Condições instrumentais utilizadas nos estudos por CE-DAD.

Condições instrumentais	
Electrólito de suporte	Tampão borato com 25 mM, pH 9,2
Capilar	L _{tot} : 53,4 cm L _{ef} : 45,1 cm ID : 75 µm com percurso óptico estendido
Temperatura do capilar	25 ° C
Injecção	50 mbar, 1 s
Voltagem	Gradiente : 0-3,5 min: 25kV; 3,5-5 min: 25-13 kV; 5-6,5 min: 13 kV; 6,5-7 min: 13-25 kV; 7-10 min: 25 kV
Detecção	214, 280 e 320 nm
Programa de pré-condicionamento	
1. Lavagem do capilar com NaOH (0,1 M) durante 1 min	
2. Lavagem do capilar com tampão durante 3 min	
3. Injecção	
Programa de pós-condicionamento	
1. Lavagem do capilar com tampão durante 1 min	

Os capilares novos eram condicionados com NaOH (1,0 M) durante 20 min, seguindo-se 5 min de água ultra-pura e 20 min com tampão. No início de cada dia de trabalho, o capilar era condicionado durante 5 min com NaOH (1,0 M), 5 min de água ultra-pura e 20 min de tampão. No fim de cada sessão de trabalho, o capilar era lavado com NaOH (1,0 M) durante 10 min, água ultra-pura 10 min e ar durante 20 min.

2.3.3. Calibração instrumental

Para o estudo dos parâmetros instrumentais, os quatro analitos foram analisados individualmente para se obter os respectivos parâmetros de retenção e espectros de UV/vis. A partir das soluções de padrões individuais preparou-se uma solução mistura dos quatro analitos com a concentração de 100 mg/L em tampão borato (25 mM, pH 9,2). Através de sucessivas diluições desta solução mistura, obtiveram-se os padrões

que foram injectados no sistema electroforético, por forma a determinar os limites de detecção (LODs) e de quantificação (LOQs) instrumentais, que correspondem a uma razão sinal/ruído de 3/1 e 10/1, respectivamente.

Para o estudo da linearidade e construção das respectivas curvas de calibração, prepararam-se soluções com cinco níveis de concentração (20, 40, 60, 80 e 100 mg/L), a partir da solução mistura dos quatro analitos (1000 mg/L). Todos os estudos foram efectuadas em triplicado.

2.3.4. Preparação das barras de BA μ E

As barras de extracção desenvolvidas consistiam num suporte cilíndrico em plástico (20 mm de comprimento e 3 mm de diâmetro) revestido com fita adesiva (Tesa), que posteriormente era coberta com o material adsorvente. As barras de extracção eram previamente condicionadas em MeOH seguida de água ultra-pura durante 5 min sob agitação antes de serem utilizadas. As barras comerciais de PDMS foram condicionadas em ACN durante 10 minutos sob agitação.



Figura 2.1 – Barras de extracção (BA μ E) propostas para o estudo dos ácidos fenólicos.

2.3.5. Ensaio de optimização e validação

Os ensaios foram efectuados medindo 25 mL de água ultra-pura para um vial de vidro apropriado, colocando-se de seguida a barra de extracção, uma barra magnética e selando o vial com recurso a um encapsulador. Posteriormente, a solução aquosa era fortificada com 200 μ L da solução padrão mistura de modo a obter uma concentração final de 0,8 mg/L. A extracção era promovida através da agitação da barra magnética durante um determinado período de tempo à temperatura ambiente. Após a extracção, o vial era aberto, retirava-se a barra de extracção e colocava-se num vial em polipropileno (1 mL) contendo 500 μ L de solvente orgânico, de modo a efectuar a retro-extracção com auxílio de tratamento ultrasónico. A barra era retirada do vial e o extracto orgânico evaporado até à secura sob corrente suave de azoto. Por fim, os analitos eram redissolvidos em 200 μ L de tampão borato (25 mM, pH 9,2) e transferidos para um outro vial em polipropileno (300 μ L), ao qual se adicionava 20 μ L de padrão interno (1000 mg/L), para posterior análise por CE-DAD.

Procedeu-se de modo semelhante com as barras em PDMS, substituindo as barras de extracção adsortiva e agitação pela barra comercial.

Por forma a optimizar a eficiência da extracção, estudaram-se diversos parâmetros, nomeadamente, solvente para dessorção (MeOH, ACN, MeOH/ACN 50% (v/v), MeOH com 2% HCOOH e MeOH com 10% HCOOH), tempo de dessorção (15, 30 e 45 min), velocidade de agitação (750, 1000 e 1250 rpm), tempo de extracção (1, 2, 3, 4 e 16 h), pH (2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12), modificador orgânico (5, 10 e 15% em MeOH (v/v)) e força iónica (5, 10 e 15% em NaCl (m/v)) da matriz.

Para avaliar as eventuais perdas dos analitos por evaporação foram medidos 500 μ L de solvente orgânico para um vial, tendo o solvente sido fortificado com 3 níveis de concentração (50, 100 e 150 mg/L) usando uma solução mistura contendo os quatro analitos. Realizou-se um tratamento ultrasónico durante 15 min, após o qual as amostras eram levadas à secura por evaporação sob corrente suave de azoto, sendo de seguida redissolvidas com 200 μ L de tampão borato mais 20 μ L de padrão interno. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo-se efectuado também ensaios em branco, ou seja, sem fortificação da amostra.

Para os estudos de validação do método, efectuaram-se ensaios com diferentes níveis de fortificação (0,8 – 8,0 mg/L), seguindo-se o procedimento anteriormente descrito em condições optimizadas.

2.3.6. Ensaio de aplicação a amostras reais

Recorreu-se ao método da adição de padrão (SAM) para quantificação dos ácidos fenólicos em estudo (ACL, AFR, ACM e ACF) nas amostras reais.

Na amostra de chá verde, preparou-se uma infusão pesando 4,0 g e colocando num recipiente com 400 mL de água ultra-pura, aquecendo até 100 °C sob agitação, onde permaneceu durante 2 - 3 min. A amostra de mel foi preparada dissolvendo-se 160,0 g em 400 mL de água ultra-pura. A amostra de frutos vermelhos consistiu em 400 mL de um sumo comercial. Todas as amostras foram colocadas durante 5 min sob tratamento ultrasónico tendo de seguida sido filtradas sob vácuo. Em cada ensaio, 25 mL de amostra eram colocados num vial e fortificados com 200 µL da solução padrão mistura para a concentração desejada (1,6 - 6,4 mg/L), seguindo-se o procedimento descrito anteriormente sob condições experimentais optimizadas. Ensaio em branco foram igualmente realizados com as amostras reais utilizando o procedimento descrito sem fortificação. O pH das amostras foi ajustado através da adição de HCl 5% ou NaOH 0,01 M.

3. Discussão de resultados

3.1. Condições instrumentais

Iniciou-se o presente trabalho com a determinação das melhores condições instrumentais para análise de quatro compostos fenólicos modelo, nomeadamente, o ácido clorogénico (ACL), ferúlico (AFR), cumárico (ACM) e cafeico (ACF). Da literatura consultada, diversos grupos de investigação [23, 24] têm utilizado, com bastante sucesso, o tampão borato para separação de compostos antioxidantes por CE, tendo sido igualmente esta a opção tomada como electrólito. A separação de polifenóis por CE com tampão borato, baseia-se na complexação específica entre o ião borato e os analitos que contêm grupos hidroxilo, resultando num complexo de borato carregado negativamente. O tampão borato, sob condições básicas, no qual os polifenóis se encontram carregados negativamente, pode afectar a separação quer pela razão massa/carga dos polifenóis desprotonados quer através da associação borato-fenol [16, 17]. No presente trabalho, variou-se a concentração em tampão borato para valores compreendidos entre 5 e 25 mM, tendo a última concentração (pH 9,2) apresentado melhores resultados relativamente à estabilidade da corrente, assim como o compromisso satisfatório para a resolução dos analitos em tempo de analítico adequado.

Uma vez o tempo de migração dos compostos em CE poder variar consideravelmente com a composição da matriz, é necessário otimizar outros parâmetros para uma identificação inequívoca dos compostos sob estudo, nomeadamente, a obtenção dos respectivos espectros de UV/vis. Neste sentido, durante o desenvolvimento do presente método, utilizou-se água ultra-pura isenta de compostos interferentes, o que permite usar com relativa segurança, o tempo de migração como parâmetro para identificação dos compostos. Assim, analisaram-se soluções padrão individuais de cada analito por forma a se obter os respectivos espectros UV/vis e os tempos de migração correspondentes. A análise por CE-DAD foi efectuada de acordo com as condições instrumentais referidas no procedimento experimental e com base nos espectros obtidos, foram seleccionados comprimentos de onda com valores de 214, 280 e 320 nm característicos da absorvância máxima verificada para os mesmos. Após a identificação dos diferentes analitos e obtenção dos respectivos espectros de UV/vis (anexo I), preparou-se uma solução mistura com os quatro compostos em estudo

contendo padrão interno (IS), previamente seleccionado. A escolha do IS deve ter em conta determinadas características, nomeadamente estrutura similar aos restantes analitos, elevada sensibilidade, fácil manipulação, baixa toxicidade e ausência endógena na amostra. Tendo em conta estas particularidades, o ácido 3-hidroxibenzóico foi seleccionado como padrão interno, uma vez ter já sido indicado na literatura para quantificação do ácido salicílico em plantas [25].

Resultados preliminares, mostraram que os electroforegramas relativos à solução mistura, apresentavam uma sobreposição parcial do AFR com o IS. No sentido de separar estes compostos, testaram-se diferentes voltagens (10, 15, 20, 25 kV), uma vez a voltagem aplicada influenciar o EOF e consequentemente a separação e o tempo de análise. As melhores condições de separação em tempo analítico aceitável (< 9 minutos) obtiveram-se recorrendo a um gradiente de diferença de potencial, como descrito no procedimento experimental.

A figura 3.1 exemplifica um electroforegrama obtido por CE-DAD relativo à mistura dos quatro ácidos fenólicos e do IS, nas condições experimentais optimizadas.

