

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS UTILIZANDO SISTEMAS
DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO**

EVANDRO PICCIN*

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA (área de
concentração QUÍMICA ANALÍTICA)

Orientador: Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho

*Bolsista CAPES

São Carlos – SP

2004

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

P588dp

Piccin, Evandro.

Determinação de polifenóis totais utilizando sistemas de análises por injeção em fluxo / Evandro Piccin. -- São Carlos : UFSCar, 2004.

98 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2004.

1. Química analítica. 2. Análise por injeção em fluxo. 3. Chás. 4. Espectrofotometria. 5. Turbidimetria. 6. Determinação de polifenóis totais. I. Título.

CDD: 543 (20^a)

Dedico esse trabalho aos meus pais, Carlos e Cleusa, que sempre lutaram para oferecer a seus filhos (Andreza, Gabriela e Eu) as oportunidades que não puderam ter.

Agradeço,

Ao Prof. Dr. Orlando Fatibello Filho, pela oportunidade, orientação, incentivo, amizade e momentos de descontração no decorrer desses anos;

Ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de São Carlos;

Aos Profs. Drs. Eduardo Fausto de Almeida Neves e Milton Duffles Capelatto pelas sugestões durante o seminário de qualificação;

Ao Prof. Dr. Joaquim de Araújo Nóbrega pelas disciplinas ministradas no PPGQ relacionadas a esse trabalho;

Aos amigos do LABBES, Oldair, Heberth, Karina, Willian, Renata, Larissa (Laila), Luiz Humberto, Claudinéia, Cleones, Viviane, Geiser, Thaís, Lucinéia, Anselmo, Camila, Bruno e Bruna, pelos momentos de trabalho e descontração;

Ao grande amigo Luiz Antônio Ramos pelo incentivo e ajuda nos primeiros contatos com equipamentos comuns em laboratório de química analítica;

Aos amigos dos demais laboratórios de química analítica do DQ, pelos momentos de descontração;

À CAPES, pela bolsa concedida.

RESUMO

DETERMINAÇÃO DE POLIFENÓIS TOTAIS UTILIZANDO SISTEMAS DE ANÁLISES POR INJEÇÃO EM FLUXO

Descrevem-se neste trabalho três métodos de análises por injeção em fluxo para determinação de polifenóis totais em amostras de chás e extratos comerciais tanínicos de acácia.

O primeiro método baseia-se na reação de oxidação entre os compostos polifenólicos e o ânion metavanadato (VO_3^-), originando como produto um cromóforo com forte absorção em 585 nm. No sistema em fluxo com zonas coalescentes empregado, volumes de 500 μL de soluções das amostras e 500 μL de solução de metavanadato de amônio (NH_4VO_3) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram injetados em soluções transportadoras (água deionizada) individuais, percorrendo distâncias iguais até se encontrarem em um ponto de confluência. Com o desenvolvimento da reação em um reator helicoidal de 150 cm, o cromóforo formado foi então monitorado espectrofotometricamente naquele comprimento de onda. A curva analítica foi linear no intervalo de concentrações de ácido tânico entre 35,7 e 544 mg L^{-1} ($2,1 \times 10^{-5}$ e $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), com um limite de detecção de 12,9 mg L^{-1} ($7,6 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$). A frequência de amostragem foi de 70 determinações por hora com desvios padrões relativos menores que 0,8% para soluções de ácido tânico de 81,7 e 493 mg L^{-1} ($4,8 \times 10^{-5}$ e $2,8 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) ($n = 10$). Como as recuperações em amostras de chás variaram entre 87,3 e 94,2%, empregou-se o método de adição múltipla de padrões para determinação de polifenóis totais nessas amostras.

No segundo método proposto empregou-se o mesmo reagente para determinação de polifenóis em amostras de extratos de acácia. A reação química envolvida no segundo método proposto também tem como base a oxidação dos compostos polifenólicos com o ânion metavanadato (VO_3^-). Nesse caso, empregou-se um sistema em fluxo de linha única com um reator em fase sólida acoplado contendo metavanadato de prata (AgVO_3) imobilizado em resina de poliéster. Nesse sistema, os volumes de 500 μL das soluções das amostras injetadas no fluxo transportador (água deionizada), ao passarem pelo reator em fase sólida com comprimento de 10 cm contendo partículas com tamanhos entre 250 e 300 μm , são convertidas no cromóforo monitorado em 585 nm. A curva analítica foi linear na faixa de concentrações de ácido tânico de 88,5 a 2041 mg L^{-1} ($5,2 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$), com limite de detecção de 10,0 mg L^{-1} ($5,9 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e desvios padrões relativos menores que 1,1% ($n = 11$) para soluções de referência de ácido tânico de 175 e 1350 mg L^{-1} ($1,0 \times 10^{-4}$ e $7,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$). A frequência de amostragem foi de 35 determinações por hora com recuperações em amostras de extratos tanínicos de acácia

entre 98,5 e 104%. A análise de polifenóis totais nessas amostras foi feita diretamente empregando-se uma curva analítica.

No terceiro método desenvolvido, um sistema de análises por injeção em fluxo foi empregado para determinação turbidimétrica de polifenóis totais utilizando como reagente precipitante íons Cu^{2+} em meio de acetato. Nesse sistema, solução do reagente Cu^{2+} $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e da amostra são injetados simultaneamente em zonas coalescentes em volumes de $350 \mu\text{L}$. Após uma prévia mistura em um reator helicoidal de 50 cm, recebem por confluência solução de acetato de amônio $0,10 \text{ mol L}^{-1}$. O precipitado formado em um reator helicoidal de 100 cm foi monitorado turbidimetricamente em 500 nm. Adaptou-se um fluxo intermitente de HNO_3 $10^{-2} \text{ mol L}^{-1}$ que efetuasse a limpeza do sistema durante a amostragem. O método foi aplicado em análise de amostras de chás, apresentando uma curva analítica linear no intervalo de concentrações de ácido tânico de 18,0 a 725 mg L^{-1} ($1,1 \times 10^{-5}$ e $4,3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$), limite de detecção de $6,49 \text{ mg L}^{-1}$ ($3,81 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) e frequência de amostragem de 90 determinações por hora. Os desvios padrões relativos foram menores que 0,9% para soluções de ácido tânico de 109 e 357 mg L^{-1} ($6,4 \times 10^{-5}$ e $2,1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) ($n = 10$). As recuperações nas amostras de chás variaram entre 91,4 e 111%. Sendo assim, empregou-se o método de adição múltipla de padrões para determinação de polifenóis totais em amostras de chás.

Os resultados das análises de amostras obtidos empregando-se os três métodos desenvolvidos foram comparados com aqueles obtidos empregando o método oficial da AOAC, com erros relativos menores que 6,4%.

ABSTRACT

DETERMINATION OF TOTAL POLYPHENOL USING FLOW INJECTION ANALYSIS SYSTEMS

In this dissertation, three flow injection analysis methods for total polyphenol determination in tea and acacia's tannins commercial extracts were developed.

The first method is based on the reaction between the polyphenol compounds and the metavanadate anion (VO_3^-), yielding a colored product with strong absorption at 585 nm. In the flow injection system with merging zones employed, 500 μL of the sample solutions and 500 μL of 0.10 mol L^{-1} ammonium metavanadate solution were injected into the individual carrier solutions (deionised water). With the reaction development in a 150 cm coil reactor, the chromogenic product formed was monitored spectrophotometrically at 585 nm. The analytical curve was linear in the tannic acid concentrations ranging from 35.7 and 544 mgL^{-1} (2.1×10^{-5} and 3.2×10^{-4} mol L^{-1}), with a detection limit of 12.9 mg L^{-1} (7.6×10^{-6} mol L^{-1}). An analytical sampling of 70 determinations per hour was obtained with relative standard deviations smaller than 0.8 % for tannic acid solutions containing 81.7 and 493 mg L^{-1} (4.8×10^{-5} and 2.8×10^{-4} mol L^{-1}). Because the recoveries from tea samples varied between 87.3 and 94.2%, the standard multiple additions method was used for total polyphenol determination in these samples.

In the second proposed method the same reagent was employed in the determination of the polyphenol compounds. In this case, a single-line flow injection system coupled with a solid phase reactor containing silver metavanadate (AgVO_3) immobilized in polyester resin was employed. In this system, volumes of 500 μL of the sample solutions injected into the carrier solution were converted in the chromogenic product in the solid phase reactor with 10 cm of length containing particles with size ranging from 250 and 300 μm of AgVO_3 immobilized in polyester. The analytical curve was linear in the tannic acid concentrations ranging from 88.5 and 2041 mg L^{-1} (5.2×10^{-5} e 1.2×10^{-3} mol L^{-1}), with a detection limit of 10.0 mg L^{-1} (5.9×10^{-6} mol L^{-1}). An analytical sampling of 35 determinations per hour was obtained with relative standard deviations smaller than 1.1 % for tannic acid solutions containing 175 and 1350 mg L^{-1} (1.0×10^{-4} and 7.9×10^{-4} mol L^{-1}). Since the recoveries from acacia's tannin extracts of samples varied between 98.5 and 104%, the total polyphenol analysis were made directly by the use of an analytical curve.

In the third developed method, a flow injection analysis system was employed for turbidimetric determination of total polyphenols, using copper(II) ions in a acetate medium as the precipitin reagent. In this system, 350 μL of reagent solution (0.10 mol L^{-1} copper(II)) and 350 μL of the sample solutions were injected simultaneously into a merging zones

system. After a previous mixing at a 50 cm coil reactor, they receive an 0.10 mol L^{-1} ammonium acetate solution by confluence. The precipitate formed at a 100 cm coil reactor, was monitored turbidimetrically at 500 nm. A $10^{-2} \text{ mol L}^{-1} \text{ HNO}_3$ solution flowing intermittently at 3.5 mL min^{-1} was used to wash the flow system during the sampling. The determination of polyphenol compounds in tea samples in the concentration range from 18.0 to 725 mg L^{-1} (1.1×10^{-5} e $4.3 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) with a detection limit of 6.49 mg L^{-1} ($3.8 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$) for standard solutions of tannic acid was obtained. The analytical sampling was 90 determinations per hour with relative standard deviations smaller than 0.9 % for tannic acid solutions containing 109 and 357 mg L^{-1} (6.4×10^{-5} and $2.1 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) ($n = 10$). Because the recoveries from tea samples varied between 91.4 and 111%, the standard multiple additions method was used for total polyphenol determination in these samples.

The results of the sample analysis obtained with the proposed methods were compared with those obtained employing the AOAC official method with relative errors smaller than 6.4%.

ÍNDICE

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO	1
1) Introdução.....	2
1.1) Objetivos.....	3
CAPÍTULO II - FUNDAMENTOS TEÓRICOS	4
2.1) Análise por injeção em fluxo (FIA).....	5
2.1.1) Histórico.....	5
2.1.2) Características.....	7
2.1.3) Constituição	11
2.1.4) Configurações elementares.....	12
2.1.5) Reatores em fase sólida em sistemas FIA	14
2.2) Compostos polifenólicos.....	16
2.2.1) Classificação dos compostos polifenólicos	18
2.2.2) Fenóis e Ácidos hidroxibenzoicos	19
2.2.3) Ácidos hidroxicinâmicos	20
2.2.4) Flavonóides	21
2.2.4.1) Antocianidinas	21
2.2.4.2) Flavonóis	22
2.2.4.3) Flavanóis (flavan-3-ol)	22
2.2.4.4) Flavanonas	24
2.2.4.5) Flavonas e isoflavonóides	24
2.2.5) Taninos.....	25
2.2.6) Propriedades dos compostos polifenólicos	27
2.3) Métodos para determinação de polifenóis.....	28
2.3.1) Métodos espectrofotométricos	29
2.3.2) Métodos fluorimétricos	31
2.3.3) Métodos quimioluminescentes	31
2.3.4) Métodos cromatográficos	32
2.3.5) Métodos eletroforéticos capilar.....	32
2.3.6) Métodos voltamétricos.....	33
2.4) Justificativa.....	33
CAPÍTULO III - PARTE EXPERIMENTAL	34
3.1) Equipamentos.....	35
3.2) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes.....	35
3.2.1) Reagentes e soluções.....	35
3.2.2) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo.....	36
3.2.3) Preparo das amostras e determinação de polifenóis	37
3.2.4) Método comparativo	37
3.3) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado contendo metavanadato de prata (AgVO_3) imobilizado.....	38
3.3.1) Reagentes e soluções.....	38
3.3.2) Preparação e Imobilização do AgVO_3	39
3.3.3) Preparo do reator em fase sólida	39

3.3.4) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo.....	40
3.3.5) Preparo das amostras e determinação de polifenóis	41
3.3.6) Método comparativo	41
3.4) Determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em sua reação de precipitação com cobre(II) em meio de acetato de amônio, utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes	42
3.4.1) Reagentes e soluções	42
3.4.2) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo.....	42
3.4.3) Preparo das amostras e determinação de polifenóis	43
3.4.4) Método comparativo	43
CAPÍTULO IV - RESULTADOS E DISCUSSÕES	44
4.1) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes.....	45
4.1.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA	46
4.1.2) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA	49
4.1.3) Curva Analítica	52
4.1.4) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem	54
4.1.5) Estudo de interferentes em potencial	55
4.1.6) Teste de adição e recuperação	56
4.1.7) Aplicação	57
4.2) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado contendo metavanadato de prata (AgVO_3) imobilizado.....	62
4.2.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA	62
4.2.2) Estudos dos parâmetros do reator em fase sólida	62
4.2.3) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA	65
4.2.4) Curva Analítica	68
4.2.5) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem	70
4.2.6) Teste de adição e recuperação	71
4.2.7) Aplicação	72
4.3) Determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em reação de precipitação com cobre(II) em meio de acetato de amônio, utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes	73
4.3.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA	76
4.3.2) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA	78
4.3.3) Curva Analítica	81
4.3.4) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem	83
4.3.5) Estudo de interferentes	84
4.3.6) Teste de adição e recuperação	85
4.3.7) Aplicação	86
CAPÍTULO V - CONCLUSÕES	91
5) Conclusões.....	92
CAPÍTULO VI REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS.....	94

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Representação de um sistema FIA. Após ser selecionado um volume de solução da amostra (a), o mesmo é introduzido em uma solução transportadora de amostras C (b). Imediatamente, forma-se uma zona de amostra a qual sofre dispersão contínua enquanto é transportada em direção ao detector D (c). No ponto X ocorre adição de um ou mais reagentes. O sinal medido pode ser registrado (d), t_i = instante de injeção da amostra ⁸	8
Figura 2.2 - A dispersão da amostra. (a) Distribuição parabólica das velocidades lineares em fluxo laminar. (b) Dispersão em ausência de difusão. (c) Dispersão em presença de difusão ⁹	9
Figura 2.3 - Determinação do valor D. Inicialmente, uma solução colorida A simulando a amostra é colocada em C_A , sendo registrado um plateau correspondente a C^0 . Posteriormente, C_A é restaurado e a solução A é injetada, sofrendo dispersão no reator R, atingindo o detector espectrofotométrico D originando um pico cuja altura reflete a concentração C da porção mais concentrada da zona de amostra ¹⁰	10
Figura 2.4 - Divisão dos sistemas FIA: unidade propulsora de flúidos, de inserção de amostra, de reação/mistura e de detecção (esquema adaptado do livro de Ruzicka e Hansen) ⁶	11
Figura 2.5 - Configurações elementares de sistemas FIA. (a) sistema linha única, (b) sistema em confluência, (c) sistema com zonas coalescentes em linha única e (d) sistema com zonas coalescentes em confluência. R, reagente; S, amostra; L, reator helicoidal; C, carregador; D, detector e W, descarte ⁸	13
Figura 2.6: Possíveis localizações de um reator em fase sólida acoplado a um sistema FIA. R, reagente; A, amostra; C, solução carregadora e D, detector ¹³	16
Figura 2.7 - Rotas de biossíntese de compostos polifenólicos. Os produtos de cada uma delas reagem para formar os flavonóides ¹	17
Figura 2.8 - Ácidos hidroxibenzoicos mais freqüentemente encontrado nas plantas. (a) ácido gálico e (b) ácido elágico ¹	20
Figura 2.9 - Estrutura básica de um ácido hidroxicinâmico. Com $R_1 = R_2 = H$ para o ácido coumárico; $R_1 = OH$ e $R_2 = H$ para o ácido cafeico ¹	20
Figura 2.10 - Estrutura básica de uma antocianidina. Com $R_1 = OH$ e $R_2 = H$ para a cianidina e $R_1 = R_2 = OH$ para a delphinidina ¹	22
Figura 2.11 - Estruturas dos principais flavonóis: (a) caempferol e (b) quercetina.	22
Figura 2.12 - Estruturas das principais procianidinas B1, B2, B3 e B4, formadas pela associação dimérica entre (a) (+) catequinas e (b) (-) epicatequinas ¹	23
Figura 2.13 - Estruturas das flavanonas mais comuns encontradas em plantas. (a) hesperidina glicosiladas e (b) naringina glicosilada ¹	24
Figura 2.14 - Estruturas das flavonas mais comuns encontradas em plantas. (a) apigenina e (b) luteolina ¹	25
Figura 2.15 - Estruturas dos isoflavonóides mais comuns encontradas em plantas. (a) formononetina e (b) genisteína.	25

Figura 2.16 - Estrutura de um (1) ácido fenolcarboxílico: ácido gálico e (2) de seu tanino hidrolisável: o galotanino: (a) carboidrato e (b) monômero do ácido gálico esterificado¹⁷. ... 26

Figura 2.17 - Estrutura da (1) flavona-3-ol e de um (2)tanino condensado: (a) e (b) ligações carbono-carbono que unem as estruturas das flavona-3-ol para formar o tanino condensado¹⁷..... 26

Figura 2.18 – Diagrama esquemático do sistema FIA empregado por Valcárcel et al para determinação de taninos em amostras de chás..... 30

Figura 3.1 - Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (100 cm; 500 µL) de A, soluções de referência e amostras; L₂, alça de amostragem (100 cm; 500 µL) de R, reagente NH₄VO₃ 0,10 mol L⁻¹; T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazões individuais de 2,6 mL min⁻¹; B, reator helicoidal (100 cm); X, ponto de confluência; D, detector espectrofotométrico em 585 nm e W, descarte. 36

Figura 3.2 - Procedimento de imobilização do reagente AgVO₃ em resina de poliéster e preparo do reator em fase sólida..... 40

Figura 3.3 - Diagrama esquemático do sistema FIA com reator em fase sólida para determinação espectrofotométrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L, alça de amostragem (100 cm; 500 µL) das soluções de referência e amostras; T, transportador (água deionizada); RFS, reator em fase sólida contendo AgVO₃ imobilizado em resina de poliéster (10 cm; 1,8 mm d.i.) na proporção 1:2 e tamanho de partículas na faixa de 250-350 µm; B, reator helicoidal (100 cm); D, detector espectrofotométrico em 585 nm e W, descarte..... 40

Figura 3.4 - Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação turbidimétrica de polifenóis . As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (70 cm; 350 µL) de A, soluções de referência e amostras; L₂, alça de amostragem (70 cm; 350 µL) de R₁, reagente CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹; R₂, reagente NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹ (0,7 mL min⁻¹); T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazões de 2,6 mL min⁻¹; B₁, reator helicoidal (50 cm); X, entrada do fluxo intermitente de HNO₃ a vazão de 3,5 mL min⁻¹; Y, confluência; B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte. 43

Figura 4.1 - Espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível do composto cromóforo formado na reação química entre polifenóis e metavanadato de amônio (NH₄VO₃). As medidas quantitativas foram feitas em 585 nm. 46

Figura 4.2 - Efeito da concentração de NH₄VO₃ sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹; alças de amostragem L₁ e L₂ de 350 µL, vazão dos transportadores (água deionizada) T₁ e T₂ de 2,6 mL min⁻¹ e comprimento do reator helicoidal de 50 cm..... 47

Figura 4.3 - Efeito da concentração hidrogeniônica no intervalo de pH entre 2 e 9 (tampões fosfato 0,2 mol L⁻¹) das soluções transportadoras T₁ e T₂ (vazões 2,6 mL min⁻¹) sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L₁ (ácido tânico 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) e L₂ (NH₄VO₃ 0,10 mol L⁻¹) de 350 µL e comprimento do reator helicoidal de 50 cm. 48

Figura 4.4 - Efeito da natureza do tampão (McIlvaine, acetato ou fosfato) 0,2 mol L⁻¹ pH 4,0, utilizados como soluções transportadoras T₁ e T₂ (vazões 2,6 mL min⁻¹) sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L₁ (ácido tânico 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) e L₂ (NH₄VO₃ 0,10 mol L⁻¹) de 350 µL e comprimento do reator helicoidal de 50 cm. 49

- Figura 4.5 - Efeito do volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), avaliados simultaneamente entre 100 e 600 μL , sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Vazão das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada) de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ e reator helicoidal de 50 cm. 50
- Figura 4.6 - Efeito do comprimento do reator helicoidal (B), avaliado entre 30 e 160 cm, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de 500 μL e vazões das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada) de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ 51
- Figura 4.7 - Efeito das vazões das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada), estudados simultaneamente na faixa de 1,1 a 3,7 mL min^{-1} , sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de 500 μL e comprimento do reator helicoidal (B) 100 cm. . 52
- Figura 4.8 - Curva analítica para determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadato (VO_3^-), empregando sistema em fluxo com zonas coalescentes apresentado em 3.2.2..... 53
- Figura 4.9 - Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $2,1 \times 10^{-5}$, (3) $8,4 \times 10^{-5}$, (4) $1,6 \times 10^{-4}$, (5) $2,1 \times 10^{-4}$ e (6) $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.2.2. 54
- Figura 4.10 - Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $4,8 \times 10^{-5}$ e (2) $2,9 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 1.2.2..... 55
n = 3..... 57
- Figura 4.11 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá verde. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 59
- Figura 4.12 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá preto. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,16 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 60
- Figura 4.13 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá mate. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 61
- Figura 4.14 - Efeito da composição m/m de AgVO_3 e resina poliéster (1:2, 1:3 e 1:4) das partículas do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reatores de 5,0 cm e tamanho de partícula na faixa de 250-350 μm , alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ 63
- Figura 4.15 - Efeito do tamanho de partículas (100-250 μm , 250-350 μm e 350-500 μm) do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reatores de 5,0 cm e composição m/m de AgVO_3 e resina poliéster 1:2, alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ 64

- Figura 4.16 - Efeito do comprimento (5, 10 e 15 cm) do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reatores com tamanho de partículas na faixa de 250 - 350 μm e composição m/m de AgVO_3 / resina poliéster de 1:2, alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ 65
- Figura 4.17 - Efeito do volume da alça de amostragem (L) de 50, 150, 250, 350, 500 e 600 μL , sobre o sinal analítico de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ e reator helicoidal de 50 cm. 66
- Figura 4.18 - Efeito do comprimento do reator helicoidal (B) sobre o sinal analítico, avaliado no intervalo de 20 a 150 cm, de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume da alça de amostragem de 500 μL 67
- Figura 4.19 - Efeito da vazão da solução transportadora (água deionizada), avaliado entre $1,5$ e $3,5 \text{ mL min}^{-1}$, sobre o sinal analítico de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, reator helicoidal de 100 cm e volume da alça de amostragem de 500 μL 68
- Figura 4.20: Curva analítica para determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com vanadato (VO_3^-), utilizando sistema em fluxo com reator em fase sólida acoplado. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4. 69
- Figura 4.21 Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $5,2 \times 10^{-5}$, (3) $2,5 \times 10^{-4}$, (4) $4,6 \times 10^{-4}$, (5) $6,3 \times 10^{-4}$, (6) $8,4 \times 10^{-4}$, (7) $1,0 \times 10^{-3}$ e (8) $1,2 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4. 70
- Figura 4.22: Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $1,03 \times 10^{-6}$ e (2) $8,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4..... 71
n = 3..... 72
- Figura 4.23: Espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível precipitado em suspensão formado pela reação química entre polifenóis sulfato de cobre em meio de acetato de amônio. As medidas quantitativas foram feitas em 500 nm. 74
- Figura 4.24 - Diagrama esquemático de sistema FIA com zonas coalescentes para determinação turbidimétrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (150 μL) de A, soluções de referência; L₂, alça de amostragem (150 μL) de R₁ (CuSO_4 $0,050 \text{ mol L}^{-1}$); R₂, reagente (NH_4Ac $0,050 \text{ mol L}^{-1}$) a vazão de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$; X, ponto de confluência; B, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte. 75
- Figura 4.25 - Diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes e R₂ entrando por confluência, para determinação turbidimétrica de polifenóis. I, injetor; L₁, alça de amostragem (150 μL) da amostra; L₂, alça de amostragem (150 μL) de R₁ (CuSO_4 $0,050 \text{ mol L}^{-1}$); R₂, reagente NH_4Ac $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,7 \text{ mL min}^{-1}$); T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$; X e Y, pontos de confluência; B₁, reator helicoidal (100 cm); B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte..... 75
- Figura 4.26 - Diagrama esquemático do sistema FIA de linha única com reagentes entrando por confluência, para determinação turbidimétrica de polifenóis. I, injetor; T, transportador (água deionizada) a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$; L, alça de amostragem (150 μL) de A, soluções de referência e amostras; R₁, reagente CuSO_4 $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$); R₂, reagente NH_4Ac $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$); B₁, reator helicoidal (100 cm); B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte..... 76

- Figura 4.27: Efeito da concentração de CuSO_4 sobre o sinal analítico na determinação turbidimétrica de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem L_1 e L_2 de $150 \mu\text{L}$, vazão dos transportadores (água deionizada) T_1 e T_2 de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, concentração de NH_4Ac ($1,7 \text{ mL min}^{-1}$) de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e comprimento dos reatores helicoidais B_1 e B_2 de 100 cm 77
- Figura 4.28 - Efeito da concentração de NH_4Ac sobre o sinal analítico na determinação turbidimétrica de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem L_1 e L_2 de $150 \mu\text{L}$, vazão dos transportadores (água deionizada) T_1 e T_2 de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, concentração de CuSO_4 ($1,7 \text{ mL min}^{-1}$) de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e comprimento dos reatores helicoidais B_1 e B_2 de 100 cm 78
- Figura 4.29 - Efeito do volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (CuSO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), avaliados simultaneamente entre 50 e $450 \mu\text{L}$, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Vazão das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada) de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, reagente R_2 (NH_4Ac $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) a vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ e reatores helicoidais B_1 e B_2 de 100 cm 79
- Figura 4.30 - Efeito das vazões das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada), estudadas simultaneamente na faixa de $1,7$ a $3,1 \text{ mL min}^{-1}$, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (reagente R_1 , CuSO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de $350 \mu\text{L}$, R_2 (NH_4Ac $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) a vazão de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$ e reatores helicoidais B_1 e B_2 de 50cm e 100cm , respectivamente. 80
- Figura 4.31 - Efeito da vazão do reagente R_2 (NH_4Ac $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), estudada na faixa de $0,7$ a $2,6 \text{ mL min}^{-1}$, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (CuSO_4 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de $350 \mu\text{L}$; T_1 e T_2 (água deionizada) a vazões de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ e reatores helicoidais B_1 e B_2 de 50 cm e 100 cm . .. 81
- Figura 4.32 - Curva analítica para determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em sua reação de precipitação com cobre, utilizando sistema em fluxo com zonas coalescentes. 82
- Figura 4.33: Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,66 \times 10^{-5}$, (4) $5,32 \times 10^{-5}$, (5) $1,06 \times 10^{-4}$, (6) $2,13 \times 10^{-4}$, (7) $2,66 \times 10^{-4}$, (8) $3,19 \times 10^{-4}$ e (9) $4,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.4.2. 83
- Figura 4.34: Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $6,41 \times 10^{-5}$ e (2) $2,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.4.2. 84
- Figura 4.35: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá verde. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 88
- Figura 4.36: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá preto. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,17 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 89
- Figura 4.37: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá mate. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,17 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ 90

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Classificação dos compostos polifenólicos segundo a cadeia carbônica principal.....	18
Tabela 2.2 - Classificação dos compostos polifenólicos segundo a magnitude das massas molares.....	19
Tabela 4.1 - Estudos de interferentes em potencial comuns em amostras de chás na determinação de polifenóis.....	56
Tabela 4.2 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de chás comerciais.....	57
Tabela 4.3 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de chás pelo método proposto e pelo método da AOAC.....	58
Tabela 4.4 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras extratos tanínicos da acácia empregados no curtimento de couros.....	72
Tabela 4.5 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de chás pelo método proposto e pelo método da AOAC.....	73
Tabela 4.6 - Estudos de interferentes em potencial comuns em amostras de chás na determinação de polifenóis.....	85
Tabela 4.7 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de chás comerciais.....	86
Tabela 4.8 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de chás pelo método proposto e pelo método da AOAC.....	87

CAPÍTULO I
INTRODUÇÃO

1) Introdução

Compostos polifenólicos constituem um complexo grupo de substâncias amplamente distribuídas em plantas, componentes comuns da alimentação humana. Esses compostos, especialmente flavonóides e taninos, possuem diversas propriedades ecológicas, fisiológicas, antioxidantes e farmacológicas. Estão extremamente relacionados a qualidade, aroma e sabor de alimentos de origem vegetal. Além disso, como captadores de radicais livres, estudos recentes atribuem a essas substâncias atividades anticarcinogênicas. Diante disso, a avaliação polifenóis totais é extremamente importante para o controle da qualidade de produtos de interesse alimentício, ambiental e farmacológico^{1,2}.

O desenvolvimento da instrumentação analítica tem proporcionado a obtenção de procedimentos rápidos, que apresentam maior precisão e que tem em aberto novos caminhos para o acoplamento com técnicas de separação e analisadores automáticos. Dentro desse contexto, a análise por injeção em fluxo (FIA) tem se mostrado como um procedimento analítico de grande utilidade para análises de amostras de interesse farmacológico, alimentício, clínico e ambiental. Essa técnica pode ser implementada com instrumentação de baixo custo, mesmo quando utiliza-se computadores para efetuar o controle e aquisição de dados. Ademais, emprega-se reduzidas quantidades de reagentes e pouca vidraria de laboratório, pois essas são substituídas em grande parte pelo sistema em fluxo. Quando é inevitável o emprego de reagentes com alguma toxicidade, os sistemas em fluxo permitem o emprego de reagentes imobilizados em quantidades reduzidas em reatores, que poderão ser tratados antes do descarte no ambiente²⁻⁴.

No presente trabalho de mestrado foram desenvolvidos três procedimentos em fluxo com detecções espectrofotométrica e turbidimétrica para determinação de polifenóis totais em chás e extratos de plantas (Capítulos III e IV). Uma revisão dos métodos empregados para determinação de compostos polifenólicos, bem como as funções que essas substâncias exercem no metabolismo de plantas e animais, e os fundamentos teóricos envolvidos na análise por injeção em fluxo, são descritos no Capítulo II. No Capítulo V, concluiu-se o trabalho comparando as metodologias desenvolvidas com aquelas até então presentes na literatura. No Capítulo VI são apresentadas algumas perspectivas para trabalhos futuros e no Capítulo VII as referências bibliográficas.

1.1) Objetivos

A determinação de compostos polifenólicos em amostras de chás e extratos vegetais não requer tanta sensibilidade, sendo mais importante o desenvolvimento de procedimentos simples, rápidos e facilmente aplicados em laboratórios de rotina.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de polifenóis totais empregando sistemas de análises por injeção em fluxo (FIA), alternativos ao método oficial sugerido pela AOAC⁵.

Com relação a configuração dos sistemas, teve-se por objetivo comparar o emprego de reagentes em solução e reagentes imobilizados em reatores em fase sólida.

CAPÍTULO II
FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1) Análise por injeção em fluxo (FIA)

2.1.1) Histórico

A automação de procedimentos para manipulação de soluções, visando a determinação quantitativa de espécies químicas, tem sido proposta como alternativa aos procedimentos convencionas quando se pretende:

- analisar um grande número de amostras por unidade de tempo,
- minimizar o consumo de amostras e de reagentes,
- eliminar algumas possibilidades de contaminação de soluções,
- melhorar a precisão dos resultados analíticos,
- diminuir o custo operacional,
- empregar métodos de análise cujo produto de reação a ser medido é instável,
- diminuir a quantidade de vidraria requerida,
- fornecer resultados analíticos após intervalo de tempo bastante curto.

Os sistemas de análises por injeção em fluxo, FIA (do inglês: “Flow Injection Analysis”), não somente suprem todos os requisitos acima, como também são caracterizados por sua simplicidade e versatilidade, aliadas a uma facilidade extrema de implantação em qualquer laboratório. Isto talvez explique o rápido desenvolvimento da tecnologia FIA após sua proposição em 1975, bem como sua utilização crescente nas análises laboratoriais⁶.

