

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

## **Determinação de compostos fenólicos por HPLC**

**Patrícia Damasceno Silva**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Química Industrial**

2º Ciclo de estudos

Orientadoras: Prof. Doutora Albertina Marques

Prof. Doutora Maria Lúcia Almeida da Silva

**Covilhã, Outubro de 2012**

*Aos meus Pais e a minha irmã*

## Agradecimentos

Em primeiro lugar, pretendo agradecer às orientadoras, Professora Doutora Albertina Marques e Professora Maria Lúcia Almeida da Silva, pela disponibilidade, a sabedoria, os ensinamentos constantes em todo o processo de orientação científica desta dissertação e por toda a paciência em me ajudarem em tudo o que necessitei. Foi um privilégio ter sido vossa orientanda.

Ao Professor Arlindo Gomes, pela ajuda e fornecimento das amostras necessárias para a realização deste trabalho.

À Inês Silva e ao Paulo Braz pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional, compreensão nos momentos de maior indisponibilidade minha, e por estarem sempre presentes.

A todos os meus amigos que me apoiaram ao longo de todo este processo, aceitando as minhas constantes ausências.

E a todas as pessoas que de uma maneira ou de outra sempre me apoiaram para que a realização deste trabalho fosse possível.

## Resumo

Na presente dissertação são descritas duas metodologias analíticas para a identificação e quantificação de compostos fenólicos, nomeadamente a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído, em amostras de concentrado obtido através de nanofiltração do efluente produzido na etapa inicial do processamento da cortiça destinada à remoção de contaminantes, designada como “cozimento”.

Utilizando a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi realizada a optimização analítica e separação cromatográfica. Utilizou-se a metodologia de análise de HPLC pelo método de eluição por gradiente com coluna de fase reversa C18 5 $\mu$ m (250 x 4mm) à temperatura de 25°C, com um fluxo de eluição de 1mL min<sup>-1</sup> e a detecção foi feita por um detector por arranjo de diodos.

A separação cromatográfica utilizou como fases móveis as misturas A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)), usando o seguinte programa de gradiente: gradiente linear de 0% a 40% de B em 3 minutos, gradiente linear de 40% a 60% de B em 22 minutos, 60% de B isocrático em 18 minutos, gradiente linear de 60% a 80% de B em 12 minutos e por fim 80% de B isocrático em 5 minutos.

A dissertação apresenta a segunda parte dedicada à optimização da metodologia analítica, utilizando a extracção em fase sólida (SPE) como método de preparação de amostra, com objectivo de extrair os compostos fenólicos presentes nas amostras em questão.

Os métodos analíticos foram validados no que diz respeito à sensibilidade, curva analítica e linearidade, limite de detecção (LD) e de quantificação (LQ), precisão, exatidão (recuperação) e robustez, podendo ser aplicados à análise da vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído nas amostras em questão.

As curvas analíticas apresentaram valores de R<sup>2</sup> de 0,9996 para a vanilina e 0,9997 para o 3,4-dihidroxibenzaldeído.

A metodologia para determinação de compostos fenólicos mostrou-se seletiva e linear para uma faixa de trabalho de 1 a 6 ppm para a vanilina e de 1 a 5 para o 3,4-dihidroxibenzaldeído e apresentou limites de detecção e quantificação para a vanilina de 0,14 e 0,43 ppm e para o 3,4-dihidroxibenzaldeído de 0,11 e 0,32 ppm, respectivamente.

O método mostrou-se adequado à análise dos compostos fenólicos e todos os parâmetros de validação encontram-se dentro dos limites sugeridos para validação de métodos cromatográficos.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

**Palavras-chave:** Vanilina; 3,4-dihidroxibenzaldeído; Cromatografia líquida de alta eficiência; Extração em fase sólida; Validação de métodos.

## Abstract

In the present study are described two analytical methods for identification and quantification of phenolic compounds, such as vanillin and 3,4-dihydroxybenzaldehyde in concentrated samples obtained through nanofiltration effluent produced in the initial stage of the processing of cork intended for removing contaminants, referred to as "cooking".

Using high performance liquid chromatography (HPLC) it was performed an analytical optimization and chromatographic separation. It was used a methodology for analysis by HPLC gradient elution method with reverse phase column C18 column 5 $\mu$ m (250 x 4mm) at 25 ° C, with a elution flow of 1mL min<sup>-1</sup> and detection was performed by a diode array detector.

The chromatographic separation used mixtures as mobile phases A: 0.01 M phosphoric acid and B: water - methanol - 0.01 M phosphoric acid (70:28:2 (v/v)), using the following gradient program: linear gradient from 0% to 40% B in 3 min, linear gradient from 40% to 60% B in 22 min, 60% isocratic B in 18 minutes, linear gradient of 60% to 80% B in 12 minutes and finally isocratic 80% B in 5 minutes.

This thesis presents the second part dedicated to the optimization of analytical method, using solid phase extraction (SPE) as a method of sample preparation in order to extract the phenolic compounds present in the samples in question.

The analytical methods were validated with regard to sensitivity, linearity, and analytic curve, detection limit (LD) and quantification (LOQ), precision, accuracy (recovery) and robustness can be applied to the analysis of vanillin and 3,4-dihydroxybenzaldehyde in the samples in question.

The analytical curves present values of R<sup>2</sup> of 0.9996 for vanillin and 0.9997 for 3,4-dihydroxybenzaldehyde.

The methodology for the determination of phenolic compounds shown to be selective and linear for a working range of 1 to 6 ppm for vanillin and 1 to 5 for the 3,4-dihydroxybenzaldehyde and showed limits of detection and quantification of 0.14 to 0.43 ppm for vanillin and 0.11 to 0.32 ppm for 3,4-dihidroxibenzaldeído respectively.

The method was suitable for the analysis of phenolic compounds and all of the validation parameters are within the limits suggested for validation of chromatographic methods.

**Keywords:** Vanillin; 3,4-dihydroxybenzaldehyde; high performance liquid chromatography, solid phase extraction; Validation methods.

# Índice

Capítulo 1 - Introdução .....	2
1.1. Objectivos.....	3
1.2. Estrutura da dissertação .....	3
Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica .....	6
2.1. Introdução às Separações Cromatográficas .....	6
2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) .....	7
2.2.1. Conceito e História da Cromatografia líquida de alta eficiência .....	7
2.2.2. Fases .....	8
2.2.2. 1. Fases Móveis .....	8
2.2.2.2. Fases Estacionárias .....	10
2.2.3. Mecanismos da HPLC .....	13
2.2.3.1. Líquido-líquido ou partição.....	13
2.2.3.2. Cromatografia Líquida com Fase Ligada .....	13
2.2.3.3. Líquido-sólido ou absorção .....	15
2.2.3.4. Cromatografia por troca iónica.....	16
2.2.3.5. Cromatografia por exclusão .....	17
2.2.4. Equipamentos .....	17
2.2.4.1. Equipamentos para HPLC .....	17
2.2.5. Identificação e quantificação .....	28
2.2.6. Análise qualitativa .....	29
2.2.7. Análise quantitativa.....	29
2.2.8. Aplicações .....	30
2.2.9. Parâmetros cromatográficos.....	31
2.3. Pré-tratamento de amostras.....	32
2.4. Extracção em fase sólida .....	33
2.4.1. Desenvolvimento do método de SPE .....	36
2.4.2. Processo da extracção em fase sólida .....	36
2.4.3. Volume de “Breakthrough” .....	39



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

2.4.4. Análise por HPLC .....	39
2.5. Caracterização da cortiça .....	40
2.5.1. A química da cortiça .....	40
2.5.2. Extracção de compostos fenólicos da cortiça .....	42
2.5.3. Água de cozedura.....	43
2.5.4. Valorização de efluentes da indústria corticeira .....	44
2.5.5. Processos alternativos .....	45
2.6. Compostos fenólicos .....	46
2.6.1. Classificação, distribuição e propriedades dos compostos fenólicos .....	46
2.6.2. Caracterização de alguns compostos fenólicos extraídos da cortiça .....	47
2.6.2.1. Ácidos fenólicos.....	47
2.6.2.2. Aldeídos fenólicos .....	48
2.7. Validação de métodos analíticos.....	52
2.7.1. Selectividade .....	53
2.7.2. Linearidade e intervalo dinâmico.....	53
2.7.3. Limite de detecção (LD).....	55
2.7.4. Limite de quantificação (LQ) .....	55
2.7.5. Precisão .....	56
2.7.6. Exatidão .....	57
2.7.7. Robustez .....	58
Capítulo 3 - Parte Experimental.....	61
3.1. Reagentes .....	61
3.2. Padrões cromatográficos .....	61
3.3. Amostras .....	62
3.4. Equipamentos .....	62
3.5. Material.....	69
3.6. Método.....	69
3.7. Validação do método.....	70
3.7.1. Selectividade .....	70
3.7.2. Linearidade .....	71
3.7.3. Precisão .....	71