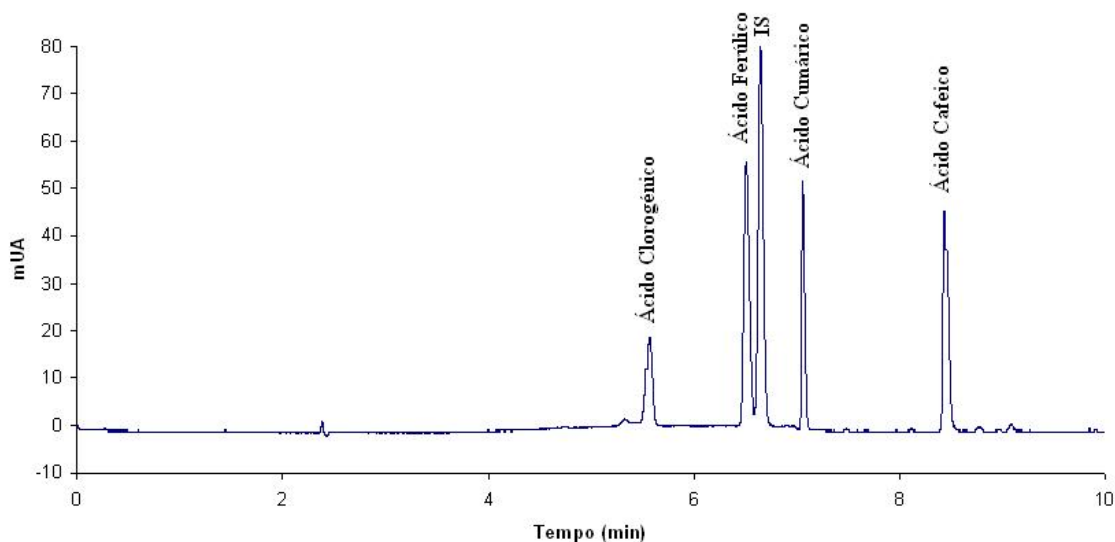


Figura 3.1 – Electroforegrama obtido por CE-DAD relativo à mistura dos quatro ácidos fenólicos em estudo e do IS, em condições experimentais optimizadas.

Para determinar a precisão instrumental, uma solução mistura contendo os quatro compostos fenólicos com concentração de 100,0 mg/L foi analisada por CE-DAD seis vezes consecutivas. A precisão foi verificada a partir do desvio padrão

relativo (RSD), evidenciando valores abaixo de 6,5%. É de salientar, que de acordo com os requerimentos da Directiva 98/83/EC para os compostos orgânicos, uma metodologia proposta é considerada aceitável se o RSD for abaixo de 25% [European Commission, Council Directive 98/93/EC, Off. J. Eur. Commun. L330 (1998) 32]. O uso da metodologia do IS aumenta a precisão, sendo fundamental para a reprodutibilidade das análises por CE de modo a compensar os erros de injeção, as flutuações no tempo de migração assim como as recuperações, particularmente em matrizes complexas [21].

Os LODs e LOQs instrumentais foram determinados com recurso a sucessivas diluições de uma solução padrão da mistura dos analitos com concentração de 100 mg/L, até se obter uma razão sinal/ruído de 3 e 10, respectivamente. Por fim, estabeleceu-se a linearidade instrumental, usando soluções padrão com cinco níveis de concentração compreendidos entre 20,0 e 100,0 mg/L e analisados em triplicado. Por aplicação do método dos mínimos quadrados aos dados obtidos, evidenciou-se uma excelente gama dinâmica de linearidade para todos os analitos na gama de trabalho estudada, apresentando valores com coeficientes de correlação compreendidos entre 0,9956 e 0,9968. A tabela 3.1 resume os dados relativos à calibração instrumental obtidos por CE-DAD para os quatro compostos nas condições experimentais utilizadas.

Tabela 3.1 – Tempo de migração (t_m), limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ), gama linear e coeficientes de correlação obtidos por CE-DAD.

Compostos	t_m (min)	LOD (mg/L)	LOQ (mg/L)	Gama Linear (mg/L)	r^2
ACL	5,6	6,0	19,8	20,0 – 100,0	0,9968
AFR	6,5	6,0	19,8	20,0 – 100,0	0,9956
ACM	7,1	3,0	10,0	20,0 – 100,0	0,9967
ACF	8,4	3,0	10,0	20,0 – 100,0	0,9962

3.2. Selecção do adsorvente para BA μ E

Depois de estabelecidos os parâmetros instrumentais, seguiu-se a selecção da fase extractiva adequada aos compostos em estudo. De entre os vários materiais estudados, nomeadamente, carvão activado comercial, polidivenilbenzeno, PDMS, entre outros, para a extracção dos compostos fenólicos, a fase que demonstrou eficiência de extracção foi o adsorvente comercial (Oásis[®] MAX Sorbent) com propriedades de troca aniónica e fase reversa. De acordo com o fabricante [26], este material foi optimizado para alcançar maior selectividade e sensibilidade na extracção de compostos ácidos por permuta dos grupos aniónicos. A figura 3.2 ilustra uma fracção da estrutura molecular do adsorvente e respectivo mecanismo de adsorção.

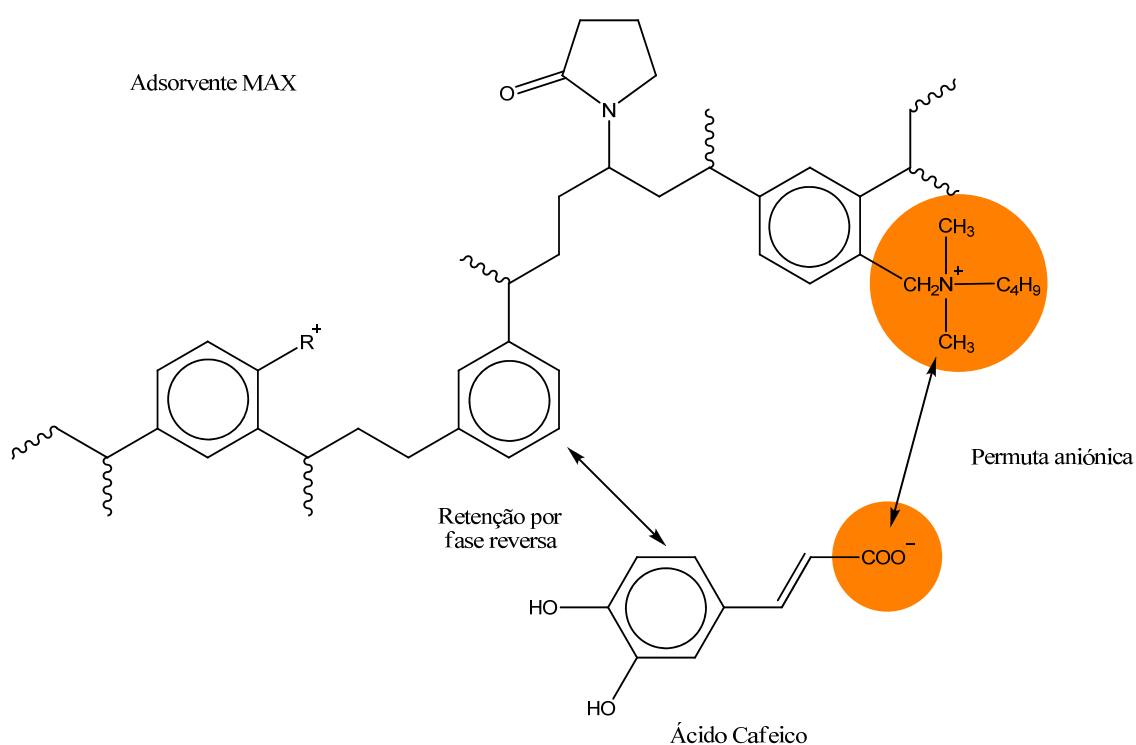


Figura 3.2 – Interações de um ácido fenólico com o adsorvente seleccionado (adaptado de [26]).

Após a fase extractiva escolhida, deu-se início à optimização da metodologia proposta para a análise dos quatro ácidos fenólicos em estudo em matrizes aquosas.

3.3. Optimização do processo de BA μ E(MAX)-LD

Tendo em conta que a metodologia proposta se baseou na técnica de BA μ E, foram estudados os parâmetros, que de acordo com SBSE, podem influenciar a eficiência deste tipo de técnicas, tanto a nível da extracção como da retro-extracção dos analitos. Assim sendo, foram realizados estudos sistemáticos de diversos parâmetros de modo a otimizar o método em desenvolvimento.

3.3.1. Optimização da retro-extracção (LD)

Os parâmetros tidos em conta na optimização do passo da dessorção líquida (LD) foram o efeito da evaporação, tipo de solvente usado, o tempo para retro-extracção e o efeito de memória ou “carry-over”.

3.3.1.1. Efeito da evaporação

Durante o processo de evaporação à secura de 500 μ L de solvente de retro-extracção e subsequente re-dissolução em solvente adequado à injeção em CE-DAD pode originar perdas de analitos, principalmente dos compostos mais voláteis. Apesar dos analitos em estudos não serem considerados voláteis, realizou-se o estudo em triplicado usando soluções mistura dos analitos com três níveis de concentração (50, 100 e 150 mg/L), conforme descrito no procedimento experimental.

Da análise por CE-DAD, verificou-se a ausência de perdas dos analitos em estudo nos três níveis de concentração estudados, e assim sendo este não é um passo limitativo na preparação das amostras. Por conseguinte, este procedimento foi usado em todas as experiências seguintes.

3.3.1.2. Efeito do tipo de solvente

A escolha do solvente adequado para a retro-extracção é de extrema importância, dado que este deve ter a capacidade de quebrar as interacções entre os

analitos e a fase extractiva, sem danificar a mesma, permitindo a transferência quantitativa dos analitos para o meio orgânico [27 - 29]. Uma retro-extracção ineficiente pode originar efeito de memória, também denominado por “carry-over”, parâmetro que será estudado mais adiante.

O processo de retro-extracção foi acelerado recorrendo a tratamento ultrasónico durante 30 minutos, no qual se utilizaram 500 μL de solvente de modo a que a barra de extracção ficasse totalmente submersa. Testaram-se cinco tipos de solventes, nomeadamente, MeOH, ACN, mistura de MeOH/ACN 50% (v/v) e mistura de MeOH com ácido fórmico (2 e 10%). Como se pode verificar através da figura 3.3 os solventes que apresentaram uma maior eficiência foram as misturas de MeOH com ácido fórmico, tendo a que continha 2%, apresentado valores de recuperação ligeiramente superiores que a de 10%. Estes resultados eram de esperar visto ser o solvente aconselhado pelo fabricante [26] para a recuperação dos compostos retidos na fase extractiva usada.