O trabalho pioneiro conduzido pelos pesquisadores Ruzicka e Hansen no qual o termo “Flow Injection Analysis” foi introduzido na literatura, deve ser considerado como ponto de partida dessa tecnologia. Nos sistemas mecanizados até então existentes, a presença de bolhas de ar no percurso analítico, segundo o conceito de Skeggs⁷ (1975), era considerada essencial para limitar a dispersão de amostra, para melhorar as condições de mistura entre amostra e reagente e para minimizar os efeitos de memória. Com a proposta do conceito FIA, demonstrou-se que estas funções também poderiam ser obtidas sem segmentação por ar. O desenvolvimento posterior indicou que a ausência de bolhas de ar não somente leva a um sistema mais simples como também expande as potencialidades da análise em fluxo.

As primeiras aplicações FIA ocorreram no Brasil, em virtude principalmente da colaboração científica entre a Agência Internacional de Energia Atômica de Viena e o Centro de Energia Nuclear de Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo, campus de Piracicaba, que permitiu a permanência de Ruzicka por um ano no CENA, o qual, em trabalho conjunto com pesquisadores da seção de Radioquímica e Química Analítica, instalou o primeiro sistema FIA para análises rotineiras.

O conceito FIA recém proposto e a grande demanda analítica para determinação de nitrogênio e fósforo total em plantas e de cloreto em águas naturais, levou ao início de desenvolvimento de novos métodos analíticos empregando injeção em fluxo. Desta forma, já em 1976, uma velocidade analítica de 420 determinações por hora era atingida na determinação espectrofotométrica de fósforo em plantas pelo método do azul de molibdênio. A precisão das medidas era considerada satisfatória, apesar da precariedade do sistema e da injeção de amostra ser feita manualmente empregando-se seringas hipodérmicas e agulhas.

Neste mesmo ano, a versatilidade dos sistemas FIA foi demonstrada ao se propor uma metodologia mecanizada para determinação colorimétrica de cloreto em águas da região amazônica. Em virtude da alta variabilidade deste elemento nas amostras, um processo de bifurcação do processo analítico foi proposto, o qual permitia a análise de todas as amostras sem a necessidade de diluição manual das mais concentradas. Ainda em 1976, foi implantado um sistema FIA para determinação simultânea de nitrogênio e fósforo total em plantas, empregando um único espectrofotômetro.

A partir de 1977 e especialmente nas duas décadas seguintes, ocorreu um desenvolvimento muito rápido da metodologia FIA em muitos países, com conseqüente expansão dos conceitos envolvidos, o que culminou com o aparecimento de analisadores FIA comercialmente disponíveis. Ao longo destes mais de vinte e oito anos vários dispositivos de propulsão de fluidos, inserção e tratamento de amostras, reagentes e produtos, bem como sistemas de detecção, tem sido desenvolvidos nessa linha de pesquisa^{3,8}.

2.1.2) Características

Métodos FIA diferem dos métodos tradicionais com relação à não obrigatoriedade de obtenção de equilíbrio químico, já que, nos sistemas FIA, o intervalo de tempo disponível para desenvolvimento das reações envolvidas é rigorosamente mantido para todas as amostras e padrões. Economiza-se então o tempo que seria gasto para complementação das reações químicas e abre-se perspectiva de controle de interferências e de utilização de método analítico que conduz a formação e quantificação de espécie instável.

Acessórios comuns à vidraria de um laboratório analítico tradicional são substituídos nos sistemas FIA pela tubulação de diâmetro interno reduzido e demais componentes, através dos quais as soluções envolvidas escoam. Desta forma, efeitos de contaminação são minimizados, já que não há contato direto entre a atmosfera do laboratório e os locais onde processam as diversas etapas do método analítico.

Como as condições de dispersão da amostra, tempo disponível para desenvolvimento das reações químicas e parâmetros das reações tais como pH, quantidades de reagentes adicionados, temperatura, etc., são controlados. Excelente precisão analítica é sempre associada aos métodos FIA. Aliás, métodos automatizados de análise fornecem resultados mais precisos do que o método manual correspondente, que exige a intervenção mais freqüente do operador⁸.

Os sistemas FIA utilizam a injeção de amostras líquidas (em geral 10 a 500 μL) em um fluido carregador não segmentado, o qual escoam através de tubulação de diâmetro reduzido em geral entre 0,5 a 1,0 mm (Figura 2.1a). Após a injeção, uma zona de amostra muito bem definida e reprodutível é estabelecida (Figura 2.1b), a qual é transportada à unidade de medida (D). No percurso analítico podem ocorrer os diversos processos requeridos pelo método de análise, tais como diluição controlada, adição de reagentes (ponto X da Figura 2.1c), tamponamento, diálise, extração por solvente, troca iônica, etc. Quando a zona processada de amostra atinge o detector, um sinal transiente é originado, o qual é geralmente registrado em forma de pico (Figura 2.1d), cuja área ou altura de pico é proporcional ao teor da espécie química a ser determinada. Posteriormente a amostra é descartada (W)^{4,8}.

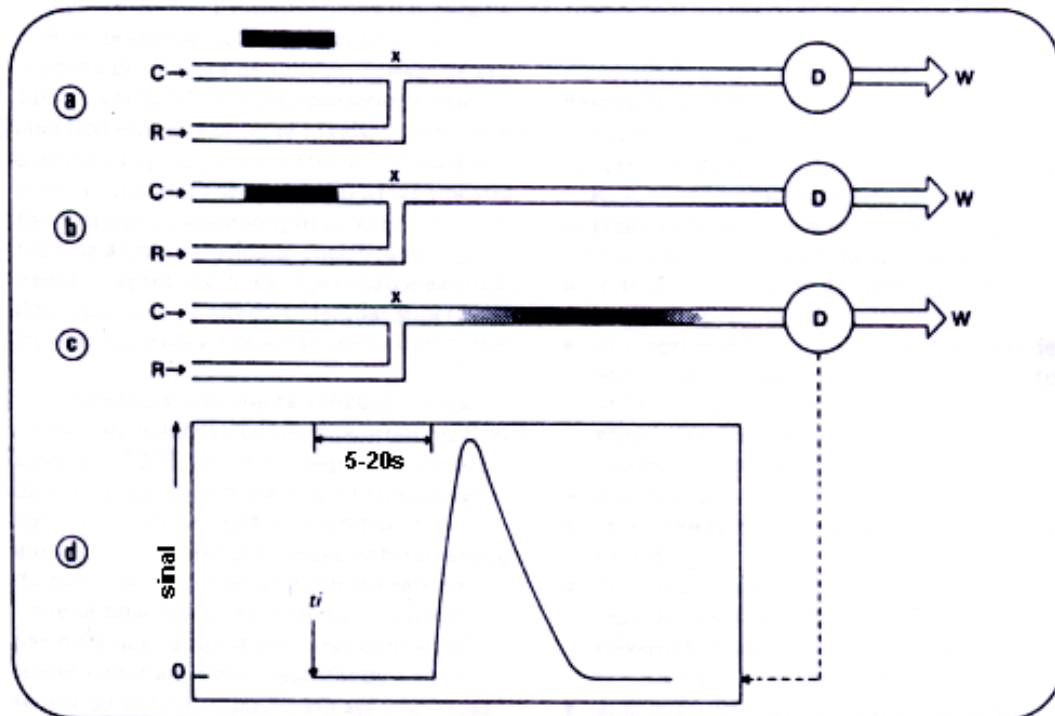


Figura 2.1 - Representação de um sistema FIA. Após ser selecionado um volume de solução da amostra (a), o mesmo é introduzido em uma solução transportadora de amostras C (b). Imediatamente, forma-se uma zona de amostra a qual sofre dispersão contínua enquanto é transportada em direção ao detector D (c). No ponto X ocorre adição de um ou mais reagentes. O sinal medido pode ser registrado (d), t_r = instante de injeção da amostra⁸.

Como o tempo médio de residência das amostras no sistema FIA é, em geral da ordem de 20 a 50 s, os sistemas FIA fornecem sempre uma resposta extremamente rápida, o que é freqüentemente imprescindível em análises de rotina. A Figura 2.1d indica, ainda, que após um intervalo de tempo bastante curto, usualmente de 10 a 30 s, o sinal analítico desaparece, ou seja, efeitos de memória são eliminados. Então, altas freqüências analíticas, em geral acima de 150 determinações por hora, constituem outra das características favoráveis dos sistemas FIA⁸.

Nestas condições, o fluxo é laminar (Figura 2.2a), sendo que a lâmina de líquido próxima a parede da tubulação é quase estática, ao passo que aquela mais central se desloca com uma velocidade linear de aproximadamente o dobro da velocidade média do fluido. A injeção da amostra origina uma zona de amostra muito bem definida, a qual sofre um processo contínuo de dispersão no fluido carregador à medida que é empurrada pelo mesmo em direção ao detector. Como o fluxo é laminar, na ausência de difusão, a zona de amostra assumiria a distribuição indicada na Figura 2.2b. Após a dispersão no percurso analítico, apresentaria uma rabeira

extremamente pronunciada. Isso geraria um efeito inaceitável de memória devido à interpenetração de amostras sucessivas. Felizmente, a difusão sempre ocorre em sistemas reais, modificando benéficamente a zona de amostra. Assim, uma espécie química situada em A (Figura 2.2b) tende a difundir-se para regiões fluindo com menor velocidade, ao passo que, se essa espécie estiver originalmente em B, sua difusão radial em direção a uma região fluindo rapidamente provoca uma diminuição na rabeira da zona de amostra, diminuindo assim o efeito de contaminação entre amostras (Figura 2.2c). É interessante observar que o desconhecimento da magnitude deste fenômeno de prevenção de uma dispersão acentuada induziu à utilização de fluxos segmentados com bolhas de ar durante muitos anos⁹.

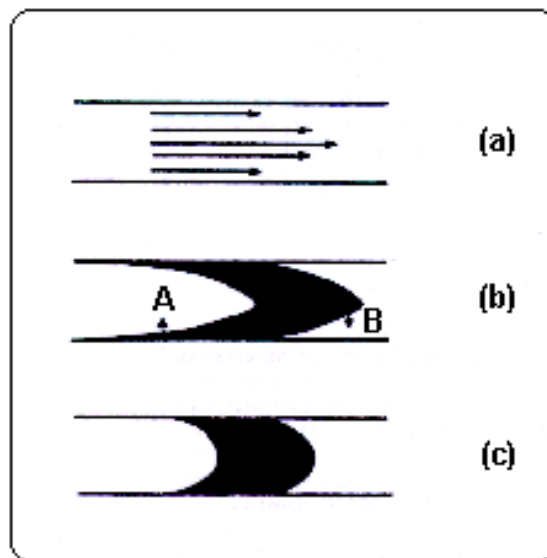


Figura 2.2 - A dispersão da amostra. (a) Distribuição parabólica das velocidades lineares em fluxo laminar. (b) Dispersão em ausência de difusão. (c) Dispersão em presença de difusão⁹.

A dispersão em sistemas FIA é um processo físico-químico dependente de um grande número de parâmetros, não podendo portanto, ser quantificada em termos de um único valor. Tem sido freqüentemente descrita por equações matemáticas cada vez mais elaboradas. Entretanto, sob o ponto de vista prático um único indicador que exprimisse a extensão da dispersão seria de enorme valia. Neste sentido a avaliação da diluição no centro da zona de amostra tem um valor prático muito grande. Desta maneira, Ruzicka e Hansen propuseram um índice, D, o qual denominaram número de dispersão:

$$D = C^0 / C$$

onde, C^0 é a concentração inicial da amostra e C é a concentração no centro da zona da amostra após o processo de dispersão, ou concentração na região da zona de amostra correspondente ao máximo do pico registrado^{6,10}.

No sistema FIA mais simples, em linha única (Figura 2.3), o valor D pode ser determinado como a razão entre as medidas relativas à amostra injetada (altura de pico) e a amostra em situação de volume infinito (altura do patamar registrado), desde que os sinais analíticos sejam linearmente proporcionais as concentrações⁷.

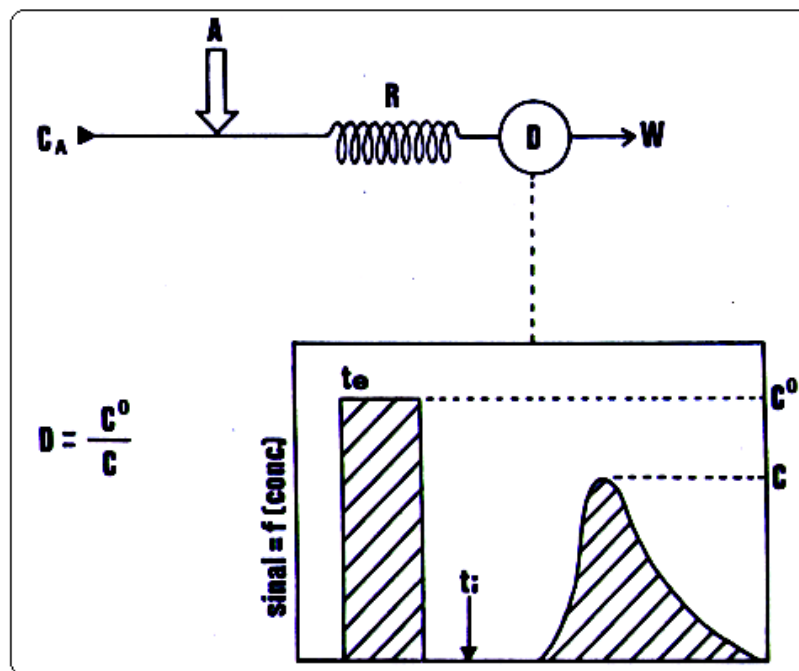


Figura 2.3 - Determinação do valor D . Inicialmente, uma solução colorida A simulando a amostra é colocada em C_A , sendo registrado um patamar correspondente a C^0 . Posteriormente, C_A é restaurado e a solução A é injetada, sofrendo dispersão no reator R , atingindo o detector espectrofotométrico D originando um pico cuja altura reflete a concentração C da porção mais concentrada da zona de amostra¹⁰.

Considerando-se apenas o valor D , a dispersão em FIA pode ser classificada como limitada ($D < 3$), média ($3 < D < 10$) e grande ($D > 10$).

Os fatores determinantes do processo de dispersão em sistemas FIA podem ser classificados em dois grandes grupos^{6,10}:

- Aqueles fatores intrinsecamente associados ao método FIA específico, e que não podem ser livremente modificados no projeto do sistema, tais como viscosidade dos fluidos, coeficientes de difusão das espécies químicas, temperatura, rugosidade das paredes internas das tubulações, etc.

- Aqueles fatores relacionados ao dimensionamento dos sistema que podem ser livremente modificados, tais como volume de amostra injetado, dimensões do percurso analítico, presença de fluxos confluentes, etc.

2.1.3) Constituição

Os sistemas FIA são basicamente constituídos por uma unidade propulsora de flúidos, de inserção de amostra, de reação/mistura e de detecção (Figura 2.4). Opcionalmente, estas unidades podem ser controladas por uma unidade de controle e aquisição de dados a qual pode estar acoplada a uma unidade de processamento e arquivo³.

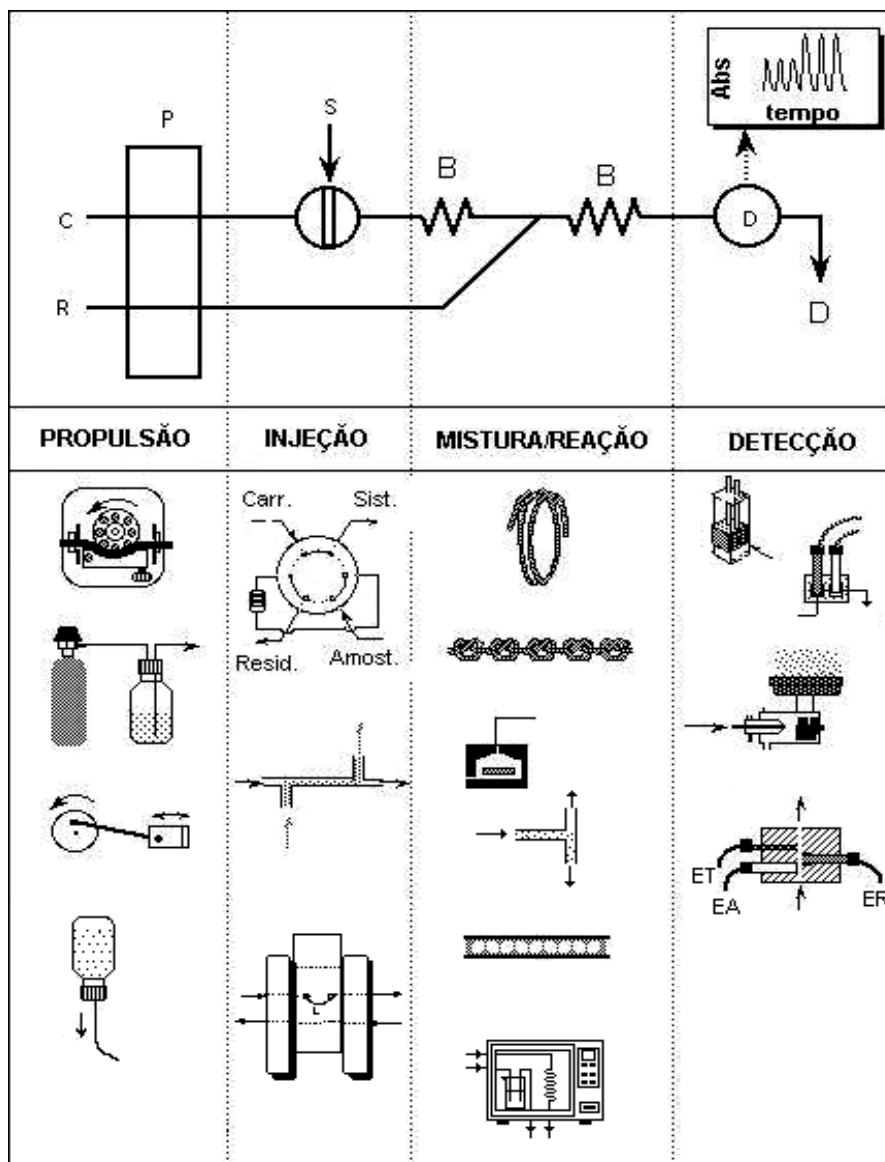


Figura 2.4 - Divisão dos sistemas FIA: unidade propulsora de flúidos, de inserção de amostra, de reação/mistura e de detecção (esquema adaptado do livro de Ruzicka e Hansen)⁶.

Como observado na Figura 2.4, a unidade propulsora é, em geral, uma bomba peristáltica (a) operando com intensidades de fluxo na faixa de 0,1 a 10,0 mL min⁻¹. Esta deve possuir torque suficiente para manter a vazão constante, mesmo que ocorram variações na impedância hidrodinâmica do sistema. O emprego de outros dispositivos propulsores como pressão através de gás comprimido, bombas de pistão e ação gravitacional tem sido propostos em aplicações específicas.

O injetor é o dispositivo fundamental do sistema de análise química por injeção em fluxo. É através dele que se introduz a amostra no percurso analítico. Vários tipos de injetores foram apresentados na literatura, sendo os mais comuns o de válvula rotatória desenvolvido por Ruzicka e Hansen e o injetor proporcional (ou injetor comutador) desenvolvido pelos pesquisadores do CENA/USP. Este último, além de ser muito versátil, é muito fácil de ser construído. Consiste em três peças de acrílico, sendo duas fixas e uma móvel. A peça central pode ser deslocada em relação às laterais, um passo para frente ou para trás, ou vice-versa. Por meio desse movimento o injetor coleta a amostra e a insere no percurso analítico.

O percurso analítico é a unidade do sistema FIA onde ocorrem as etapas de reação e/ou mistura. Em sistemas simples, os conectores empregados para entrada de reagentes, confluências e coalescências, e reatores (ou bobinas) helicoidais são os dispositivos mais comuns empregados nesta unidade. Sistemas mais elaborados incluem reatores empacotados com reagentes em estado sólido, geralmente imobilizados em resinas, câmaras de diluição e agitação, câmaras de separação de fases, extração com solvente, resinas de troca iônica, fornos de microondas, reamostragem de zona dispersa e fluxos intermitentes.

No que diz respeito à unidade de medida, os detectores devem apresentar volume morto e tempo de resposta compatíveis com o sistema FIA. De acordo com a espécie a ser quantificada, tem sido empregados, praticamente, todas as técnicas usuais em química analítica: espectrofotometria de ultravioleta – visível, absorção e emissão atômica, potenciometria, condutometria, voltametria, entre outros^{3,4,8}.

2.1.4) Configurações elementares

As configurações de sistemas FIA mais elementares são os sistemas de linha única, sistemas em confluência e sistemas com zonas coalescentes (Figura

2.5). Os sistemas FIA também podem ser ainda projetados a partir de implementações de outras variáveis nos sistemas elementares. Exemplos dessas implementações são os sistemas com fluxos alternativos, fluxos intermitentes, aprisionamento de zona de amostra, amostragem na zona de amostra, etc⁸.

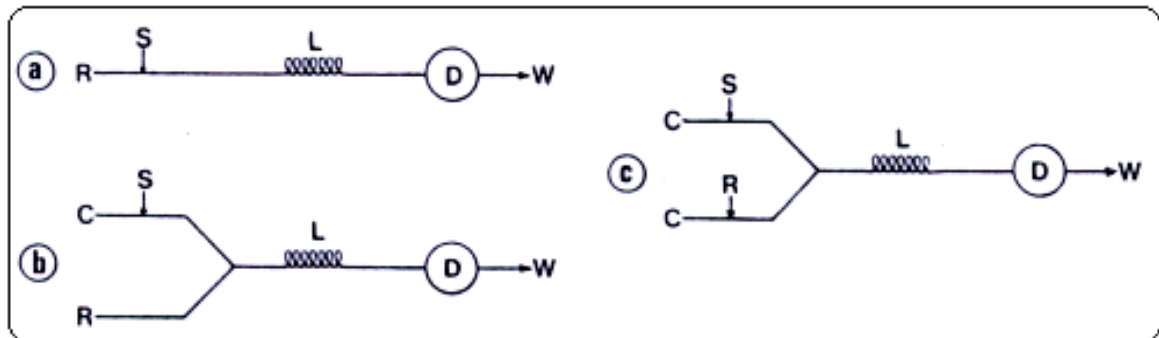


Figura 2.5 - Configurações elementares de sistemas FIA. (a) sistema linha única, (b) sistema em confluência e (c) sistema com zonas coalescentes. R, reagente; S, amostra; L, reator helicoidal; C, carregador; D, detector e W, descarte⁸.

Sistema em linha única

É o sistema mais simples (Figura 2.5a), o qual não apresenta pontos de confluência no percurso analítico, conforme a proposta original em 1975. O fluido carregador, é em geral, uma solução quimicamente inerte, cuja função principal é transportar a amostra injetada até a unidade de detecção, promovendo dispersão controlada da amostra e posteriormente lavando o percurso analítico. Eventualmente, o fluido carregador pode ser uma solução reagente, o qual reage com a amostra devido ao fenômeno de dispersão. Entretanto, nessa situação o reagente não é idealmente utilizado.

Sistemas de linha única são freqüentemente empregados em conexão com espectrometria de absorção atômica, potenciometria, métodos que não requerem adição de reagentes ou naqueles envolvendo alta diluição da amostra⁸.

Sistema em confluência

A amostra é injetada em um fluido carregador quimicamente inerte, o qual apresenta características matriciais semelhantes à amostra. A adição de reagentes ocorre via pontos de confluência (Figura 2.5b)⁸.

As limitações do sistemas em linha única foram resolvidas, adotando-se a adição do reagente por confluência. O reagente adicionado por confluência, logo após o injetor, permite que cada fração da amostra receba a mesma quantidade de reagente. Evidentemente, adição seqüencial de reagentes pode ser conseguida em sistemas em confluência.

A partir da confluência somam-se as vazões do carregador e do reagente, então a amostra é distribuída em um espaço maior que o ocupado anteriormente, o que corresponde a uma diluição. Neste caso, a amostra ocupa uma maior fração do percurso analítico, o que é equivalente ao emprego de uma alça de amostragem mais longa, e isso aumenta a dispersão. É conveniente que se conheça em que extensão a intensidade do fluxo confluyente afeta a magnitude da medida³.

Sistema com zonas coalescentes

Nestes sistemas, tanto a amostra como o reagente são introduzidos simultaneamente, com sua interação ocorrendo por confluência dos respectivos fluidos carregadores (Figura 2.5c)⁸.

O emprego de zonas coalescentes leva a uma economia significativa de reagentes, uma vez que o reagente somente é consumido em presença da amostra, sendo recuperado durante a lavagem do percurso analítico pelos fluidos carregadores. Zonas coalescentes tem sido utilizadas ainda, visando: maior estabilidade da linha base com conseqüente melhoria na precisão da medida, determinações simultâneas utilizando um único módulo de análise, síntese de reagentes instáveis fora do percurso analítico, mecanização do método das adições de padrão, verificação do grau de interferência em métodos analíticos sem a necessidade de se preparar um número excessivo de soluções padrão mistas, determinação de altas concentrações de espécies químicas sem pré-diluição de amostras³.

2.1.5) Reatores em fase sólida em sistemas FIA

Entre as possibilidades de inclusão de uma fase sólida em sistemas de análise por injeção em fluxo, a utilização de reagentes pouco solúveis de interesse

analítico é a mais amplamente difundida, basicamente devido à versatilidade química dos processos de conversão do analito em uma espécie detectável por métodos ópticos e eletroquímicos. Essa modificação consiste no acoplamento de um reator contendo reagentes sólidos imobilizados em um dado ponto do sistema em fluxo contínuo com a finalidade de possibilitar reações na interface sólido-solução. Quando a amostra passa através do reator em fase sólida, o analito reage com o reagente sólido imobilizado, sendo convertido na espécie detectável que é conduzida para o detector.

O confinamento de reagentes em um reator em fase sólida pode ser alcançado pela utilização direta de reagentes insolúveis nas soluções que fluem através do reator, denominada imobilização natural, ou pela retenção dos reagentes em suportes sólidos através de um mecanismo físico ou químico⁷.

Na imobilização natural, reagentes sólidos pouco solúveis (sais, óxidos, metais, amálgamas), resinas de troca iônica, adsorventes e enzimas em seus ambientes naturais (células, tecidos, bactérias) são confinados em colunas e acopladas diretamente nos sistemas FIA.

A imobilização em suportes sólidos envolve o aprisionamento do reagente em polímeros, confinamento em membranas microporosas, ligação eletrostática em resinas de troca-iônica, ligação covalente sobre carbono, adsorção em suportes como sílica e alumina, entre outros¹¹.

A razão do emprego de reagentes sólidos ao invés de soluções pode ser justificada por algumas vantagens oferecidas pelo acoplamento de reatores em fase sólida em sistemas FIA. Entre essas vantagens, destacam-se¹¹:

a) aumento do sinal analítico e da sensibilidade, como resultado da diminuição da dispersão da amostra, pois a transferência de massa radial em um reator de fase sólida é mais intensa e também a espécie de interesse que passa pelo reator (analito ou reagente) é convertida mais prontamente em um determinado ponto do sistema;

b) simplificação do sistema, uma vez que dispensa um canal adicional que deveria conduzir a solução do reagente;

c) economia de reagentes, como consequência das pequenas quantidades requeridas de reagentes sólidos e,

d) em alguns casos, eliminação de interferência no detector, uma vez que esse é consumido estequiometricamente na interface sólido-solução. Ademais, o

emprego de reatores em fase sólida, permite superar as limitações como quando o reagente não existe na forma solúvel.

Na configuração do sistema em fluxo contendo um reator de fase sólida, a localização e as dimensões do reator dependem do propósito e da sua função no processo analítico (Figura 2.6). Funções estas que podem ser: (a) pré-tratamento da amostra antes da inserção no percurso analítico, (b) pré-tratamento de reagente, (c) conversão da amostra (reator na alça de amostragem), (d) conversão de amostra (reator entre o injetor e o detector, posição mais comum dos reatores em fase sólida) e (e) integração reação-deteção (reagente imobilizado no sistema de detecção)¹².

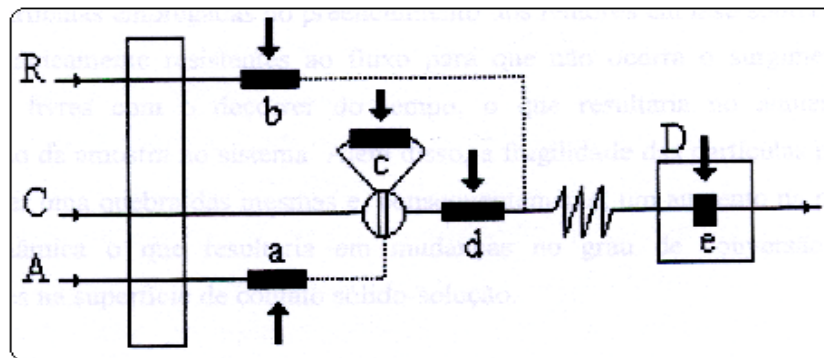


Figura 2.6: Possíveis localizações de um reator em fase sólida acoplado a um sistema FIA. R, reagente; A, amostra; C, solução carregadora e D, detector¹³.

2.2) Compostos polifenólicos

Substâncias químicas classificadas como polifenóis possuem em sua estrutura no mínimo um anel aromático com um ou mais grupos funcionais hidroxilas. Além dos grupos hidroxilas, os anéis aromáticos também podem apresentar outros grupos funcionais como ésteres, metilesteres, glicosídeos, etc¹.

Os compostos polifenólicos são amplamente distribuídos em plantas, como bioprodutos de seu metabolismo secundário. Podem ser sintetizados por duas rotas biossintéticas distintas: (a) rota do chiquimato onde originam-se os fenilpropanóis e coumarinas e (b) rota do acetato que produz as fenonas e quinonas. Os produtos dessas rotas biossintéticas elementares podem dar origem, através de rotas secundárias, a outros compostos polifenólicos, como é o caso dos flavonóides e taninos. A Figura 2.7 apresenta um diagrama esquemático das rotas biossintéticas dos compostos polifenólicos pelo metabolismo de plantas¹.

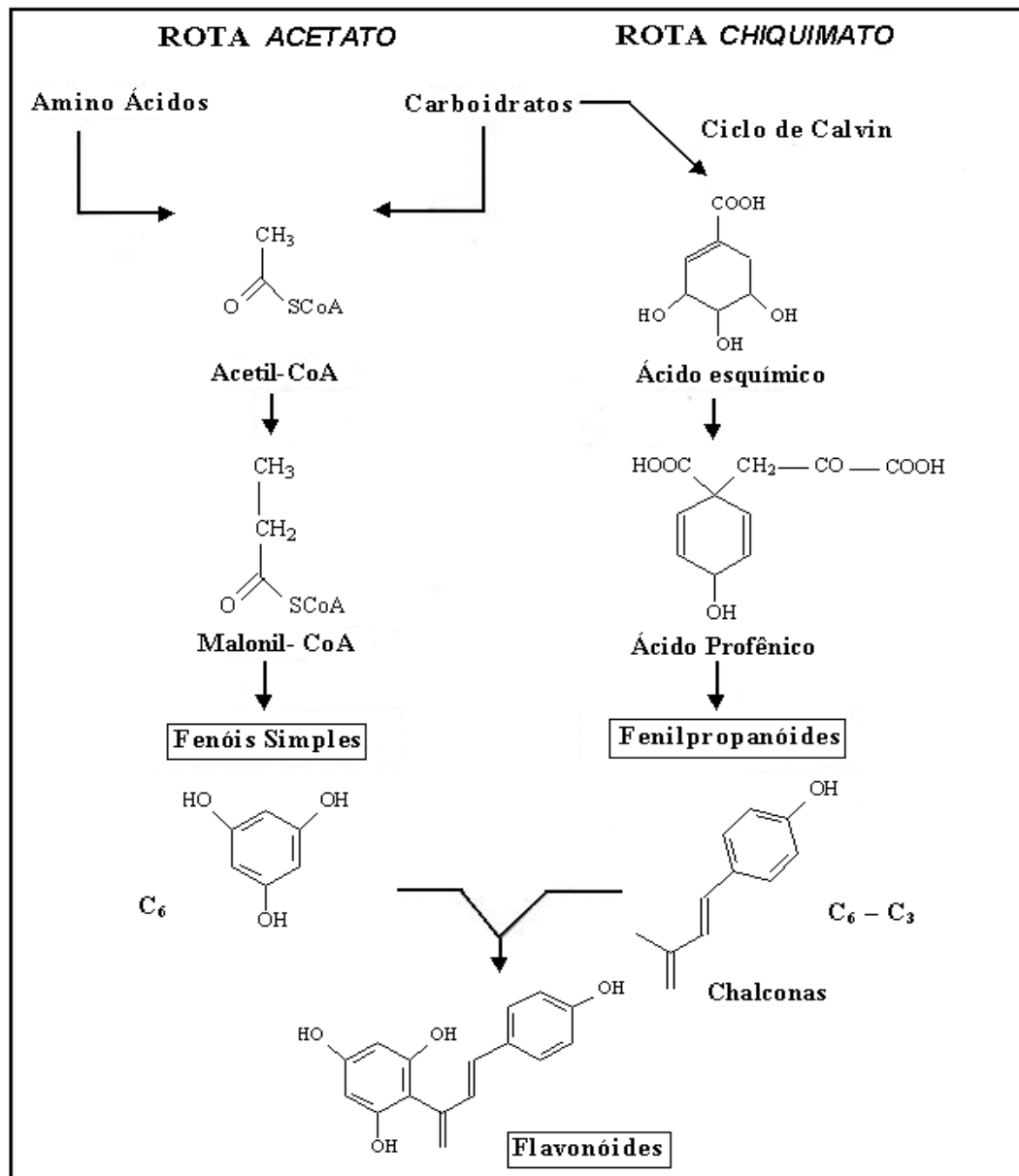


Figura 2.7 - Rotas de biossíntese de compostos polifenólicos. Os produtos de cada uma delas reagem para formar os flavonóides¹.