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

3.7.4.	Exatidão .....	71
3.7.5.	Robustez .....	72
3.7.6.	Determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ) .....	73
Capítulo 4 - Análise de Resultados.....		75
4.1.	Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada composto .....	75
4.2.	Escolha da fase móvel, caudal e temperatura do forno .....	77
4.3.	Determinação do tempo de retenção de cada composto .....	79
4.4.	Validação do método .....	81
4.4.1.	Seletividade .....	81
4.4.2.	Linearidade .....	82
4.4.3.	Precisão .....	86
4.4.4.	Exatidão .....	88
4.4.5.	Robustez .....	92
4.4.6.	Limite de quantificação e limite de detecção .....	93
4.5.	Determinação do teor dos compostos na amostra .....	94
Capítulo 5 - Conclusões e Perspectivas Futuras .....		97
Referências Bibliográficas .....		100

## Lista de Figuras

Figura 1 - Estrutura esquemática da sílica gel.....	11
Figura 2 - Esquema de troca iônica da Cromatografia por Troca Iônica. ....	16
Figura 3 - Esquema do cromatógrafo líquido. ....	18
Figura 4 - Bomba pneumática. ....	21
Figura 5 - Bomba recíproca .....	22
Figura 6 - Bomba do tipo seringa.....	22
Figura 7 - Medidor de pressão Bourbon. ....	23
Figura 8 - Medidor de pressão do tipo transdutor de pressão.....	23
Figura 9 - Válvula rotatória de amostragem para HPLC.....	24
Figura 10 - Cromatograma típico da separação de compostos, por HPLC. ....	28
Figura 11 - Representação de um cartucho e um disco, usados em SPE. ....	34
Figura 12 - Representação dos dispositivos utilizados na SPE. A: Seringa; B: kitassato; C- sistema extrator. ....	35
Figura 13 - Etapas de operação do sistema de preparo da amostra por SPE. ....	37
Figura 14 - Suberina: éster glicerol- $\omega$ -hidroxiácido-ácido ferúlico. ....	41
Figura 15 - Estrutura benzénica (fenólica) C <sub>6</sub> com grupo hidroxilo (OH). ....	46
Figura 16 - Estrutura dos ácidos fenólicos (A- ácidos benzóicos; B-ácidos cinâmicos). ....	48
Figura 17- Estrutura dos aldeídos fenólicos (A- aldeídos benzóicos; B - aldeídos cinâmicos). .	48
Figura 18 - Estrutura química da vanilina. ....	49
Figura 19 - Estrutura química do 3,4-dihidroxibenzaldeído. ....	49
Figura 20 - Componentes de um sistema cromatográfico: (A) Fase móvel; (B) Bomba; (C) Injector; (D) Detector de fotodíodos; (E) Forno contendo a coluna cromatográfica; (F) Computador para aquisição e processamento de dados. ....	63
Figura 21 - Componente de um sistema cromatográfico: Coluna. ....	64
Figura 22 - Componente de um sistema cromatográfico: Detector de fotodíodos. ....	65
Figura 23 - Componente de um sistema cromatográfico: Forno de colunas.....	65
Figura 24 - Componente de um sistema cromatográfico: Bomba. ....	66
Figura 25- Distribuidor de vácuo, modelo de 12 portas.....	67
Figura 26 - Bomba de vácuo. ....	67
Figura 27 - Fonte de vácuo - frasco de polipropileno, uma rolha de borracha com um buraco, e duas mangueiras de vácuo de borracha.....	68
Figura 28 - Tubo SPE de 3 mL com enchimento DPA-6S.....	68
Figura 29 - Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por HPLC-DAD para os padrões: (A) Vanilina e (B) 3,4-dihidroxibenzaldeído, com uma concentração de 30 ppm. ....	76
Figura 30 - Cromatograma típico de uma solução padrão de vanilina com uma concentração de 30 ppm, mostrando o tempo de retenção do composto ( $t_R=15,59$ minutos).....	79

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Figura 31 - Cromatograma 3D típico de uma solução padrão de vanilina com uma concentração de 30 ppm, demonstrando o tempo de retenção do composto ( $t_R=15,59$ minutos), o comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda_{m\acute{a}x}=280$ nm) e a intensidade do pico. ....	79
Figura 32 - Cromatograma típico de uma solução padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 30 ppm, mostrando o tempo de retenção do composto ( $t_R = 9,47$ minutos). 80	80
Figura 33 - Cromatograma 3D típico de uma solução padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 30 ppm, demonstrando o tempo de retenção do composto ( $t_R =9,47$ minutos), o comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda_{m\acute{a}x} =280$ nm) e a intensidade do pico. ....	80
Figura 34 - Cromatograma típico de uma solução mistura de vanilina (C= 50ppm) e 3,4-dihidroxibenzaldeído (C= 50ppm). ....	81
Figura 35 - Cromatograma típico de uma solução mistura de vanilina (C= 50ppm) e 3,4-dihidroxibenzaldeído (C= 50ppm). ....	82
Figura 36 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 1 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos. ....	89
Figura 37 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 2 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos. ....	89
Figura 38 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 2 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos. ....	90
Figura 39 - Cromatograma obtido por HPLC através da amostra.....	94

## Lista de Gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica da curva de calibração da vanilina.....	83
Gráfico 2 - Representação gráfica da curva de calibração do 3,4 dihidroxibenzaldeído.....	84

## Lista de Tabelas

Tabela 1 - Tipos de fases estacionárias para HPLC. ....	12
Tabela 2 - Fases móveis e estacionárias mais utilizadas na CLL.....	13
Tabela 3 - Principais radicais R utilizados nas fases estacionárias de cromatografia líquida com fase ligada. ....	14
Tabela 4 - Classificação das colunas de separação. ....	25
Tabela 5 - Detectores utilizados na HPLC. ....	27
Tabela 6 - Resumo dos principais resultados publicados sobre a composição química da cortiça. ....	41
Tabela 7 - Características química da vanilina e do 3,4-dihidroxibenzaldeído. ....	50
Tabela 8 - Características principais dos padrões cromatográficos. ....	61
Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído. ....	70
Tabela 10 - Recuperação da solução padrão de vanilina adicionada à amostra. ....	72
Tabela 11 - Recuperação da solução padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído adicionada à amostra. ....	72
Tabela 12 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído, na avaliação do parâmetro de robustez. ....	73
Tabela 13 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído, na avaliação do parâmetro de robustez. ....	77
Tabela 14 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído. ....	77
Tabela 15 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos compostos por HPLC-DAD. ....	78
Tabela 16 - Tempos de retenção obtidos por HPLC para os padrões de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído com concentração de 30 ppm. ....	80
Tabela 17 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da vanilina por HPLC. ....	83
Tabela 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC. ....	84
Tabela 19 - Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de vanilina em HPLC. ....	85
Tabela 20 - Valores dos tratamentos estatísticos da vanilina em HPLC. ....	85
Tabela 21 - Valores dos tratamentos estatísticos do 3,4-dihidroxibenzaldeído em HPLC. ....	85
Tabela 22 - Precisão intra-dia do método para quantificação da vanilina por HPLC. ....	86
Tabela 23 - Precisão inter-dia do método analítico para quantificação da vanilina por HPLC. ....	86

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 24 - Precisão intra-dia do método para quantificação do 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC. ....	87
Tabela 25 - Precisão inter-dia do método analítico para quantificação da vanilina por HPLC	88
Tabela 26 - Parâmetros relativos a adição de padrão de vanilina com uma concentração de 1, 2 e 3 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos. ....	90
Tabela 27 - Parâmetros relativos a adição de padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 1, 2 e 3 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos. ....	91
Tabela 28 - Exatidão do método para quantificação de vanilina em HPLC. ....	91
Tabela 29 - Exatidão do método para quantificação de 3,4-dihidroxibenzaldeído em HPLC. ..	92
Tabela 30 - Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise. ....	92
Tabela 31 - Áreas dos picos obtidos por HPLC na análise dos compostos na amostra. ....	94
Tabela 32 - Cálculo da concentração dos compostos estudados presentes na amostra obtidos por HPLC. ....	95

# Lista de Símbolos, Siglas e Abreviaturas

ACN - acetonitrilo

ANOVA - Análise de variância

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

APCOR - Associação Portuguesa de cortiça

b - ordenada na origem

CE - Cromatografia por exclusão

CLFL - Cromatografia líquida com fase ligada

CLL - Cromatografia líquido-líquido

CLS - Cromatografia líquido-sólido

CV% - Coeficiente de variação percentual

C<sub>18</sub> - Fase estacionária de octadecil

DAD - Detector por arranjo de diodos

DPR - desvio padrão relativo

GFC - Cromatografia por filtração em gel

GPC - Cromatografia com permeação em gel

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial do Brasil

ICH - International Conference on Harmonisation

LD - Limite de detecção

LLE - Extração líquido-Líquido

LQ - Limite de quantificação

m - coeficiente angular da curva analítica

n - número de medições de uma solução amostra e padrões

s - desvio padrão da resposta



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

SPE - Extração em fase sólida

UV - Ultravioleta

$t_R$  - Tempo de retenção de um analito

$R^2$  - Coeficiente de correlação

$\lambda_{\text{máx}}$  - Comprimento de onda de absorção máximo

%R - Recuperação percentual

$\bar{x}$  - média aritmética das medições

# Capítulo 1 - Introdução

---

# Capítulo 1 - Introdução

A cortiça, revestimento exterior do tronco e ramos do Sobreiro (*Quercus suber* L.), é um produto natural que, desde há muitos séculos, tem despertado o interesse das pessoas para diversos fins devido às suas propriedades físicas, mecânicas e químicas (VIEIRA, 2009).