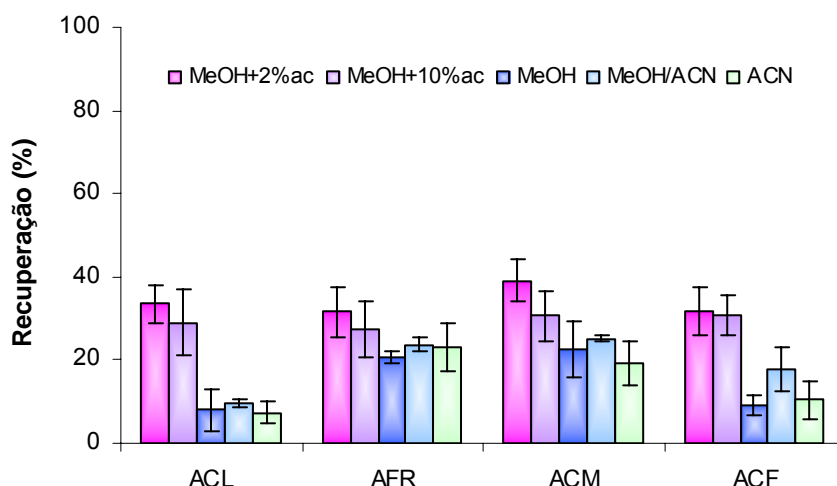


Figura 3.3 – Efeito do solvente de retro-extracção na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção (750 rpm) e 30 min de retro-extracção), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

3.3.1.3. Efeito do tempo

Tal como referido anteriormente, a retro-extracção implica a transferência quantitativa dos analitos da fase extractiva para o solvente orgânico, pelo que o tempo de actuação deve de ser suficiente por forma a permitir uma completa transferência dos

analitos, evitando assim fenómenos de “carry-over”. Estudou-se o efeito da dessorção ao fim de 15, 30 e 45 minutos sob tratamento ultrasónico.

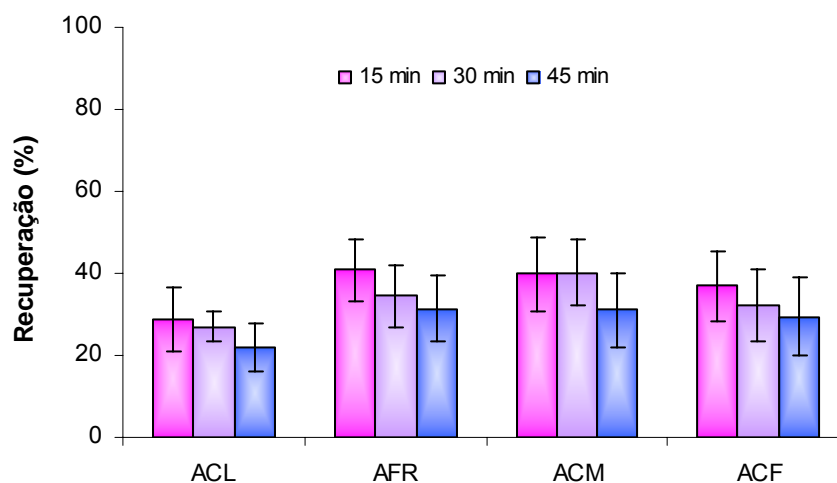


Figura 3.4 – Efeito do tempo de retro-extracção na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção a 750 rpm), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

Por observação da figura 3.4 verificou-se que para o ACM entre os 15 e 30 min não existe uma diferença significativa, só ao fim de 45 min é que há um decréscimo na recuperação deste analito. No caso do ACL, AFR e ACF, a eficiência da dessorção diminui ao longo do tempo. Consequentemente, o tempo seleccionado para prosseguir os estudos foi de 15 min.

3.3.1.4. Efeito do “carry-over”

Conforme referido na secção anterior, os efeitos de memória podem dever-se à escolha de um solvente de retro-extracção inadequado e/ou a um tempo de dessorção insuficiente. Para verificar que o solvente e o tempo de retro-extracção seleccionados permitem uma dessorção completa dos analitos, efectuou-se uma segunda retro-extracção. Esta consistiu em colocar a barra de extracção, após a primeira retro-extracção, num novo vial, adicionar 500 μ L do solvente de retro-extracção (MeOH + 2% ácido fórmico) e submeter durante mais 15 min num banho de ultrasons. Da análise por CE-DAD desta segunda retro-extracção não se observaram sinais dos analitos em

estudo, por outras palavras, os sinais obtidos encontravam-se abaixo dos LODs instrumentais. Assim sendo, o solvente e tempo de retro-extracção determinados anteriormente revelaram-se adequados para uma dessorção eficaz.

3.3.2. Optimização da BA μ E(MAX)

Uma vez optimizados os parâmetros relativos à retro-extracção, prosseguiu-se com a optimização dos principais parâmetros do processo de micro-extracção, nomeadamente, velocidade de agitação, tempo de extracção, pH da matriz, modificador orgânico e força iónica.

3.3.2.1. Efeito da velocidade de agitação

A velocidade de agitação promove a transferência de massa dos analitos presentes na matriz para a fase extractiva da barra. De acordo com a literatura [21, 27], em metodologias como a SPME ou a SBSE, o aumento da velocidade de agitação pode ser favorável, diminuindo o tempo necessário à extracção, podendo no entanto em certos casos ser prejudicial, levando a uma diminuição da precisão do método. Para averiguar o efeito da velocidade de agitação na presente metodologia, testaram-se as velocidades de 750, 1000 e 1250 rpm durante 3 h. Não se testaram velocidades acima das 1250 rpm visto que mesmo a esta velocidade foi difícil manter as barras de extracção numa estabilidade uniforme. Analisando a figura 3.5, verificou-se que à excepção do ACF para o qual a velocidade de agitação não influencia a sua recuperação, os restantes três analitos apresentam melhores eficiências para velocidades de 1000 rpm, tendo sido usada nos ensaios seguintes.

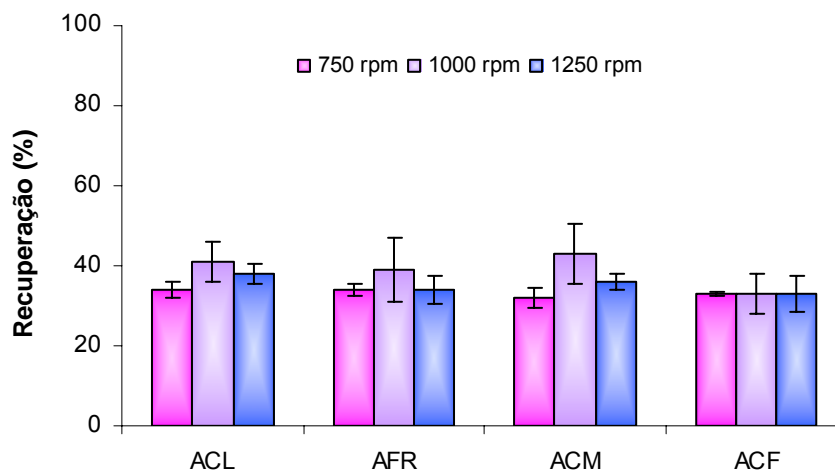


Figura 3.5 – Efeito da velocidade de agitação na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h extracção e 15 min de retro-extracção com MeOH + 2% ác. fórmico), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

3.3.2.2. Efeito do tempo de extracção

Um parâmetro de enorme importância na optimização da metodologia é o tempo de equilíbrio necessário para que cada analito seja extraído da matriz aquosa para a fase extractiva. O tempo de extracção, assim como a velocidade de agitação estão directamente relacionados com o coeficiente de difusão dos compostos. Esta propriedade dos compostos afecta a velocidade de transferência entre as fases, uma vez os compostos que apresentam coeficientes de difusão reduzidos necessitam de maior tempo para atingir o equilíbrio. Os resultados obtidos apresentam-se na figura 3.6, onde é possível verificar que a recuperação dos analitos em estudo é mais eficiente ao fim de 3 h, à excepção do ACF para o qual o equilíbrio se estabelece mais rapidamente, mostrando uma recuperação mais elevada ao fim de 1 h e mantendo-se praticamente constante até 3 h de extracção. No caso do ACL há um aumento progressivo até 3 h de extracção a partir do qual começa a diminuir. Para o AFR e ACM aparenta uma recuperação constante até 2 h de extracção, aumentando substancialmente ao fim de 3 h, porém para períodos superiores ocorre uma queda acentuada da eficiência. Embora no caso do ACF ser necessária somente 1 h, foi seleccionado um tempo de 3 h de extracção para ensaios posteriores, uma vez haver um compromisso multi-resíduo para os compostos em estudo.

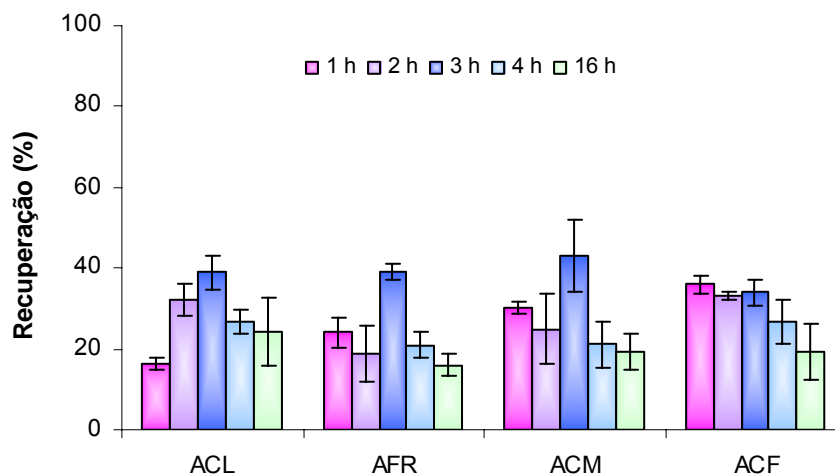


Figura 3.6 – Efeito do tempo de extração na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (1000 rpm e 15 min de retro-extração com MeOH + 2% ác. fórmico), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

3.3.2.3. Efeito do pH da matriz

O controlo do pH da matriz é de extrema importância na recuperação dos compostos em estudo, uma vez condicionar a ionização dos mesmos. Neste sentido, foram testados valores de pH de 2, 4, 6, 7, 8, 10 e 12 por forma a ajustar a concentração hidrogeniónica da matriz da amostra que favoreça a extração. Os resultados obtidos encontram-se reproduzidos na figura 3.7, podendo-se verificar que o valor de pH 6 é o que apresenta melhores recuperações para os quatro ácidos. Outros valores de pH promovem diminuição da recuperação, sendo mais acentuado para valores mais básicos.