A natureza química dos compostos polifenólicos é bastante heterogênea, com estruturas químicas livres ou conjugadas que podem ser divididas em várias classes. Além disso, uma grande variedade de substâncias naturais, principalmente monossacarídeos como a glicose, frutose e galactose, podem formar ligações com grupos funcionais de polifenóis aumentando ainda mais sua variedade química. Essas ligações são chamadas de glicosídicas².

Considerando-se que os polifenóis estão amplamente distribuídos em plantas, é facilmente observável que essas substâncias são importante parte da dieta diária humana. O principal interesse de pesquisadores no estudo de

compostos polifenólicos está na sua capacidade antioxidante, efeitos fisiológicos causados quando ingeridos e propriedades relacionadas à qualidade de alimentos^{1,2,14}.

2.2.1) Classificação dos compostos polifenólicos

Os compostos polifenólicos constituem um grupo de substâncias com estruturas orgânicas extremamente variadas. Assim, é necessário que se estabeleça uma classificação adequada que permita diferenciá-las.

A Tabela 2.1 apresenta uma das classificações mais comuns das principais classes de polifenóis. Essa classificação é baseada na cadeia de carbonos principal que constitui o composto polifenólico. Como pode ser observado, algumas classes possuem a mesma cadeia carbônica principal e, como no caso dos flavonóides, algumas classes podem ser divididas em sub classes: flavanonas, flavonóis, antocianidinas, chalconas, flavanóis, flavonas e isoflavonas¹.

Tabela 2.1 - Classificação dos compostos polifenólicos segundo a cadeia carbônica principal.

ESTRUTURA	CLASSE POLIFENÓLICA
C_6	Fenóis
C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzóicos
C_6-C_2	Acetofenonas e Ácidos fenilacéticos
C_6-C_3	Ácidos hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas e Xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenos e Antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides: flavanonas, flavonóis, antocianidinas, chalconas, flavanóis, flavonas e isoflavonas.
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonóides
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados ou Proantocianidinas
<hr/>	
C_6	– anel benzênico

Uma classificação alternativa, divide os compostos polifenólicos em função de sua ocorrência em determinada planta. Com isso, há a possibilidade de distinção entre os polifenóis mais comuns daqueles que estão presentes em

situações esporádicas. Por exemplo, nesta classificação é possível observar que ácidos hidroxibenzóicos, hidroxicinâmicos e flavonóides são amplamente encontrados em vegetais alimentares. Ao contrário, os isoflavonóides constituem um discreto grupo de polifenóis cuja presença está confinada apenas em algumas plantas leguminosas.

Outra classificação muito utilizada está baseada na massa molar. Como mostra a Tabela 2.2, os polifenóis são divididos em três classes: de baixa, média e alta massas molares, que podem ser relacionados também com as cadeias carbônicas principais¹.

Tabela 2.2 - Classificação dos compostos polifenólicos segundo a magnitude das massas molares.

MASSA MOLAR	ESTRUTURA	CLASSE POLIFENÓLICA
Baixa	C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzóicos
	C_6-C_3	Ácidos hidroxicinâmicos
Média	$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides
Alta	$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
	$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

Como pode ser observado, ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos constituem o grupo dos compostos polifenólicos de baixa massa molecular. Os flavonóides e taninos formam o grupo dos polifenóis de massas molares intermediárias e altas, respectivamente.

2.2.2) Fenóis e Ácidos hidroxibenzóicos

Fenóis e ácidos hidroxibenzóicos são os compostos polifenólicos de estruturas mais simples, indicadas por C_6 e C_6-C_2 , respectivamente. Apesar da simplicidade estrutural, essas substâncias são as mais representativas em termos de

variedade e ocorrência. Além disso, desempenham funções biológicas vitais para as plantas como germinação de sementes e crescimento.

Entre os ácidos hidróxibenzóicos, o ácido gálico é o mais comum, aparecendo tanto na forma livre como nas estruturas dos polifenóis de alta massa molar. O ácido elágico, assim como o ácido gálico, apresenta-se também como monômero da estrutura de taninos hidrolizáveis^{1,2}. A Figura 2.8 apresenta os ácidos hidroxibenzóicos mais representativos em plantas.

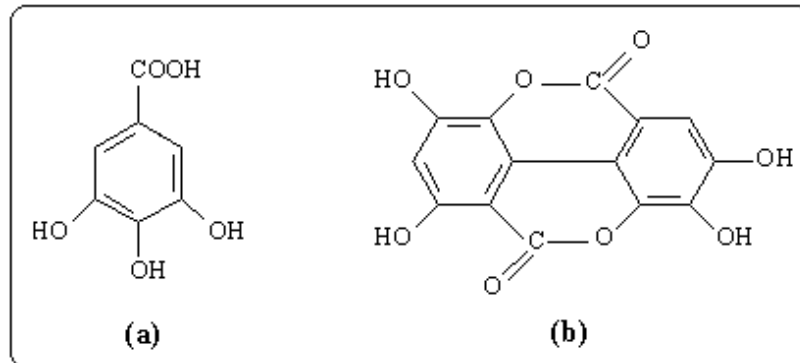


Figura 2.8 - Ácidos hidroxibenzóicos mais frequentemente encontrado nas plantas. (a) ácido gálico e (b) ácido elágico¹.

2.2.3) Ácidos hidroxicinâmicos

Estritamente relacionados, os ácidos hidroxicinâmicos são também conhecidos como fenilpropanóides. Entre eles, os mais representativos são os ácidos coumárico, cafeico, ferúlico e sinápico, os quais possuem uma estrutura básica em comum (Figura 2.9). Similarmente aos outros compostos polifenólicos, são encontrados em plantas na forma livre ou como parte da estrutura de outras substância. Um exemplo típico da importância dessas substâncias é o ácido clorogênico, amplamente empregado em alimentos^{1,2}.

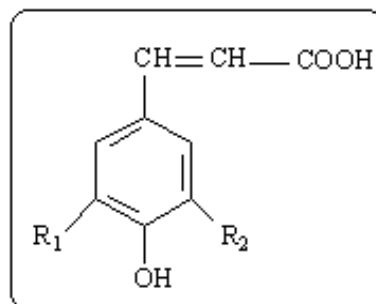


Figura 2.9 - Estrutura básica de um ácido hidroxicinâmico. Com $R_1 = R_2 = H$ para o ácido coumárico; $R_1 = OH$ e $R_2 = H$ para o ácido cafeico¹.

Funções biológicas vitais para as plantas também estão relacionadas aos ácidos hidroxicinâmicos, como inibição do crescimento e germinação, bem como atividades antibióticas^{1,2}.

2.2.4) Flavonóides

Os compostos polifenólicos denominados flavonóides são os mais comumente encontrados em produtos de origem natural. Essa classe de substâncias pode ser dividida em 5 subclasses: antocianidinas, flavonóis, flavanonas, isoflavonóides e chalconas¹⁵.

2.2.4.1) Antocianidinas

As antocianidinas são os flavonóides que conferem cor às frutas; embora em algumas delas, como o tomate a cenoura e a laranja, a cor é observada devido a presença de carotenóides. Em soluções ácidas, as antocianidinas não glicosiladas apresentam-se na forma de diferentes isômeros catiônicos.

A pigmentação das antocianidinas tem atribuído às mesmas o emprego como aditivos em sucos e geléias na indústria de alimentos.

A estabilidade das antocianidinas depende da espécie em questão, do pH (devido suas propriedades ácido-base) e a fatores físicos como suscetibilidade a oxidação e a luz. Essas características impedem que as antocianidinas sejam purificadas, restringindo suas aplicações comerciais principalmente na indústria de alimentos e de tinturas. É possível detectar diferenças quantitativas dessas substâncias em frutas de acordo com o clima, com a intensidade de luz e temperatura em que são cultivadas¹⁵. Uma das principais características dessas substâncias é que em frutas elas aparecem principalmente na forma monoglicosilada. A cianidina glicosilada é a estrutura antocianidina mais abundante em frutas. A Figura 2.10 apresenta estrutura básica de uma antocianidinas.

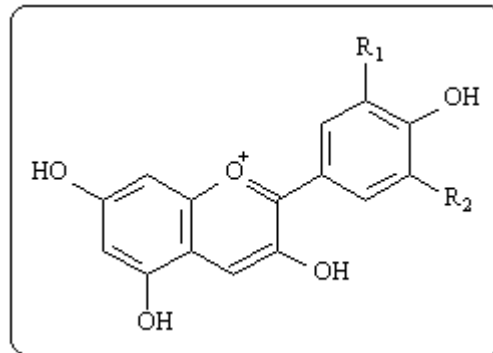


Figura 2.10 - Estrutura básica de uma antocianidina. Com $R_1 = \text{OH}$ e $R_2 = \text{H}$ para a cianidina e $R_1 = R_2 = \text{OH}$ para a delphinidina¹.

2.2.4.2) Flavonóis

Devido suas propriedades anticarcinogênicas, o interesse no estudo desses compostos está em crescimento contínuo e ocupa uma relevante posição na lista de substâncias mais intensamente investigadas.

A composição estrutural dos flavonóis depende de um grande número de fatores ambientais. Pelo menos 200 estruturas não glicosiladas já foram reportadas, entre elas, as mais comuns são a quercetina, canferol, miricetina e isoramnetina¹. Em alguns casos, os flavonóis aparecem na forma glicosilada. A Figura 2.11 apresenta as estruturas dos principais flavonóis, o caempferol e a quercetina.

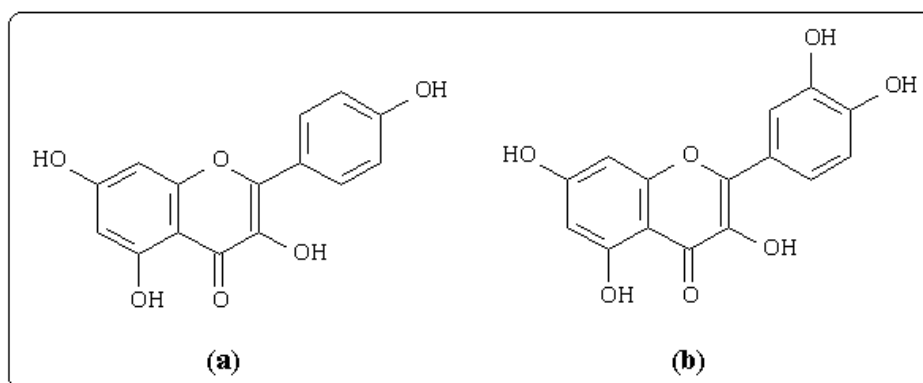


Figura 2.11 - Estruturas dos principais flavonóis: (a) canferol e (b) quercetina.

2.2.4.3) Flavanóis (flavan-3-ol)

Os compostos polifenólicos flavan-3-ol são os flavonóides mais encontrados na natureza. Com relação às estruturas, é conveniente que se faça

uma distinção entre as unidades monoméricas (+) catequinas e (-) epicatequinas, e os polímeros formados por essas estruturas^{14,15}.

Quando ocorre uma associação dimérica entre (-) epicatequinas e (+) catequinas, os compostos formados levam os nomes de B1, B2, B3, B4 procianinas. Substâncias poliméricas formadas por esses monômeros são denominados taninos condensados ou proantocianidinas. Do ponto de vista estrutural, uma das mais importantes características dos flavanóis é que, diferentemente da maioria dos flavonóides, eles não formam compostos glicosilados. A Figura 2.12 apresenta as estruturas monoméricas das (+) catequina e (-) epicatequina, bem como as estruturas oligoméricas das principais procianidinas B1, B2, B3 e B4^{1,2}.

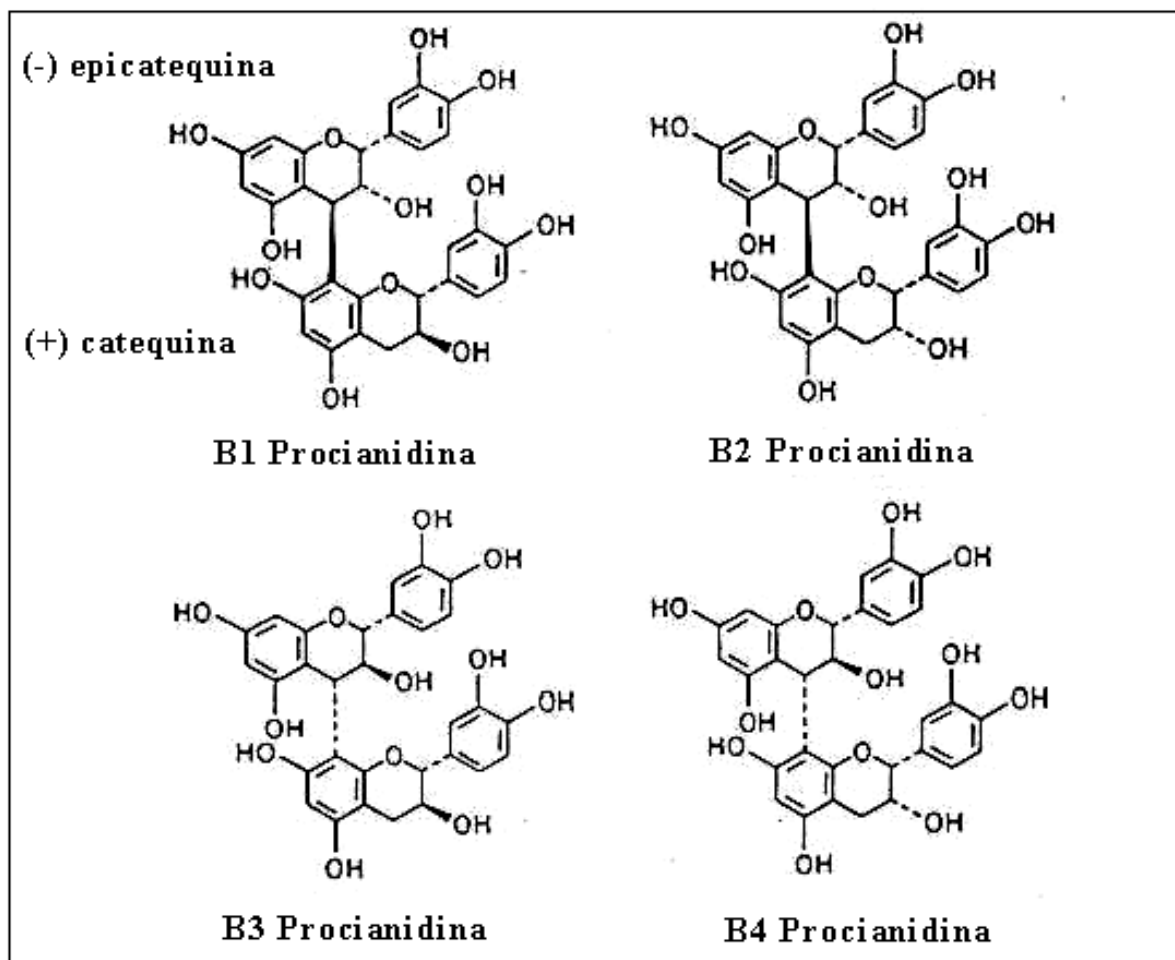


Figura 2.12 - Estruturas das principais procianidinas B1, B2, B3 e B4, formadas pela associação dimérica entre (a) (+) catequinas e (b) (-) epicatequinas¹.

2.2.4.4) Flavanonas

As flavanonas constituem um grupo minoritário dos flavonóides distribuídos em vegetais, exceto em frutas cítricas que é o grupo de frutas que eles constituem a maior parte dos polifenóis. Entre as flavanonas glicosiladas, a hesperidina, naringina e a narirutina são as mais comuns.

Enquanto em frutas cítricas as flavanonas estão presentes fundamentalmente na forma não glicosilada, em outras plantas prevalecem as estruturas glicosiladas com açúcares mono e dissacarídeos. A Figura 2.13 apresenta as estruturas das flavanonas hesperidina e naringina, ambas glicosiladas¹.

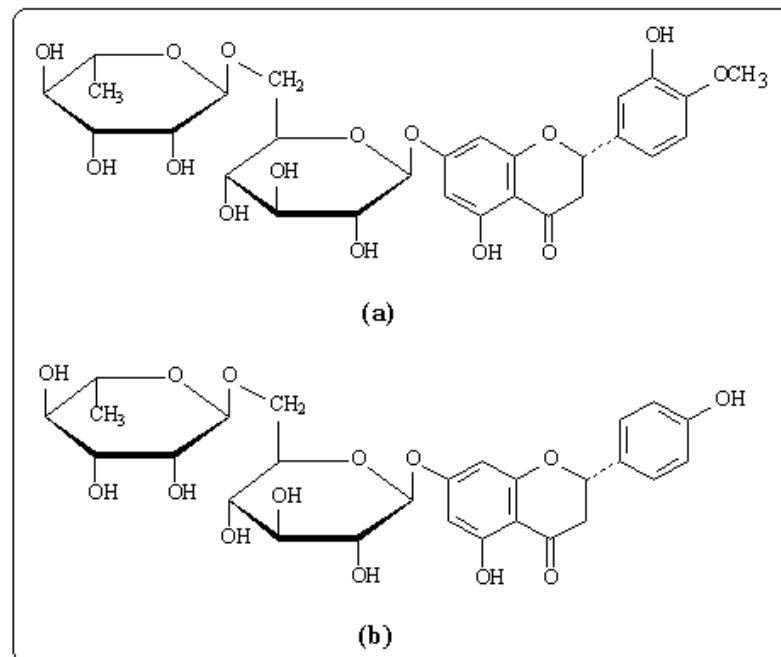


Figura 2.13 - Estruturas das flavanonas mais comuns encontradas em plantas. (a) hesperidina glicosilada e (b) naringina glicosilada¹.

2.2.4.5) Flavonas e isoflavonóides

As flavonas constituem a última classe em representação dos flavonóides em alimentos. Entre os não glicosilados a apigenina e a luteolina, que estão apresentados na Figura 2.14, são os mais comuns¹.

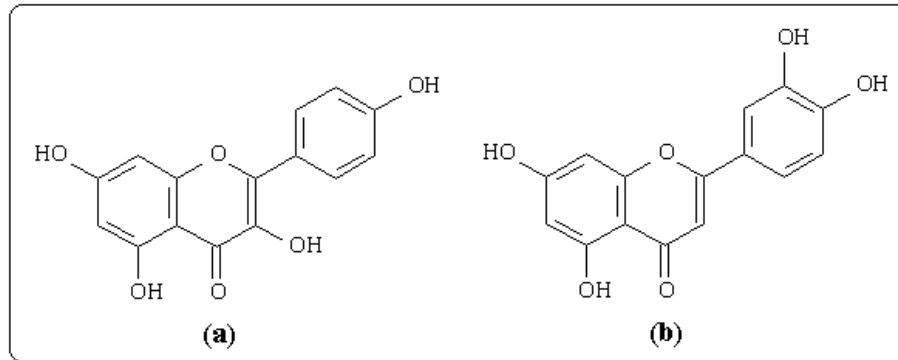


Figura 2.14 - Estruturas das flavonas mais comuns encontradas em plantas. (a) apigenina e (b) luteolina¹.

Com relação aos isoflavonóides, assim como as flavanonas e flavonas, constituem a minoria dos compostos polifenóis flavonóides. Os isoflavonóides aparecem mais em plantas leguminosas. Entre os não glicosilados a formononetina e a genisteína são os mais comuns (Figura 2.15)¹.

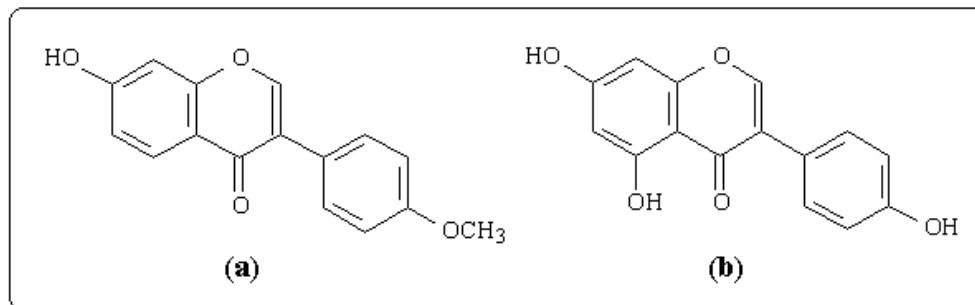


Figura 2.15 - Estruturas dos isoflavonóides mais comuns encontradas em plantas. (a) formononetina e (b) genisteína.

Assim como a maioria dos flavonóides, as flavonas e isoflavonóides podem aparecer tanto na forma glicosilada como na forma não glicosilada¹.

2.2.5) Taninos

Compostos polifenólicos de massa molar entre 500 e 3000 g mol⁻¹, que ocorrem naturalmente em vegetais superiores, são coletivamente conhecidos como taninos. Os taninos são compostos hidrossolúveis que podem, de acordo com a estrutura, ser divididos em dois grandes grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados^{1,2,16,17}.

Os taninos hidrolisáveis possuem um grupo carboidrato, geralmente D-glicose, no centro de sua estrutura. Os radicais hidroxilas do carboidrato

apresentam-se parcial ou totalmente esterificados com ácidos hidroxibenzoicos². A Figura 2.16 apresenta o ácido gálico e o tanino hidrolisável formado por monômeros do ácido gálico: o galotanino.

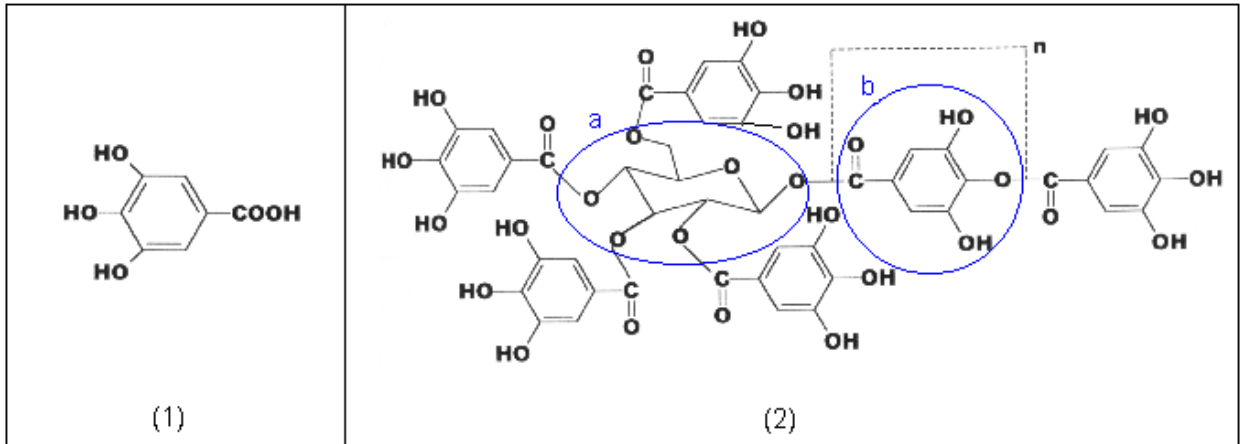


Figura 2.16 - Estrutura de um (1) ácido fenolcarboxílico: ácido gálico e (2) de seu tanino hidrolisável: o galotanino: (a) carboidrato e (b) monômero do ácido gálico esterificado¹⁷.

Os taninos hidrolisáveis sofrem hidrólise ácida, alcalina ou enzimática, liberando seus compostos precursores.

Os taninos condensados ou proantocianidinas são polímeros de unidades flavonóides do tipo flavona-3-ol ((+) catequinas e (-) epicatequinas), unidas por ligações carbono-carbono (Figura 2.17), as quais não são susceptíveis à clivagem por hidrólise. Esses compostos podem conter de duas a cinquenta unidades flavonóides^{2,18}.

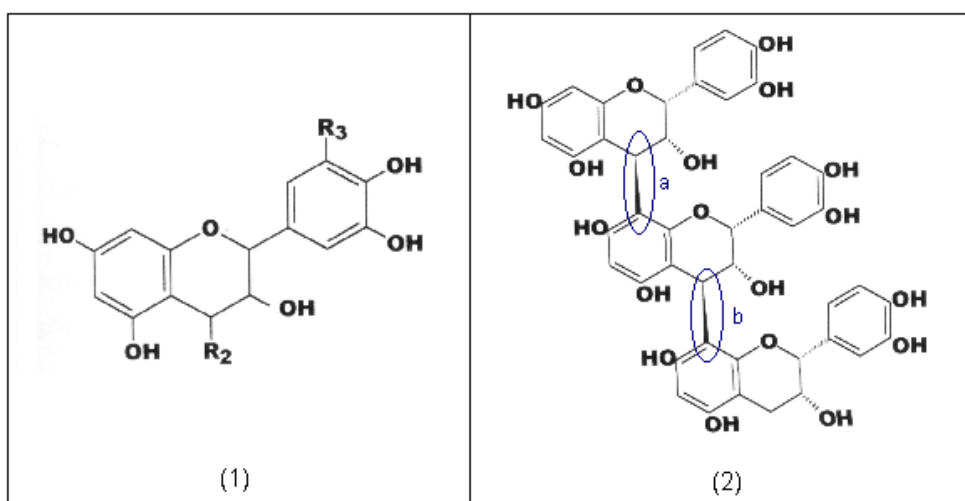


Figura 2.17 - Estrutura da (1) flavona-3-ol e de um (2)tanino condensado: (a) e (b) ligações carbono-carbono que unem as estruturas das flavona-3-ol para formar o tanino condensado¹⁷.

A principal característica dos taninos é sua alta capacidade de associação com proteínas e carboidratos. Baseada nesta característica, eles possuem qualidades antinutrientes e são responsáveis pelo sabor adstringente dos alimentos¹⁶.

2.2.6) Propriedades dos compostos polifenólicos

Com relação ao metabolismo das plantas, os compostos polifenólicos são responsáveis pelo crescimento e germinação, além de protegê-las contra infecções e agressões de outros microorganismos presentes no meio ambiente. Ademais, servem como filtros de radiação UV, fundamentais em regiões com altas doses dessa radiação. Diante disso, essas substâncias são fundamentais ao ciclo de vida das plantas¹⁹.

Compostos polifenólicos são poderosos antioxidantes, interceptores de radicais livres, agentes complexantes de metais e inibidores da peroxidação de lipídios. Com isso, esses compostos exibem determinadas propriedades relacionadas a prevenção de oxidações, inflamações, alergias e câncer. Alguns deles reduzem a pressão arterial e regulam o ritmo cardíaco. Efeito que pode ser facilmente explicado pelo fato dos polifenóis, especialmente flavonóides altamente oxidantes, protegerem o revestimento interno proteína-lipídio das artérias. Consequentemente, evitam o princípio da arteriosclerose facilitando o relaxamento do músculo cardíaco, diminuindo os batimentos e a pressão arterial^{19,20}.

Várias pesquisas sugerem a ação direta de radicais livres no surgimento de doenças cancerígenas. Pela sua capacidade de captar radicais livres, polifenóis podem prevenir o avanço e surgimento dessa doença degenerativa.

As propriedades fisiológicas dos compostos polifenólicos, estão relacionadas a presença de grupos hidroxilas que permitem a associação com proteínas e carboidratos, reduzindo a disponibilidade de macronutrientes da alimentação. A solubilidade dessas substâncias é o que determinará seus efeitos fisiológicos. Polifenóis solúveis são absorvidos e metabolizados pelo trato gastrointestinal, enquanto que os insolúveis são simplesmente excretados^{16,19}.

A ampla variedade química dos polifenóis, permite que sejam relacionados a taxonomia das plantas. Assim, variedades de uma mesma espécie de

frutas podem ser agrupadas de acordo com a presença ou ausência de determinados polifenóis. Por exemplo, algumas variedades de uvas da espécie *vitis vinifera* são classificadas em dois grandes grupos pela ausência ou presença de antocianidinas metiladas. Outra aplicação dessa propriedade dos polifenóis é no controle de qualidade de produtos. A composição de flavonóis em sucos de laranja indicam possíveis adulterações com adição de outras espécies de frutas.

Quanto à qualidade de frutas, vinhos, cervejas e chás, os polifenóis desempenham um papel fundamental na cor e aroma. O sabor adstringente desses produtos está relacionada a interação das proteínas digestivas com polifenóis, principalmente taninos. Vinhos com altos teores de taninos podem ser indícios de que são provenientes de uvas mal separadas de seus caules. Portanto, a avaliação do índice de polifenóis é extremamente importante para avaliação da qualidade desses produtos^{1,2,19}.

2.3) Métodos para determinação de polifenóis

Vários métodos analíticos empregados para determinação de polifenóis estão descritos na literatura^{5,21-46}.

Os métodos cromatográficos e eletroforéticos, por serem mais seletivos, permitem separar e quantificar individual ou simultaneamente cada um dos compostos polifenólicos presentes na amostra. Portanto, é possível determinar se uma, entre as várias classes dessas substâncias, é mais representativa que outra.

Com relação aos métodos espectrofotométricos, que geralmente empregam reações de oxidação, não há possibilidade de quantificar classes desses compostos. Esses procedimentos, incluindo o método oficial proposto pela AOAC, são vastamente empregados em laboratórios de controle de qualidade para determinar polifenóis totais presentes, principalmente em amostras de interesse alimentício^{21,22}.

A literatura é controversa com relação a seletividade dos métodos colorimétricos empregados para determinação de polifenóis totais. Por exemplo, Martins et al²³ e Cerdá et al²⁴ publicaram trabalhos que empregam praticamente as mesmas condições de análises (oxidação com reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico). Entretanto, Martins et al descrevem o procedimento como determinação de

taninos totais e Cerdá et al como determinação de polifenóis totais. Compostos tanínicos representam somente uma das várias classes de polifenóis.

2.3.1) Métodos espectrofotométricos

A AOAC⁵ indica um procedimento espectrofotométrico para determinação de polifenóis totais empregando oxidação com reagente de Folin-Ciocalteu. O reagente de Folin-Ciocalteu é basicamente uma mistura de óxido de molibdênio (MoO_3), tungstato de sódio (Na_2WO_4) e ácido fosfórico (H_3PO_4) que pode ser preparado ou adquirido comercialmente. O mecanismo da reação de oxidação entre os compostos polifenólicos e o reagente de Folin-Ciocalteu não é totalmente entendido. O cromóforo produzido é um complexo fosfomolibdênico-fosfotunguístico² quantificado em 670 nm. A reação é feita em meio básico e necessita de 30 minutos para se completar. Este procedimento permite quantificar polifenóis em uma faixa linear de 2,6 a 26 mg L^{-1} .

MARTINS et al²³ automatizaram o método oficial da AOAC em um sistema de análise por injeção em fluxo com detecção espectrofotométrica. Neste sistema, volumes de 200 μL das amostras de efluentes industriais contendo taninos foram injetados em um fluxo transportador de água deionizada. Em seguida, a zona de amostra recebe por confluência a solução do reagente de Folin-Ciocalteu em fluxo intermitente e uma solução de hidróxido de sódio 2% (m/v). O cromóforo formado foi monitorado em 670 nm, obtendo-se uma curva analítica com faixa linear de concentrações entre 5,0 e 100 mg L^{-1} para padrões de ácido tânico com desvios padrões relativos menores que 3% e frequência analítica de 250 determinações por hora.

CERDÀ et al²⁴ também automatizaram o método da AOAC determinando em fluxo polifenóis totais em amostras de vinhos. Nesse caso, volumes de 100 μL das amostras foram injetados no fluxo transportador de água deionizada. Durante o transporte até a unidade de detecção a amostra recebe por confluências o reagente de Folin-Ciocalteu e solução de hidróxido de sódio 0,5 mol L^{-1} . A curva analítica foi linear no intervalo de concentrações de 5,0 a 100 mg L^{-1} quando empregados padrões de ácido gálico e 12,5 a 150 mg L^{-1} quando empregados padrões de ácido tânico. A frequência analítica foi de 60 determinações por hora com desvios padrões relativos menores que 0,8%.

HUANG et al²⁵ desenvolveram um método analítico para determinação do índice total de taninos em chás e cervejas empregando reação com ferro(III). Após 20 minutos de reação em uma temperatura de 80°C, o ferro(II) formado na reação de oxi-redução foi quantificado espectrofotometricamente em 540 nm empregando reação com 1,10-fenantrolina em pH 4,5. O método apresentou curva analítica linear em uma faixa de concentrações entre 0,5 e 5,5 mg L⁻¹ e precisão de 1,8%.