A composição química da cortiça não é ainda totalmente conhecida. Diferentes autores apresentaram uma ampla variação de valores devido ao uso de diferentes amostras de cortiça. De facto, a constituição química deste material natural depende de vários factores tais como a origem geográfica, as condições de solo e clima, a origem genética, a dimensão e idade da árvore, condições de crescimento, entre outros (PEREIRA, 1988; CONDE *et al.*, 1998; CONDE *et al.*, 1999).

A cortiça contém uma quantidade apreciável de substâncias que não são constituintes estruturais da parede celular e que podem ser retiradas por extracção. Aproximadamente 15% da cortiça corresponde a extractáveis. Os constituintes da cortiça designados por extractáveis são facilmente extraídos com solventes orgânicos ou água (PEREIRA, 1988).

O processo de transformação da cortiça envolve o uso de grandes quantidades de água, havendo conseqüentemente uma elevada produção de águas residuais (AEP, 2000).

A água originada pelo processo de cozedura das pranchas de cortiça apresenta uma composição complexa (MACHADO, 2005). O seu encaminhamento para o meio receptor sem tratamento prévio é problemático devido à grande variedade de compostos orgânicos e fenólicos dissolvidos, cor característica (castanho escuro), baixo pH, elevada toxicidade (dos compostos fenólicos), baixa biodegradabilidade e elevada temperatura (MACHADO, 2005; BERNARDO *et al.*, 2011).

Como foi referido anteriormente, as águas de cozedura de cortiça são misturas complexas de extractos vegetais, que apresentam concentrações elevadas de compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pentaclorofenol, ácido benzóico e ácidos cinâmicos (BENÍTEZ *et al.*, 2008). Segundo Minhalma e Pinho (2001a) os ácidos fenólicos que existem em maior quantidade na água de cozedura de cortiça são os ácidos gálico, protocatéquico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico.

Dos compostos fenólicos extractíveis da cortiça, Conde *et al.* (1997) identificou ácidos fenólicos (gálico, protocatequico, vanílico, cafeico, ferúlico e elágico), aldeídos fenólicos (protocatequico, vanilina, coniferaldeído e sinapaldeído) e cumarinas (esculetina e escopoletina).

Os compostos fenólicos ou polifenóis, quimicamente, podem ser definidos como substâncias que possuem um anel aromático contendo um ou mais grupos hidroxílicos incluindo os seus derivados funcionais. Possuem estrutura variável, constituindo um amplo grupo de

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

substâncias, com mais de 8000 estruturas fenólicas conhecidas, que se encontram largamente distribuídas no reino vegetal (ANGELO et al., 2007). Estes compostos originam-se do metabolismo secundário das plantas, são essenciais para o seu crescimento e reprodução, e são também sintetizadas quando a planta é submetida a condições de stress como, infecções, ferimentos, radiações UV, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

### 1.1. Objectivos

De acordo com o contexto referido na secção anterior, o trabalho apresentado nesta dissertação tem por objectivo principal a determinação de compostos fenólicos, nomeadamente a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído, através da cromatografia líquida de alta eficiência, em amostras de concentrado obtido através de nanofiltração do efluente produzido na etapa inicial do processamento da cortiça destinada à remoção de contaminantes, designada como “cozimento”.

Para que o objectivo principal fosse atingido, foram estabelecidos vários objectivos específicos:

- ✓ Desenvolver e validar a metodologia analítica para a determinação de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído via cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC. Esta etapa procurou cumprir os requisitos de selectividade, linearidade, precisão, exatidão e robustez segundo os padrões estipulados.
- ✓ Identificar e quantificar os dois compostos em estudo, a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído, nas amostras através do método alcançado.
- ✓ E por fim, procurou-se maximizar a concentração dos compostos fenólicos na amostra através da extracção em fase sólida e posterior análise quantitativa por HPLC.

### 1.2. Estrutura da dissertação

Esta dissertação está dividida em cinco capítulos. Neste primeiro capítulo são introduzidos os principais temas do trabalho e os objectivos principais desta dissertação.

No Capítulo 2 faz-se a revisão bibliográfica sobre os aspectos teóricos considerados necessários para a realização deste trabalho. Assim, faz-se uma abordagem aos aspectos encontrados na literatura referentes às separações cromatográficas, nomeadamente à cromatografia líquida de alta eficiência, e uma referência ao pré-tratamento das amostras, o método de extracção em fase sólida.

O capítulo prossegue com uma abordagem teórica relativamente aos compostos fenólicos, nomeadamente a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído, e à descrição da composição química da cortiça e das águas de cozedura. Aborda-se, também, um assunto de enorme relevância no

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

que diz respeito aos desperdícios químicos, ou seja, a valorização e aproveitamento dos resíduos da indústria corticeira.

Por último serão abordados os aspectos mais relevantes na validação de métodos cromatográficos.

No capítulo 3 encontram-se descritas as metodologias, material e equipamento utilizado na realização das actividades laboratoriais. Os resultados obtidos bem como uma breve discussão dos mesmos encontram-se no Capítulo 4. As conclusões retiradas das análises efectuadas bem como algumas sugestões para trabalho futuro são apresentados no Capítulo 5 e, por último, as referências bibliográficas utilizadas para a elaboração do trabalho encontram-se no Capítulo 6.

## Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

---

## Capítulo 2 - Revisão Bibliográfica

### 2.1. Introdução às Separações Cromatográficas

Os métodos para análise química são, em geral, selectivos e poucos são realmente específicos. Consequentemente, a separação do analito de potenciais interferências é, na maioria dos casos, uma etapa crucial nos procedimentos analíticos.

A cromatografia é um poderoso método de separação que encontra aplicação em todos os ramos da ciência. Foi inventada e denominada pelo botânico russo Mikhail Tswett no início do século 20. Ele aplicou a técnica para separar vários pigmentos de plantas como clorofila e xantofila, passando soluções desses componentes através de uma coluna de vidro empacotada com carbono de cálcio finamente dividido. As espécies separadas apareciam como bandas coloridas na coluna, o que colaborou para a escolha do nome do método (em grego **chroma** significa cor e **graphein** significa escrever).

As aplicações da cromatografia cresceram de modo explosivo nos últimos cinquenta anos e isto deve-se não somente ao desenvolvimento de vários novos tipos de técnicas cromatográficas mas também à necessidade crescente dos cientistas de melhores métodos para caracterizar misturas complexas. O tremendo impacto desses métodos na ciência é atestado pelo Prémio Nobel de 1952 concedido a A. J. P. Martin e R. L. M. Synge pelas suas descobertas nesse campo. Talvez ainda mais impressionante seja a lista de 12 Prémios Nobel entre 1937 e 1972 baseados em trabalhos nos quais a cromatografia tenha desempenhado papel vital.

A cromatografia compreende um grupo diversificado e importante de métodos que permitem ao cientista separar componentes muito semelhantes de misturas complexas. Muitas dessas separações são impossíveis por outros meios. Em todas as separações cromatográficas, a amostra é transportada por uma fase móvel, que pode ser um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Essa fase móvel é então forçada através de uma fase estacionária imiscível fixa, colocada na coluna ou numa superfície sólida. As duas fases são escolhidas de modo que os componentes da amostra se distribuam entre as fases móvel e estacionária em vários graus.

Os componentes que são mais fortemente retidos na fase estacionária movem-se muito lentamente no fluxo da fase móvel. Ao contrário, os componentes que se ligam mais fracamente à fase estacionária movem-se mais rapidamente. Como consequência dessa diferença na mobilidade, os componentes da amostra separam-se em bandas ou zonas discretas que podem ser analisadas qualitativa em/ou quantitativamente (SKOOG et al., 2002).

## 2.2. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC)

É um tipo de cromatografia líquida que utiliza pequenas colunas, enchidas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Ela tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em escala de tempo de poucos minutos, com alta resolução, eficiência e sensibilidade (VALENTE et al., 1983).

### 2.2.1. Conceito e História da Cromatografia líquida de alta eficiência

A cromatografia líquida, incluindo o trabalho original de Tswett, foi inicialmente feita em colunas de vidro com diâmetros de 1 a 5 cm e comprimentos de 50 a 500 cm. Para assegurar caudais razoáveis, o diâmetro das partículas de fase estacionária sólida estava geralmente no intervalo de 150 a 200  $\mu\text{m}$ . Mesmo assim, os caudais eram muito baixos. E os tempos de separação eram longos - de várias horas. Tentativas de acelerar o procedimento clássico por aplicação de bomba de vácuo ou por bombeamento não foram eficientes porque o aumento no caudal provoca aumento na altura dos pratos, além do mínimo no gráfico típico de altura de prato versus caudal e o resultado era a perda de eficiência.