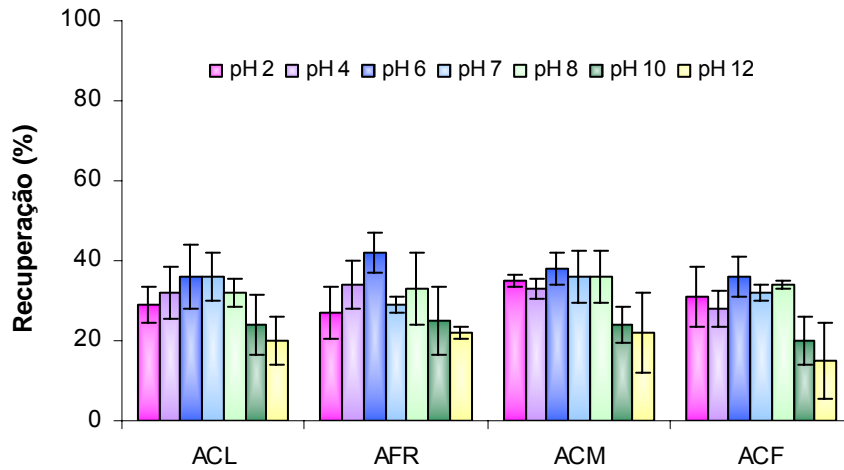


Figura 3.7 – Efeito do pH na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h de extracção a 1000 rpm e 15 min de retro-extracção com MeOH + 2% ác. fórmico), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

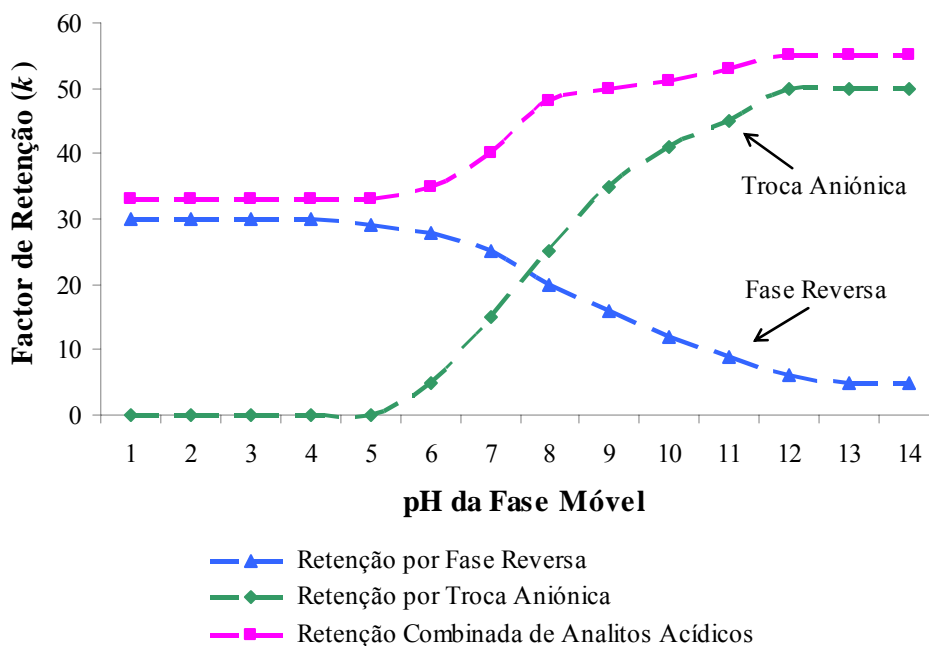


Figura 3.8 – Gráfico da capacidade de retenção do adsorvente para analitos ácidos (adaptado de [26]).

A figura 3.8 ilustra a capacidade de retenção dos analitos ácidos no adsorvente em função do pH da matriz. Por observação do gráfico verifica-se que para valores de pH elevados, a retenção é fundamentalmente condicionada pelo mecanismo de permuta

aniônica, no entanto, ainda contém uma ligeira contribuição da fase reversa na retenção dos analitos. No entanto, para valores de pH mais baixos, o mecanismo de permuta aniônica deixa de contribuir na retenção, uma vez que os analitos se encontram na sua forma neutra, embora a retenção por fase reversa se encontre na sua capacidade máxima. A partir dos dados referidos, seria de esperar que valores de pH elevado obtivesse melhores recuperações. Este facto não foi verificado, provavelmente devido à ionização dos analitos em estudo. Segundo os resultados obtidos a partir do programa SPARC “on-line” [30], os analitos em estudo contém duas constantes de acidez, à excepção do ACL e ACF que contém três constantes de acidez, o qual se encontram na tabela 3.2.

Tabela 3.2 – Valores de pKa dos ácidos fenólicos em estudo obtidos com recurso ao programa SPARC “on-line”.

Compostos	pKa
ACL	3,24 / 7,73 / 12,76
AFR	4,42 / 8,79
ACM	4,32 / 8,81
ACF	4,40 / 8,26 / 13,16

Confrontando os valores de pKa dos analitos com os dados da figura 3.8 verifica-se que acima de pH 9 os analitos se encontram maioritariamente na sua segunda forma de ionização, ou seja, os grupos OH dos analitos encontram-se na sua forma ionizada, aumentando assim a solubilidade dos analitos e consequentemente baixando a eficiência de recuperação. No anexo II, encontram-se os resultados obtidos pelo programa SPARC.

3.3.2.4. Efeito do modificador orgânico

Um fenómeno que por vezes ocorre neste tipo de metodologia é a adsorção dos analitos ao vidro dos frascos de amostragem, o que origina uma diminuição na

eficiência extractiva [31,32]. Para minimizar este fenómeno é comum adicionar MeOH à matriz aquosa como modificador orgânico do meio, por forma a aumentar a solubilidade dos analitos na matriz, evitando assim eventuais fenómenos adsorção. No entanto, a adição de MeOH deve ser controlada, uma vez que grandes quantidades podem aumentar de tal forma a afinidade dos analitos para a matriz, que tornem inviável a recuperação pela barra extractiva. Os ensaios foram realizados por a adição de 5, 10 e 15% de MeOH (v/v) nas amostras de água fortificada com a mistura dos quatro padrões. Na figura 3.9 encontra-se a representação gráfica dos resultados obtidos, onde se verifica que o aumento gradual de MeOH à matriz produz uma redução nas recuperações dos analitos, embora para o ACF essa redução não seja tão acentuada como para os restantes analitos em estudo. Estes resultados demonstram que a adição de MeOH aumenta a afinidade dos analitos para a matriz, dificultando assim a sua transferência para a barra. Por conseguinte, a adição do modificador orgânico foi desprezado nos estudos seguintes.

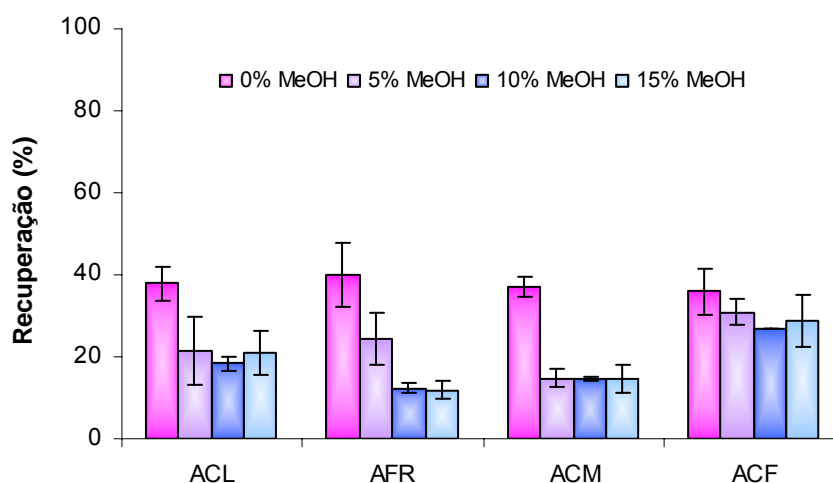


Figura 3.9 – Efeito do modificador orgânico (MeOH) na recuperação dos ácidos fenólicos estudados (3 h de extracção a 1000 rpm e 15 min de retro-extracção com MeOH + 2% ác. fórmico), obtido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

3.3.2.5. Efeito da força iónica

Segundo a literatura [21, 27], a força iónica na matriz aquosa é outro factor que pode ter grande influência na eficiência extractiva deste tipo de metodologias analíticas.

O efeito da força iónica pode aumentar ou diminuir a eficiência da extracção, dependendo do tipo de compostos e do tipo de fase extractiva usada. No presente trabalho, este efeito foi estudado por adição de 5, 10 e 15% de NaCl (m/v) à matriz. Os ácidos fenólicos em estudo são compostos ligeiramente polares, por isso seria de esperar que a adição de um electrólito como o NaCl, diminuísse a solubilidade dos compostos na matriz, favorecendo a sua extracção pela barra. No entanto, a adição de NaCl teve exactamente o efeito contrário, anulando totalmente a extracção dos analitos. Tendo em conta que a fase extractiva usada consistiu numa resina de troca iónica, é provável que os iões do sal tenham ficado retidos no polímero impedindo a ligação dos ácidos fenólicos à mesma. Inclusivamente, após a extracção, a barra apresentava-se coberta por uma camada de sal. Conclui-se então que para esta metodologia, a adição de NaCl é claramente prejudicial ao processo de extracção.

Concluída a optimização dos parâmetros sob estudo nesta metodologia, obtiveram-se as melhores condições para a extracção e retro-extracção dos analitos em estudo. As condições optimizadas encontram-se resumidas na tabela 3.3, sendo essas as condições utilizadas nos estudos posteriores. As recuperações obtidas, nas condições experimentais optimizadas, para os quatro compostos fenólicos encontram-se na tabela 3.4, verificando-se valores médios compreendidos entre 35 e 40%.

Tabela 3.3 – Resumo das condições optimizadas para o método desenvolvido por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

Condições experimentais optimizadas	
Tempo de extracção (h)	3
Velocidade de agitação (rpm)	1000
pH da matriz	6
% MeOH	-
% NaCl	-
Tempo para retro-extracção (min)	15
Solvente para retro-extracção	MeOH com 2% ácido fórmico

Tabela 3.4 – Recuperações médias dos analitos nas condições optimizadas obtidas por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

Compostos	Recuperação (%)
ACL	37,0 \pm 5,6
AFR	39,0 \pm 6,0
ACM	40,0 \pm 6,2
ACF	35,0 \pm 5,6

3.4. Validação do método BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

Após efectuada a optimização experimental, prosseguiu-se com a validação da metodologia proposta, estudando os limites analíticos, gama dinâmica de trabalho, e precisão associada. A precisão do método foi avaliada através do RSD, evidenciando valores inferiores a 15%. Conforme referido anteriormente e de acordo com os requerimentos da Directiva 98/83/EC para os compostos orgânicos, uma metodologia proposta é considerada aceitável sempre que o RSD se encontre abaixo de 25% [European Commission, Council Directive 98/93/EC, Off. J. Eur. Commun. L330 (1998) 32].

Os limites analíticos do actual método para os quatro analitos foram verificados com recurso de LODs e LOQs e encontram-se representados na tabela 3.5.

Tabela 3.5 – LODs e LOQs para os analitos em estudo obtidos na validação do método BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD.