AMIN²⁶ propôs uma metodologia espectrofotométrica baseada na oxidação de polifenóis com azul de tetrazolim em meio alcalino. O procedimento emprega temperatura de 90 °C com um tempo de reação de 15 minutos. O cromóforo formado foi monitorado em 527 nm, obtendo-se uma curva analítica com faixa linear de concentrações entre 0,2 e 9,0 mg L⁻¹. A precisão do método foi de 1,65%. Várias amostras de chás foram analisadas e os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método oficial da AOAC.

VALCÁRCEL et al²⁷ desenvolveram um método indireto em fluxo com detecção por espectrometria de absorção atômica em chama para a determinação do índice total de taninos em vinhos e chás. Compostos polifenólicos são precipitados com Cu(II) em meio de acetato de amônio 0,1 mol L⁻¹ em pH 5,2, e o Cu(II) em excesso determinado por espectrometria de absorção atômica. A Figura 2.18 apresenta o diagrama esquemático do sistema em fluxo empregado.

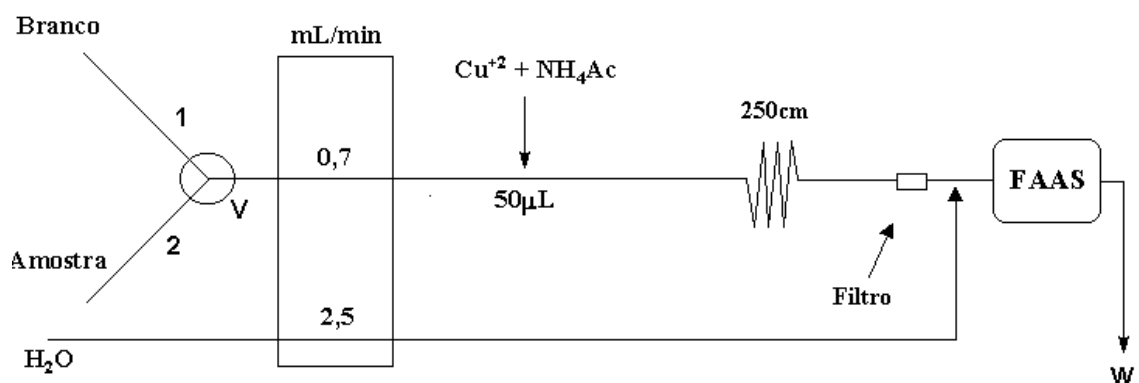


Figura 2.18 – Diagrama esquemático do sistema FIA empregado por Valcárcel et al para determinação de taninos em amostras de chás.

Neste sistema, o fluxo transportador é constituído pela própria solução da amostra ou pela solução empregada para o registro do branco. Quando a válvula V está com o canal 1 aberto, água deionizada flui pelo sistema e um volume de 50 µL de solução contendo Cu²⁺ 200 µg mL⁻¹ e acetato de amônio 0,10 mol L⁻¹ é

injetado nesse fluxo. A absorção é medida e, descontada daquela obtida quando essa mesma análise é feita com o canal 2 da válvula aberta, quando flui a amostra pelo sistema, é proporcional a concentração de taninos nas amostras. Um filtro constituído por fase estacionária de coluna de HPLC foi adaptado ao sistema para que o precipitado formado ficasse retido no mesmo. O método apresentou curva analítica linear em uma faixa de concentrações entre 1,0 e 25 mg L⁻¹, precisão de 2,0% e frequência analítica de 80 determinações por hora. O método foi aplicado na determinação de polifenóis em várias amostras de chás e vinhos, com os resultados comparados àqueles obtidos empregando-se o método oficial da AOAC. Os erros relativos entre o método proposto e o método oficial foram negativos em todas as amostras.

2.3.2) Métodos fluorimétricos

FENG et al²⁸ descreveram um método para a determinação de taninos em chás com detecção fluorimétrica. Esta metodologia baseia-se no efeito de ativação dos compostos polifenólicos na oxidação da rodamina 6G (Rh 6G) por peróxido de hidrogênio catalisada por Cu(II). A reação é desenvolvida em temperatura de 80 °C com tempo de 10 minutos, em tampão Britton-Robinson pH 2,0. A intensidade de fluorescência foi obtida contra um branco apropriado no λ_{exc} de 348,9 nm e λ_{emiss} de 549,2 nm. A curva analítica foi linear em um intervalo de concentrações de 0,08 a 1,28 mg L⁻¹, com limite de detecção de 0,045 mg L⁻¹. O desvio padrão relativo para 11 determinações em solução de ácido tânico 0,40 mol L⁻¹ foi de 0,96 %.

2.3.3) Métodos quimioluminescentes

MENG et al²⁹ propuseram um método de análises por injeção em fluxo com detecção quimioluminescente para determinação de ácido tânico em chás. Esse procedimento, envolve a inibição da quimioluminescência do sistema luminol-H₂O₂-Cu²⁺ pelo ácido tânico. A amostra é injetada, em volumes de 100 µL, em uma solução transportadora contendo Cu²⁺ 1,0 x 10⁻⁵ mol L⁻¹. No próprio sistema, antes da zona de amostra, ocorre a mistura através de confluência de uma solução contendo luminol 8,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (preparada em tampão NaHCO₃ – Na₂CO₃ pH

12) e uma solução de H_2O_2 $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$. Em seguida, essa mistura é inserida na zona de amostra e a medida é feita em 425 nm. A curva analítica foi linear em um intervalo de concentrações de 0,12 a 17 mg L^{-1} de ácido tânico. Desvios padrões de 2,5% foram obtidos para 7 determinações em solução de ácido tânico $1,0 \text{ mg L}^{-1}$. A frequência analítica não foi informada.

2.3.4) Métodos cromatográficos

ACHILLI et al³⁰ descreveram um método de identificação e determinação de compostos polifenólicos em vinhos e extratos de plantas, empregando cromatografia líquida com detecção coulométrica. Neste procedimento, utilizou-se uma coluna cromatográfica de fase reversa e fase móvel contendo $35 \mu \text{ mol L}^{-1}$ de dodecil sulfato de sódio e $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ de fosfato de sódio monobásico em uma mistura de 50% metanol / água. O sistema de detecção consistiu em quatro células coulométricas dispostas em série, cada uma contendo quatro eletrodos de trabalho de grafite poroso, um eletrodo de referência de paládio e um contra eletrodo de platina. Com apenas uma injeção ($10 \mu\text{L}$) foi possível identificar e determinar 36 diferentes compostos polifenólicos em 30 minutos de análise, com desvios padrões relativos menores que 1,6%. A faixa linear de concentrações para determinação dos compostos não foi informada. Para avaliação dos tempos de retenção, foram injetados os padrões em concentrações na ordem de 10^{-4} g L^{-1} .

ZHAO et al³¹ quantificaram compostos polifenólicos em extratos vegetais empregando cromatografia líquida em fase-reversa. Neste sistema, foi utilizada detecção quimioluminescente baseada na inibição da quimioluminescência do sistema luminol-hexacianoferrato(III) pelos polifenóis. A separação foi feita em coluna de fase-reversa C_{18} com fase móvel em gradientes de concentrações de ácido fosfórico dissolvido em metanol. Em condições ótimas de análises foram obtidos limites de detecção variando entre $6,8 \times 10^{-7}$ a $2,0 \times 10^{-9} \text{ g mL}^{-1}$.

2.3.5) Métodos eletroforéticos

ARCE et al³² propuseram um método para determinação simultânea de 11 diferentes polifenóis, em amostras de chás, empregando eletroforese capilar (CE) com detector de arranjo de diodos. A separação foi feita utilizando-se uma coluna capilar ($57 \text{ cm} \times 75 \mu\text{m}$ I.D.) de sílica fundida com solução de ácido bórico $0,15 \text{ mol}$

L⁻¹ pH 8,5 (ajustado com NaOH) como tampão carregador. As análises foram feitas após extração, filtração e diluição dos analitos empregando-se um sistema FIA acoplado ao equipamento de eletroforese capilar. Os tempos de análises foram menores que 20 minutos com limites de detecção variando entre 0,04 µg mL⁻¹ para flavonóides e 1,2 µg mL⁻¹ para o ácido gálico.

2.3.6) Métodos voltamétricos

MELLO et al³³ desenvolveram um biossensor amperométrico de pasta de carbono para determinação de polifenóis em extratos vegetais. Para preparação do biossensor, primeiramente foram imobilizados, em 25 mg de um compósito de sílica-titânio, 0,1 mg de DNA e 200 µL de uma solução 1 mg mL⁻¹ de polifenoloxidase. Essa imobilização foi feita empregando adsorção e ligação cruzada usando 5µL de uma solução de glutaraldeído 5% (m/v). Após isso, essa mistura foi seca a temperatura ambiente e homogeneizada com 25 mg de grafite e 25 µL de óleo mineral. Essa pasta foi colocada na cavidade de 1mm entre as paredes de um tubo de vidro selado na extremidade com um disco de platina. Em condições ótimas, o biossensor apresentou curva analítica em um intervalo de concentração de ácido clorogênico de 1 a 5 µmol L⁻¹ com desvios padrões relativos de menores que 5,6% (n = 10). O biossensor apresentou um bom tempo de vida com queda de 50% no sinal após 100 determinações. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se o método de Folin-Ciocalteu.

2.4) Justificativa

Como apresentado anteriormente, a principal razão em estudar os compostos polifenólicos está em sua importância biológica como metabólito secundário de plantas, capacidade antioxidante, atividade anticarcinógena, efeitos fisiológicos, e suas propriedades relacionadas à qualidade de alimentos, principalmente em bebidas como sucos, vinhos e chás.

O chá é uma das bebidas mais populares do mundo, que pode ser consumida na forma natural (chá verde) ou fermentada (chá preto ou marrom). Há tempos em que a avaliação da qualidade de chás tem sido feita mundialmente por degustadores profissionais. Por um longo período, tem-se procurado correlacionar

suas decisões com os constituintes químicos dessas amostras. Os objetivos de uma análise química em amostras de chás está relacionada, no mínimo, a três diferentes objetivos: (a) encontrar um constituinte ou grupo de constituintes que podem medir a qualidade dos chás, (b) otimizar o seu cultivo, e (c) correlacionar os constituintes do mesmo com efeitos causados na saúde humana. Juntamente a outras substâncias como alcalóides, aminoácidos e vitaminas, polifenóis são talvez os mais importantes constituintes dessas amostras, em termos de ocorrência e concentração.

O método ideal para estimar a quantidade de polifenóis totais pode ser aquele que os determina simultaneamente ou separadamente. Nos métodos que analisam separadamente, há um alto consumo de tempo no preparo das amostras e, muitas vezes, como se trata de um número grande de compostos, não é possível e nem necessário realizá-lo. Um conhecimento geral da quantidade total de polifenóis contidos em chás, expressos como um valor numérico, provém uma informação suficiente para seu controle de qualidade. Os métodos empregados para esse propósito devem ser reprodutíveis e devem quantificar todos os tipos de polifenóis.

Diante disso, nesse trabalho de mestrado, desenvolveu-se três métodos para determinação de polifenóis totais em amostras de interesse. Os resultados obtidos indicaram que os métodos propostos são precisos, simples, rápidos, empregam reagentes e equipamentos de baixo custo e, portanto, podem ser facilmente empregados em laboratórios de rotina como alternativos ao método oficial da AOAC para a determinação de polifenóis totais.

Capítulo III
Parte Experimental

3) PARTE EXPERIMENTAL

3.1) Equipamentos

Nos sistemas de análise por injeção em fluxo (FIA) desenvolvidos nesse trabalho, utilizaram-se uma bomba peristáltica Ismatec de 12 canais, modelo 7618-50, com tubos de propulsão de Tygon® de diferentes diâmetros internos, tubos de condução de polietileno de 0,8 mm de diâmetro interno e conectores de acrílico. Para introdução de soluções de referência, de amostras e de reagentes nos sistemas FIA, foi utilizado um injetor comutador⁴⁷ duplo manual construído em acrílico. As medidas de absorvância foram obtidas utilizando-se um espectrofotômetro de feixe simples Femto, modelo 435 equipado com célula espectrofotométrica com caminho ótico de 1,0 cm, acoplado a um registrador x-t, de dois canais da Cole Parmer, modelo 1202.000.

As medidas espectrofotométricas, quando não realizadas nos sistemas FIA, foram feitas em um espectrofotômetro com arranjo linear de diodos da Hewlett Packard, modelo 8452A, com uma cubeta de quartzo de 1,0 cm de caminho óptico, acoplado a um microcomputador Vectra 286/12.

As medidas de pH das soluções foram feitas com um pHmetro da Orion, modelo EA 940, dispondo-se de um eletrodo de vidro combinado Analion, modelo V 620, com um eletrodo de referência interno de Ag/AgCl, contendo solução de KCl 3,0 mol L⁻¹.

3.2) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadado (VO₃⁻), utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes.

3.2.1) Reagentes e soluções

As soluções estoque de ácido tânico (MM = 1701,23 g mol⁻¹) 1,0 x 10⁻³ mol L⁻¹ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 170 mg do composto (Aldrich) em 100 mL de água deionizada. As soluções de referência com concentrações entre 2,1 x 10⁻⁵ mol L⁻¹ e 3,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ foram preparadas por diluições das soluções estoque com água deionizada. Todas as

soluções foram preparadas imediatamente antes das análises com o propósito de evitar degradações.

As soluções de metavanadato de amônio (NH_4VO_3 , $\text{MM} = 116,97 \text{ g mol}^{-1}$) $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de cerca de 2,9 g do composto em 250 mL de água deionizada. Para isso, houve a necessidade de aquecimento da água pela baixa solubilidade do composto.

As soluções de tampão fosfato com concentração analítica $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas de 13,6 g de hidrogênio fosfato de potássio anidro (KH_2PO_4) em 500 mL água deionizada.

As soluções de tampão acetato com concentração analítica $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) foram preparadas misturando-se 100 mL de solução de acetato de sódio $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ com 400 mL de solução aquosa de ácido acético $0,2 \text{ mol L}^{-1}$.

As soluções de tampão McIlvaine com concentração analítica $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 4,0) foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 6,6 g de hidrogênio fosfato de sódio anidro (Na_2HPO_4) e 5,4 g de citrato de sódio anidro ($\text{H}_3\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) em 500 mL de água destilada.

3.2.2) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo

A Figura 3.1 apresenta o diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes utilizado para a determinação de polifenóis.

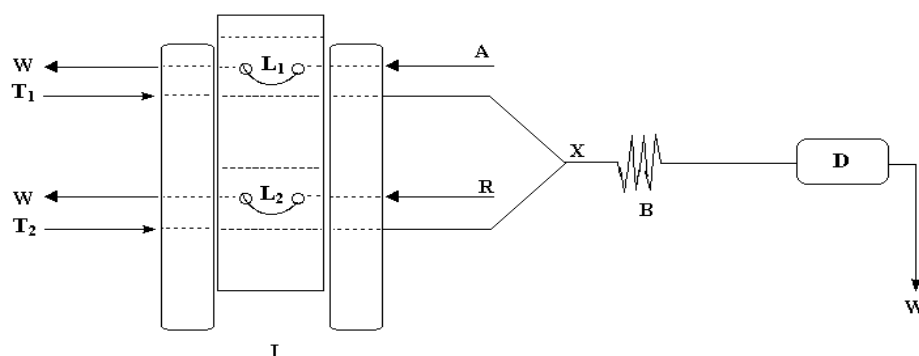


Figura 3.1 - Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação espectrofotométrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (100 cm; 500 μL) de A, soluções de referência e amostras; L₂, alça do reagente R (100 cm; 500 μL), NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$; T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazões individuais de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$; B, reator helicoidal (100 cm); X, ponto de confluência; D, detector espectrofotométrico em 585 nm e W, descarte.

Neste sistema, quando o injetor está na posição de injeção, a amostra na alça L₁ (500 µL) e o reagente (NH₄VO₃ 0,10 mol L⁻¹) na alça L₂ (500 µL) são injetados nos respectivos transportadores individuais T₁ e T₂ (água deionizada, ambos a vazão de 2,6 mL min⁻¹). As zonas de amostra e reagente percorrem distâncias iguais até se encontrarem no ponto de confluência X, ocorrendo a reação química no reator helicoidal B (100 cm) sendo o cromóforo formado monitorado espectrofotometricamente em 585 nm.

3.2.3) Preparo das amostras e determinação de polifenóis

Amostras de chá verde (*camellia sinensis*), chá preto (*camellia sinensis*) e chá mate (*ilex paraguariensis*) da marca Leão[®] foram adquiridas no comércio e analisadas.

Foram misturados e pesados o conteúdo de dez saquinhos de cada amostra. Para infusão das amostras de chás, quantidades acuradamente pesadas em torno de 1,5 g de cada amostra foram transferidas para frascos de béquer, tampados com vidro de relógio, contendo 50 mL de água em ebulição, e deixados durante 10 minutos. Após resfriamento da mistura, filtrou-se a vácuo e o volume completado para 100 mL com água deionizada.

Para a análise por adição de padrões, alíquotas de 500 µL foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL contendo soluções de referência de ácido tânico e o volume completado com água deionizada.

3.2.4) Método comparativo

Os resultados obtidos empregando-se o procedimento proposto foram comparados com os resultados obtidos empregando-se a metodologia indicada nos métodos oficiais da AOAC, que emprega oxidação de polifenóis com reagente de Folin-Ciocalteu em meio alcalino.

Na preparação do reagente de Folin-Ciocalteu foram misturados, em 50 mL de água deionizada, 10,038g de tungstato de sódio dihidratado (Na₂WO₄ . 2H₂O), 1,816 g de óxido de molibdênio (MoO₃) e 5 mL de ácido fosfórico concentrado (H₃PO₄). Após aquecimento da mistura em refluxo por 2 horas, completou-se o volume da solução para 100 mL⁴⁸.

A solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) foi preparada com a adição de 35 g do composto anidro em 100 mL de água. Após aquecimento em 70 – 80 °C e resfriamento a temperatura ambiente, filtrou-se os cristais remanescentes com papel de filtro.

Para obtenção da curva analítica, alíquotas de 250 a 2500 μL de solução de referência de ácido tânico $6,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ (102 mg L^{-1}) foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL contendo 1250 μL de reagente de Folin-Ciocalteu e 2,5 mL de carbonato de sódio saturado. Completou-se o volume com água deionizada e após 30 minutos de reação mediu-se absorvância em 760 nm.

Alíquotas de 100 a 200 μL das amostras de chá, preparadas como descrito anteriormente, foram analisadas empregando-se as mesmas condições experimentais empregadas para as soluções de referência de ácido tânico. O teor total de polifenóis foi calculado utilizando a curva analítica.

3.3) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado contendo metavanadato de prata (AgVO_3) imobilizado.

3.3.1) Reagentes e soluções

As soluções estoque de ácido tânico ($\text{MM} = 1701,23 \text{ g mol}^{-1}$) $2,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 340 mg do composto (Aldrich) em 100 mL de água deionizada. As soluções de referência com concentrações entre $5,0 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$ e $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por diluições da solução estoque com água deionizada. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes das análises, com o propósito de evitar degradações.

A imobilização do AgVO_3 foi feita utilizando-se uma solução de resina de poliéster (Resapol T-208, Resana) e solução de peróxido de metilcetona (Iberê, Ramires & Cia) como catalisador.

3.3.2) Preparação e imobilização do AgVO_3

O metavanadato de prata (AgVO_3) foi preparado dissolvendo-se, primeiramente, 3,4306 g de metavanadato de amônio (NH_4VO_3) em 600 mL de água deionizada sob aquecimento. Após resfriamento dessa solução a temperatura ambiente, foram adicionados sob agitação 20 mL de solução aquosa de nitrato de prata $1,5 \text{ mol L}^{-1}$ previamente preparada pela dissolução de 5,0306 g do composto (Synth) em água deionizada. O sólido laranja de AgVO_3 obtido foi filtrado, lavado e seco a temperatura ambiente em dessecador contendo sílica gel.

Diversas proporções m/m de resina poliéster e AgVO_3 foram misturadas em frascos de polietileno. Após homogeneização manual, cerca de duas gotas do catalisador (peróxido de metiletilcetona) foram adicionados. A mistura foi deixada à temperatura ambiente por dois dias e o sólido rígido obtido foi triturado em um moinho. Separou-se o material triturado em peneiras de granulometrias conhecidas.

As proporções m/m de resina poliéster e AgVO_3 estudadas foram de 1:2, 1:3 e 1:4. Estudou-se o efeito do tamanho das partículas do reator em faixas de 100-250 μm , 250-350 μm e 350-500 μm .

3.3.3) Preparo do reator em fase sólida

As partículas de AgVO_3 imobilizadas em resina de poliéster com as diferentes granulometrias foram introduzidas por aspiração, com o auxílio de uma seringa, em tubos de vidro de diferentes comprimentos (diâmetros internos de 1,8 mm), vedados em uma das extremidades com lã de vidro para prevenir a saída de partículas do reator.

Estudou-se o efeito do tamanho do reator em fase sólida de comprimentos: 5, 10 e 15 cm. A Figura 3.2 apresenta esquematicamente as etapas de imobilização do AgVO_3 em resina poliéster e de preparo do reator em fase sólida.

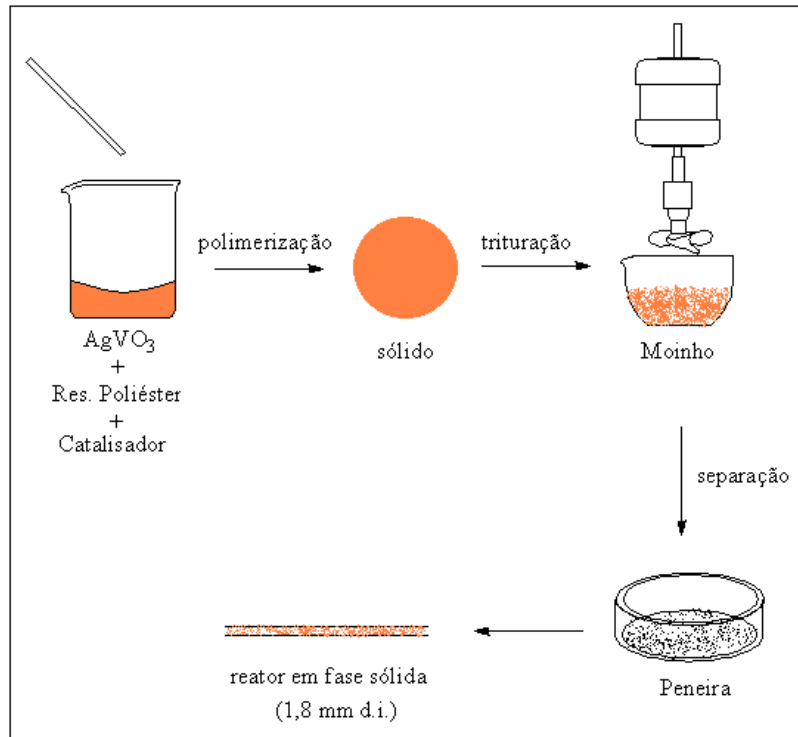


Figura 3.2 - Procedimento de imobilização do reagente AgVO_3 em resina de poliéster e preparo do reator em fase sólida.

3.3.4) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo

A Figura 3.3 apresenta o diagrama esquemático do sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado, utilizado para a determinação de polifenóis.

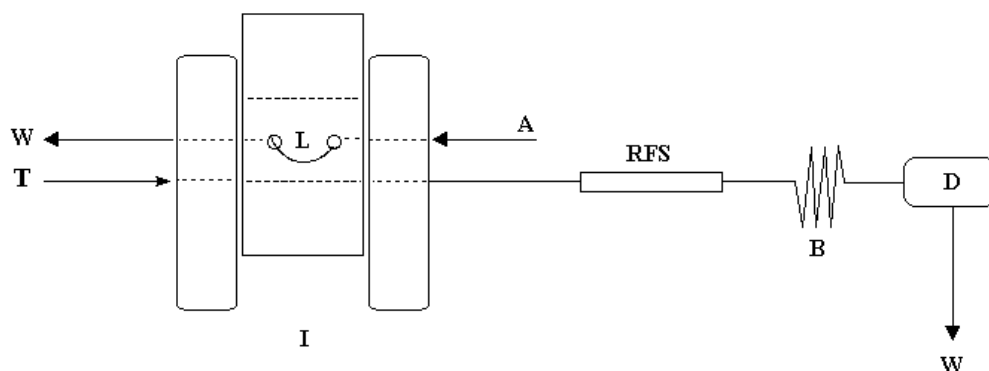


Figura 3.3 - Diagrama esquemático do sistema FIA com reator em fase sólida para determinação espectrofotométrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L, alça de amostragem (100 cm; 500 μL) das soluções de referência e amostras; T, transportador (água deionizada); RFS, reator em fase sólida contendo AgVO_3 imobilizado em resina de poliéster (10 cm; 1,8 mm d.i.) na proporção 1:2 e tamanho de partículas na faixa de 250-350 μm ; B, reator helicoidal (100 cm); D, detector espectrofotométrico em 585 nm e W, descarte.

As soluções de referência de ácido tânico e das amostras são introduzidas na solução transportadora (água deionizada) com o auxílio do injetor comutador manual com alça de amostragem de 500 μL . A solução contendo o analito de interesse passa pelo reator em fase sólida contendo ânions VO_3^- , sofrendo reação química com formação do cromóforo que é então monitorado espectrofotometricamente em 585 nm.

3.3.5) Preparo das amostras e determinação de polifenóis

Amostras de extratos tanínicos de acácia empregados no curtimento de couros, foram adquiridas no mercado e analisadas pelo método proposto: (A) Seta Supersol Light[®] e (B) Seta Supersol Líquido[®] (Seta S/A – Extrativa Tanino de Acácia, Estância Velha – RS).

Para análise da amostra (A), comercializada na forma sólida em embalagens de polietileno de 25 kg, quantidades acuradamente pesadas em torno de 0,8 g foram dissolvidas em béqueres contendo 50 mL água deionizada. Após filtração por gravidade, essa solução foi transferida para um balão de 100 mL, com o volume completado com água deionizada (solução 1). Alíquotas de 1 mL dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água deionizada. As concentrações das soluções assim obtidas ficaram dentro da faixa linear do método proposto.

Para análise da amostra (B), comercializada na forma líquida em embalagem de polietileno de 60 litros, foram pipetadas alíquotas de 1 mL desse conteúdo e diluídas em balões volumétricos de 100 mL (solução 2). Alíquotas de 1 mL dessas soluções foram transferidas para balões volumétricos de 10 mL e o volume completado com água deionizada. As concentrações das soluções assim obtidas ficaram dentro da faixa linear do método proposto.

3.3.6) Método comparativo

De maneira a comparar os resultados obtidos empregando-se método proposto, as amostras (A) e (B) foram analisadas pelo método comparativo da AOAC. As condições experimentais estão descritas em 3.2.4.

Para obter soluções das amostras (A) e (B) em concentrações que estivessem dentro da faixa linear da curva analítica do método comparativo, alíquotas de 100 μL das soluções 1 e 2 preparadas em 3.3.6 foram diluídas em balões volumétricos de 10 mL.

3.4) Determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em sua reação de precipitação com cobre(II) em meio de acetato de amônio, utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes

3.4.1) Reagentes e soluções

As soluções estoque de ácido tânico ($\text{MM} = 1701,23\text{g mol}^{-1}$) $1,0 \times 10^{-3}\text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 170mg do composto (Aldrich) em 100 mL de água deionizada. As soluções de referência com concentrações entre $1,0 \times 10^{-5}\text{ mol L}^{-1}$ e $3,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas por diluições da solução estoque com água deionizada. Todas as soluções foram preparadas imediatamente antes das análises, com o propósito de evitar degradações das mesmas.

As soluções de sulfato de cobre(II) (CuSO_4) $0,10\text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 6,2 g do composto $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Reagen) em 250 mL de água deionizada e padronizadas com EDTA⁴⁹.

As soluções de acetato de amônio (NH_4Ac) $0,10\text{ mol L}^{-1}$ foram preparadas dissolvendo-se massas acuradamente pesadas em torno de 3,9 g do composto (Carlo Erba) em 500 mL de água deionizada.

As soluções de ácido nítrico (HNO_3) $0,01\text{ mol L}^{-1}$ empregadas para limpeza do sistema, foram preparadas dissolvendo-se 0,5 mL de uma solução 85% do composto em 500 mL de água deionizada.

3.4.2) Diagrama esquemático do sistema de análises por injeção em fluxo

A Figura 3.4 mostra o diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes empregado para a determinação de taninos, baseada em sua reação de precipitação com cobre em meio de acetato de amônio.

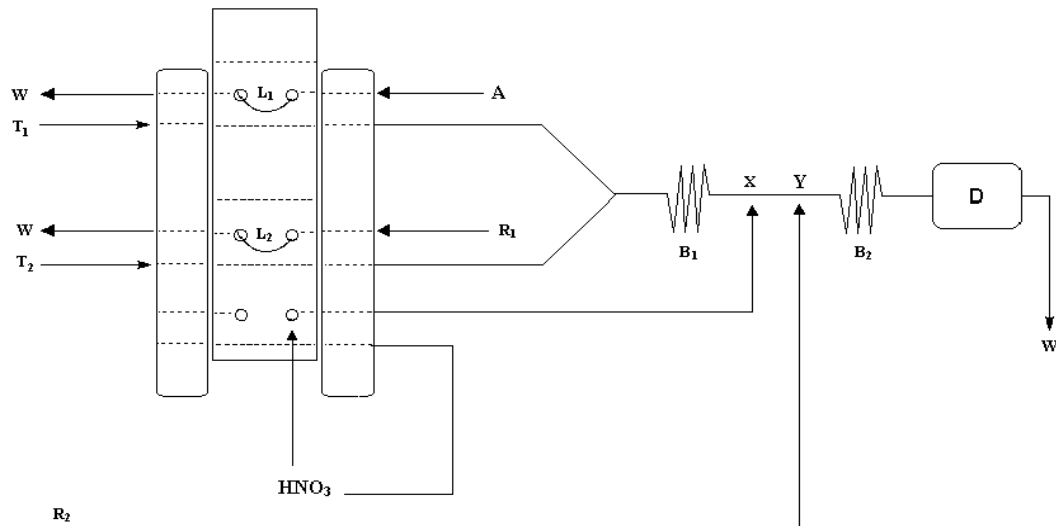


Figura 3.4 - Diagrama esquemático do sistema FIA para determinação turbidimétrica de polifenóis . As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (70 cm; 350 μ L) de A, soluções de referência e amostras; L₂, alça de R₁ (70 cm; 350 μ L), reagente CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹; R₂, reagente NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹ (0,7 mL min⁻¹); T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazões de 2,6 mL min⁻¹; B₁, reator helicoidal (50 cm); X, entrada do fluxo intermitente de HNO₃ a vazão de 3,5 mL min⁻¹; Y, confluência; B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte.

Nesse sistema, quando o injetor está na posição de injeção, a amostra na alça L₁ (350 μ L) e o reagente R₁ (CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹) na alça L₂ (350 μ L) são injetados nos respectivos transportadores individuais T₁ e T₂ (água destilada), ambos nas vazões de 2,6 mL min⁻¹. As zonas de amostra e reagente percorrem distâncias iguais até se encontrarem no ponto de coalescência, ocorrendo a mistura no reator helicoidal B₁. No ponto de confluência Y há a entrada do reagente NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹ a uma vazão de 0,7 mL min⁻¹ ocorrendo a reação química no reator helicoidal B₂, formando o precipitado quantificado turbidimetricamente em 500 nm.

Quando o injetor comutador está na posição de amostragem, o fluxo intermitente de solução de HNO₃ 0,010 mol L⁻¹ a vazão de 3,5 mL min⁻¹, entra no ponto de confluência X efetuando a limpeza do sistema.

3.4.3) Preparo das amostras e determinação de polifenóis

Empregou-se o mesmo procedimento descrito em 3.2.3.

3.4.4) Método comparativo

Empregou-se o mesmo procedimento descrito em 3.2.4.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análises por injeção em fluxo com zonas coalescentes

A reação química entre o ácido gálico e ânions metavanadato (VO_3^-) foi estudada por ELINANY et al⁵⁰ empregando polarografia. Nesses estudos, foram registrados polarogramas de uma solução contendo metavanadato de amônio $0,5 \text{ mmol L}^{-1}$, antes e depois à adição de solução de ácido gálico. O deslocamento da onda polarográfica observado depois da adição do ácido gálico indica redução do vanádio(V) para vanádio(IV). Dessa maneira observa-se mudança de coloração de amarelo (vanádio (V)) para azul (vanádio(IV))⁵¹. O monitoramento espectrofotométrico desse cromóforo azul formado já foi a base para métodos de quantificação de vanádio (V) em fluidos biológicos^{52,53} e é a base do método de determinação de polifenóis totais aqui proposto.