No início do desenvolvimento da cromatografia líquida, os cientistas perceberam que a eficiência da coluna podia ser aumentada através da diminuição do tamanho da partícula da fase estacionária. Entretanto, somente no final dos anos 1960 foi desenvolvida a tecnologia para a produção e uso de fases estacionárias com partículas de diâmetro de 3 a 10  $\mu\text{m}$  (SKOOG et al., 2002).

Somente a partir dos anos 70 se conseguiu um avanço considerável da cromatografia líquida moderna que até então era essencialmente subdesenvolvida, apesar de que uma das primeiras experiências sobre cromatografia, no início do século, foi do tipo que é hoje chamada cromatografia líquida clássica. O avanço foi gradual e atingiu o atual nível de sofisticação que a HPLC apresenta, devido ao revolucionário desenvolvimento tecnológico da prática deste tipo de cromatografia (PERES, 2002).

Desde 1968 tornou-se possível encher colunas com partículas de pequeno tamanho, necessárias para alta resolução e, também, adquiria equipamentos que funcionam nas altas pressões necessárias para obter uma boa velocidade na eluição.

Nos últimos doze anos ocorreu o desenvolvimento de vários detectores espectrofotométricos, bem como acoplamento com o espectrómetro de massas, tornado possível a detecção da maioria dos compostos e análise de traços em amostras complexas, como sangue, urina, solo, alimentos, petróleo, etc (MALDANER e JARDIM, 2009).



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Esta tecnologia exigiu equipamentos sofisticados operando a altas pressões, que contrastavam acentuadamente com as colunas simples de vidro da clássica cromatografia líquida de fluxo por gravidade. O nome cromatografia líquida de alta eficiência - HPLC (em inglês, high performance liquid chromatography) é utilizado para distinguir esses procedimentos mais novos dos métodos básicos, ainda usados para finalidades preparativas.

A HPLC é a mais usada de todas as técnicas analíticas de separação. As razões para a popularidade do método são a sua sensibilidade, a fácil adaptação para determinações quantitativas, a sua adequação à separação de espécies não voláteis ou termicamente frágeis e, acima de tudo, a sua ampla aplicabilidade a substâncias de grande interesse para a indústria, para muitos campos da ciência e para o público. Exemplos desses materiais incluem: aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, hidrocarbonetos, hidratos de carbono, drogas, terpenóides, pesticidas, antibióticos, esteróides, espécies organo-metálicas e muitas substâncias inorgânicas (SKOOG et al., 2002).

### 2.2.2. Fases

#### 2.2.2. 1. Fases Móveis

O projeto da separação perfeita de misturas, utilizando a cromatografia a líquido, somente terá sucesso se for possível acoplar uma fase móvel correta a uma fase estacionária conveniente. Na HPLC e em todos os casos da cromatografia a líquido, a fase móvel deve ser um líquido, e dentro do universo das substâncias líquidas puras e de suas misturas encontramos várias possibilidades de solventes candidatos (AQUINO-NETO, 2003).

Para que um solvente possa ser utilizado como fase móvel na HPLC este deve apresentar alto grau de pureza ou ser de fácil purificação; deve dissolver a amostra sem decompor os seus componentes, para que estes sejam transportados pela coluna sem que haja modificação; não deve dissolver a fase estacionária; deve ser compatível com o detector; não ser tóxico; deve ter baixa viscosidade e ter polaridade adequada para permitir uma separação conveniente dos componentes da amostra (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; AQUINO-NETO, 2003).

A fase móvel deve ter alta pureza, como um solvente de grau cromatográfico, permitindo realizar análises de alta sensibilidade com detectores por fluorescência ou por absorvância no ultravioleta, onde as impurezas da fase móvel podem absorver e diminuir a sensibilidade do detector para os componentes da amostra. É importante que a amostra seja solúvel na fase móvel e não sofra decomposição, para que possa ser transportada através da coluna sem que os seus componentes se modifiquem. Quando possível, o solvente da amostra é a própria fase móvel ou um dos seus componentes, para que ela não sofra precipitação no injetor ou na coluna, o que provocará queda de resolução na separação (COLLINS et al., 1997).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A baixa viscosidade da fase móvel é muito importante na eficiência da separação porque a viscosidade interfere no efeito de transferência de massa entre a fase estacionária e a fase móvel (coeficiente de difusão da substância analisada), e também na intensidade do caudal, sendo que os compostos que têm viscosidade inferior a um, como metanol e álcool, são considerados ótimos facilitando o bombeamento. E deve ser compatível com o detector utilizado, o qual é particularmente importante no caso de eluição por gradiente, porque a mudança na composição da fase móvel pode afetar o funcionamento do detector (CIOLA, 1998).

Se durante a separação for utilizado um único solvente de composição constante a eluição é chamada de isocrática. Mas algumas amostras que são formadas de componentes que necessitam de uma separação por gradiente, para que esta seja mais eficiente, requerem mudança na composição da fase móvel durante a análise, com a variação da proporção entre os solventes, que geralmente diferem entre si na polaridade (SKOOG et al., 2002; CECCHI, 2003). Depois que a eluição começa, a razão entre os solventes é variada de modo programado, algumas vezes de forma contínua e outras vezes numa série de passos (SKOOG et al., 2002). A separação por gradiente tem as vantagens de reduzir o tempo de análise, aumentar a resolução e reproduzir picos mais finos e mais simétricos. Mas também apresenta as desvantagens de aumentar o custo, já que necessita de bomba com misturador; não ser compatível com todos os detectores, como por exemplo, com o detector de índice de refração; ter menor estabilidade da linha de base pela variação da fase móvel e também pode degenerar a coluna, sendo necessário fazer a sua regeneração, pois a mudança na força da fase móvel no início e no final da cromatografia é grande (SKOOG et al., 2002; CECCHI, 2003).

Ao se trabalhar com gradiente, é recomendado que o índice de refração dos componentes da fase móvel tenham valores bem próximos, apresentando nesse caso uma menor variação na linha de base. Dos solventes miscíveis, a água, acetonitrila e o metanol, possuem índices de refração satisfatórios para operação com misturas. E trabalhando com detectores espectrofotométricos, deve-se conhecer as regiões de absorção da fase móvel utilizada (CIOLA, 1998).

Uma fase móvel adequada é indispensável para a HPLC, por isso é necessário examinar fatores que determinam a sua escolha, como a polaridade desta, que determina o seu poder de eluição juntamente com a polaridade da fase estacionária e com a natureza dos componentes da amostra. Se a separação for com fase normal, o poder de eluição aumenta com o aumento da polaridade, se a separação for em fase reversa, o poder de eluição diminui com o aumento da polaridade. Outros fatores que também devem ser considerados são o ponto de ebulição, a viscosidade, a compatibilidade com o detector e a toxicidade (VOGEL, 1981; CIOLA, 1998).

### 2.2.2.2. Fases Estacionárias

Os materiais ideais da fase móvel a serem utilizadas na HPLC são aqueles que, em menor tempo possível, têm a máxima capacidade de amostra, dão a melhor resolução na separação da mistura, são de fácil introdução na coluna, produzem pequena queda de pressão e que sejam de baixo custo (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003).

As dimensões das partículas dos materiais utilizados são pequenas e muitas vezes estas partículas têm forma regular que contribui para a uniformidade do enchimento da coluna. Outra característica da partícula, que também é importante para a uniformidade, é a de ter uma faixa de variação de diâmetros bem pequena. Alguns destes materiais são completamente porosos e outros peliculares (superficialmente porosos), ambos podendo conter fases quimicamente ligadas a sua superfície.

As partículas da fase estacionárias podem ser classificadas quanto ao seu tamanho em: macropartículas, quando apresentam diâmetro entre 20 e 40 $\mu\text{m}$ ; intermediárias, quando tem entre 20 e 10 $\mu\text{m}$ ; e micropartículas, de 3 a 10 $\mu\text{m}$ . Quanto menor for a partícula, maior será a eficiência da separação, melhorando assim o processo de difusão das moléculas da amostra dentro e fora das partículas, pois partículas menores reduzem a distância de contato do soluto com as fases estacionária e móvel, facilitando o equilíbrio e, conseqüentemente, melhorando a eficiência da coluna. Elas podem ser de formato esférico, também chamado de regular, e de formato irregular, sendo que as regulares são mais eficientes por oferecerem um enchimento mais uniforme e mais reprodutível da coluna e por esse motivo são mais caras (CECCHI, 2003; ARAÚJO, 2004).

Considerando as suas propriedades físicas, os enchimentos para a HPLC podem ser classificados de acordo com os seguintes aspectos: sólidos rígidos, semi rígidos ou não rígidos; partículas porosas ou peliculares; partículas esféricas ou irregulares; partículas com diferentes diâmetros (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; CECCHI, 2003).