Compostos	LOD (μ g/L)	LOQ (μ g/L)
ACL	29,9	99,7
AFR	81,8	272,5
ACM	39,8	132,6
ACF	18,4	61,2

As curvas de calibração, representadas na figura 3.10, relacionam a razão (A_i/A_{IS}) da área normalizada do pico de cada analito (A_i) e a do padrão interno (A_{IS}) com a concentração do respectivo analito (i ; mg/L)

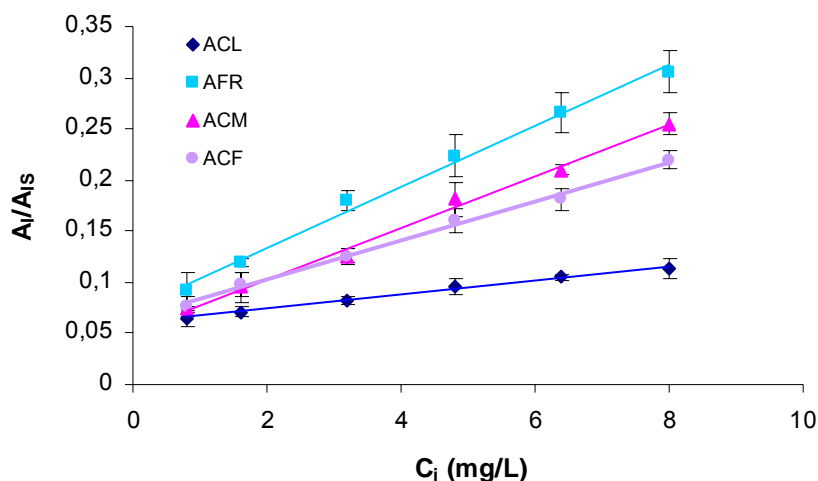


Figura 3.10 – Curvas de calibração do ACL, AFR, ACM e ACF obtidas por SAM.

A linearidade da gama dinâmica de trabalho foi avaliada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo as regressões lineares sido aplicadas no intervalo de concentrações compreendidas entre 0,8 e 8,0 mg/L (envolvendo seis níveis de concentrações, cada uma analisada em triplicado), usando o ácido 3-hidroxibenzoico como IS. As curvas de regressão linear no intervalo de concentrações estudado, bem como os respectivos coeficientes de correlação, que apresentam valores superiores a 0,9929, são apresentados na tabela 3.6.

Tabela 3.6 – Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.

Compostos	Gama linear (mg/L)	a	B	r^2
ACL	0,8 – 8,0	0,0069	0,0600	0,9944
AFR	0,8 – 8,0	0,0297	0,0748	0,9929
ACM	0,8 – 8,0	0,0251	0,0530	0,9941
ACF	0,8 – 8,0	0,0192	0,0642	0,9951

3.5. Amostras reais

No sentido de demonstrar a aplicação prática da presente metodologia, análises a matrizes reais, incluindo chá, mel e sumo, foram realizadas sob as condições experimentais optimizadas. A escolha destas três matrizes deve-se ao facto de serem referenciadas como potenciais fontes de compostos fenólicos [33 - 38]. Para determinar a concentração dos ácidos fenólicos em estudo nas amostras analisadas, recorreu-se ao SAM, por forma a controlar os efeitos de matriz bem como eventuais contaminações intrínsecas. Recorrendo ao método desenvolvido, quatro níveis de fortificação (1,6, 3,2, 4,8 e 6,4 mg/L) foram aplicados às diferentes matrizes, realizando-se também o ensaio em branco, ou seja, a não fortificação da amostra.

3.5.1. Amostra de chá verde

O chá para além dos atraentes aromas e sabores específicos tem-lhe sido atribuídos efeitos benéficos para a saúde, tornando-se assim uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo. Existem diversos estudos que relacionam o consumo de chá com uma redução do risco de doenças cardiovasculares, níveis elevados de colesterol, diabetes, artrite, entre outros. Estes efeitos benéficos têm sido atribuídos às propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos presentes no chá [33,34].

A infusão obtida através das folhas, flores e raízes da planta *Camélia sinensis* origina o chá, que é tradicionalmente classificado em quatro grupos principais, nomeadamente, chá branco, chá verde, “oolong” e chá preto, consoante o seu grau de oxidação. O chá verde, em particular, caracteriza-se por ser submetido a uma oxidação mínima e apresentar um teor muito reduzido de cafeína, sendo as suas propriedades medicinais conhecidas há vários milénios. É também a esse factor que se deve o recente aumento de procura deste chá, consequência ainda do aumento de investigação científica que se tem verificado nas últimas décadas [33,34].

A partir dos resultados obtidos pelas análises da matriz de chá, construíram-se as curvas de regressão correspondentes para cada analito. Conforme se verifica na figura 3.11, obteve-se boa linearidade com coeficientes de correlação superiores a 0,9840. Os valores de concentração determinados por SAM assim como os parâmetros de

linearização obtidos através do método dos mínimos quadrados, são apresentados na tabela 3.7.

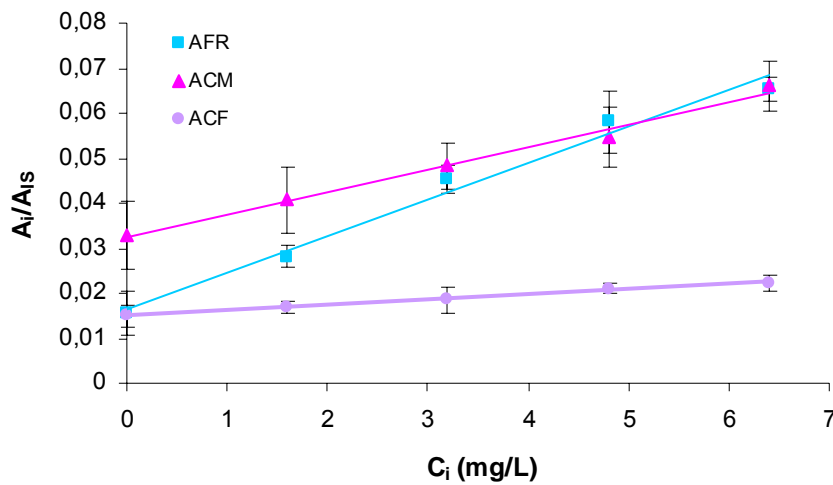


Figura 3.11 – Curvas de regressão do AFR, ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de chá verde.

Tabela 3.7 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de chá verde.

Compostos	<i>a</i>	<i>b</i>	<i>r</i> ²	<i>c</i> (mg/L)
AFR	0,0081	0,0166	0,9840	2,0
ACM	0,0050	0,0325	0,9899	6,5
ACF	0,0012	0,0150	0,9910	12,5

Os ensaios realizados para a matriz de chá verde, revelaram a existência de AFR, ACM e ACF com as concentrações de 2,0, 6,5 e 12,5 mg/L, respectivamente. Não é simples comparar os resultados obtidos com os publicados por outros autores [33], uma vez a constituição do chá depender da origem do mesmo e até do modo de preparação.

A figura 3.12 apresenta electroforegramas relativos à amostra de chá verde.

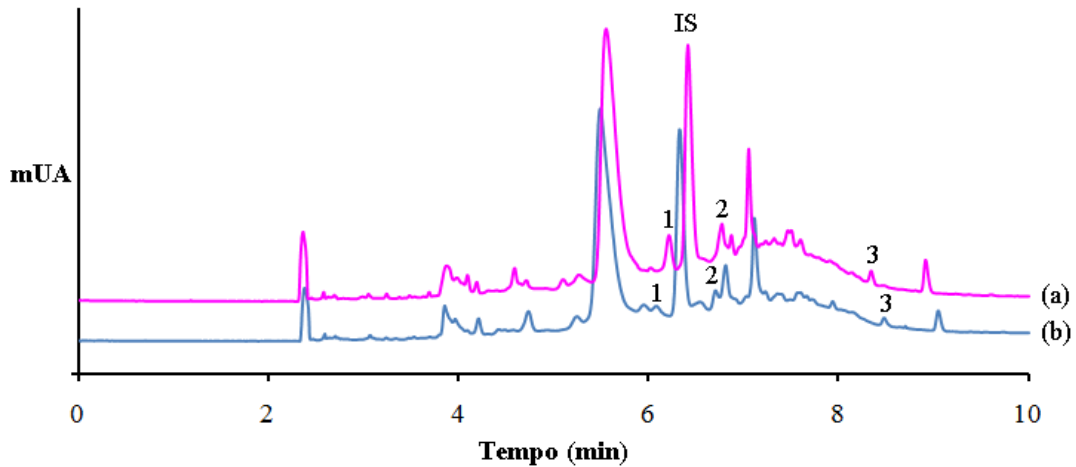


Figura 3.12 – Electroforegramas relativos a uma amostra de chá verde, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD. 1 – AFR, 2 – ACM, 3 – ACF.

3.5.2. Amostra de mel

O mel é constituído essencialmente por açúcar e água, possuindo ainda diversos tipos de compostos fenólicos, muitos dos quais conhecidos por apresentarem propriedades antioxidantes. A composição do mel é bastante variável e depende principalmente da origem floral, mas também de diversos factores externos, como a sazonalidade, factores ambientais e de processamento. Diversas pesquisas têm demonstrado a importância do mel para a saúde, devido em particular aos compostos fenólicos presentes na sua constituição [35 - 38].

As curvas de regressão obtidas para a matriz de mel (figura 3.13) demonstram óptima linearidade. Os valores obtidos por aplicação do método dos mínimos quadrados e as concentrações encontradas na amostra de mel estão apresentados na tabela 3.8.

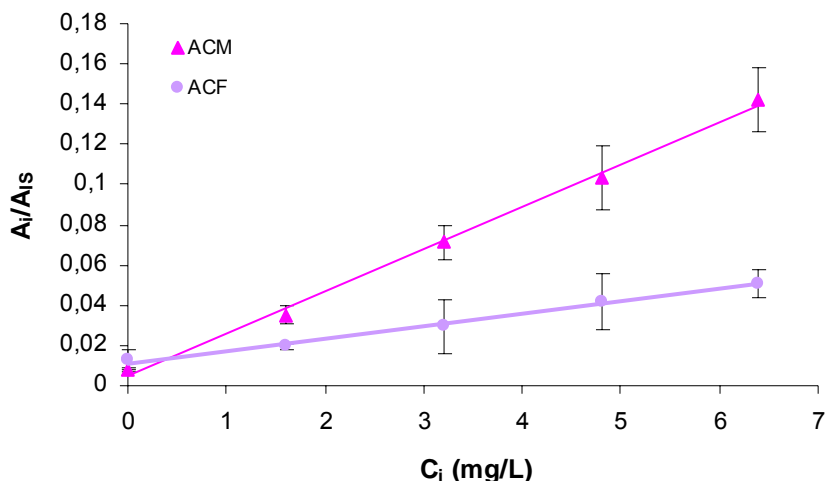


Figura 3.13 – Curvas de regressão do ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de mel.

Tabela 3.8 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de mel.