A oxidação de compostos polifenólicos em amostras complexas levam a formação de uma variedade muito ampla de espécies químicas. Sendo assim, a interação entre essas espécies oxidadas e a espécie reduzida (vanádio (IV)) não é ainda compreendida²¹.

O espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível do cromóforo, formado na reação química entre o ácido tânico e o metavanadato de amônio (NH_4VO_3), apresenta um máximo de absorção em 585 nm (Figura 4.1), sendo então selecionado para as determinações quantitativas.

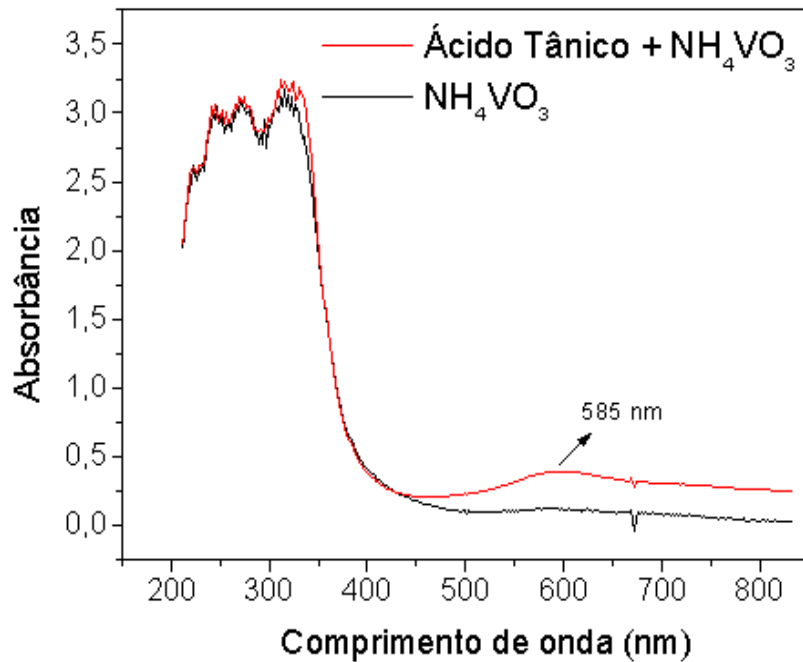


Figura 4.1 - Espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível do branco (reagente metavanadato de amônio (NH_4VO_3)) e do composto cromóforo formado na reação química entre ácido tânico e metavanadato de amônio (NH_4VO_3). As medidas quantitativas foram feitas em 585 nm.

4.1.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA

Inicialmente, foram estudados os parâmetros químicos do sistema FIA de modo a investigar as condições adequadas para a reação entre o ácido tânico e o metavanadato (VO_3^-). Os experimentos foram feitos em um sistema FIA com comprimento de alças de amostragem L_1 e L_2 de $350 \mu\text{L}$, vazão dos transportadores T_1 e T_2 de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento do reator helicoidal de 50 cm . Todas as medidas foram feitas em triplicata utilizando-se soluções de ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito da concentração do reagente NH_4VO_3 sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$ a $0,20 \text{ mol L}^{-1}$, mantendo a concentração de ácido tânico sempre em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. A Figura 4.2 mostra que a absorbância aumentou com o aumento de concentração de NH_4VO_3 até $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ e manteve-se praticamente inalterada nas concentrações superiores desse reagente. Portanto, a concentração de $0,10 \text{ mol L}^{-1}$ foi selecionada para o reagente em estudos posteriores.

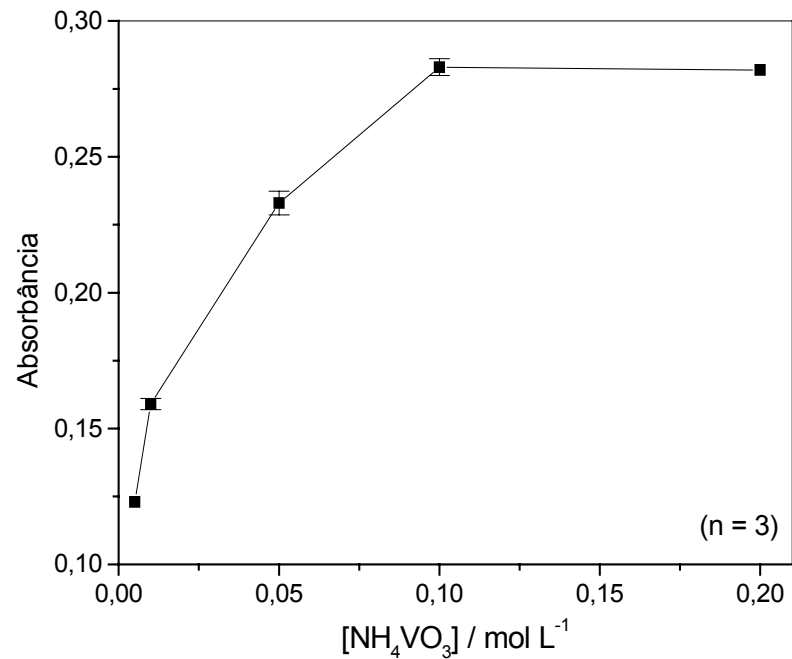


Figura 4.2 - Efeito da concentração de NH_4VO_3 sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem L_1 e L_2 de $350 \mu\text{L}$, vazão dos transportadores (água deionizada) T_1 e T_2 de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ e comprimento do reator helicoidal de 50 cm .

Várias soluções foram estudadas como soluções transportadoras de maneira a verificar seu efeito sobre o sinal analítico. O efeito do pH das soluções de T_1 e T_2 foi avaliado usando soluções tampões fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de pH entre 2,1 e 8,0. A Figura 4.3 mostra que ocorreu um aumento de absorbância até o pH 4,0, a partir do qual observa-se diminuição de sinal analítico. Portanto, selecionou-se pH 4,0 para estudos posteriores.

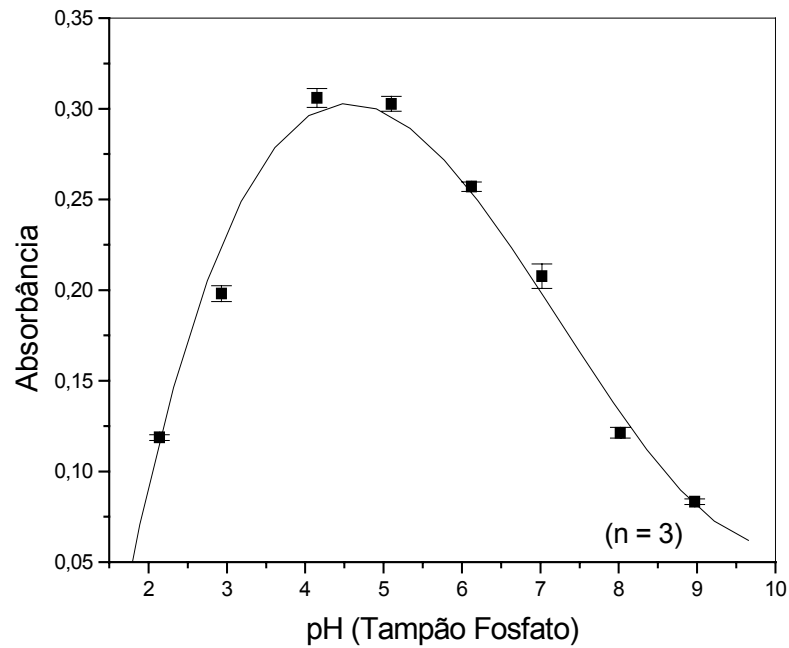


Figura 4.3 - Efeito da concentração hidrogeniônica no intervalo de pH entre 2 e 9 (tampões fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$) das soluções transportadoras T_1 e T_2 (vazões $2,6 \text{ mL min}^{-1}$) sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de $350 \mu\text{L}$ e comprimento do reator helicoidal de 50 cm .

De modo a verificar a influência da natureza do tampão, em comparação com o tampão fosfato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0 selecionado anteriormente, avaliou-se também o emprego de tampões acetato e McIlvaine $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ em pH 4,0. A Figura 4.4 mostra que o maior sinal analítico foi obtido com o uso do tampão fosfato. Entretanto, o aumento de sinal analítico empregando a solução tampão não foi tão significativo em relação à água deionizada. Dessa maneira, selecionou-se água deionizada como solução transportadora de modo a eliminar a etapa de preparação do tampão.

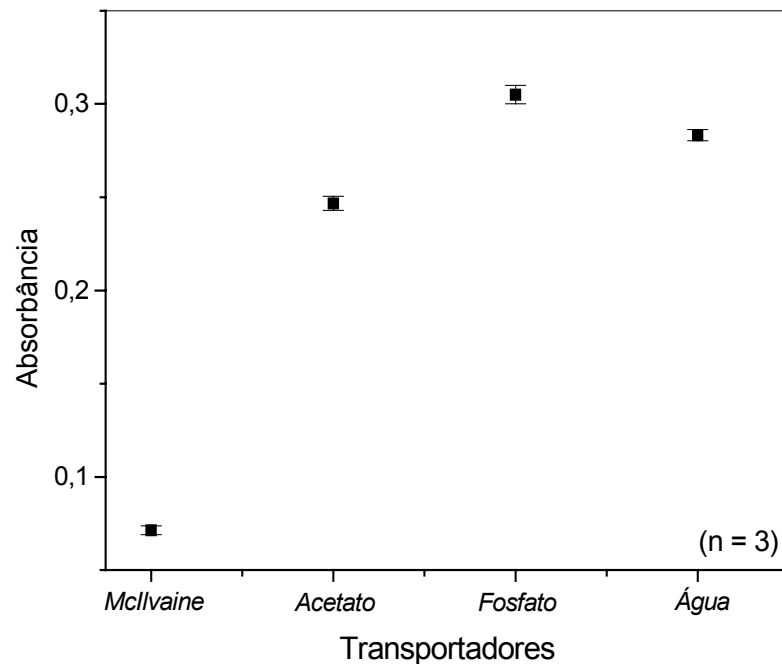


Figura 4.4 - Efeito da natureza do tampão (McIlvaine, acetato ou fosfato) $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ pH 4,0, utilizados como soluções transportadoras T_1 e T_2 (vazões $2,6 \text{ mL min}^{-1}$) sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de $350 \mu\text{L}$ e comprimento do reator helicoidal de 50 cm .

Soluções aquosas diluídas ($0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido acético também foram avaliadas como soluções transportadoras, porém apresentaram desempenhos analíticos bem menores que aqueles verificados empregando-se água deionizada.

4.1.2) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA

Os parâmetros físicos do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de sensibilidade, estabilidade de linha base e frequência analítica. Todas as medidas foram feitas em triplicatas utilizando-se soluções de ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

O efeito da variação dos volumes da amostra e do reagente, foram estudados variando-se simultaneamente os comprimentos das alças L_1 e L_2 entre 100 e $600 \mu\text{L}$. Como mostra a Figura 4.5, ocorreu um aumento significativo na magnitude do sinal analítico com o aumento do volume das alças até $500 \mu\text{L}$, a partir

do qual ocorreu aumento não relevante. Desta maneira, os volumes de 500 μL foram selecionados para as alças da amostra e do reagente.

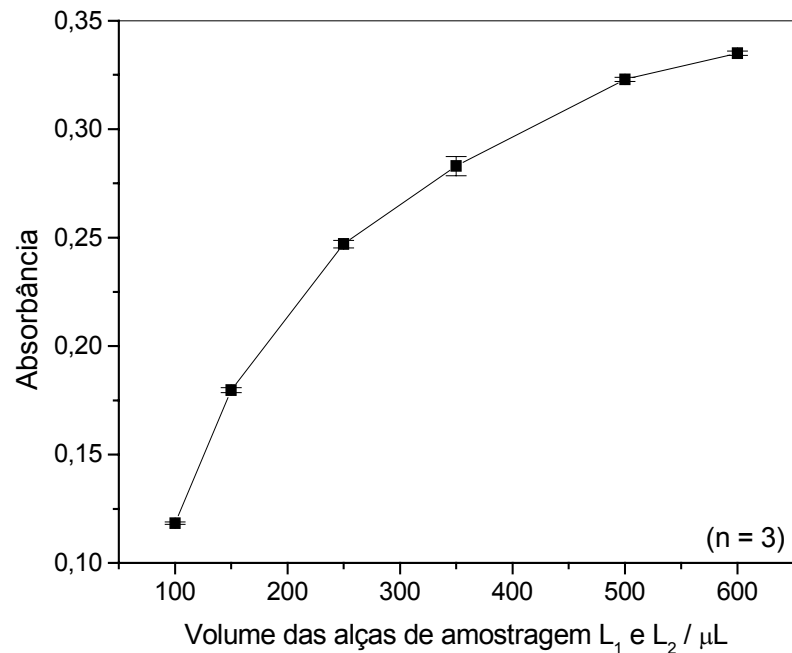


Figura 4.5 - Efeito do volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$), avaliados simultaneamente entre 100 e 600 μL , sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Vazão das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada) de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ e reator helicoidal de 50 cm.

A influência do comprimento do reator helicoidal (B) sobre o sinal analítico foi avaliada no intervalo de 30 a 160 cm. Como mostra a Figura 4.6, ocorreram pequenas variações na magnitude do sinal analítico com o aumento do comprimento até 120 cm, a partir do qual observa-se leve diminuição. Reactores com comprimentos menores que 100 cm ocasionam instabilidade na linha base. O comprimento do reator helicoidal de 100 cm foi selecionado como a melhor combinação entre sensibilidade e estabilidade da linha base.

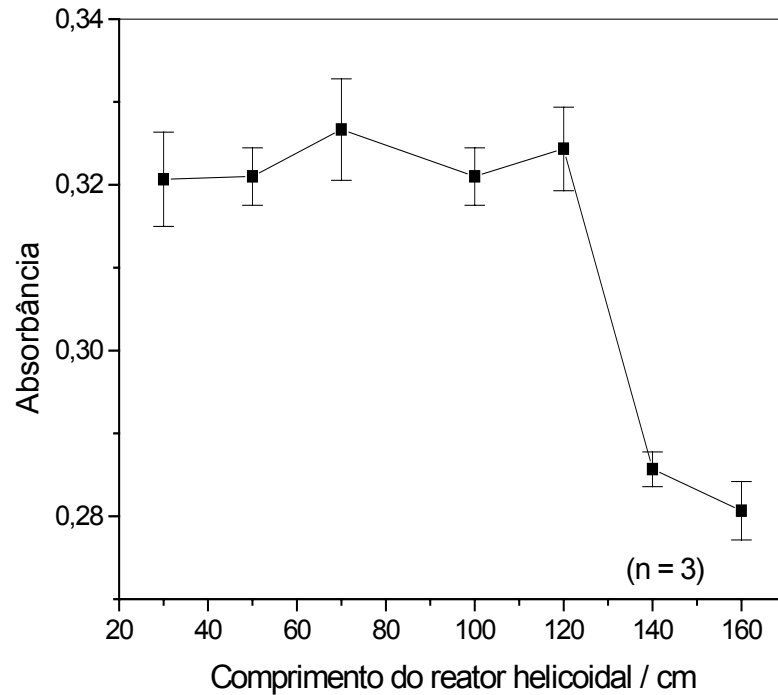


Figura 4.6 - Efeito do comprimento do reator helicoidal (B), avaliado entre 30 e 160 cm, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Volume das alças de amostragem L_1 (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) e L_2 (NH_4VO_3 $0,10 \text{ mol L}^{-1}$) de $500 \mu\text{L}$ e vazões das soluções transportadoras T_1 e T_2 (água deionizada) de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$.

O efeito das vazões das soluções transportadoras T_1 e T_2 foi estudado simultaneamente na faixa de $1,1$ a $3,7 \text{ mL min}^{-1}$ (individuais). Como mostra a Figura 4.7, foi verificado um aumento no sinal analítico com o aumento da vazão até $2,6 \text{ mL min}^{-1}$, a partir da qual observa-se diminuição de sinal. Portanto, foi selecionada a vazão de $2,6 \text{ mL min}^{-1}$ para estudos posteriores.

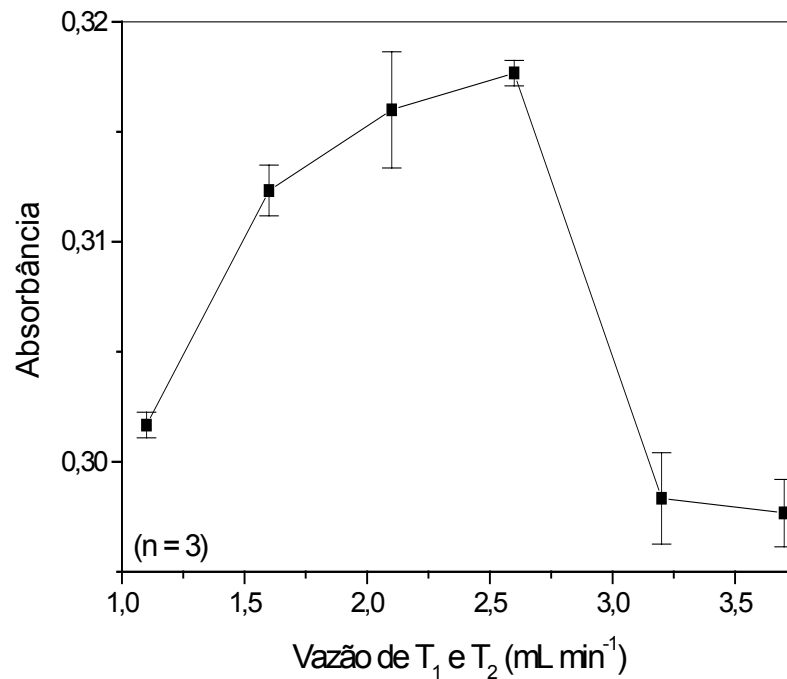


Figura 4.7 - Efeito das vazões das soluções transportadoras T₁ e T₂ (água deionizada), estudados simultaneamente na faixa de 1,1 a 3,7 mL min⁻¹, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Volume das alças de amostragem L₁ (ácido tânico 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) e L₂ (NH₄VO₃ 0,10 mol L⁻¹) de 500 μL e comprimento do reator helicoidal (B) 100 cm.

4.1.3) Curva Analítica

Após otimização, o sistema de análise por injeção em fluxo com zonas coalescentes para a determinação espectrofotométrica de polifenóis apresentou uma curva analítica ($A = -0,0043 + 3232,03 \times C$, $r = 0,9989$) linear no intervalo de concentrações de ácido tânico entre 2,1 x 10⁻⁵ e 3,2 x 10⁻⁴ mol L⁻¹ (35,7 a 544 mg L⁻¹) e um limite de detecção de 7,6 x 10⁻⁶ mol L⁻¹ (12,9 mg L⁻¹) (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica), conforme apresentado na Figura 4.8.

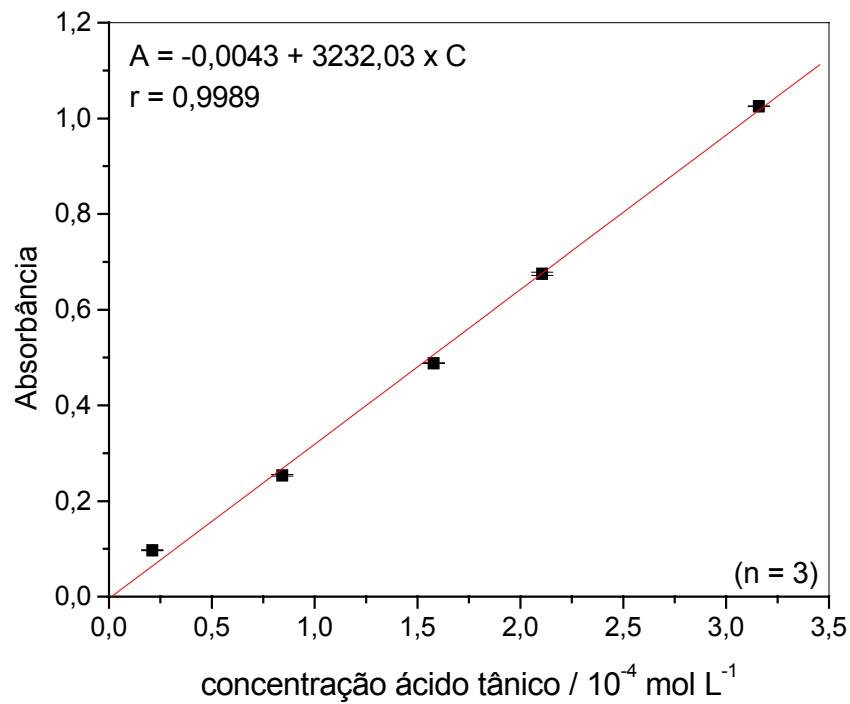


Figura 4.8 - Curva analítica para determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadato (VO_3^-), empregando sistema em fluxo com zonas coalescentes apresentado em 3.2.2.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas ($2,1 \times 10^{-5}$, $8,4 \times 10^{-5}$, $1,6 \times 10^{-4}$, $2,1 \times 10^{-4}$ e $3,2 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) das soluções de referência de ácido tânico injetadas no sistema em fluxo são mostrados na Figura 4.9.

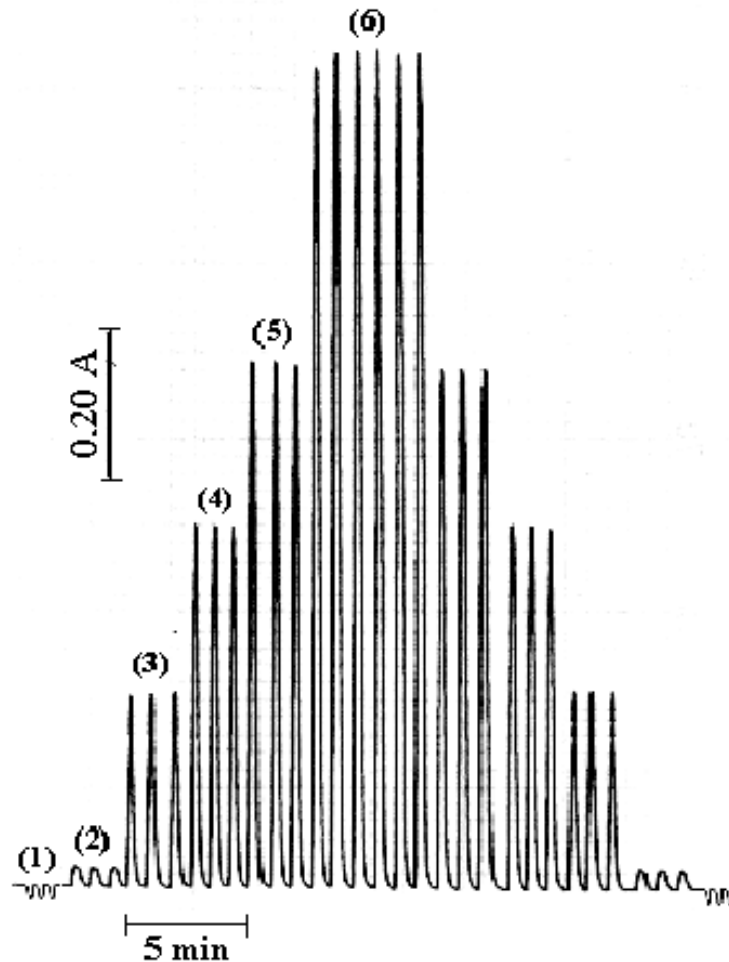


Figura 4.9 - Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $2,1 \times 10^{-5}$, (3) $8,4 \times 10^{-5}$, (4) $1,6 \times 10^{-4}$, (5) $2,1 \times 10^{-4}$ e (6) $3,2 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.2.2.

4.1.4) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento analítico em concentrações de solução padrão de ácido tânico de $4,8 \times 10^{-5}$ e $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos de 0,8 e 0,6 % respectivamente (Figura 4.10). A frequência de amostragem foi de 70 determinações por hora.

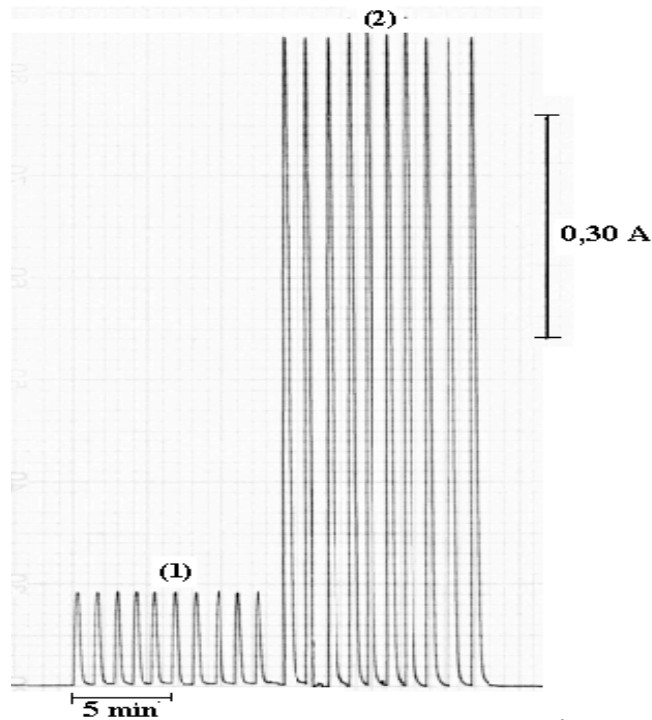


Figura 4.10 - Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $4,8 \times 10^{-5}$ e (2) $2,9 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 1.2.2.

4.1.5) Estudo de interferentes em potencial

O efeito de interferentes em potencial na determinação de polifenóis em amostras de chás foi avaliado para substâncias comuns neste tipo de amostra. Nesses experimentos, foram comparados os sinais analíticos de soluções de referência de ácido tânico $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (170 mg L^{-1}) e os sinais analíticos de soluções contendo ácido tânico nesta mesma concentração juntamente com cada interferente em potencial em concentrações dez vezes maiores, na mesma concentração e em concentrações dez vezes inferiores a esta. A Tabela 4.1 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 4.1 - Estudos de interferentes em potencial comuns em amostras de chás na determinação de polifenóis.

Interferente em potencial	Padrão / Interferente (respostas relativas %)		
	10/1	1/1	1/10
Cafeína	101	102	99,0
Carboximetilcelulose	99,6	90,3	85,4
Glicose	99,5	100	98,8
Ácido ascórbico	101	94,5	23,5

Como pode ser observado na Tabela 4.1 nenhuma das substâncias estudadas como interferentes em potencial interferiram no método proposto nas concentrações de 10/1 (padrão/interferente) e apenas a carboximetilcelulose e o ácido ascórbico causaram alguma interferência em concentrações equimolares e em concentrações 1/10 (padrão/interferente) a interferência causada por estas substâncias foi acentuada. Entretanto, chás apresentam quantidades de ácido ascórbico extremamente baixa não causando portanto interferência no método.

4.1.6) Teste de adição e recuperação

No teste de adição e recuperação, três concentrações diferentes de ácido tânico, a saber: $3,2 \times 10^{-5}$, $1,1 \times 10^{-4}$ e $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (54,0 , 181 e 362 mg L⁻¹) foram adicionadas a três amostras de chás e os resultados obtidos (descontados daqueles originalmente presentes na amostra sem a adição de analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.2. Como pode ser observado, a recuperação variou de 87,3 a 94,2 %. Assim, utilizou-se o método de adição múltipla de padrão para a determinação de polifenóis nas amostras de chás.

Tabela 4.2 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de chás comerciais.

Amostras	Adicionado/mg L⁻¹	Recuperado/mg L⁻¹	% Recuperação
Chá Verde Leão [®]	54,0	48,4 ± 0,3	89,7
<i>Camelia sinensis</i>	181	164 ± 1	90,6
	362	336 ± 1	92,8
Chá Preto Leão [®]	54,0	47,1 ± 0,5	87,3
<i>Camelia sinensis</i>	181	160 ± 1	88,4
	362	341 ± 2	94,2
Chá Mate Leão [®]	54,0	48,9 ± 0,9	90,5
<i>Ilex paragua- riensis</i>	181	161 ± 1	88,9
	362	337 ± 2	93,1

n = 3

4.1.7) Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação do teor total de polifenóis em três amostras de chás comerciais, a saber: chá verde leão[®], chá preto leão[®] e chá mate leão[®]. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se a metodologia proposta pela AOAC.

O resultados obtidos empregando-se o procedimento em fluxo desenvolvido e procedimento da AOAC são apresentados na Tabela 4.3. Como pode ser observado nessa tabela, os resultados encontrados foram concordantes em um nível de 95% de confiança e dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento em fluxo desenvolvido e a importância do mesmo.

Tabela 4.3 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de chás pelo método proposto e pelo método da AOAC.

Amostras	Comparativo	Proposto	Er (%)
	mg g ⁻¹		
Chá Verde Leão [®] <i>Camellia sinensis</i>	87,0 ± 0,9	83,0 ± 0,7	-4,6
Chá Preto Leão [®] <i>Camellia sinensis</i>	65,8 ± 0,8	63,1 ± 0,9	-4,1
Chá Mate Leão [®] <i>Ilex paraguariensis</i>	105 ± 2	102 ± 1	-2,9

n = 3, nível de confiança de 95%.

Er, erro relativo entre o método proposto e o método comparativo da AOAC.

As Figuras 4.11, 4.12 e 4.13 apresentam as curvas e sinais transientes obtidos nas análises empregando o método de adição múltipla de padrões das amostras de chá verde, chá preto e chá mate, respectivamente.