Os sólidos rígidos à base de sílica são os enchimentos mais usados atualmente. Estes enchimentos podem resistir a pressões relativamente altas, resultando em enchimento estável e colunas eficientes de partículas pequenas.

Estas partículas de sílica podem ser obtidas em vários tamanhos, formas e graus de porosidade. Felizmente, vários grupos funcionais ou camadas poliméricas podem ser ligados à superfície da sílica, sendo útil para aplicações em alguns métodos individuais da HPLC (TONHI et al., 2002).

O empacotamento de colunas a sílica consiste principalmente em dióxido de silício ( $\text{SiO}_2$ ) com o átomo de silício no centro de um tetraedro, sendo a valência remanescente na superfície ocupada por um grupo hidroxilo (-OH) (Figura 1). Esta não deve ser utilizada em pH acima de 8,0, pois isso causaria a sua dissolução, então, para a cromatografia de compostos básicos

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

com pH entre 8,0 e 12,0 recomenda-se o uso de compostos poliméricos como poliestireno, ligado covalentemente a fase estacionária (ARAÚJO, 2004; HARRIS, 2005).

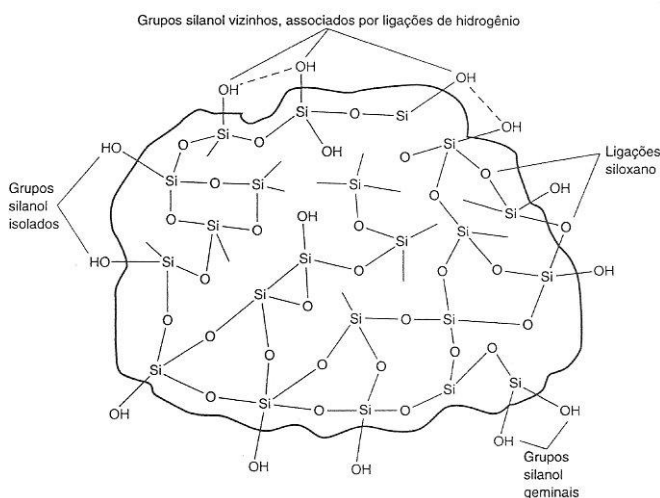


Figura 1 - Estrutura esquemática da sílica gel (HARRIS, 2005).

Uma superfície de sílica tem cerca de  $8\mu\text{mol}$  de grupos silanol ( $\text{Si-OH}$ ) por metro quadrado, em pH entre 2,0 e 3,0 estes se encontram completamente protonados e em uma ampla faixa de pH acima de 3,0 se dissociam em  $\text{Si-O}^-$ , que se ficarem expostos podem reter fortemente bases protonadas (como  $\text{RNH}_3^+$ ), provocando a formação de caudas nos picos (HARRIS, 2005).

A sílica sozinha pode ser usada como fase estacionária para a cromatografia de adsorção, já para a sua utilização na cromatografia de partição esta deve estar quimicamente ligada, na qual dependendo do radical R esta pode ser utilizada como fase normal ou fase reversa.

Os sólidos semi-rígidos são geralmente constituídos de partículas porosas de poliestireno entrecruzado com divinilbenzeno. Dependendo de como eles são preparados, a partícula resultante pode variar em rigidez e porosidade, superando completamente grandes limites, sendo usado para pressões até 350 bars, mas algumas destas partículas são limitadas a pressões inferiores a 150 bars. O maior interesse no semi-rígido atualmente é para aplicações na HPLC por exclusão com fase móvel orgânica, contudo eles são também usados na troca iônica (JARDIM et al., 2006).

Os sólidos não rígidos, tais como agarose ou dextrose, usados em cromatografia por exclusão clássica, são aplicados exclusivamente para a separação de moléculas grandes, solúveis em água, como as proteínas (COLLINS et al., 1997).

Os dois tipos de materiais, peliculares ou porosos, diferem em algumas das suas propriedades e têm muitas outras em comum. Ambos podem ser introduzidos na coluna com certa facilidade, obtendo-se colunas muito eficazes (CIOLA, 1998).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A fase estacionária de octadecil ( $C_{18}$ ) é a mais utilizada na cromatografia líquida de alta eficiência, sendo representada por ODS (octadecilsilano) (HARRIS, 2005). Alguns tipos de fases estacionárias para HPLC estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Tipos de fases estacionárias para HPLC (ARAÚJO, 2004).

<i>Descrição</i>	<i>Polaridade/ interação</i>
Octadecil ( $C_{18}$ )	Altamente apolar
Octil ( $C_8$ )	Moderadamente apolar
Etil ( $C_2$ )	Fracamente apolar
Metil ( $C_1$ )	Fracamente apolar
Fenil (PH)	Moderadamente apolar
Cicloexano (CH)	Moderadamente apolar
Cianopropil (CN)	Moderadamente apolar/polar
Diol (2 OH)	Polar
Sílica (Si)	Polar
Ácido Carboxílico (CBA)	Troca catiónica fraca
Ácido Propilsulfônico (PRS)	Troca catiónica forte
Ácido Benzenossulfônico (SCX)	Troca catiónica forte
Aminopropil ( $NH_2$ )	Troca aniônica fraca/polar
Amina Primária/Secundária (PSA)	Troca aniônica fraca/polar
Dietilaminopropil (DEA)	Troca aniônica fraca/polar
Amina Quaternária (SAX)	Troca aniônica forte
Ácido Fenilborônico (PBA)	Covalente

De acordo com a natureza das fases móvel e estacionária pode-se classificar o processo como: cromatografia em fase normal e cromatografia em fase reversa.

**Cromatografia em fase normal:** neste método a fase estacionária utilizada é polar e a fase móvel é apolar, em relação à eluição, os solutos mais apolares são eluídos primeiramente, enquanto que os polares são retidos pela fase estacionária e são eluídos depois.

**Cromatografia com fase reversa:** a fase estacionária é apolar e a fase móvel polar, portanto os compostos polares são eluídos primeiro e os mais apolares eluídos posteriormente (VOGEL, 1981).

### 2.2.3. Mecanismos da HPLC

#### 2.2.3.1. Líquido-líquido ou partição

Com a finalidade de obter a separação de aminoácidos, Martin e Synge, em 1941 desenvolveram a cromatografia líquido-líquido (CLL), utilizando como fase estacionária água em sílica e como fase móvel clorofórmio. Este método é preferencialmente utilizado na separação de compostos não-iônicos, polares e que apresentem de baixo a moderado peso molecular, sendo este geralmente inferior a 3000 (SKOOG et al., 2002).

O método consiste de uma fase líquida (estacionária) que por adsorção física é retida na superfície da coluna empacotada geralmente com sílica e de uma fase móvel, também líquida, que passa sobre esta fase estacionária sendo uma destas polar e a outra apolar. A separação baseia-se na solubilidade da amostra em relação ao solvente (fase móvel) e a fase estacionária, sendo assim os componentes da amostra que são mais solúveis na fase móvel são eluídos primeiro enquanto os que têm maior afinidade com a fase estacionária são seletivamente retidos por ela (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; SKOOG et al., 2002; VOGEL, 1981).

A CLL pode ser dividida em cromatografia líquido-líquido normal (onde a fase estacionária é polar e a fase normal e apolar) e em cromatografia com fase reversa (fase estacionária apolar e fase móvel polar). As fases móveis e estacionárias mais utilizadas nestes métodos estão descritas na tabela 2 (VOGEL, 1981).

Tabela 2 - Fases móveis e estacionárias mais utilizadas na CLL (VOGEL, 1981).

Fases estacionárias	Fases móveis
<i>Normal</i>	
B, B'-oxidipropionitrila Carbowax (400, 600, 750, etc.)	Hidrocarbonetos saturados: hexano e heptano; solventes aromáticos: tolueno e xileno; hidrocarbonetos saturados misturados (até 10%) com dioxano, metanol, etanol, clorofórmio, cloreto de metileno.
Glicóis (etileno, dietileno)	
Ciano-etil-silicone	
<i>Fase reversa</i>	
Esqualano	Água e misturas álcool-água; acetonitrila e misturas acetonitrila-água
Zipax-HCP	
Ciano-etil-silicone	

#### 2.2.3.2. Cromatografia Líquida com Fase Ligada

Tendo por objetivo solucionar o problema da perda da fase estacionária da CLL surgiu à cromatografia líquida com fase ligada (CLFL), na qual a fase estacionária está quimicamente

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

ligada à superfície de um suporte eliminando, assim, o problema da solubilidade desta na fase móvel (COLLINS; GUIMARÃES, 1997).

Nesta forma de cromatografia as fases monoméricas e poliméricas ligam-se a uma vasta gama de materiais de suporte. As fases ligadas são geralmente preparadas por reações de silanização. Na superfície da sílica que foi completamente hidrolisada, por aquecimento com HCl 0,1M por um dia ou dois, forma-se grupos silanóis, estes grupos, posteriormente, irão reagir com cloro-silanos substituídos formando as fases estacionárias quimicamente ligadas (sendo cloro-metil-silano amplamente utilizado) (VOGEL, 1981).