Analitos	<i>A</i>	<i>b</i>	r^2	<i>c</i> (mg/L)
ACM	0,0209	0,0050	0,9968	0,2
ACF	0,0061	0,0113	0,9912	1,9

A figura 3.14 apresenta electroforegramas da matriz de mel, no qual foi possível identificar o ACM e o ACF, com concentrações de 0,2 mg/L e 1,9 mg/L, respectivamente, determinadas por aplicação do SAM.

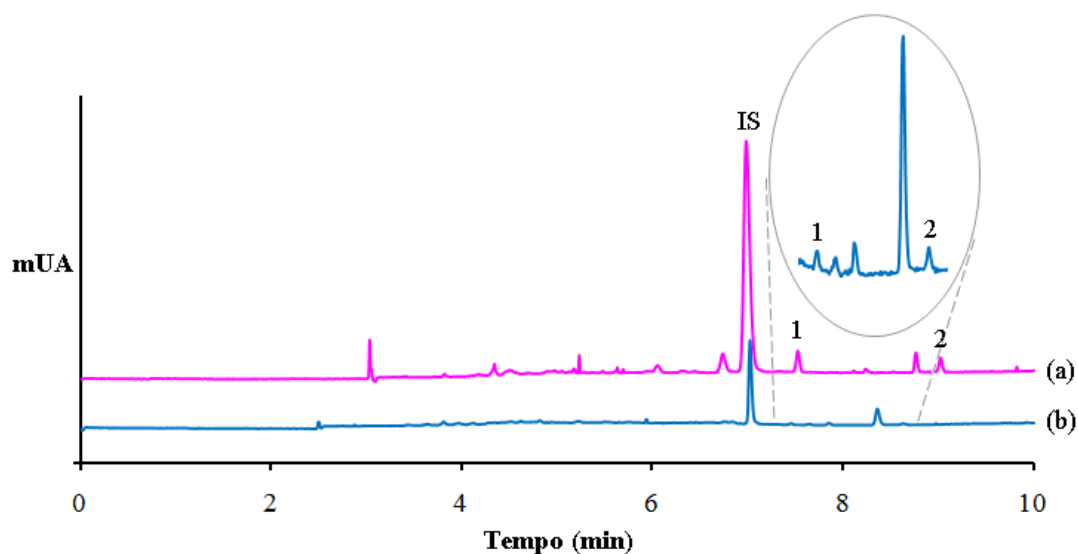


Figura 3.14 – Electroforegramas relativos a uma amostra de mel, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD. 1 – ACM, 2 – ACF.

3.5.3. Amostra de sumo de frutos vermelhos

Os compostos fenólicos surgem em diferentes tipos de frutas e legumes, tendo-se verificado que os frutos vermelhos possuem actividade antioxidante devido à grande predominância de compostos fenólicos na sua constituição [3].

O método apresentou óptima linearidade para a matriz de sumo, como se verifica pelas curvas de calibração obtidas e representadas na figura 3.15. Os valores de concentração determinados pelo SAM bem como os parâmetros de linearização obtidos através do método dos mínimos quadrados, encontram-se na tabela 3.9.

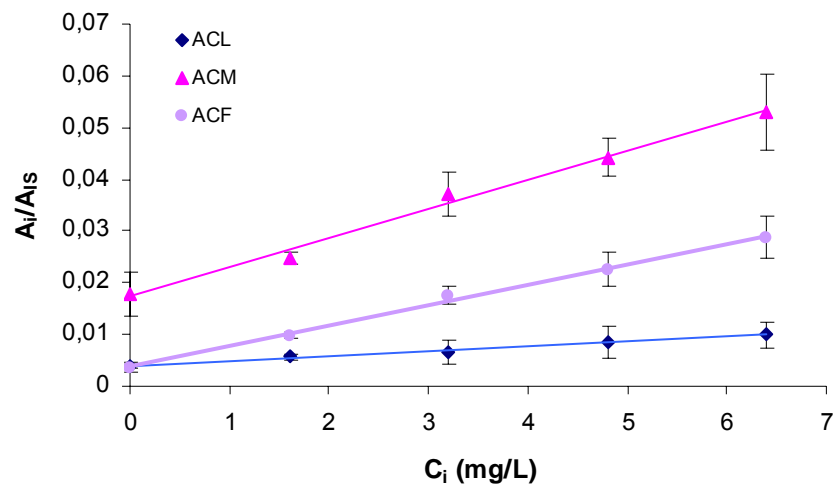


Figura 3.15 – Curvas de regressão do ACL, ACM e ACF obtidas por SAM para a amostra de sumo de frutos vermelhos.

Tabela 3.9 – Parâmetros relativos às curvas de regressão obtidas por SAM para a amostra de sumo de frutos vermelhos.

Analitos	a	b	r^2	c (mg/L)
ACL	0,0009	0,0040	0,9952	4,4
ACM	0,0056	0,0174	0,9937	3,1
ACF	0,0039	0,0039	0,9966	1,0

Os estudos realizados, mostraram a presença do ACL, ACM e ACF na matriz de sumo, como é possível verificar nos electroforegramas apresentados na figura 3.16. As concentrações determinadas foram de 4,4, 3,1 e 1,0 mg/L, repectivamente.

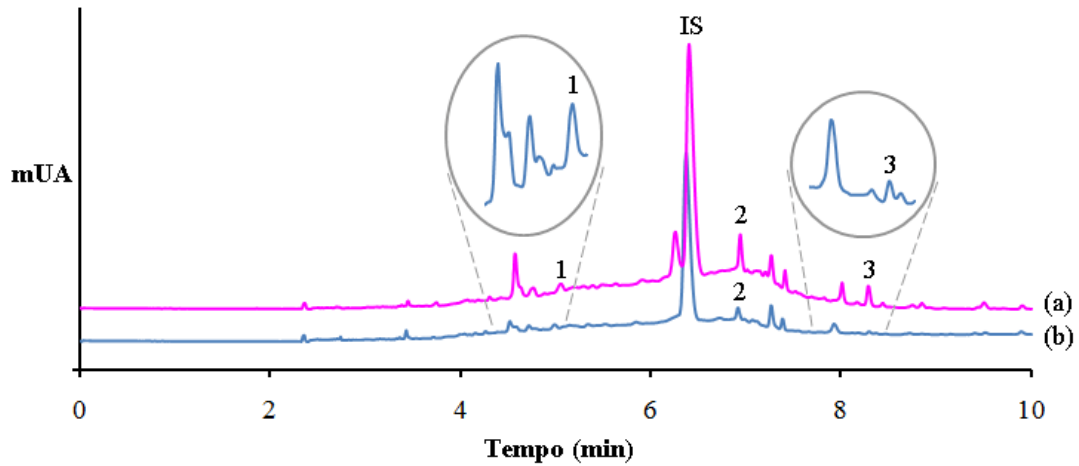


Figura 3.16 – Electroforegramas relativos a uma amostra de sumo de frutos vermelhos, fortificada (a) e sem fortificação (b), obtidos por BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD. 1 – ACL, 2 – ACM, 3 – ACF.

4. Conclusões

No presente trabalho propõe-se uma nova metodologia (BA μ E-LD/CE-DAD), simples e adequada à separação e determinação de quatro ácidos fenólicos (ACL, AFR, ACM e ACF) em amostras de produtos alimentares.

Para a preparação das amostras desenvolveu-se uma nova metodologia à qual é possível aplicar diferentes tipos de materiais adsorventes. Dos materiais testados, aquele que demonstrou maior eficiência na extracção dos ácidos fenólicos seleccionados foi um adsorvente comercial de um derivado de co-polímero de divinilbenzeno com propriedades de troca aniónica e fase reversa (Oásis[®] MAX Sorbent).

A optimização dos parâmetros instrumentais (CE-DAD) demonstrou que o sistema analítico utilizado é apropriado para a análise dos ácidos fenólicos em estudo. Obteve-se uma separação adequada dos analitos num tempo inferior a 9 min, usando uma solução tampão de borato 25 mM (pH 9,2). Com base na razão sinal/ruído de 3:1 e 10:1 determinaram-se respectivamente, os LODs e LOQs para os quatro analitos. Os LODs obtidos foram de 6,0 mg/L para o ACL e AFR, e 3,0 mg/L para o ACM e ACF, enquanto que os LOQs foram de 19,8 mg/L para o ACL e AFR, e 10,0 mg/L para o ACM e ACF. Verificou-se ainda boa precisão (RSD < 6,5%) e excelente linearidade ($r^2 > 0,99$) na gama de trabalho compreendida entre 20,0 e 100,0 mg/L.

A optimização da metodologia desenvolvida para a preparação de amostras, consistiu no estudo de diversos parâmetros que podem afectar a extracção e retro-extracção dos analitos. As condições optimizadas para os ácidos fenólicos estudados foram 3h de extracção (1000 rpm), em meio com pH 6, tendo sido preterida a adição de MeOH e NaCl, e 15 min para retro-extracção em MeOH com ácido fórmico (2%). Verificou-se ainda, a ausência de perdas significativas através do passo de evaporação do solvente e a inexistência de “carry-over”, não sendo por isso mesmo factores limitativos da metodologia desenvolvida.

Após optimização da metodologia, obtiveram-se recuperações compreendidas entre 35 e 40% nas amostras de água ultra-pura fortificada para um nível de 0,8 mg/L.

Finalizada a optimização do método, procedeu-se à respectiva validação, tendo-se verificado um acentuado decréscimo nos limites de detecção para valores compreendidos entre 18,4 e 81,8 μ g/L. A gama de trabalho usada (0,8 - 8,0 mg/L)

demonstrou excelente linearidade para os compostos estudados, com coeficientes de correlação superiores a 0,99 e razoável precisão (RSD < 15%).

A aplicabilidade da metodologia desenvolvida (BA μ E(MAX)-LD/CE-DAD) foi testada em matrizes reais, nomeadamente em amostras de chá verde, mel e sumo de frutos vermelhos. Os estudos efectuados nas matrizes reais fortificadas, com recurso ao método da adição de padrão, permitiram alcançar óptimas linearidades ($r^2 > 0,98$), considerando a complexidade das matrizes envolvidas, possibilitando a identificação e quantificação de alguns dos ácidos fenólicos estudados.

Na amostra de chá verde foi possível identificar o AFR, ACM e ACF com teores de 2,0 mg/L, 6,5 mg/L e 12,5 mg/L, respectivamente. A amostra de mel revelou presença de ACM e ACF com concentrações de 0,2 e 1,9 mg/L, respectivamente. No sumo de frutos vermelhos analisado, observaram-se teores de 4,4 mg/L para o ACL, 3,1 mg/L para o ACM e 1,0 mg/L para o ACF.

Apesar das recuperações obtidas nas condições optimizadas não serem as mais desejadas, tendo em conta a complexidade das amostras estudadas, os resultados obtidos foram satisfatórios. A metodologia desenvolvida apresenta ainda como vantagem fundamental, o facto de se poder aplicar diferentes materiais adsorventes na barra de extracção.