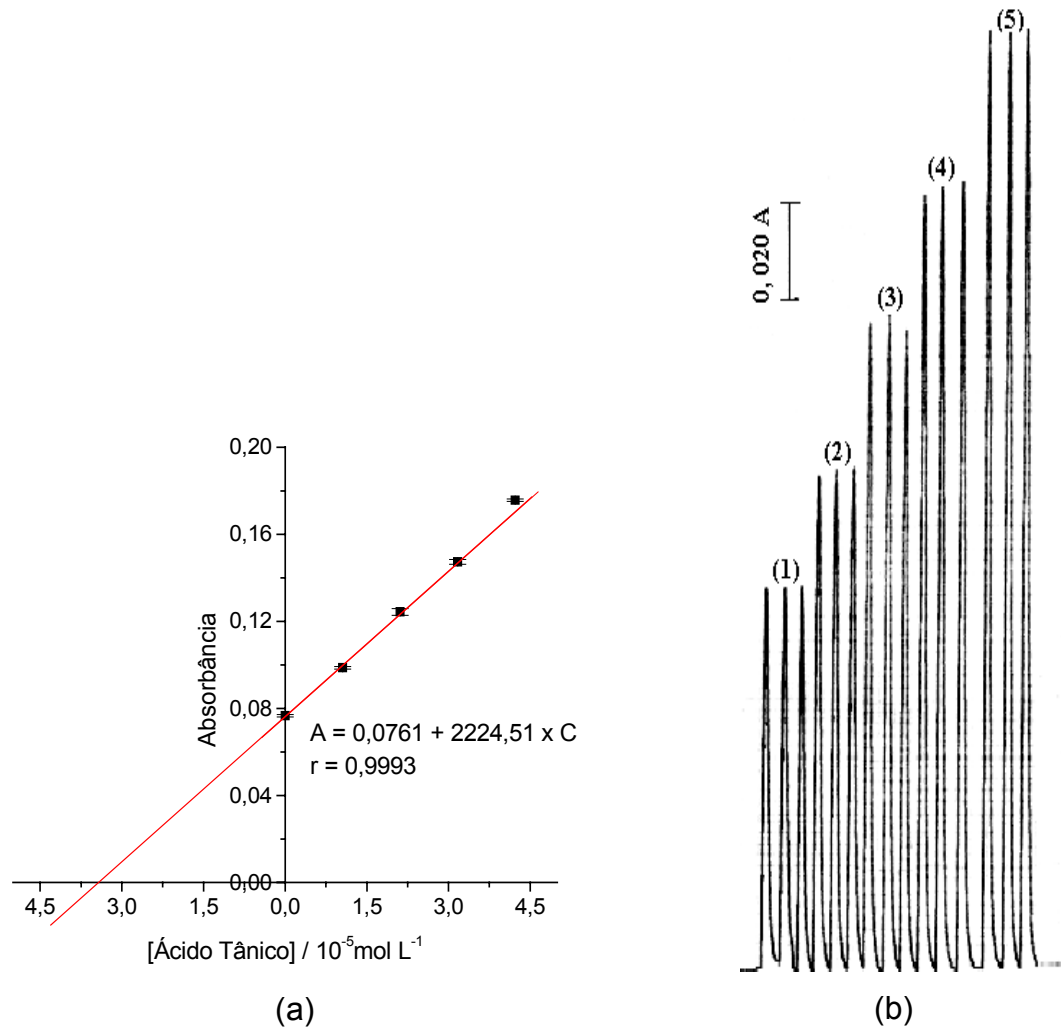


Figura 4.11 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá verde. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

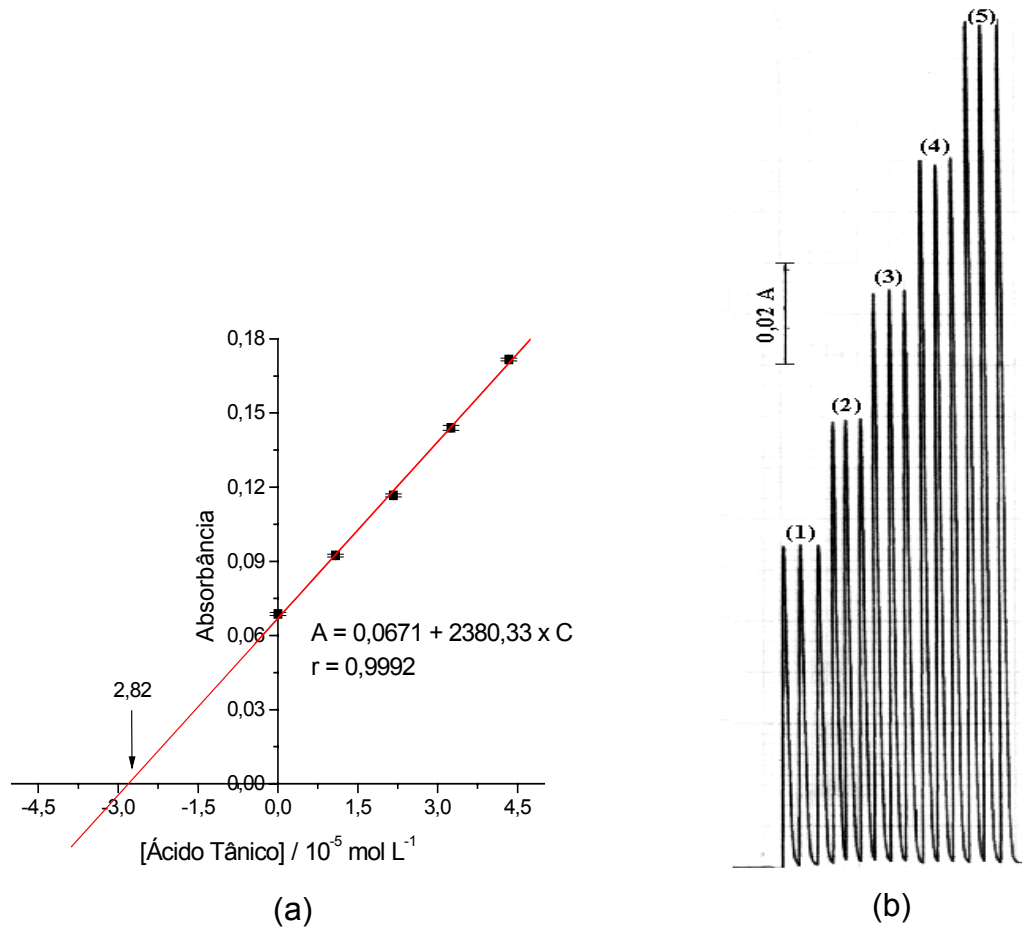


Figura 4.12 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá preto. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,16 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

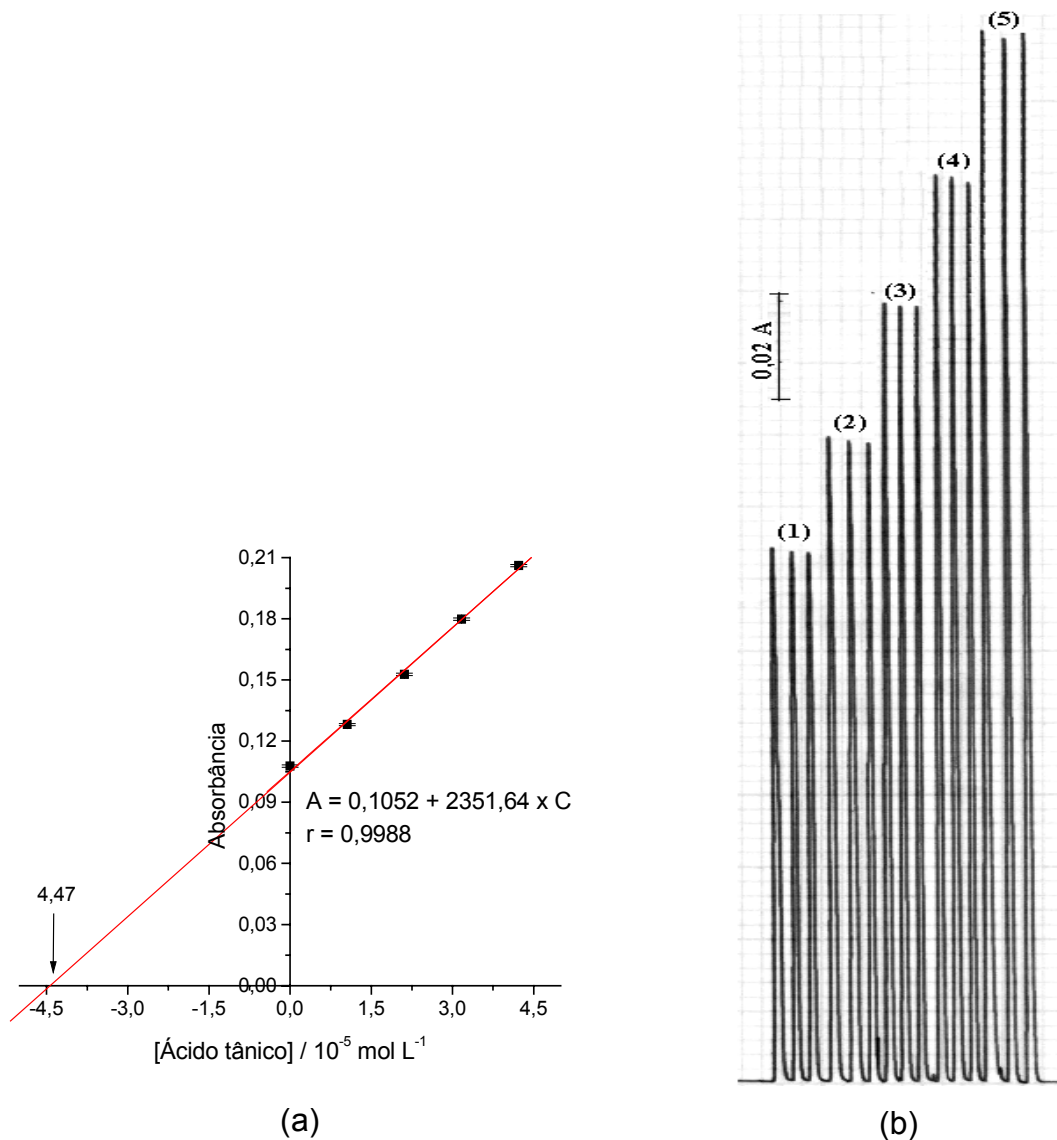


Figura 4.13 - (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá mate. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

Como observado na Tabela 4.3, os teores de polifenóis totais determinados empregando-se o método oficial da AOAC foram sempre superiores àqueles teores encontrados empregando-se o método proposto. Como já discutido por diversos autores²⁷⁻²⁹, esses teores elevados já eram esperados uma vez que o reagente de Folin-Ciocalteu é um oxidante muito forte e o tempo reacional de 30 minutos possibilita a reação desse oxidante com compostos fenólicos das mais diversas classes.

Quando empregadas condições mais brandas de reação, há a possibilidade de não ocorrer a quantificação de polifenóis menos redutores.

4.2) Determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em reação com metavanadado (VO_3^-), utilizando sistema de análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado contendo metavanadato de prata (AgVO_3) imobilizado

4.2.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA

Inicialmente, algumas soluções foram avaliadas como soluções transportadoras no sistema FIA de modo a verificar seu efeito sobre o sinal analítico. Nesses experimentos foram utilizados reatores em fase sólida (5,0 cm x 1,8 mm d.i.) contendo AgVO_3 imobilizado em resina poliéster na proporção de 1:3 (composto / resina) com tamanho de partículas na faixa de 250-350 μm , solução de ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, alça de amostragem de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$. Todas as medidas foram feitas em triplicatas.

Poucas opções de soluções transportadoras podem ser avaliadas no sistema FIA porque a maioria delas possuem ânions que formam precipitados quando reagem com cátions de prata (Ag(I)) presentes no reator em fase sólida. Ademais, em soluções muito alcalinas ocorreria a precipitação de óxido de prata. Soluções ácidas relativamente concentradas aumentam a solubilidade do composto imobilizado, acarretando um baixo tempo de vida do reator.

Diante disso, foram testadas como soluções transportadoras somente soluções de ácido nítrico diluídas em concentrações de $5,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ e $0,05 \text{ mol L}^{-1}$. Nenhuma dessas soluções estudadas apresentou melhor desempenho em termos de magnitude de sinal analítico e estabilidade de linha de base em comparação à água deionizada. Assim, selecionou-se água deionizada como transportador da amostra nos estudos posteriores.

4.2.2) Estudos dos parâmetros do reator em fase sólida

Os reatores em fase sólida foram construídos em tubos de vidro com 1,8 mm de diâmetro interno devido a maior facilidade para confecção e não ocasionar grande pressão hidrodinâmica no sistema de análise por injeção em fluxo.

Foram estudados três diferentes composições m/m entre AgVO_3 e a resina poliéster (1:2, 1:3 e 1:4) de modo a verificar o efeito sobre o sinal analítico. Foi

observado um aumento contínuo da sensibilidade com o aumento da proporção de metavanadato de prata incorporado na resina até a máxima proporção avaliada (1:2), como mostra a Figura 4.14. Essa proporção resulta na quantidade máxima de AgVO_3 que pode ser agregado à resina poliéster, uma vez que quantidades maiores do sal impossibilitam a homogeneização da mistura. Portanto, a proporção 1:2 m/m foi selecionada em função da sensibilidade e também garantia de maior tempo de vida para o reator em fase sólida.

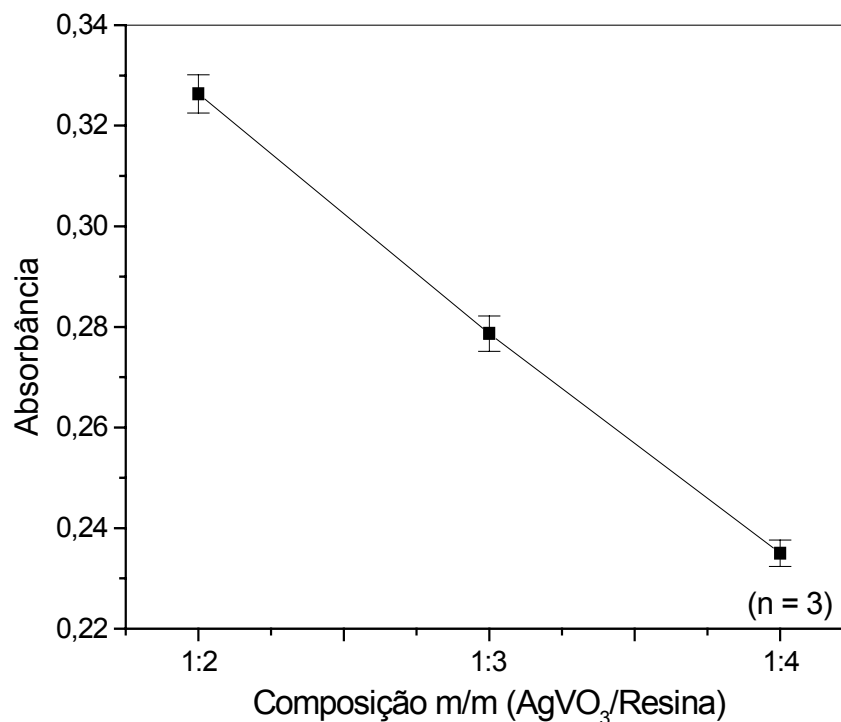


Figura 4.14 - Efeito da composição m/m de AgVO_3 e resina poliéster (1:2, 1:3 e 1:4) das partículas do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reactores de 5,0 cm e tamanho de partícula na faixa de 250-350 μm , alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de 2,5 mL min^{-1} .

O tamanho das partículas contidas no RFS afeta a sensibilidade do sinal analítico. Partículas menores propiciam uma superfície de contato maior entre a zona de amostra e o reagente sólido imobilizado. Entretanto, partículas muito pequenas podem causar uma resistência hidrodinâmica elevada, sendo incompatíveis com sistemas de baixa pressão, como é o caso de sistemas FIA.

Nesse trabalho, três faixas de tamanho de partículas foram avaliadas, a saber: 100-250 μm , 250-350 μm e 350-500 μm . Como mostra a Figura 4.15, houve uma contínua diminuição de sinal analítico com o aumento do tamanho de partículas, devido a menor superfície de contato. As partículas de tamanho na faixa

de 100-250 μm geraram uma elevada pressão hidrodinâmica no sistema causando instabilidade na linha base. Portanto, selecionou-se tamanhos de partículas na faixa de 250-350 μm para os reatores em fase sólida por apresentarem melhor compromisso entre sensibilidade e repetibilidade.

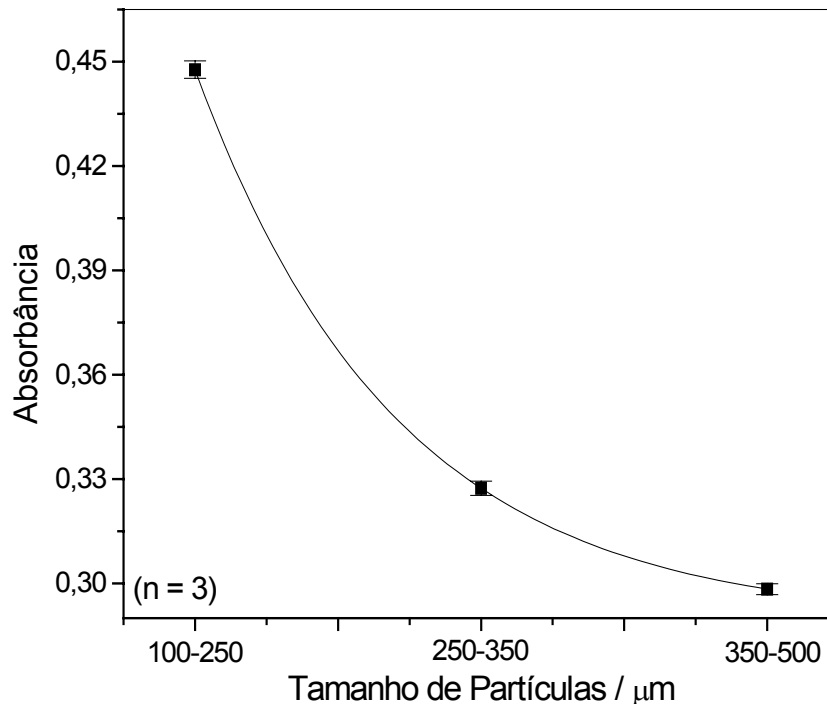


Figura 4.15 - Efeito do tamanho de partículas (100-250 μm , 250-350 μm e 350-500 μm) do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reatores de 5,0 cm e composição m/m de AgVO_3 e resina poliéster 1:2, alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$.

O efeito do comprimento do RFS foi avaliado em 5,0 cm, 10 cm e 15 cm; com composição m/m de AgVO_3 e resina poliéster de 1:2 e tamanho de partículas na faixa de 250-350 μm , como selecionados anteriormente. Como pode ser observado na Figura 4.16, houve um aumento de sinal analítico com o aumento do tamanho do reator. Entretanto, o reator em fase sólida com 15 cm de comprimento apresentou baixa repetibilidade e aumento da pressão hidrodinâmica do sistema. Portanto, selecionou-se o comprimento de 10 cm para o reator em fase sólida por apresentar melhor compromisso entre sensibilidade e repetibilidade.

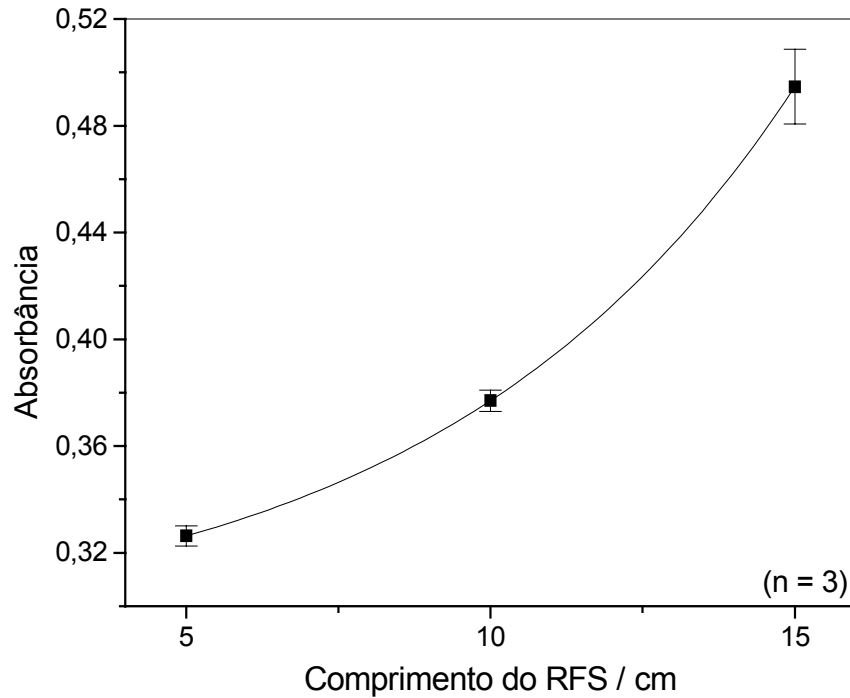


Figura 4.16 - Efeito do comprimento (5, 10 e 15 cm) do reator em fase sólida sobre o sinal analítico. Reatores com tamanho de partículas na faixa de 250 - 350 μm e composição m/m de AgVO_3 / resina poliéster de 1:2, alça de amostragem (ácido tânico $1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) de 250 μL , reator helicoidal de 50 cm e vazão do carregador de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$.

4.2.3) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA

Os parâmetros físicos do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de estabilidade de linha base, sensibilidade e frequência analítica. As medidas foram feitas em triplicatas, utilizando solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$.

O volume da amostra foi avaliado variando a alça de amostragem (L) em 50, 150, 250, 350, 500 e 600 μL . Como mostra a Figura 4.17, ocorreu um aumento significativo na magnitude do sinal analítico com o aumento do volume da alça de amostragem até 500 μL , a partir do qual ocorreu aumento não relevante. Desta maneira, o volume de 500 μL foi selecionado considerando-se maior sensibilidade.

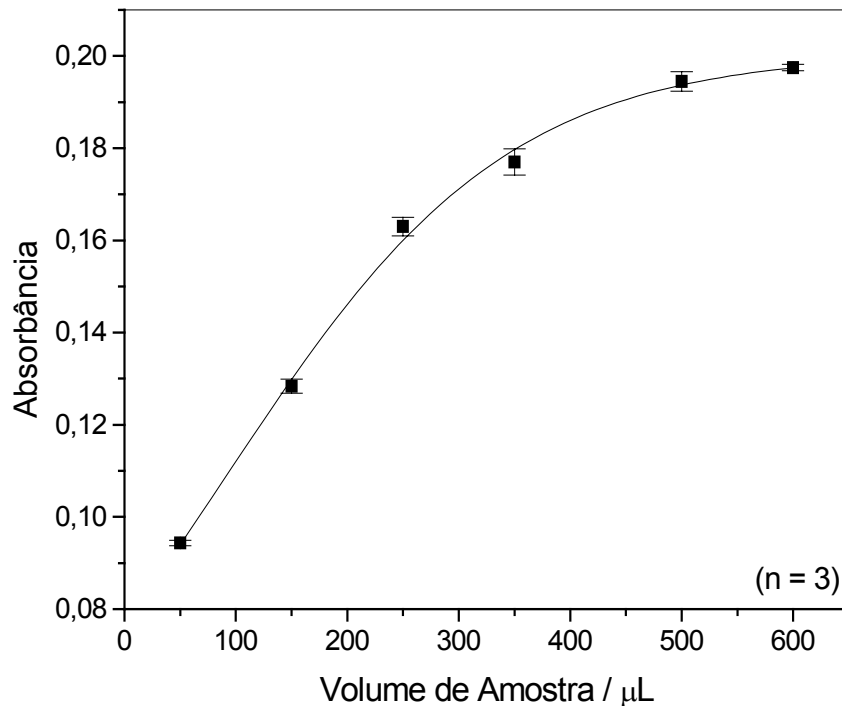


Figura 4.17 - Efeito do volume da alça de amostragem (L) de 50, 150, 250, 350, 500 e 600 μL , sobre o sinal analítico de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ e reator helicoidal de 50 cm.

A influência do comprimento do reator helicoidal (B) sobre o sinal analítico foi avaliada no intervalo de 20 a 150 cm. Como mostra a Figura 4.18, ocorreu um pequeno aumento na magnitude do sinal analítico com o aumento do comprimento até 100 cm, a partir do qual ocorreu leve diminuição. Reatores com comprimentos menores que 100 cm ocasionaram instabilidade na linha de base. Desta maneira, o comprimento de 100 cm foi selecionado considerando-se que esse que apresentou maior sensibilidade e estabilidade da linha de base.

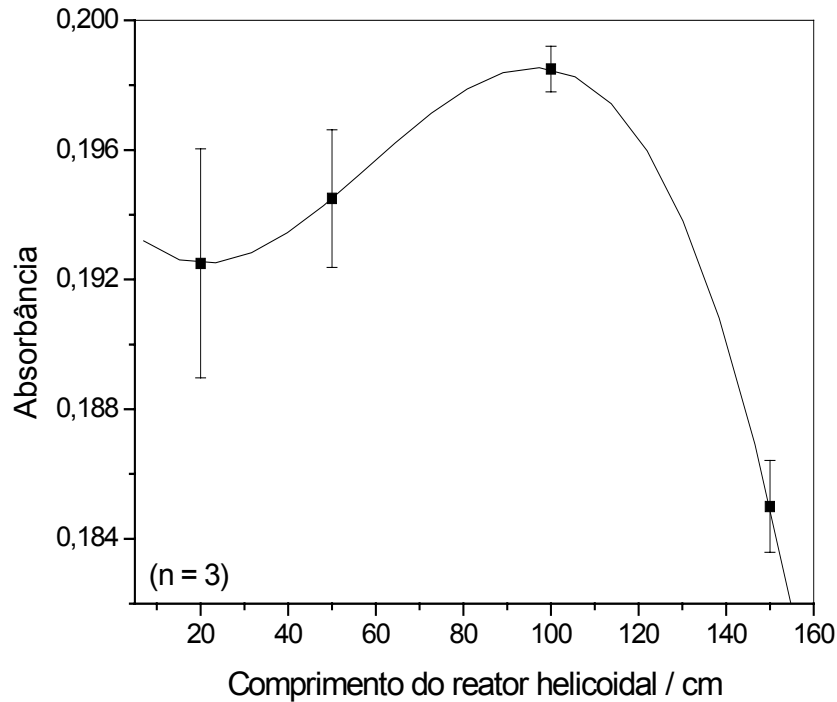


Figura 4.18 - Efeito do comprimento do reator helicoidal (B) sobre o sinal analítico, avaliado no intervalo de 20 a 150 cm, de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, vazão da solução transportadora de $2,5 \text{ mL min}^{-1}$ e volume da alça de amostragem de $500 \mu\text{L}$.

O efeito da vazão da solução transportadora (água deionizada) foi avaliado entre $1,5$ e $3,5 \text{ mL min}^{-1}$. Como mostra a Figura 4.19, foi verificado um aumento significativo no sinal analítico quando usada a vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$, devido a maior tempo de interação entre o analito e o RFS. Selecionou-se a vazão de $1,5 \text{ mL min}^{-1}$ pela maior sensibilidade, embora a frequência analítica tenha diminuído.

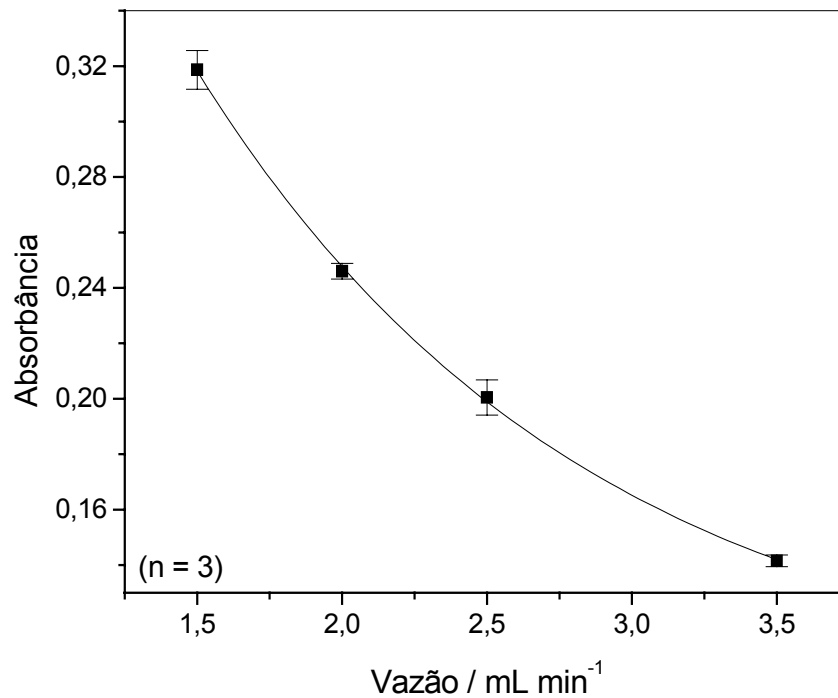


Figura 4.19 - Efeito da vazão da solução transportadora (água deionizada), avaliado entre 1,5 e 3,5 mL min⁻¹, sobre o sinal analítico de uma solução de ácido tânico $5,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, reator helicoidal de 100 cm e volume da alça de amostragem de 500 μ L.

4.2.4) Curva Analítica

Após otimização, o sistema da análise por injeção em fluxo com reator em fase sólida acoplado para determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com metavanadato (VO_3^-), apresentou uma curva analítica ($A = 0,0627 + 487,96 \times C$, $r = 0,9998$) linear no intervalo de concentrações de ácido tânico entre $5,2 \times 10^{-5}$ e $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ (88,5 a 2041,5 mg L⁻¹) e um limite de detecção de $5,9 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (10,0 mg L⁻¹) (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica), conforme apresentado na Figura 4.20.

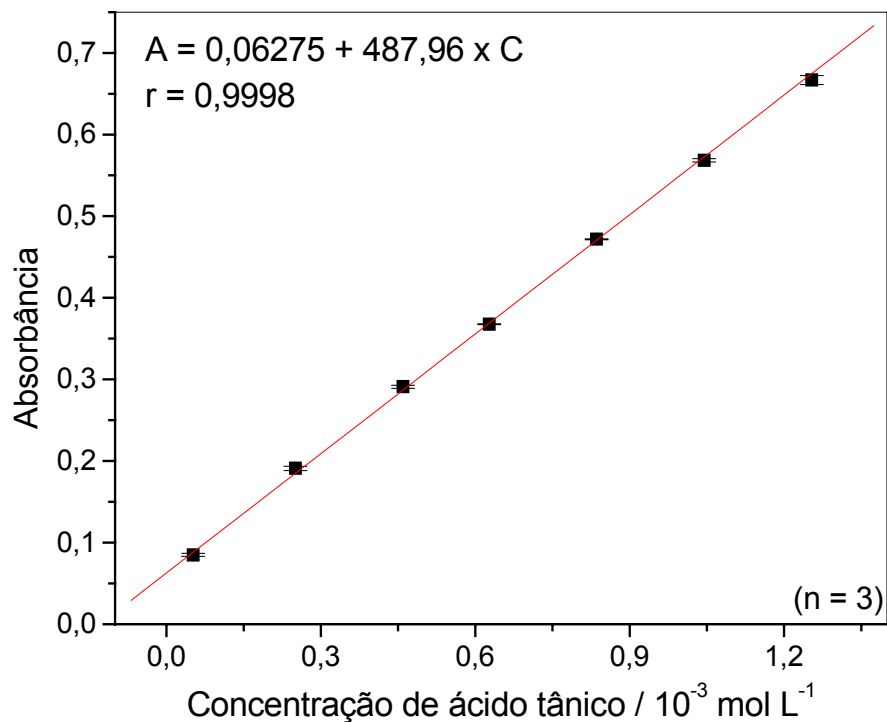


Figura 4.20: Curva analítica para determinação espectrofotométrica de polifenóis, baseada em sua reação com vanadato (VO_3^-), utilizando sistema em fluxo com reator em fase sólida acoplado. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas ($5,2 \times 10^{-5}$, $2,5 \times 10^{-4}$, $4,6 \times 10^{-4}$, $6,3 \times 10^{-4}$, $8,4 \times 10^{-4}$, $1,0 \times 10^{-3}$ e $1,2 \times 10^{-3}$ mol L $^{-1}$) das soluções de referência de ácido tânico injetadas no sistema em fluxo, são mostrados na Figura 4.21.

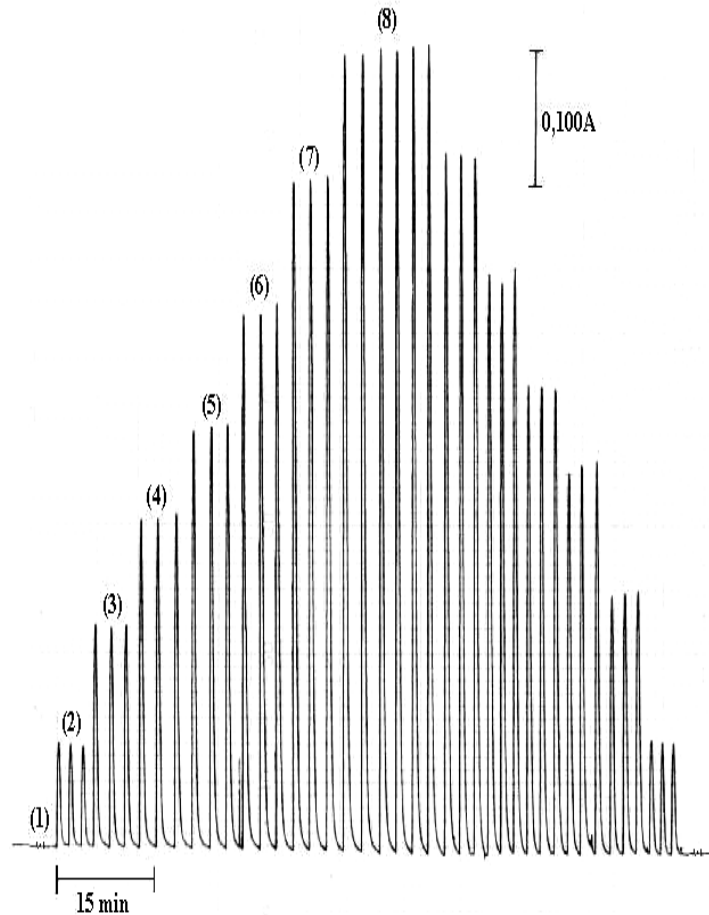


Figura 4.21 Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $5,2 \times 10^{-5}$, (3) $2,5 \times 10^{-4}$, (4) $4,6 \times 10^{-4}$, (5) $6,3 \times 10^{-4}$, (6) $8,4 \times 10^{-4}$, (7) $1,0 \times 10^{-3}$ e (8) $1,2 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹. As condições dos sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4.

4.2.5) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento analítico em concentrações de solução padrão de ácido tânico de $1,03 \times 10^{-4}$ e $8,22 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹, obtendo-se desvios padrões relativos de 1,1 e 0,9 % respectivamente (Figura 4.22). A frequência de amostragem foi de 35 determinações por hora.

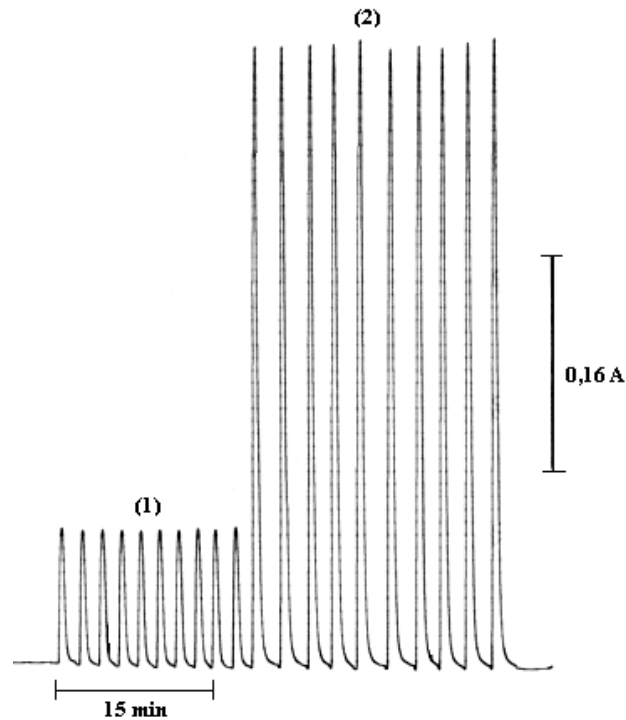


Figura 4.22: Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $1,03 \times 10^{-6}$ e (2) $8,22 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.3.4.