De acordo com o grupo funcional que está ligado ao radical R é que se classifica quanto:

- A Fase normal, quando este é de natureza polar;
- E a fase reversa, quando este é de natureza apolar

Na tabela 3 estão descritas as principais substâncias utilizadas como radical R tanto em fase normal como em fase reversa (VOGEL, 1981).

Tabela 3 - Principais radicais R utilizados nas fases estacionárias de cromatografia líquida com fase ligada (SKOOG et al., 2002).

<i>Fase normal</i>	<i>Fase reversa</i>
- C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> CN (ciano)	Cadeia C <sub>8</sub> (- octil)
-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> OCH <sub>2</sub> CHOHCH <sub>2</sub> OH (diol)	Cadeia C <sub>18</sub> (-octildecil)
-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NH <sub>2</sub> (amina)	
-C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> (dimetilamina)	

Os grupos silanóis que não reagiram podem absorver moléculas polares, levando a mudanças nas propriedades cromatográficas da fase ligada na cromatografia com fase reversa, já que esta apresenta a fase estacionária apolar, ou também pode ocorrer a formação de caudas nos picos cromatográficos, particularmente com solutos básicos. Estes efeitos podem ser reduzidos pela inativação de grupos silanóis que são revestidos pela reação com trimetilcloro-silano, que em função do seu tamanho menor, tem a capacidade de se ligarem a muitos grupos silanóis (VOGEL, 1981; SKOOG et al., 2002).

### 2.2.3.3. Líquido-sólido ou absorção

Sendo introduzida inicialmente por Stwett no início do século XX, a cromatografia líquido-sólido (CLS) é a forma mais clássica da cromatografia líquida e devido a recentes adaptações tornou-se o mais importante membro dos métodos de HPLC (SKOOG et al., 2002).

Este tipo de cromatografia baseia-se na competição entre as moléculas do soluto e do solvente pelos sítios ativos do adsorvente, estando relacionada com a interação entre os grupos funcionais das partículas do suporte da fase estacionária e os grupos polares das moléculas do soluto (ARAÚJO, 2004). Primeiramente uma molécula da fase móvel passa a ser deslocada da superfície para que possa ser adsorvida pela fase estacionária, levando em consideração que esta possui uma superfície polar ela terá pouca afinidade com grupos apolares que não serão retidos por não terem sido deslocados da fase móvel (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997).

As fases estacionárias devem permitir a interação diferencial com os componentes da amostra a serem separadas. As principais interações responsáveis pela adsorção são as de Van de Waals, eletrostática, pontes de hidrogénio e interações hidrofóbicas. Os grupos que são capazes de formar pontes de hidrogénio serão fortemente retidos pela superfície do adsorvente assim como as moléculas polarizáveis que irão apresentar a interação dipolo-dipolo-induzido, portanto o grau de retenção depende da polarização de cada molécula ou grupo funcional, sendo que compostos que contêm grupos funcionais polares serão fortemente retidos pelo adsorvente polar e, portanto, eluídos por último, enquanto que com os solutos apolares ocorrerá o contrário (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; ARAÚJO, 2004; SKOOG et al., 2002).

Geralmente usa-se como adsorvente, um sólido ativo com grande área superficial, os mais comumente usados são a sílica e a alumina. Um aspecto que deve ser considerado é que adsorventes muito ativos podem adsorver irreversivelmente o soluto sendo que a sílica que é ligeiramente ácida pode reter fortemente solutos básicos e a alumina que é básica não deveria ser usada em cromatografia de compostos sensíveis a bases (VOGEL, 1981).

A escolha do solvente é de extrema importância neste método devido ao fato deste competir com o soluto pelos sítios ativos do adsorvente, pois quanto mais forte a interação da fase móvel com a estacionária, menor a adsorção do soluto. Os solventes são classificados de acordo com sua série eluotrópica, ou seja, a sua capacidade de absorção, que são utilizadas na escolha do melhor solvente a ser utilizado para uma determinada separação. Este também deve ser puro, pois impurezas podem afetar tanto a eficiência da coluna como a detecção (VOGEL, 1981).

É muito apropriada para compostos apolares que tem pesos moleculares menores do que 5000, geralmente é mais apropriada para amostras que são solúveis em solventes apolares, utilizando fase normal (GONÇALVEZ, 2001).



#### 2.2.3.4. Cromatografia por troca iónica

Para resolver o problema de separação de terras raras e da concentração de iões transurânio necessária para o desenvolvimento das primeiras armas nucleares, no início dos anos 40, foi desenvolvida a cromatografia de troca iónica. A sua aplicação em HPLC começou em 1975 com o desenvolvimento de trabalhos de uma técnica de suspensão do eluente que tornou possível a detecção condutométrica dos iões eluídos na Dow Chemical Company (SKOOG et al., 2002).

A Cromatografia por troca iónica é um método de absorção que baseia-se na interação eletrostática entre o soluto e a fase estacionária, buscando o equilíbrio de troca entre iões em solução e iões de mesmo sinal na superfície de um sólido que deve ser insolúvel e de alto peso molecular. A amostra a ser separada é geralmente uma solução aquosa contendo iões orgânicos e inorgânicos; na superfície da fase estacionária catiões e aniões são ligados covalentemente e iões são trocados com a fase móvel, separando assim os iões que não interagem com a resina daqueles que se ligam com os grupos carregados (SKOOG et al., 2002; ARAÚJO, 2004).

A fase estacionária utilizada neste método, geralmente, é uma resina de poliestireno entrecruzada com divinilbenzeno a qual são ligados os grupos iónicos. As trocas podem ser catiónicas ou aniónicas o que depende da natureza da fase estacionária. Os sítios ativos mais comuns para as resinas trocadoras de catiões são o grupo ácido sulfônico  $-SO_3^-H^+$ , um ácido forte, e o grupo ácido carboxílico  $-COO^-H^+$ , um ácido fraco; e para os trocadores de aniões são os que contêm grupos amina terciárias  $-N(CH_3)_3^+OH^-$ , base forte, e aminas primárias  $-N^+OH^-$ , base fraca. Os grupos iónicos possuem contra-iões que são deslocados por iões de carga similar da fase móvel. Nas trocas catiónicas, as resinas possuem sítios ativos negativos e contra-iões com carga positiva, de forma que os catiões da resina sejam trocados pelos catiões da amostra; nas trocas aniónicas, ocorre o contrário, os sítios ativos da resina têm carga positiva e o contra-ião tem carga negativa permitindo a troca destes com a fase móvel. O esquema das trocas catiónicas e aniónicas pode ser visualizado na Figura 2 (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; SKOOG et al., 2002; ARAÚJO, 2004).

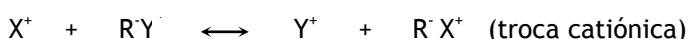
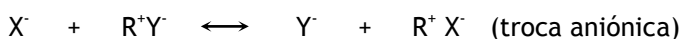


Figura 2 - Esquema de troca iónica da Cromatografia por Troca Iónica (ARAÚJO, 2004).

Através da alteração do pH ou aumento da troca iónica, que leva ao enfraquecimento das interações eletrostáticas, a fase móvel deve ser modificada, afim de eluir o soluto da resina (ARAÚJO, 2004).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Geralmente os compostos que são separados por este método são ácidos carboxílicos, bases orgânicas, peptídeos e aminoácidos, que podem se ionizar em soluções com pH devidamente tamponado, bem como aniões inorgânicos e catiões metálicos ou complexos (JARDIM et al., 2006).

### 2.2.3.5. Cromatografia por exclusão

Geralmente utilizada na separação de componentes de alto peso molecular, a cromatografia por exclusão (CE) baseia-se na separação de acordo com o tamanho efetivo das moléculas. Este método é subdividido em cromatografia por filtração em gel (GFC) e cromatografia com permeação em gel (GPC). A GFC é utilizada na separação de espécies solúveis água (polares) sendo a fase estacionária hidrofílica, na GFC os solventes utilizados são orgânicos apolares e fases estacionárias hidrofóbicas, o que torna o método complementar sendo que podem ser analisadas substâncias polares e apolares (SKOOG et al., 2002; VOGEL, 1981).

Pelo fato de não haver interações físicas ou químicas entre o soluto e a fase estacionária, a CE difere dos demais métodos cromatográficos. O principal mecanismo de retenção das moléculas do soluto é a penetração diferenciada destas no interior das partículas do gel. A coluna é empacotada com matéria inerte com poros de tamanho controlado, ao entrar em contato com a fase estacionária as moléculas pequenas ficam retidas no interior de seus poros apresentando maior tempo de retenção sendo eluídas mais lentamente pela fase móvel, enquanto que as moléculas maiores, que não conseguiram penetrar nos poros, são carregadas pela fase móvel, tendo, portanto, menor tempo de retenção (COLLINS et al., GUIMARÃES, 1997; SKOOG et al., 2002; VOGEL, 1981).