Por comparação com os métodos cromatográficos, a CE é uma excelente alternativa para a análise simultânea de compostos fenólicos, uma vez obterem-se separações rápidas, a eficiência ser muito superior e utilizarem-se quantidades reduzidas de amostras e solventes orgânicos. A possibilidade de hifenção CE-MS, combina as vantagens da elevada eficiência da CE com a selectividade e sensibilidade inerente ao MS, podendo tornar-se um método ainda mais vantajoso.

5. Bibliografia

- [1] R. H. F. Cheung, P. J. Marriott, D. M. Small, "CE methods applied to the analysis of micronutrients in foods", *Electrophoresis*, 28 (2007) 3390 - 3413.
- [2] M. N. Bravo, et al, "Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal", *Analytica Chimica Acta*, 563 (2006) 84 - 92.
- [3] C. H. Degáspari, N. Waszczyński, "Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos", *Visão Académica*, 5:1 (2004) 33 - 40.
- [4] H. Y. Huang, W. C. Lien, C. W. Chiu, "Comparison of microemulsion electrokinetic chromatography and micellar electrokinetic chromatography methods for the analysis of phenolic compounds", *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 973 - 981.
- [5] S. E. Soares, "Ácidos fenólicos como antioxidantes", *Revista de Nutrição*, 15:1 (2002) 71 - 81.
- [6] P. M. Angelo, N. Jorge, "Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão", *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66:1 (2007) 1 - 9.
- [7] M. C. Boyce, "Determination of additives and organic contaminants in food by CE and CEC", *Electrophoresis*, 28 (2007) 4046 - 4062.
- [8] J. Woraratphoka, K-O. Intarapichet, K. Indrapichate, "Phenolic compounds and antioxidative properties of selected wines from northeast of Thailand", *Food Chemistry*, 104 (2007) 1485 - 1490.
- [9] N. R. Neng, "Aplicação de metodologias analíticas emergentes para determinação de α -oxoaldeídos em matrizes biológicas e ambientais", Dissertação de Mestrado em Química Inorgânica Biomédica, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, Lisboa, 2007.
- [10] G. Zgórká, K. Glowniak, "Variation of free phenolic acids in medicinal plants belonging to the *Lamiaceae* family", *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 26 (2001) 79 - 87.
- [11] D. Arráez-Román, et al, "Identification of phenolic compounds in rosemary honey using solid-phase extraction by capillary electrophoresis-electrospray ionization-mass spectrometry", *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 1648 - 1656.
- [12] A. A. Garcia, B. C. Grande, J. S. Gándara, "Development of a rapid method based on solid-phase extraction and liquid chromatography with ultraviolet absorbance detection for the determination of polyphenols in alcohol-free beers", *Journal of Chromatography A*, 1054 (2004) 175 - 180.

- [13] C. Almeida, et al, “Novas Perspectivas na Preparação de Amostras para Análise Cromatográfica”; *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*; 95 (2004) 69 - 77.
- [14] E. Baltussen, et al, “Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples: theory and principles”; *Journal of Microcolumn Separations*; 11:10 (1999) 737 - 747.
- [15] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, “Sorptive Sample Preparation – a review”; *Anal Bioanal Chem*; 373 (2002) 3 - 22.
- [16] F. David, B. Tienpont, P. Sandra, “Stir-bar sorptive extraction of trace organic compounds from aqueous matrices”; *LC-GC Europe*, (2003).
- [17] Patente registada com o n. PPP 2009 1000096389.
- [18] R. J. N. B. Silva, M. F. G. F. C. Camões, “Electroforese Capilar”, *Química*, 56 (1995) 26 - 32.
- [19] H. Engelhardt, W. Beck, T. Schmitt, “Capillary Electrophoresis – Methods and Potentials”, Vieweg, Germany, 1995
- [20] D. A. Skoog, E. J. Holler, S. R. Crouch, “Principles of Instrumental Analysis” 6th edition, Thomson Brooks/Cole, Canada, 2007
- [21] P. M. A. Rosário, “Desenvolvimento e optimização da extracção sorptiva em barra de agitação e análise por cromatografia micelar electrocinética (SBSE-MEKC/DAD) na monitorização de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs) em matrizes ambientais e biológicas”, Dissertação de Mestrado em Química Analítica Aplicada, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica, Lisboa, 2005.
- [22] J. Safra, et al, “Determination of selected antioxidants in *Melissae herba* by isotachopheresis and capillary zone electrophoresis in the column-coupling configuration”, *Journal of Chromatography A*, 1171 (2007) 124 - 132.
- [23] J. Gorbatsova, et al, “Comparison of the contents of various antioxidants of sea buckthorn berries using CE”, *Electrophoresis*, 28 (2007) 4136 - 4142.
- [24] M. Vaheer, M. Koel, “Separation of polyphenolic compounds extracted from plant matrices using capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography A*, 990 (2003) 225 - 230.
- [25] S. M. Eshita, “3-Hydroxybenzoic Acid as an Internal Standard for the High-Pressure Liquid Chromatography Quantitation of Salicylic Acid in Plants”, *Analytical Biochemistry*, 289 (2001) 99 - 102.

- [26] Chromatography Columns, SPE, Supplies and Water Quality Parts® Catalog, Waters Corporation, 2007/2008
- [27] C. V. P. Almeida, “Optimização da extracção sorptiva em barra de agitação e análise por HPLC/DAD na determinação de hormonas esteróides em matrizes ambientais e biológicas”, Dissertação de Mestrado em Química Analítica Aplicada, Universidade de Lisboa, Faculdade de Ciências, Departamento de Química e Bioquímica. Lisboa, 2005.
- [28] P. M. Á. Rosário, J. M. F. Nogueira, “Combining stir bar sorptive extraction and MEKC for the determination of polynuclear aromatic hydrocarbons in environmental and biological matrices”, *Electrophoresis*, 27:23 (2006) 4694 - 4702.
- [29] C. Almeida, J. M. F. Nogueira, “Determination of steroid sex hormones in water and urine matrices by stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with diode array detection”, *J. Pharma.Biomed. Anal.*, 41:4 (2006) 1303 - 1311.
- [30] S. W. Karickhoff, L. A. Carreira, S. H. Hilal – SPARC Performs Automated Reasoning in Chemistry v3.1, United States : University of Georgia, [Consult. 11 Dez. 2008]. Disponível na WWW: <URL:<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>>.
- [31] P. Serôdio, J. M. F. Nogueira, “Considerations on ultra-trace analysis of phthalates in drinking water”, *Water Research*, 40:13 (2006) 2572 - 2582.
- [32] V. Léon, et al, “Analysis of 35 priority semivolatiles in water by stir bar sorptive extraction-thermal desorption-gas chromatography-mass spectrometry: I. Method optimisation”, *Journal of Chromatography A*; 999 (2003) 91 - 101.
- [33] D. Horzic, et al, “The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions”, *Food Chemistry*, 115 (2009) 441 - 448.
- [34] E. Reich, et al, “HPTLC Methods for Identification of Green Tea and Green tea Extract”, *J. Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (2006) 2141 - 2151.
- [35] Y. Liang, et al, “Simultaneous determination of four phenolic components in citrus honey by high performance liquid chromatography using electrochemical detection”, *Food Chemistry*, 114 (2009) 1537 - 1541.
- [36] L. Estevinho, et al, “Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey”, *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2008) 3774 - 3779.
- [37] A. M. Gómez-Caravaca, A. Segura-Carretero, A. Fernández-Gutiérrez, “Problems of quantitative and qualitative estimation of polyphenols in honey by capillary electrophoresis with UV-vis detection”, *AgroFOOD industry hi-tech*, 4 (2006) 68 - 71.

- [38] A. M. Gómez-Caravaca, et al, “Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees”, *J. Pharma. Biomed. Anal.*, 41 (2006) 1220 - 1234.

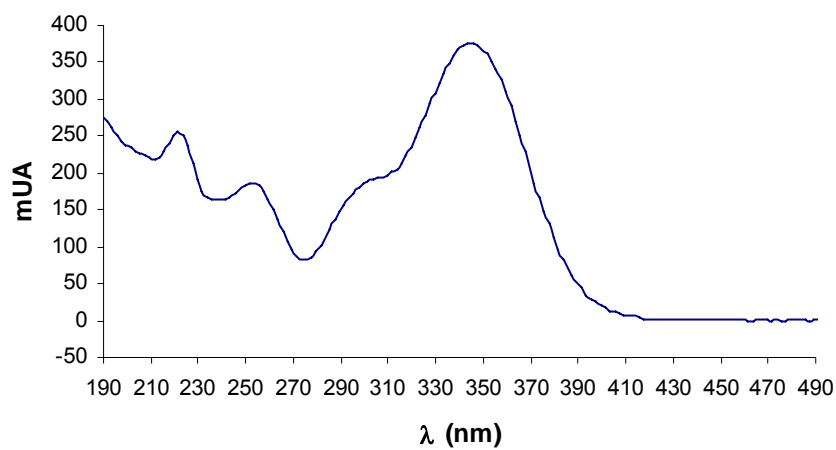
Anexos**I – Espectros de UV/vis**

Figura I - Espectro de UV/vis do ácido clorogénico.

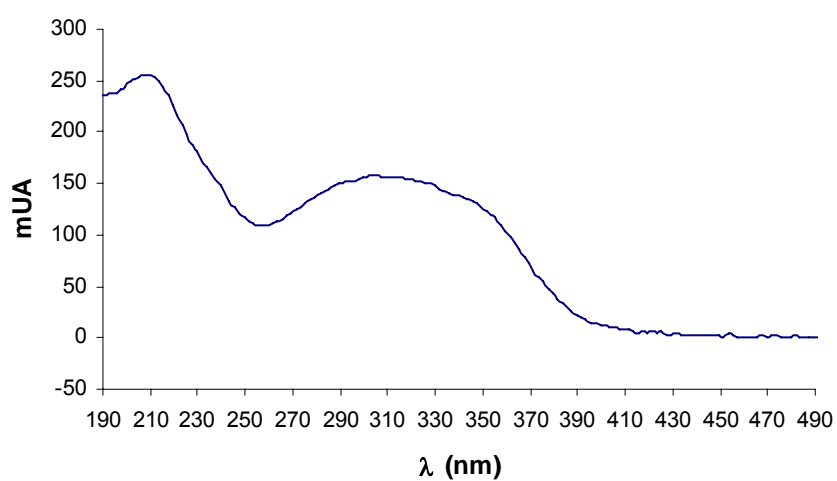


Figura II - Espectro de UV/vis do ácido ferúlico.