4.2.6) Teste de adição e recuperação

No teste de adição e recuperação três concentrações diferentes de ácido tânico, a saber: $5,2 \times 10^{-5}$, $4,6 \times 10^{-4}$, e $8,4 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (88,5 , 782 e 1430 mg L⁻¹) foram adicionadas a duas amostras de extratos tanínicos de acácia e os resultados obtidos (descontados daqueles originalmente presente na amostra sem a adição de analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.4. Como pode ser observado, a recuperação variou de 98,5 a 104%. Assim, as análises das amostras foram feitas pelo método direto, determinando as concentrações utilizando uma curva analítica.

Tabela 4.4 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras extratos tanínicos da acácia empregados no curtimento de couros.

Amostras	Adicionado/mg L ⁻¹	Recuperado/mg L ⁻¹	% Recuperação
Amostra (A)	88,5	90,3 ± 0,8	102
	782	773 ± 1	98,9
	1430	1408 ± 4	98,5
Amostra (B)	88,5	92,0 ± 0,5	104
	782	798 ± 2	102
	1430	1411 ± 4	98,7

n = 3

(A) - SETA SUPERSOL LIGHT®

(B) - SETA SUPERSOL LÍQUIDO®

4.2.7) Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação de polifenóis totais em duas amostras comerciais de extratos tanínicos de acácia empregados em processos de curtimento de couros, a saber: SETA SUPERSOL LIGHT® e SETA SUPERSOL LÍQUIDO® (Seta S/A – Extrativa Tanino de Acácia. Estância Velha –RS). Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se a metodologia proposta pela AOAC.

O resultados obtidos empregando-se o procedimento em fluxo desenvolvido e procedimento da AOAC são apresentados na Tabela 4.5. Como pode ser observado nessa tabela, os resultados encontrados foram concordantes a um nível de 98% de confiança e dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento em fluxo desenvolvido e a importância do mesmo.

Tabela 4.5 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de extratos tanínicos da acácia empregados no curtimento de couros.

Amostras	Rotulado	Comparativo	Proposto	Er (%)
	(A) mg g ⁻¹ e (B) mg mL ⁻¹			
(A)	710	712 ± 3	698 ± 1	-2,0
(B)	360	370 ± 3	359 ± 1	-2,9

n = 3, nível de confiança de 98%.

Er, erro relativo entre o método proposto e o método comparativo da AOAC.

(A) - SETA SUPERSOL LIGHT®

(B) - SETA SUPERSOL LÍQUIDO®

4.3) Determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em reação de precipitação com cobre(II) em meio de acetato de amônio, utilizando sistema de análiseS por injeção em fluxo com zonas coalescentes

A reação química de precipitação entre cátions metálicos e compostos polifenólicos, em meio de acetato, foi pouco estudada. Entretanto, métodos analíticos que empregam esse sistema químico foram propostos, com resultados satisfatórios quando comparados a outros métodos presentes na literatura. Como descrito na seção 2.4.1, Valcárcel et al²⁷ determinaram polifenóis em vinhos e chás empregando reação com Cu(II) em meio de acetato. Em outra metodologia, Reed et al⁵⁰ empregaram itérbio(III) em meio de acetato para quantificar compostos polifenólicos em extratos de plantas.

O espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível do precipitado em suspensão, formado pela reação química entre polifenóis e sulfato de cobre em meio de acetato de amônio, está apresentado na Figura 4.23. Foi selecionado o comprimento de onda de 500 nm para as medidas quantitativas. Comprimentos de onda superiores a esse apresentam a absorção referente ao cobre(II) presente no meio reacional.

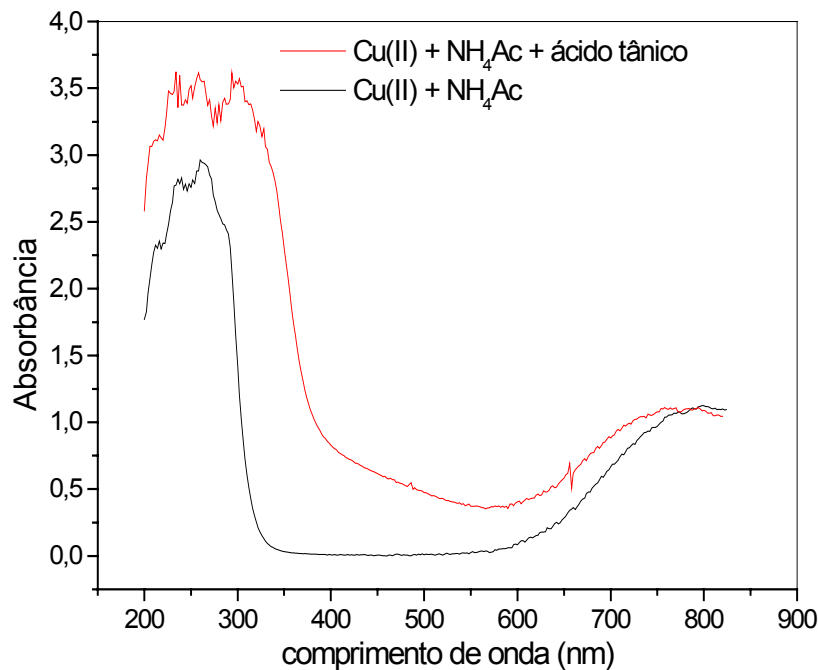


Figura 4.23: Espectro de absorção molecular na região do ultravioleta e visível do branco (reagentes sulfato de cobre e acetato de amônio) e do precipitado em suspensão formado pela reação química entre ácido tânico e sulfato de cobre em meio de acetato de amônio. As medidas quantitativas foram feitas em 500 nm.

Inicialmente, foram estudados três diferentes configurações de sistemas em fluxo com o objetivo de avaliar os melhores resultados em termos de sensibilidade e estabilidade de linha de base. Os experimentos foram feitos em sistemas FIA com comprimento de alças de amostragem de $150\mu\text{L}$, vazão total medida no descarte de $5,2\text{ mL min}^{-1}$ e comprimento do reatores helicoidais de 100 cm. Todas as medidas foram feitas em triplicata utilizando-se soluções de ácido tânico $1,0 \times 10^{-4}\text{ mol L}^{-1}$, sulfato de cobre (CuSO_4) $0,05\text{ mol L}^{-1}$ e acetato de amônio $0,05\text{ mol L}^{-1}$.

As Figuras 4.24, 4.25 e 4.26 apresentam os diagramas esquemáticos das configurações dos sistemas FIA avaliadas. Os sistemas diferem-se pela forma de entrada dos reagentes empregando coalescência, confluência ou transportador.

Nos sistemas representados pelas Figuras 4.24 e 4.25, o reagente CuSO_4 $0,05\text{ mol L}^{-1}$ (R_1) é inserido por coalescência e o reagente NH_4Ac $0,05\text{ mol L}^{-1}$ (R_2) é inserido pelo transportador e por confluência, respectivamente. O sistema representado pela Figura 4.26 emprega confluência para a inserção de ambos os reagentes.

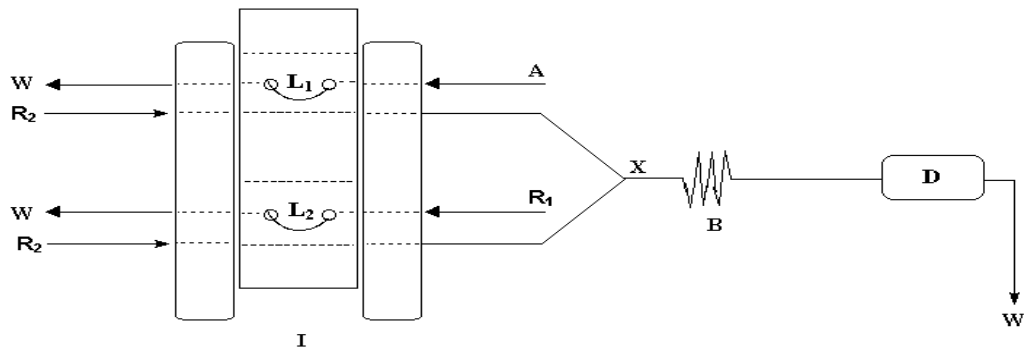


Figura 4.24 - Diagrama esquemático de sistema FIA com zonas coalescentes para determinação turbidimétrica de polifenóis. As representações são: I, injetor comutador; L₁, alça de amostragem (150 μ L) de A, soluções de referência; L₂, alça de amostragem (150 μ L) de R₁ (CuSO_4 0,050 mol L⁻¹); R₂, reagente (NH_4Ac 0,050 mol L⁻¹) a vazão de 2,6 mL min⁻¹; X, ponto de confluência; B, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte.

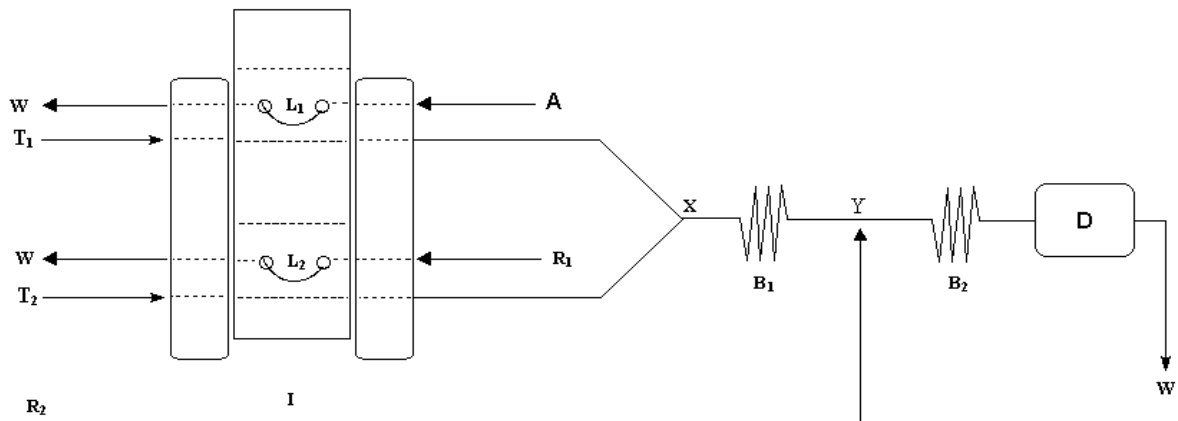


Figura 4.25 - Diagrama esquemático do sistema FIA com zonas coalescentes e R₂ entrando por confluência, para determinação turbidimétrica de polifenóis. I, injetor; L₁, alça de amostragem (150 μ L) da amostra; L₂, alça de amostragem (150 μ L) de R₁ (CuSO_4 0,050 mol L⁻¹); R₂, reagente NH_4Ac 0,050 mol L⁻¹ (1,7 mL min⁻¹); T₁ e T₂ transportadores da amostra e do reagente (água deionizada) a vazão de 1,7 mL min⁻¹; X e Y, pontos de confluência; B₁, reator helicoidal (100 cm); B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte.

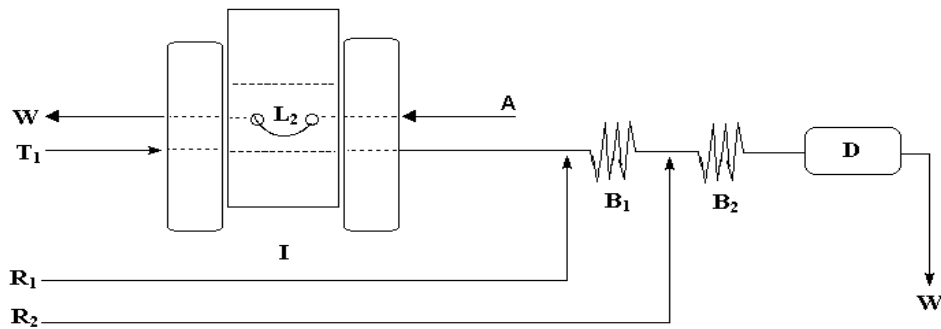


Figura 4.26 - Diagrama esquemático do sistema FIA com reagentes entrando por confluência, para determinação turbidimétrica de polifenóis. I, injetor; T, transportador (água deionizada) a $1,3 \text{ mL min}^{-1}$; L, alça de amostragem ($150 \mu\text{L}$) de A, soluções de referência e amostras; R₁, reagente CuSO_4 $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$); R₂, reagente NH_4Ac $0,050 \text{ mol L}^{-1}$ ($1,3 \text{ mL min}^{-1}$); B₁, reator helicoidal (100 cm); B₂, reator helicoidal (100 cm); D, detector em 500 nm e W, descarte.

Não foram observadas variações significativas na magnitude do sinal analítico para os diferentes sistemas. O sistema apresentado na Figura 4.25 apresentou melhores resultados em termos de estabilidade de linha base, além de ser o sistema que possui menor consumo total de reagentes. Diante disso, esse sistema com a adaptação do fluxo intermitente de limpeza, foi selecionado para estudos posteriores.

Observou-se nestes estudos preliminares a necessidade de adaptação de um fluxo intermitente de solução de HNO_3 , a alta vazão ($3,5 \text{ mL min}^{-1}$), para a limpeza do sistema no momento de amostragem (Figura 3.4). Com essa etapa de limpeza, foram superados problemas de aumento de linha base causados pela deposição de precipitado na cela de detecção até então observados.

4.3.1) Estudo dos parâmetros químicos do sistema FIA

Várias soluções foram empregadas como soluções transportadoras para verificar seu efeito sobre o sinal analítico. Todas as medidas foram feitas em triplicata. O efeito do pH das soluções transportadoras T₁ e T₂ foi avaliado usando soluções tampões acetato $0,2 \text{ mol L}^{-1}$ na faixa de pH 4,0 e 6,0. Houve um pequeno aumento de sinal analítico com o aumento do pH da solução tampão. Entretanto, a água deionizada apresentou maior sinal analítico em comparação aos tampões.

Soluções aquosas diluídas ($0,01 \text{ mol L}^{-1}$) de ácido nítrico, ácido sulfúrico e ácido acético também foram avaliadas como soluções transportadoras, porém tiveram piores desempenhos em termos de magnitude de sinal analítico em

comparação a água deionizada. Dessa maneira, água deionizada foi selecionada como soluções transportadoras T₁ e T₂ em estudos posteriores.

O efeito da concentração do reagente CuSO₄ sobre o sinal analítico foi avaliado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ a $0,10$ mol L⁻¹, mantendo a concentração de ácido tânico sempre em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A Figura 4.27 mostra que a absorvância aumentou com o aumento de concentração de CuSO₄ até $0,10$ mol L⁻¹, acima da qual permaneceu constante. Portanto, a concentração de $0,10$ mol L⁻¹ foi selecionada para o reagente CuSO₄ em estudos posteriores.

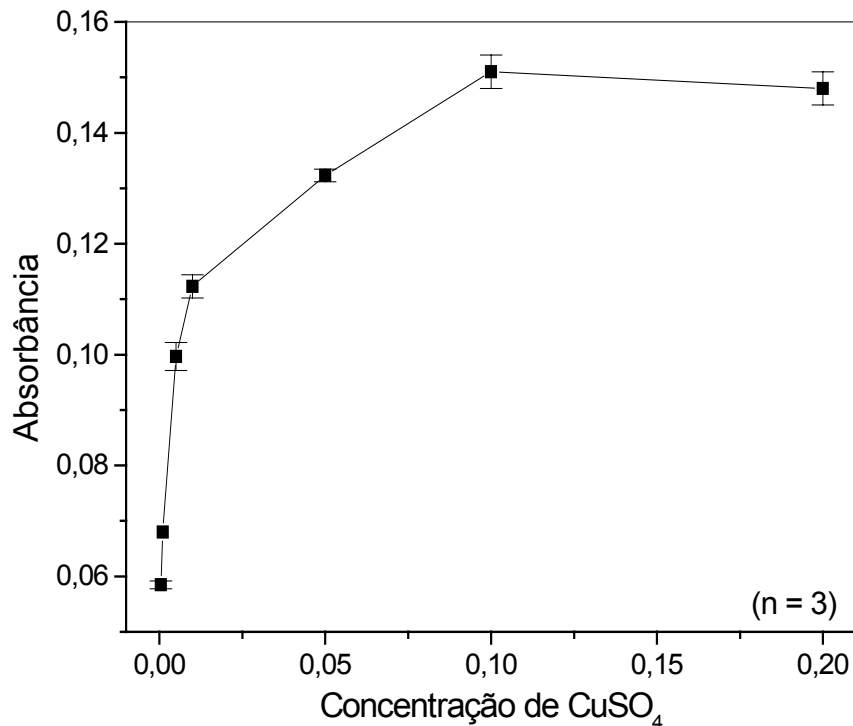


Figura 4.27: Efeito da concentração de CuSO₄ sobre o sinal analítico na determinação turbidimétrica de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹; alças de amostragem L₁ e L₂ de 150 μL, vazão dos transportadores (água deionizada) T₁ e T₂ de 1,7 mL min⁻¹, concentração de NH₄Ac (1,7 mL min⁻¹) de $0,05$ mol L⁻¹ e comprimento dos reatores helicoidais B₁ e B₂ de 100 cm.

O efeito da concentração do reagente NH₄Ac sobre o sinal analítico, foi avaliado na faixa de concentração de $1,0 \times 10^{-3}$ mol L⁻¹ a $0,10$ mol L⁻¹, mantendo a concentração de ácido tânico sempre em $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. A Figura 4.28 mostra que a absorvância aumentou com o aumento de concentração de NH₄Ac até $0,10$ mol L⁻¹, acima da qual ocorreu aumento não significativo. Portanto, a concentração de $0,10$ mol L⁻¹ foi selecionada para o reagente NH₄Ac em estudos posteriores.

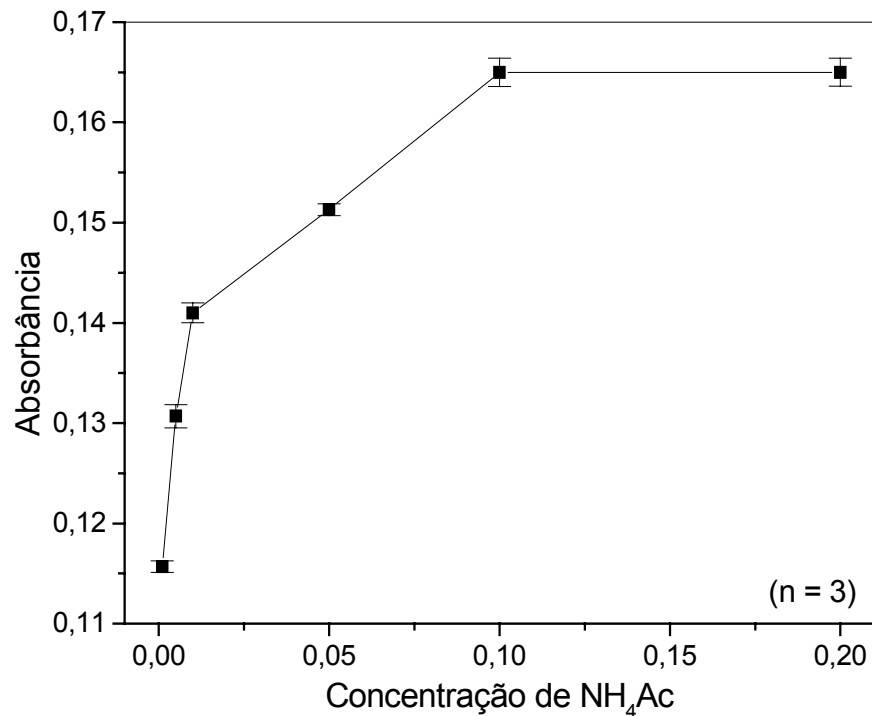


Figura 4.28 - Efeito da concentração de NH₄Ac sobre o sinal analítico na determinação turbidimétrica de polifenóis. Concentração de ácido tânico mantida em $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$; alças de amostragem L₁ e L₂ de 150 μL , vazão dos transportadores (água deionizada) T₁ e T₂ de $1,7 \text{ mL min}^{-1}$, concentração de CuSO₄ ($1,7 \text{ mL min}^{-1}$) de $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e comprimento dos reatores helicoidais B₁ e B₂ de 100 cm.

4.3.2) Estudo dos parâmetros físicos do sistema FIA

Os parâmetros físicos do sistema em fluxo foram otimizados para obtenção dos melhores resultados em termos de sensibilidade, estabilidade da linha de base e frequência de amostragem. Todas as medidas foram feitas em triplicata.

O efeito da variação dos volumes da amostra e do reagente, foram estudados variando-se simultaneamente os comprimentos das alças de amostragem L₁ e L₂. Os volumes foram variados simultaneamente entre 50 e 450 μL . Como mostra a Figura 4.29, para uma solução de ácido tânico de $1,0 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, ocorreu um aumento significativo na magnitude do sinal analítico com o aumento do volume das alças de amostragem até 350 μL , a partir da qual permaneceu praticamente constante. Desta maneira, volumes de 350 μL foram selecionados para a amostra e o reagente.

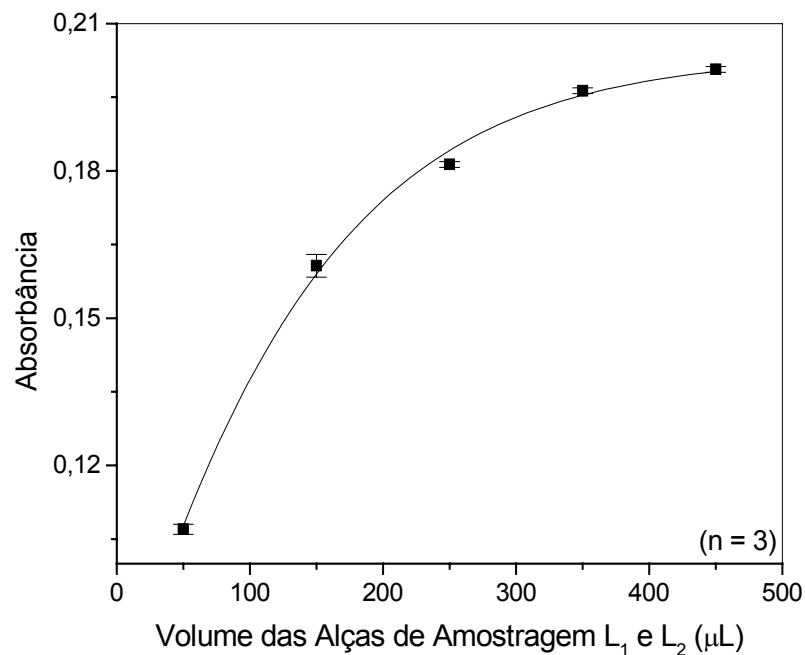


Figura 4.29 - Efeito do volume das alças de amostragem L₁ (ácido tânico $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹) e L₂ (CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹), avaliados simultaneamente entre 50 e 450 µL, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Vazão das soluções transportadoras T₁ e T₂ (água deionizada) de 1,7 mL min⁻¹, reagente R₂ (NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹) a vazão de 1,7 mL min⁻¹ e reatores helicoidais B₁ e B₂ de 100 cm.

O efeito do comprimento dos reatores helicoidais foram estudados univariadamente na faixa de 50 a 300 cm. Não foram observadas mudanças significativas na magnitude de sinal com a variação nos comprimentos dos reatores. Foram selecionados comprimentos de 50 e 100 cm para os reatores B₁ e B₂, respectivamente, pelos melhores resultados em termos de estabilidade da linha de base e frequência de amostragem.

O efeito das vazões das soluções transportadoras T₁ e T₂ foi estudado simultaneamente na faixa de 1,7 a 3,1 mL min⁻¹. Como mostra a Figura 4.30, não foi verificada variação significativa na magnitude do sinal analítico no intervalo de vazões de 1,7 a 2,6 mL min⁻¹, a partir do qual houve diminuição de sinal. Desta maneira, selecionou-se vazão de 2,6 mL min⁻¹ pela maior frequência analítica.

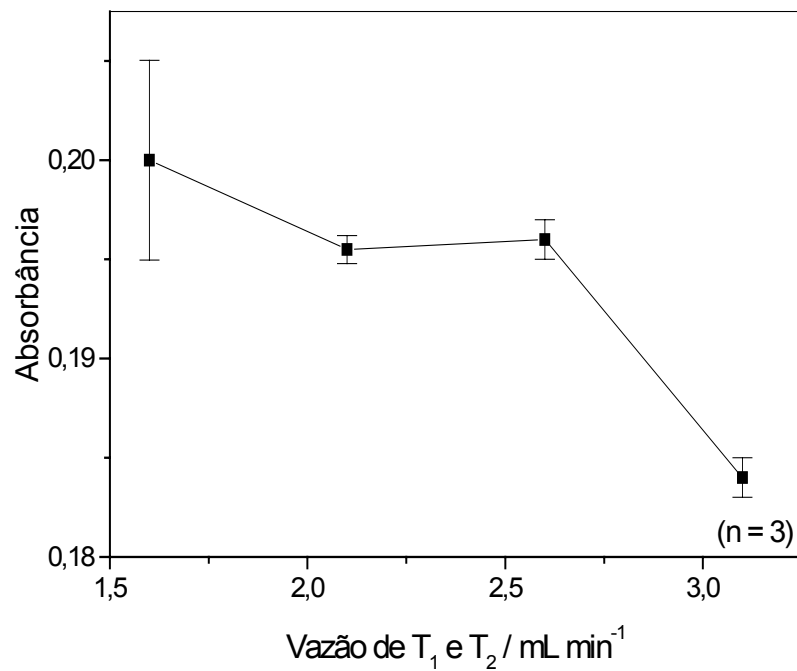


Figura 4.30 - Efeito das vazões das soluções transportadoras T₁ e T₂ (água deionizada), estudadas simultaneamente na faixa de 1,7 a 3,1 mL min⁻¹, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L₁ (ácido tânico 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) e L₂ (reagente R₁, CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹) de 350 μL, R₂ (NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹) a vazão de 1,7 mL min⁻¹ e reatores helicoidais B₁ e B₂ de 50cm e 100cm, respectivamente.

O efeito da vazão do reagente R₂ (NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹) foi avaliado na faixa de 0,7 a 2,6 mL min⁻¹. Como mostra a Figura 4.31, foi verificado aumento no sinal analítico com o diminuição da vazão. Foi selecionada a vazão de 0,7 mL min⁻¹ pela maior sensibilidade e menor consumo de reagente..

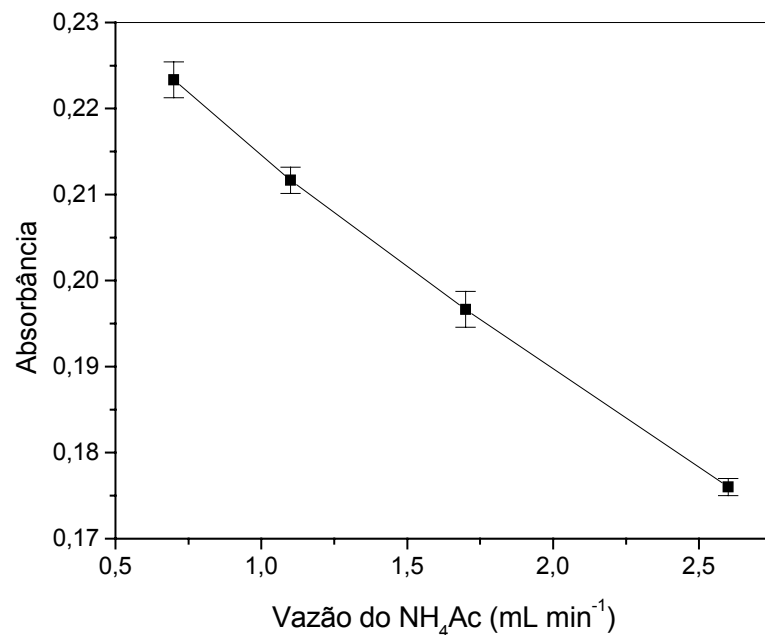


Figura 4.31 - Efeito da vazão do reagente R₂ (NH₄Ac 0,10 mol L⁻¹), estudada na faixa de 0,7 a 2,6 mL min⁻¹, sobre o sinal analítico na determinação de polifenóis. Alças de amostragem L₁ (ácido tânico 1,0 x 10⁻⁴ mol L⁻¹) e L₂ (CuSO₄ 0,10 mol L⁻¹) de 350 μL; T₁ e T₂ (água deionizada) a vazões de 2,6 mL min⁻¹ e reatores helicoidais B₁ e B₂ de 50 cm e 100 cm, respectivamente.

4.3.3) Curva Analítica

O sistema da análise por injeção em fluxo para determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em reação de precipitação com cobre(II) em meio de acetato de amônio, apresentou uma curva analítica ($A = -0,00408 + 1974,55 \times C$, $r = 0,9997$) linear no intervalo de concentrações de ácido tânico entre $1,06 \times 10^{-5}$ e $4,26 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (18,0 a 724,7 mg L⁻¹) e um limite de detecção de $3,81 \times 10^{-6}$ mol L⁻¹ (6,49 mg L⁻¹) (três vezes o desvio padrão do branco/inclinação da curva analítica), conforme apresentado na Figura 4.32.

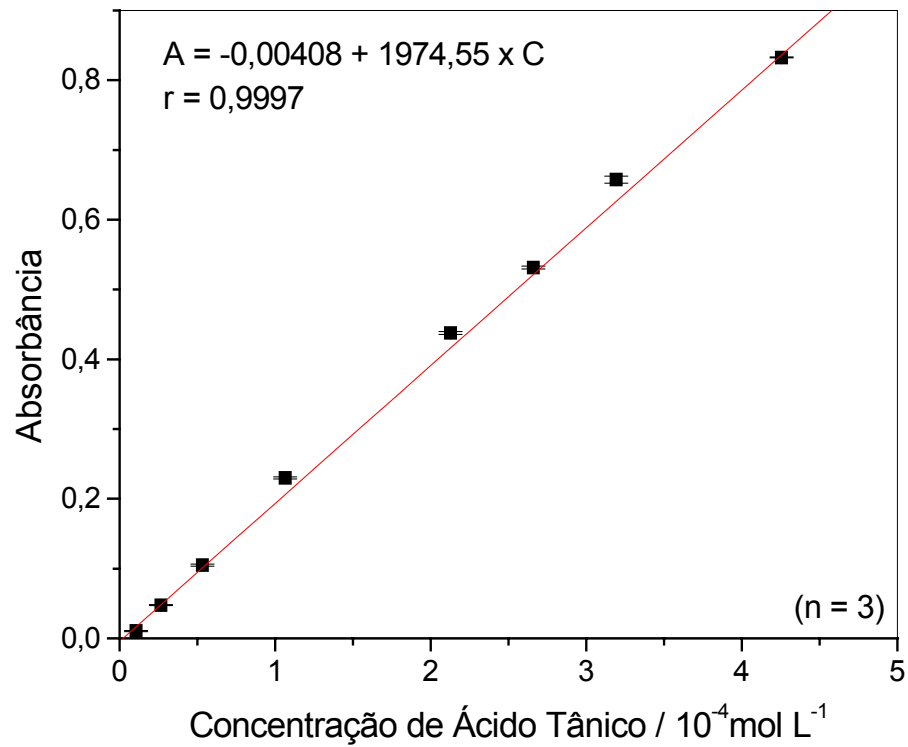


Figura 4.32 - Curva analítica para determinação turbidimétrica de polifenóis, baseada em sua reação de precipitação com cobre, utilizando sistema em fluxo com zonas coalescentes.

Os sinais transientes obtidos em triplicatas ($1,06 \times 10^{-5}$, $2,66 \times 10^{-5}$, $5,32 \times 10^{-5}$, $1,06 \times 10^{-4}$, $2,13 \times 10^{-4}$, $2,66 \times 10^{-4}$, $3,19 \times 10^{-4}$ e $4,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$) das soluções de referência de ácido tânico injetadas no sistema em fluxo, são mostrados na Figura 4.33.