Utiliza-se este método na separação de materiais orgânicos e inorgânicos, mas sua maior utilidade é no estudo de biomoléculas ou de compostos com alto grau de polimerização. O material utilizado no empacotamento da coluna deve ser com estrutura rígida a fim de facilitar o empacotamento, e que sejam capazes de suportar as pressões elevadas da cromatografia líquida de alta eficiência. Geralmente o empacotamento da coluna para este método é feito por leito de polímeros e partículas de sílica, ambos com diâmetro de 5 a 10µm (SKOOG et al., 2002; VOGEL, 1981).

### 2.2.4. Equipamentos

#### 2.2.4.1. Equipamentos para HPLC

A HPLC é uma técnica que atualmente utiliza um conjunto de equipamentos especiais. Eles poderão diferir em características e grau de automação, porém, são absolutamente necessários para uma execução conveniente e são chamados de cromatógrafos a líquido. Eles caracterizam-se por terem os seguintes componentes (Figura 3):

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Reservatório e sistema de bombeamento da fase móvel;
- Sistema de introdução da amostra;
- Sistema analítico - coluna cromatográfica e termóstato das colunas;
- Sistema de detecção (um ou mais detectores);
- Sistema de registo e tratamento de dados (CIOLA, 1998).

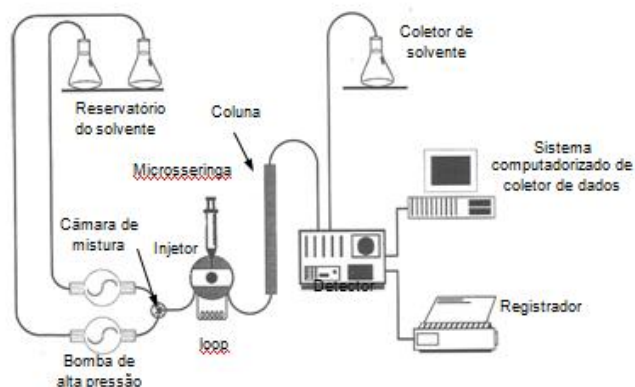


Figura 3 - Esquema do cromatógrafo líquido (ARAÚJO, 2003).

De acordo com a figura, o solvente que se encontra no reservatório é bombeado com o auxílio da bomba através do sistema de introdução da amostra até a coluna cromatográfica, situada ou não dentro de um termóstato. Nela, efetua-se a separação dos componentes da mistura de acordo com a natureza da fase móvel, fase estacionária e a natureza dos componentes analisados. A fase móvel sai da coluna e passa por um sistema de detecção, onde são identificadas alterações de alguma propriedade física específica. Esta variação é transformada num sinal elétrico, que é convenientemente registado e tratado matematicamente por um processador conveniente. O gráfico obtido chama-se cromatograma (CIOLA, 1998).

Existem alguns conceitos e fórmulas pré-estabelecidos para avaliar os cromatogramas, dentre eles o número de pratos teóricos, que é uma medida utilizada para quantificar a eficiência das colunas cromatográficas, pois quanto maior o número de pratos teóricos, maior é o equilíbrio termodinâmico entre a fase móvel, a fase estacionária, e o componente que está a ser analisado. A eficiência de uma coluna está relacionada com o alargamento dos picos, pois quanto maior o alargamento dos picos, menor será a eficiência na separação entre duas substâncias que eluem próximas, sendo ideais os picos finos. Outro conceito importante é a resolução, considerando como um cromatograma com boa resolução aquele em que os picos estão mais separados e todos os picos finalizam na linha de base antes de iniciar um novo pico (COLLINS et al., 1997).

### A) Reservatórios de fase móvel e sistemas de tratamento de solvente

O abastecimento da fase móvel é equipado com um ou mais reservatórios que podem ser de vidro, o próprio recipiente do solvente; de plástico, desde que este seja inerte; ou de aço inoxidável, sendo que este não é apropriado para fases móveis tamponadas em pH baixo, pois poderá ocorrer a corrosão do recipiente. Este deve ter uma capacidade de um a três litros (CECCHI, 1999; SKOOG et al., 2002; SCOTT, 2003).

A captação da fase móvel geralmente é feita através de um filtro, para remover pequenas partículas que podem obstruir e estragar o sistema de bombeamento e a coluna. Para remover ar ou gases que podem estar dissolvidos no solvente e que afetam o funcionamento do detector e a eficiência da coluna, o frasco poderá estar acoplado a aquecedores, agitadores ou a sistemas de vácuo (CIOLA, 1998).

Fases móveis como a água e outros solventes polares têm tendência em dissolverem gases como oxigênio e nitrogênio, se estes gases forem libertados dentro do equipamento podem formar bolhas na coluna e no sistema de detecção essas bolhas podem causar o espalhamento de banda e interferir na eficiência do detector, por este motivo os solventes devem ser desgaseificados, o que pode ser feito através de sistemas de bomba de vácuo, de sistemas de destilação, de dispositivos de aquecimento e agitação do solvente, sob a ação de ultra-som e também através do sistema de borbulhamento que geralmente é feito com gás hélio, por ser um gás inerte e de baixa solubilidade (SKOOG et al., 2002; SCOTT, 2003; POMBEIRO, 2003).

Alguns sistemas contem também filtros a fim de impedir que a poeira e materiais particulados no solvente que causem danos no sistema de bombeamento e de injeção e entupimento da coluna. Não necessariamente os desgaseificadores e filtros devem fazer parte do equipamento, um método bastante eficiente é passar os solventes em filtros “milipore” sob vácuo, antes de introduzi-los no recipiente, o que ocasiona a remoção dos gases e materiais em suspensão (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997; SKOOG et al., 2002).

### B) Programadores de fase móvel

A HPLC pode ser efetuada mantendo-se a composição da fase móvel constante durante toda a análise cromatográfica, que é denominada HPLC isocrática.

Quando é necessária a utilização de solventes de diferentes polaridades e percentagens destes em misturas, denomina-se HPLC como programação por gradiente, tendo como vantagem análises mais rápidas, melhores separações e maior simetria nos picos, em contraste à eluição isocrática, que pode tomar muito tempo com forma de picos nem sempre adequados. As desvantagens incluem a necessidade de regenerar a coluna antes de fazer uma nova injeção de amostra e a incompatibilidade com o detector em certos casos (COLLINS et al., 1997). Os solventes utilizados apresentam diferentes polaridades variando a percentagem

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

destes em mistura binária, ternária ou quaternária, aumentando a força cromatográfica da fase móvel, fazendo assim, com que picos retidos eluam mais rapidamente. Também podem ser utilizados em misturas isocráticas, em que a fase móvel apesar de ter uma concentração contínua é formada por mais de um solvente. Para que a programação seja automática são utilizados microcomputadores. Existem dois tipos de programadores: a baixa e a alta pressão (JARDIM et al., 2006).

Nos programadores de baixa pressão os reservatórios de solventes estão dispostos em ordem crescente de polaridade e os solventes são misturados antes da bomba. Através de uma válvula ligada ao reservatório do solvente faz-se o gradiente, sendo que esta é programada para ficar aberta até que saia o volume desejado dos solventes, que serão misturados à pressão atmosférica numa câmara com agitação magnética, posteriormente são enviados a uma bomba de alta pressão, passando pelo injetor, coluna e detector (JARDIM et al., 2006).

Nos programadores de alta pressão diferentes solventes alimentam diferentes bombas. O caudal de cada bomba é modificado para produzir os mais variados tipos de gradientes. Os solventes são libertados pelas bombas estando estes a alta pressão e vão para uma câmara de pequeno volume onde são misturados por agitação magnética, sendo encaminhados posteriormente ao injetor, coluna e detector (JARDIM et al., 2006).

### C) Sistema de bombeamento

Devido ao fato de trabalhar com colunas de partículas muito reduzidas, a HPLC necessita que o fluxo da fase móvel seja constante e a alta pressão o que se consegue através de um sistema de bombeamento eficaz. A utilização de alta pressão é necessária, pois partículas exercem alta resistência ao fluxo da fase móvel e se não fosse utilizada a análise seria muito lenta. O fluxo deve ser constante para garantir a reprodutibilidade, sensibilidade e resolução da análise. Utiliza-se também o sistema de bombeamento para fazer gradiente de eluição quando os compostos apresentam fator de separação muito próximo (CECCHI, 2003).

Os requisitos para um sistema de bombeamento de HPLC são rigorosos e incluem:

- (1) A geração de pressões de até 600bars;
- (2) O caudal contínuo sem pulsos, ou, se pulsando, com amortecedor de pulsos;
- (3) As velocidades de fluxo variando de 0,1 a 10ml/min;
- (4) A reprodutibilidade e constância do caudal de 1%;
- (5) Os componentes resistentes à corrosão. De acordo com as características de funcionamento e desenho podem-se considerar basicamente dois tipos de bombas, as mecânicas e as pneumáticas. Entre as bombas mecânicas existem dois tipos diferentes, as recíprocas e tipo seringa (SKOOG et al., 1997).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Levando em consideração o desempenho e características de funcionamento, existem basicamente dois tipos de bombas, as pneumáticas e as mecânicas (COLLINS et al.; GUIMARÃES, 1997).