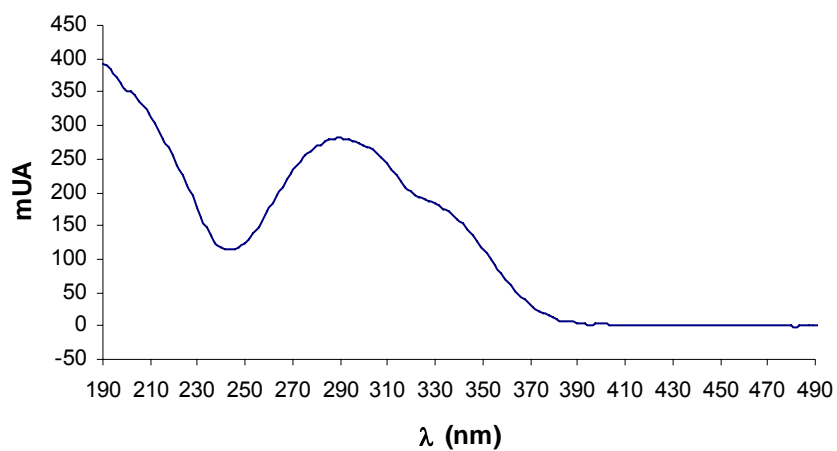


Figura III - Espectro de UV/vis do ácido cumárico.

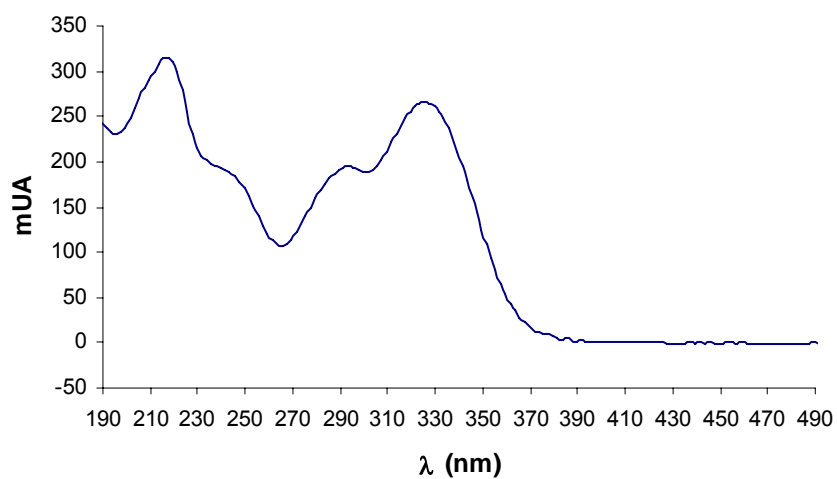
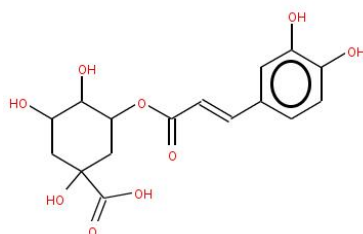


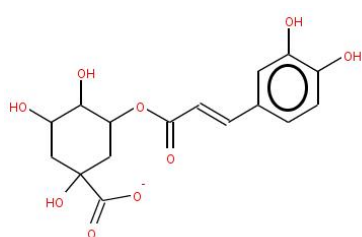
Figura IV - Espectro de UV/vis do ácido cafeico.

II - Dados obtidos pelo "SPARC" para o estudo do efeito de pH

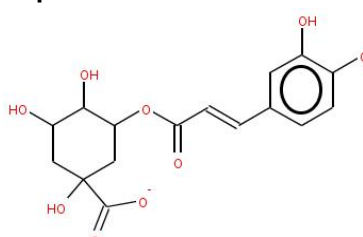
Ácido Clorogénico



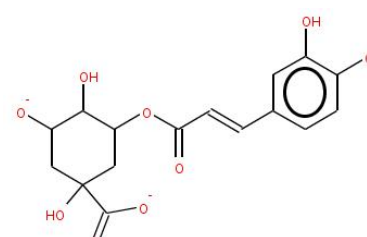
Espécie 1



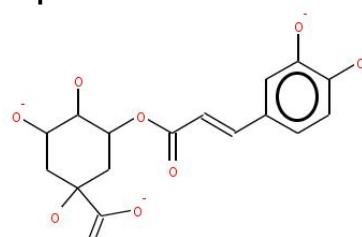
Espécie 2



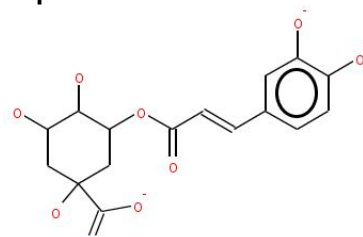
Espécie 3



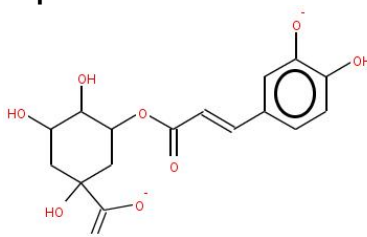
Espécie 4



Espécie 5



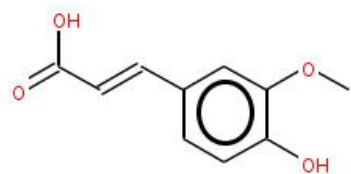
Espécie 6



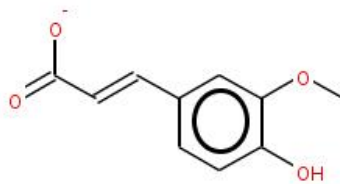
Espécie 7

pH	Espécie 1	Espécie 2	Espécie 3	Espécie 4	Espécie 5	Espécie 6	Espécie 7
1	0.99	0.01	0	0	0	0	0
2	0.95	0.05	0	0	0	0	0
3	0.64	0.36	0	0	0	0	0
4	0.15	0.85	0	0	0	0	0
5	0.02	0.98	0	0	0	0	0
6	0	0.98	0.02	0	0	0	0
7	0	0.85	0.15	0	0	0	0.01
8	0	0.36	0.61	0	0	0	0.04
9	0	0.05	0.90	0	0	0	0.05
10	0	0.01	0.94	0	0	0	0.06
11	0	0	0.93	0	0	0.02	0.05
12	0	0	0.81	0	0	0.14	0.05
13	0	0	0.34	0.01	0.02	0.60	0.02
14	0	0	0.04	0.01	0.23	0.71	0

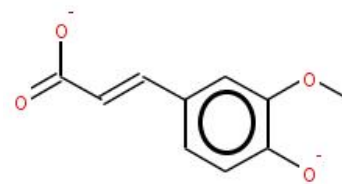
Ácido Ferúlico



Espécie 1

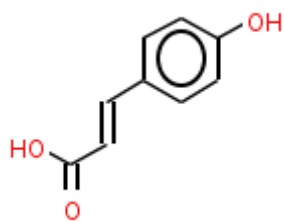
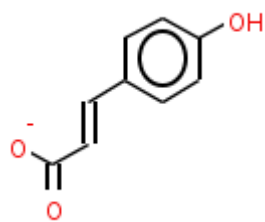
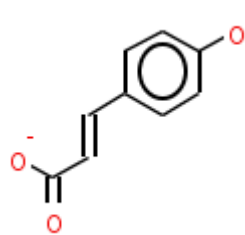


Espécie 2



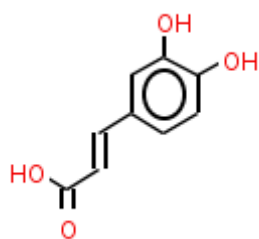
Espécie 3

pH	Espécie 1	Espécie 2	Espécie 3
1	1.00	0	0
2	1.00	0.00	0
3	0.96	0.04	0
4	0.73	0.27	0
5	0.21	0.79	0
6	0.03	0.97	0
7	0.00	0.98	0.02
8	0	0.86	0.14
9	0	0.38	0.62
10	0	0.06	0.94
11	0	0.01	0.99
12	0	0	1.00
13	0	0	1.00
14	0	0	1.00

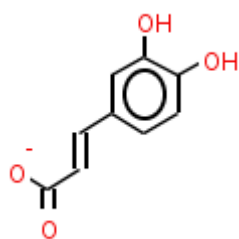
Ácido Cumárico**Espécie 1****Espécie 2****Espécie 3**

pH	Espécie 1	Espécie 2	Espécie 3
1	1.00	0	0
2	1.00	0	0
3	0.95	0.05	0
4	0.68	0.32	0
5	0.17	0.83	0
6	0.02	0.98	0
7	0	0.98	0.02
8	0	0.87	0.13
9	0	0.39	0.61
10	0	0.06	0.94
11	0	0.01	0.99
12	0	0	1.00
13	0	0	1.00
14	0	0	1.00

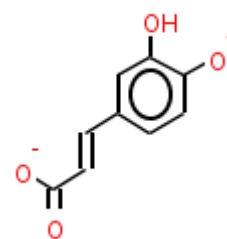
Ácido Cafeico



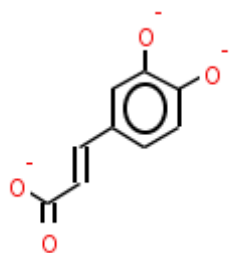
Espécie 1



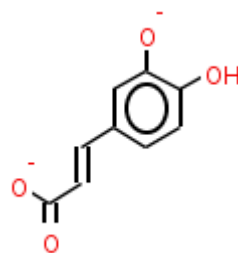
Espécie 2



Espécie 3



Espécie 4



Espécie 5

pH	Espécie 1	Espécie 2	Espécie 3	Espécie 4	Espécie 5
1	1.00	0	0	0	0.00
2	1.00	0	0	0	0.00
3	0.96	0.04	0	0	0.00
4	0.71	0.29	0	0	0.00
5	0.20	0.80	0	0	0.00
6	0.02	0.97	0	0	0.00
7	0	0.95	0.05	0	0.00
8	0	0.65	0.32	0	0.03
9	0	0.15	0.77	0	0.07
10	0	0.02	0.90	0	0.08
11	0	0	0.91	0.01	0.08
12	0	0	0.86	0.07	0.08
13	0	0	0.54	0.41	0.05
14	0	0	0.11	0.87	0.01

III - Fórmulas utilizadas no cálculo das recuperações

O cálculo da média (\bar{X}), desvio padrão (σ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização), foram efectuados com recurso às funções pré-definidas no software Microsoft Excel. No caso do desvio padrão relativo (RSD) não se encontra pré-definido, sendo por isso utilizada a seguinte relação:

$$\text{RSD} = \left(\frac{\sigma}{\bar{X}} \right) \times 100\%$$

O cálculo da recuperação foi efectuada através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \left(\frac{A_{\text{obt}}}{A_{\text{esp}}} \right) \times 100\%$$

em que A_{obt} é a área obtida e A_{esp} a área esperada.