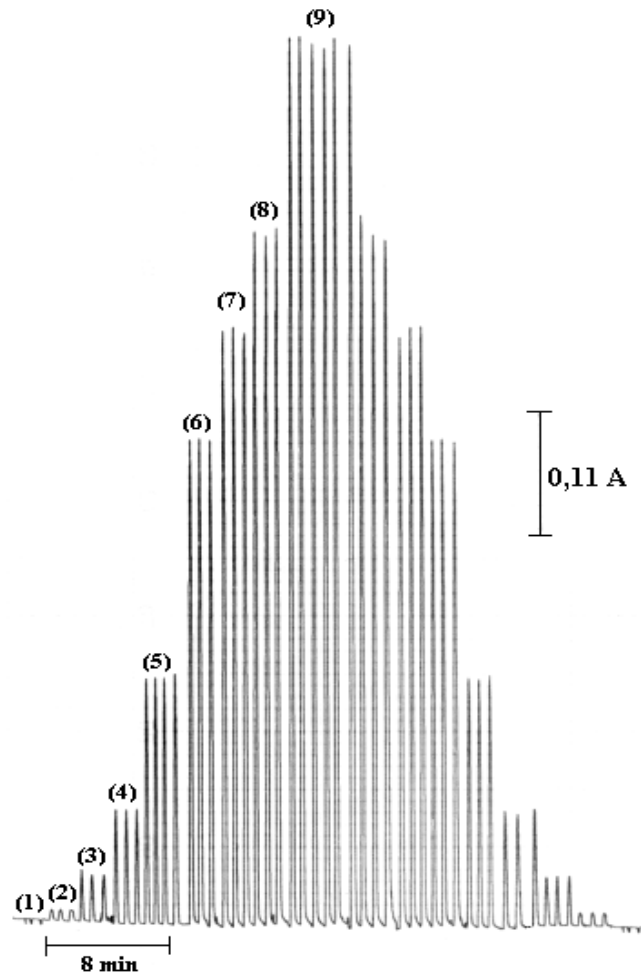


Figura 4.33: Sinais transientes em triplicatas (1) do branco e das soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,66 \times 10^{-5}$, (4) $5,32 \times 10^{-5}$, (5) $1,06 \times 10^{-4}$, (6) $2,13 \times 10^{-4}$, (7) $2,66 \times 10^{-4}$, (8) $3,19 \times 10^{-4}$ e (9) $4,26 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.4.2.

4.3.4) Estudo da repetibilidade e frequência de amostragem

Estudou-se a repetibilidade do procedimento analítico em concentrações de soluções padrões de ácido tânico de $6,41 \times 10^{-5}$ e $2,14 \times 10^{-4} \text{ mol L}^{-1}$, obtendo-se desvios padrões relativos de 0,87 e 0,96 % respectivamente (Figura 4.34). A frequência de amostragem foi de 90 determinações por hora.

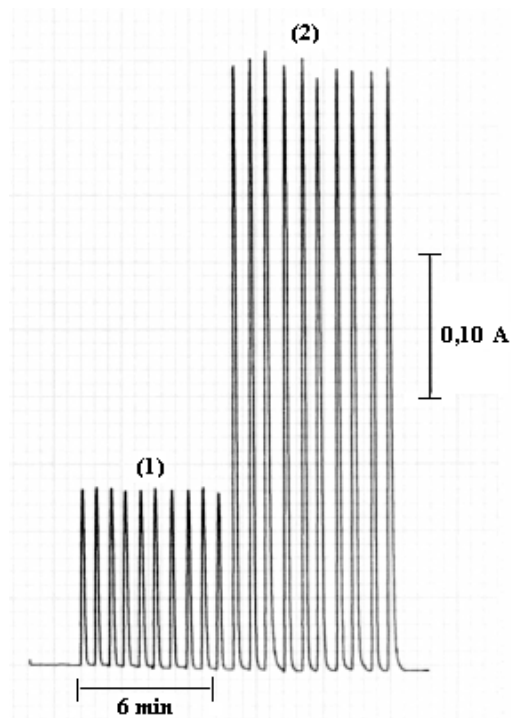


Figura 4.34: Estudo da repetibilidade para soluções de referência de ácido tânico nas concentrações de (1) $6,41 \times 10^{-5}$ e (2) $2,14 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹. As condições do sistema FIA são aquelas apresentadas no item 3.4.2.

4.3.5) Estudo de interferentes em potencial

O efeito de interferentes em potencial na determinação de polifenóis em amostras de chás foi avaliado para substâncias comuns neste tipo de amostra. Nesses experimentos, foram comparados os sinais analíticos de soluções de referência de ácido tânico $1,0 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (170 mg L⁻¹) e os sinais analíticos de soluções contendo ácido tânico nesta mesma concentração juntamente com o interferente em potencial em concentrações dez vezes inferiores, na mesma concentração e em concentrações dez vezes superiores. A Tabela 4.6 apresenta os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 4.6 - Estudos de interferentes em potencial comuns em amostras de chás na determinação de polifenóis.

Interferente em potencial	Padrão / Interferente (respostas relativas %)		
	10/1	1/1	1/10
Cafeína	99,1	102	107
Carboximetilcelulose	101	93,9	90,2
Glicose	97,9	101	98,8
Ácido ascórbico	103	98,0	86,2

Os resultados apresentados na Tabela 4.6 mostram que apenas o ácido ascórbico e a carboximetilcelulose causaram interferência significativa em concentrações 10 vezes superiores à concentração de ácido tânico (padrão para compostos polifenólicos).

A interferência observada do ácido ascórbico em concentrações 1/10 (padrão/interferente) provavelmente seja devido a redução do Cu(II) a Cu(I) por esse interferente. Como o Cu(I) não forma complexo com polifenóis, há a diminuição de sinal analítico. Entretanto, como discutido anteriormente, chás possuem concentrações baixas de ácido ascórbico.

4.3.6) Teste de adição e recuperação

No teste de adição e recuperação três concentrações diferentes de ácido tânico, a saber: $2,0 \times 10^{-5}$, $1,0 \times 10^{-4}$, e $2,1 \times 10^{-4}$ mol L⁻¹ (35,0 , 175 e 350 mg L⁻¹) foram adicionadas a três amostras de chás e os resultados obtidos (descontados daqueles originalmente presente na amostra sem a adição de analito) foram comparados com as concentrações adicionadas. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.7.

Tabela 4.7 - Estudo de adição e recuperação de ácido tânico em amostras de chás comerciais.

Amostras	Adicionado/mg L⁻¹	Recuperado/mg L⁻¹	% Recuperação
Chá Verde Leão [®]	35,0	38,8 ± 0,4	111
<i>Camelia sinensis</i>	175	167 ± 1	95,4
	350	324 ± 2	92,6
Chá Preto Leão [®]	35,0	39,8 ± 0,4	114
<i>Camelia sinensis</i>	175	160 ± 1	91,4
	350	325 ± 2	93,0
Chá Mate Leão [®]	35,0	38,1 ± 0,3	109
<i>Ilex paragua-</i>	175	164 ± 1	93,7
<i>riensis</i>	350	320 ± 1	91,3

n = 3

Como pode ser observado, a recuperação variou de 91,3 a 114%, indicando interferência da matriz da amostra no sinal analítico do procedimento proposto. Desta maneira, optou-se por analisar as amostras pelo método de adição múltipla de padrão.

4.3.7) Aplicação

O método proposto foi aplicado na determinação do teor total de polifenóis em três amostras de chás comerciais, a saber: chá verde leão[®], chá preto leão[®] e chá mate leão[®]. Os resultados foram comparados com aqueles obtidos empregando-se a metodologia proposta pela AOAC.

Os resultados obtidos empregando-se o procedimento em fluxo desenvolvido e o procedimento da AOAC são apresentados na Tabela 4.8. Com um nível de confiança de 95%, os resultados encontrados foram concordantes dentro de um intervalo de erro aceitável, mostrando-se assim a confiabilidade do procedimento em fluxo desenvolvido e a importância do mesmo.

Tabela 4.8 - Determinação do teor total de polifenóis em amostras de chás pelo método proposto e pelo método da AOAC.

AMOSTRAS	COMPARATIVO	PROPOSTO	ER (%)
	mg g ⁻¹		
Chá Verde Leão [®] <i>Camelia sinensis</i>	87,0 ± 0,9	85,6 ± 0,7	-1,6
Chá Preto Leão [®] <i>Camelia sinensis</i>	65,8 ± 0,9	62,0 ± 0,6	-5,8
Chá Mate Leão [®] <i>Ilex paraguariensis</i>	105 ± 2	98,3 ± 0,9	-6,4

n = 3, nível de confiança de 95%.

Er, erro relativo entre o método proposto e o método comparativo da AOAC.

As Figuras 4.35, 4.36 e 4.37 apresentam os sinais transientes e as curvas obtidos nas determinações empregando-se o método de adição múltipla de padrões das amostras de chá verde, chá preto e chá mate, respectivamente.

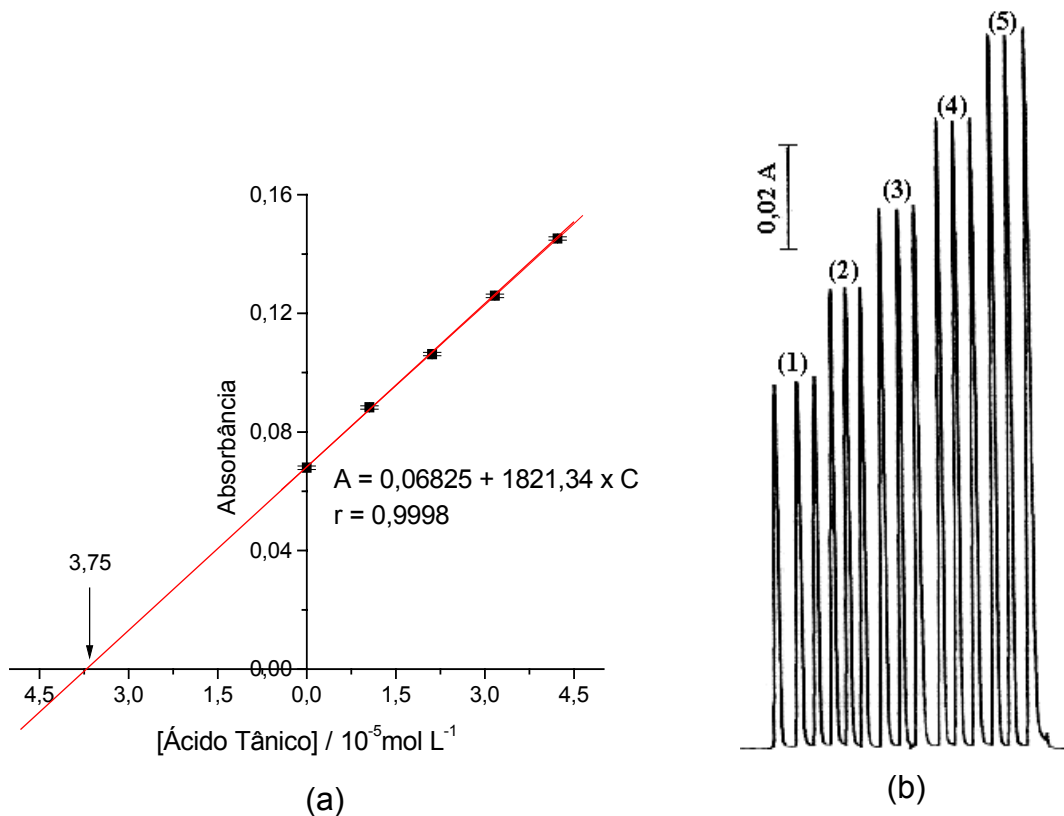


Figura 4.35: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá verde. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,06 \times 10^{-5}$, (3) $2,11 \times 10^{-5}$, (4) $3,17 \times 10^{-5}$ e (5) $4,22 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

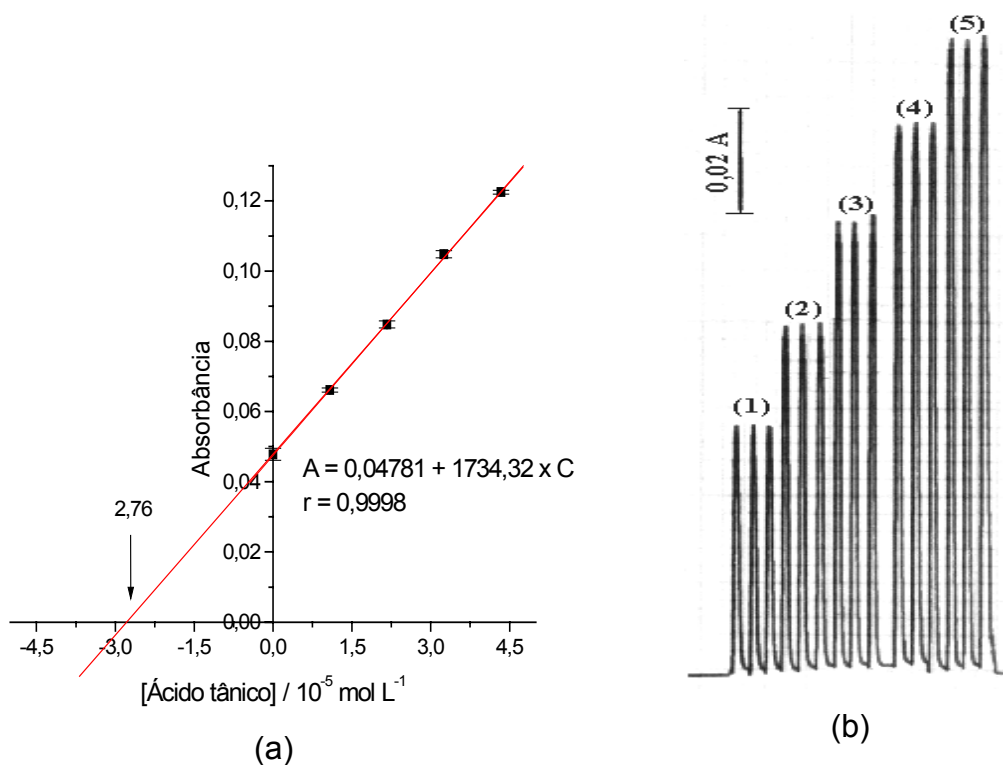


Figura 4.36: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá preto. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,17 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5}$ mol L⁻¹.

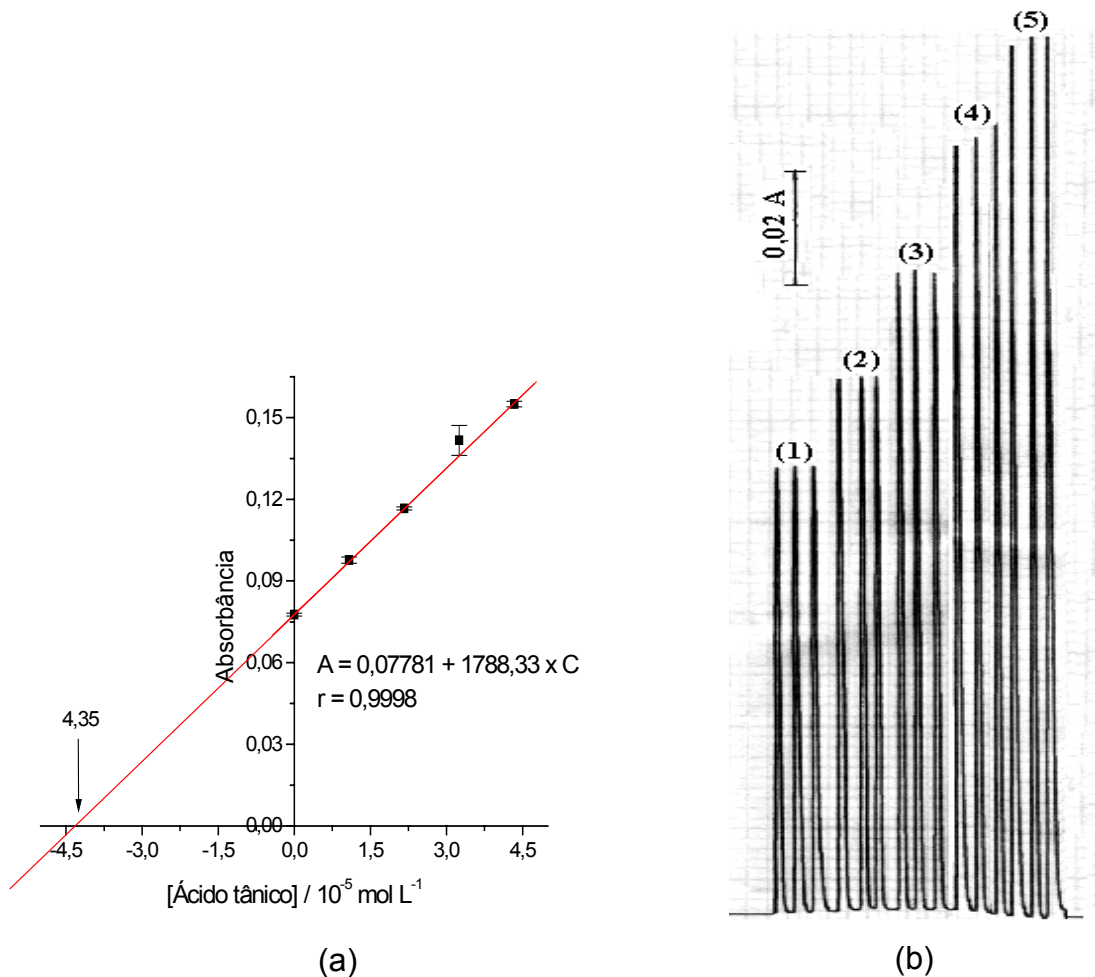


Figura 4.37: (a) Curva de adição múltipla de padrão para determinação de polifenóis em amostra de chá mate. (b) Sinais transientes obtidos em triplicata da curva de adição múltipla de padrão de ácido tânico a cada balão volumétrico: (1) sem adição, (2) $1,08 \times 10^{-5}$, (3) $2,17 \times 10^{-5}$, (4) $3,25 \times 10^{-5}$ e (5) $4,34 \times 10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$.

Como discutido anteriormente, as condições experimentais empregadas pelo método oficial da AOAC resulta em teores de polifenóis totais maiores que aqueles teores encontrados empregando uma metodologia que utiliza condições menos drásticas. Esse comportamento tem sido observado por diversos pesquisadores²⁵⁻²⁹, inclusive por Valcárcel et al²⁷ que propuseram um método para determinação de polifenóis totais (seção 2.4.1) que utiliza condições experimentais semelhantes ao método turbidimétrico aqui proposto. Dessa maneira, como observado na Tabela 4.8, as concentrações de polifenóis totais encontradas empregando-se o método oficial foram sempre maiores que aquelas encontradas empregando-se o método proposto em fluxo.

CAPÍTULO V
CONCLUSÕES

5) Conclusões

Os estudos realizados nesse trabalho de mestrado, permitiram o desenvolvimento de métodos analíticos em fluxo que podem ser facilmente aplicados em laboratórios de rotina na determinação de polifenóis totais, como alternativos ao método oficial da AOAC. Com isso, pode-se destacar algumas vantagens dos métodos propostos em relação ao método sugerido pela AOAC, como principalmente a frequência de amostragem e emprego de reagentes mais comuns em laboratórios de química analítica. Ademais, como os métodos propostos empregam mecanização, são obtidos melhores resultados em termos de precisão (repetibilidade).

Embora outros métodos descritos na literatura apresentem melhores sensibilidades que os métodos propostos, as amostras que geralmente são analisadas apresentam teores de polifenóis totais elevados, não limitando dessa maneira a aplicabilidade dos métodos em fluxo propostos nessa dissertação. Além disso, o emprego de reagentes de custo elevado como a rodamina²⁸ e o luminol²⁹, utilizados em algumas metodologias, podem ser substituídos por reagentes de menores custos como CuSO_4 e NH_4VO_3 .

A imobilização de reagentes sólidos em resina de poliéster permitiu a construção e o acoplamento de reatores em fase sólida em sistemas de análise em fluxo. Sistemas que empregam imobilização de reagente em reatores em fase sólida, geralmente apresentam melhores sensibilidades quando comparados a sistemas que utilizam reagentes em solução. Esse comportamento ocorre como resultado da diminuição da dispersão da amostra, pois a transferência de massa radial em um reator de fase sólida é mais intensa e também a espécie de interesse que passa pelo reator (analito ou reagente) é convertida mais prontamente em um determinado ponto do sistema^{11,12}. No sistema contendo reator em fase sólida proposto neste trabalho, embora fossem esperados melhores resultados em termos de sensibilidade quando comparado ao método que emprega o reagente em solução aquosa, esse comportamento não foi observado. Isso pode ter ocorrido devido ao uso de um reator com diâmetro interno grande (1,8 mm).

O desenvolvimento de métodos analíticos para determinação de polifenóis totais que utilizam a reação de precipitação com o reagente cobre(II) em meio de acetato, como discutido na seção 2.3.1, já havia sido preposto por Valcárcel

et al²⁷. Comparando-se o método turbidimétrico proposto nesse trabalho e o método desenvolvido por Valcárcel et al, pode-se observar :

- Com relação à sensibilidade, a metodologia de Valcárcel et al apresentou melhores resultados. Entretanto, como discutido anteriormente, as amostras em que são determinados polifenóis totais apresentam teores elevados dessas substâncias.
- Com relação a configuração dos sistemas, Valcárcel et al empregam um sistema em fluxo com um filtro conectado em posição não usual, o qual necessita de limpeza fora do sistema.
- A detecção turbidimétrica proposta no sistema descrito nessa dissertação, substituiu o espectrofotômetro de absorção atômica em chama utilizado por Valcárcel et al. Significando um menor custo tanto em termos operacionais como de implementação.

A Tabela 5.1 apresenta uma sinopse dos resultados obtidos no desenvolvimento dos métodos analíticos propostos para a determinação de polifenóis totais.

Tabela 5.1: Sinopse dos resultados obtidos no desenvolvimento dos métodos analíticos para a determinação de polifenóis totais.

Método Proposto	Linearidade / mol L⁻¹	L.D.^a / mol L⁻¹	Precisão (rsd)	% R^b	F. A.^c / h⁻¹
Espectrofotométrico com zonas coalescentes	2,1 x 10 ⁻⁵ a 3,2 x 10 ⁻⁴	7,6 x 10 ⁻⁶	0,8%	87,3 – 94,2	70
Espectrofotométrico com reator em fase sólida	5,2 x 10 ⁻⁵ a 1,2 x 10 ⁻³	5,9 x 10 ⁻⁶	1,1%	98,5 – 104	35
Turbidimétrico empregando Cu(II) / acetato	1,1 x 10 ⁻⁵ a 4,3 x 10 ⁻⁴	3,8 x 10 ⁻⁶	1,0%	91,3 - 114	90

^a limite de detecção

^b porcentagem de recuperação

^c freqüência de amostragem

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS

1. ESCARPA, A.; GONZALES, M.C., "An overview of analytical chemistry of phenolic compounds in foods". *Crit. Rev. in Anal. Chemistry*, **31**: 57, 2001.
2. HUANG, M.T.; HO, C.T.; LEE, C.Y., "Phenolic compounds in food and their effects on Health I: analysis, occurrence, and chemistry". ACS Symposium Series, Fourth Chemical Congress of North America, New York, 1991.
3. REIS, B.F.; GINÉ, M.F.; KRONKA, A.M. "A análise química por injeção em fluxo contínuo", *Quim. Nova*, **12**: 82, 1989.
4. REIS, B.F. "Análise química por injeção em fluxo: vinte anos de desenvolvimento", *Quim. Nova*, **19**: 51 1996.
5. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 40th edition, USA, 1984, pp.187-788.
6. RUZICKA, J.; HANSEN, E.H., "Flow injection analysis", New York, John Wiley & Sons, 2nd edition, USA, 1988.
7. SKEGGS, L.T., "An authomatic method for colorimetric analysis", *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**: 311, 1957.
8. Meios & Métodos "Análises químicas por injeção em fluxo: capítulo I", *Jornal de Tecnologia e Ciência* publicado pela Micronal[®], Ano VII, Nº 41, 1984.
9. Meios & Métodos "Análises químicas por injeção em fluxo: capítulo II", *Jornal de Tecnologia e Ciência* publicado pela Micronal[®], Ano VII, Nº 42, 1984.
10. Meios & Métodos "Análises químicas por injeção em fluxo: capítulo III", *Jornal de Tecnologia e Ciência* publicado pela Micronal[®], Ano VII, Nº 43, 1984.
11. MARTÍNEZ-CALATAYUD, J.; GARCÍA-MATEO, J. V. "On-line solid-phase reactors for unsegmented continuous-flow drugs analysis", *Trends Anal. Chem.*, **12**: 428, 1993.
12. LUQUE DE CASTRO, M.D. "Solid-phase reactors in flow injections analysis", *Trends Anal. Chem.*, **11**: 149, 1992.
13. PEREIRA, A.V., "*Aplicações de forno de microondas e de reatores em fase sólida em sistema por injeção em fluxo*". Tese de Doutorado, São Carlos, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 1999.
14. HANDIQUE, J.G.; BARUAH, J.B. "Polyphenolic compounds: an overview", *React. & Funct Polym.*, **52**: 163, 2002.
15. NIJVELDT, R.J; VAN NOOD, E; VAN HOORN, DEC; BOELEN, PG; VAN NORREN, K; VAN LEEUWEN, P.A.M., "Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications", *Amer. J. of Clin. Nutr.*, **74**: 418, 2001.
16. CHUNG, K.T.; WONG, T. Y.; WEI, C.; HUANG; Y.W.; LIN, Y., "Tannins and Human Health: A Review", *Crit. Rev. in Food Scien. and Nut.*, **38**: 421, 1998.

17. FERREIRA, E.C., “Determinação de taninos baseada em reação de precipitação com hemoglobina”. Dissertação de Mestrado, São Carlos, Universidade Federal de São Carlos – UFSCar, 2001.
18. SANTOS-BUELGA, C.; SCALBERT, A., “Proanthocyanidins and tannin-like compounds - nature, occurrence, dietary intake and effects on nutrition and health”. *J. of the Sci. of Food and Agric.*, **80**: 1094, 2000.
19. BRAVO, L., “Polyphenols: Chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance”. *Nutrition Reviews*, **56**: 317, 1998.
20. DREOSTI, I.E.; WARGOVICH, M.J.; YANG, C.S., “Inhibition of carcinogenesis by tea: The evidence from experimental studies”. *Crit. Rev. in Food Scien. and Nut.*, **37**: 761, 1997.
21. MUELLER-HARVEY, I., “Analysis of hydrolysables tannins”. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, **91**: 3, 2001.
22. Schofield, P.; Mbugua, D.M.; Pell, A.N., “Analysis of condensed tannins: a review”. *Anim. Feed Sci. and Tech.*, **91**: 21, 2001.
23. DRESSLER, V.L.; MACHADO, E.L.; MARTINS, A.F., “Spectrophotometric determination of tannin in tanning effluent with a flow injection system”, *Analyst*, **120**: 1185, 1995.
24. CERDÀ, V.; CELESTE, M.; TOMÁS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M. “Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index of wines using Folin-Ciocalteu reagent”, *Anal. Chim. Acta*, **269**: 21-28, 1992.
25. HUANG, H.L.; LUK, S.F.; LAU, O.W. “Spectrophotometric determination of tannins in tea and beer samples with iron(III) and 1,10-phenanthroline as reagents”, *Analyst*, **114**: 631, 1989.
26. AMIN, A.S., “Utilization of tetrazolium blue for the colorimetric assay of tannin in tea”, *Mikrochim. Acta*, **126**: 105, 1997.
27. YEBRA, M.C; GALLEGO, M.; VALCÁRCEL, M., “Indirect flow-injection determination of tannins in wines and tea by atomic absorption spectrometry”, *Anal. Chim. Acta*, **308**: 357, 1995.
28. FENG, S.; TANG, A.; JIANG, J.; FAN, J. “Spectrofluorimetric determination of tannins based on their activative effect on the Cu(II) catalytic oxidation of Rhodamine 6G by hydrogen peroxide”, *Anal. Chim. Acta*, **455**: 187-191, 2002.
29. MENG, R.; CUI, H.; LI, Q.; ZHAO, H. AND HE, C. “Flow injection analysis of tannic acid inhibited chemiluminescent detection”, *Anal. Chim. Acta.*, **362**: 151-155, 1998.
30. ACHILI, G.; CELLERINO, G.P.; GAMACHE; P.H.; D’EDRIL, G.V.M.; “Identification and determination constituents in natural beverages and plant extracts by means of a coulometric electrode array system”. *J. of Chromat*, **632**: 111, 1993.

31. ZHAO, G.; HE, C.; CUI, H., "Determination of polyphenols by high-performance liquid chromatography with inhibited chemiluminescence detection", *J. of Chromat A*, **855**: 171, 1999.
32. ARCE, L.; RÍOS; A.; VALCÁRCEL; M., "Determination of anti-carcinogenic polyphenols present in green tea using capillary electrophoresis coupled to a flow injection system". *J. of Chrom A*, **827**: 113, 1998.
33. MELLO, L.D.; SOTOMAYOR, M.P.T.; KUBOTA, L.T., "HRP-based amperometric biosensor for the polyphenols determination in vegetables extract", *Sensors and Actuators B*, **96**: 636, 2003.
34. MAKKAR, H.P.S.; DAWRA, R.K.; SINGH, B. "Protein precipitation assay for quantitation of tannins: determination of protein in tannin-protein complex", *Anal. Biochem.*, **166**: 435, 1987.
35. HAGERMAN, A.E.; BUTLER, L.G., "Protein precipitation method for the quantitative determination of tannins". *J. Agric. Food. Chem.*, **4**: 809, 1978.
36. CERDÁ, V.; CELESTE, M.; TOMÁS, C.; CLADERA, A.; ESTELA, J.M.; "Thermometric titration of polyhydric phenols. Application to the determination of tannin content in wines". *Analyst*, **118**: 895, 1993.
37. DING, M.; YANG, H.; XIAO, S., "Rapid, direct determination of polyphenols in tea by reversed-phase column liquid chromatography". *J. of Chrom. A*, **849**: 637, 1999.
38. LUQUE DE CASTRO, M.D.; MATAIX, E., "Simultaneous (or sequential) determination of the total polyphenol index (or I₂₈₀) and the density in wines by flow injection". *Analyst*, **126**: 251, 2001.
39. UCHIYAMA, S.; SUZUKI, S., "Flow-injection determination of polyphenols using a plant juice carrier". *Anal. Chim. Acta*, **261**: 361, 1992.
40. BAJAJ, K.L.; DEVSHARMA, A.K., "A colorimetric method for the determination of tannins in tea", *Mikroch. Acta.*, **11**: 249, 1997.
41. CHRISTIAN, J.B.S.; MAYNARD, A.J.; LUKTON, A.; "Determination of tannins and related polyphenols in food: Comparison of Loewrenthal and pro methods". *Anal. Chem.*, **27**: 1159, 1955.
42. SHARMA, O.P.; BHAT, T.K.; SINGH, B. "Thin-layer chromatography of gallic acid, methyl gallate, pyrogallol, phloroglucinol, catechol, resosinol, hydroquinone, catechin, epicatechin, cinnamic acid, ferulic acid and tannic acid", *J. Chromatog. A*, **822**: 167-171, 1998.
43. GONZÁLEZ-RODRÍGUES, J.; PÉREZ-JUAN, P.; LUQUE DE CASTRO, M.D., Method for the simultaneous determination of total polyphenol and anthocyan indexes in red wines using a flow injection approach". *Talanta*, **56**: 53, 2002.

44. ZEEB, D.J.; NELSON, B.C.; ALBERT, K.; DALLUGE, J.J. "Separation and identification of twelve catechins in tea using liquid chromatography/atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry", *Anal. Chem.*, **72**: 5020-5026, 2000.
45. KAPEL, M.; KARUNANIYHY, R. "The determination of tannins with cerium(IV) sulphate", *Analyst*, **99**: 661-665, 1974.
46. ITTAH, Y. "Titration of tannin via alkaline phosphatase activity", *Analytical Biochem.*, **192**: 277-280, 1991.
47. REIS, F.B.; BERGAMIN F^o, H., "Evolução dos injetores empregados em sistemas de análise por injeção em fluxo". *Quím. Nova*, **16**: 570, 1993.
48. MORITA, T.; ASSUNPÇÃO, R.V., "Manual de soluções, reagentes e solventes", 2^a edição, Ed. Edgard Blucher Ltda, 1998, p 172.
49. JEFFERY, G.H.; BASSET, J.; MENDHAM, J.; DENNEY, R.C., "Vogel: Análise química quantitativa", tradução Horácio Macedo, 5^a edição, editora Guanabara Koogan S.A., Rio de Janeiro/R.J., 1992.
50. ELINANY, G.A.; EBEID, F.M.; ZANRA, A.M.; ZIEDAN, F.I. "Polarography of metal-gallic complexes", *J. Electroanal. Chem.*, **72**: 363, 1976.
51. SENOZAN, N.M., "Vanadium in living world", *J. Chem. Educ.*, **51**: 503, 1974.
52. ABDEL-GAWAD, F.; ISSA, R.M., "Spectrophotometric determination of vanadium(V) with tannic acid & its applications to biological fluids". *Indian J. of Chem.*, **25**: 701, 1986.
53. SERRAT, F.B.; MORELL, G.B., "Colorimetric method for the determination of vanadium with tannic acid in water and oils". *Fres. J. Anal. Chem.*, **349**: 717, 1994.