- **Bombas pneumáticas**

Neste tipo de bombas um gás inerte exerce uma pressão deslocando o líquido de forma contínua, a pressão pode ser diretamente sobre o líquido ou sobre um recipiente onde o mesmo está contido. Essas bombas são baratas e livres de pulsos, mas sofrem limitações de capacidade e pressão de saída e são dependentes da velocidade de fluxo com a viscosidade do solvente e pressão de retorno da coluna. Além disso, não são fáceis para trabalhar com eluição com gradientes e estão limitadas a pressões menores do que 200bar. Ela pode ser visualizada na Figura 4.

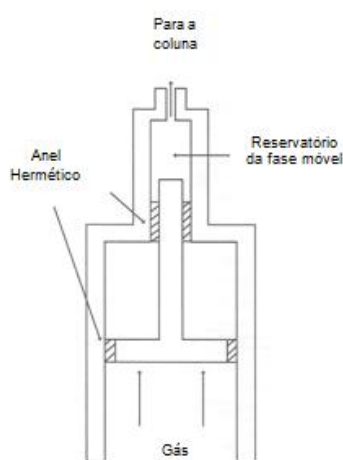


Figura 4 - Bomba pneumática (JARDIM et al., 2006).

- **Bombas mecânicas**

As bombas mecânicas podem ser divididas em bombas recíprocas e bombas tipo seringa:

**Bombas recíprocas:** Consiste numa pequena câmara na qual o solvente é bombeado pelo deslocamento de um pistão controlado por um motor, desloca fluxos de volume constante, porém de forma descontínua, ou seja, em pulsos (SKOOG et al., 2002). Tendo a desvantagem de produzir um fluxo pulsado que deve ser amortecido porque a sua presença manifesta-se como um ruído de fundo, na linha de base do cromatograma. As vantagens de bombas recíprocas incluem o seu pequeno volume interno, as altas pressões de saída, a fácil adaptabilidade à eluição com gradiente e os caudais constantes, que são independentes da pressão de retorno da coluna e da viscosidade do solvente (COLLINS et al., 1997). Esse tipo de bomba pode ser visto na Figura 5.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

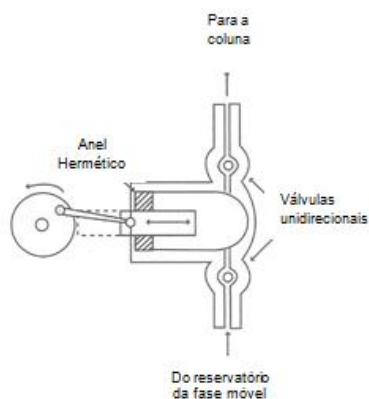


Figura 5 - Bomba recíproca (JARDIM et al., 2006).

**Bombas do tipo seringa:** Também chamadas de bombas de deslocamento contínuo (Figura 6), essas bombas são formadas por um pistão que se move por ação de um mecanismo de rosca, sustentado por um motor, o fluxo é contínuo e sem pulsações, porém tem capacidade total limitada, devendo parar para o enchimento após o fornecimento de uma relativamente baixa quantidade de solvente (SKOOG et al., 2002; POMBEIRO, 2003; CIOLA, 1998).

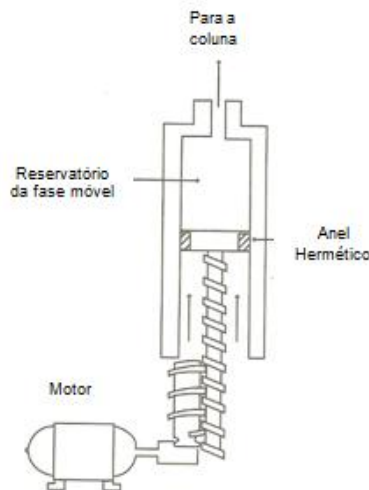


Figura 6 - Bomba do tipo seringa (JARDIM et al., 2006).

### D) Medidores e controladores de pressão

Problemas no equipamento, como entupimentos ou vazamentos, podem ser diagnosticados pelos monitores de pressão, que também podem ser utilizados para aperfeiçoar a separação. Dois tipos de medidores de pressão podem ser utilizados: Bourbon ou diafragma (Figura 7) e transdutor de pressão (Figura 8).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

**Bourbon ou diafragma:** no qual um tubo de aço inoxidável flexível preenchido com um líquido viscoso abaixa pressão, se expande com o aumento da pressão da fase móvel que vai da bomba para a coluna, essa expansão desloca o ponteiro acusando o aumento da pressão.

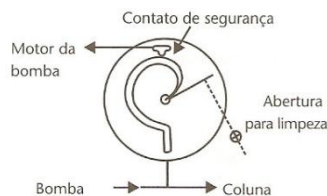


Figura 7 - Medidor de pressão Bourbon (JARDIM et al., 2006).

**Transdutor de pressão:** Ao ir da bomba para a coluna a fase móvel exerce uma pressão numa membrana, que é sentida no transdutor convertendo a pressão em corrente elétrica, cujo valor é medido.

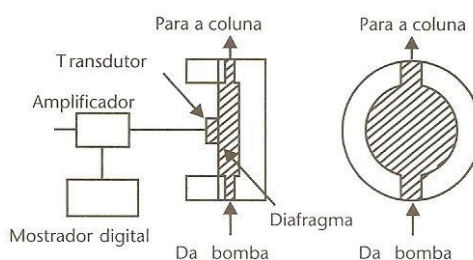


Figura 8 - Medidor de pressão do tipo transdutor de pressão (JARDIM et al., 2006).

### E) Sistema de injeção da amostra

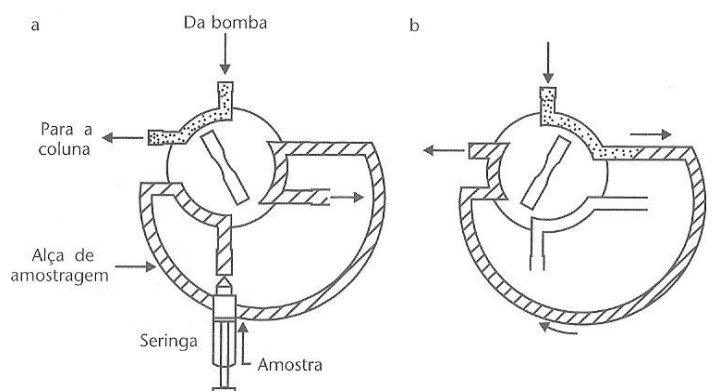
Para se obter uma boa eficiência em análises cromatográficas, um fator muito importante a considerar é a maneira como se introduz a amostra na coluna. A injeção deve ser reprodutível e ter grandes variedades de volumes, assim como não deve introduzir bolhas. Esta parte do instrumento necessita de um cuidadoso desenho, pois devem resistir a altas pressões e as suas cavidades devem ser completamente lavadas pela fase móvel. Duas são as formas de injeção da amostra: com microseringas e com válvula rotatória, sendo esta de injeção automática (JARDIM et al., 2006).

O injetor do tipo seringa apresenta a vantagem de ser mais barato, porém é de baixa reprodutibilidade e necessita de um septo para evitar o retorno da amostra e do êmbolo para fora do injetor. O sistema de injeção mais utilizado é o da válvula rotatória, pois além de ser reprodutível, elimina o problema de retorno da amostra. Neste sistema o volume injetado não necessita ser preciso, pois a válvula rotatória tem uma alça capilar amostradora (*loop*) capaz de selecionar volumes de 1 a 100  $\mu\text{L}$  de amostra, sendo o excesso levado para fora do



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

equipamento. Na Figura 11 pode ser visualizado o método de injeção da amostra com a válvula rotatória. Na posição de carregar (Figura 9 a) um determinado volume de amostra é carregado enquanto a fase móvel vai direto para a coluna, a rotação da posição geralmente é feita manualmente, assim na posição injetar (Figura 9 b), mudam-se as conexões, fazendo com que a fase móvel passe pela alça de amostragem e arraste a amostra para a coluna (CECCHI, 2003; JARDIM et al., 2006).



a: posição para carregar

b: posição para injetar

Figura 9 - Válvula rotatória de amostragem para HPLC (JARDIM et al., 2006).

### F) Coluna

Num cromatógrafo líquido podem ter três tipos de colunas, a coluna de saturação, a coluna de guarda e a coluna analítica (JARDIM et al., 2006).

- **Coluna de saturação**

Também chamada de pré-coluna, é colocada entre a bomba e o injetor sendo usada para condicionar a fase estacionária. Muito aplicada no passado quando se utilizava a cromatografia líquido-líquido com a finalidade de saturar a fase móvel com o líquido da fase estacionária, não sendo tão necessária atualmente devido ao grande desempenho das fases estacionárias quimicamente ligadas. Mas ainda pode ser utilizada quando se usam enchimentos a base de sílica e uma fase móvel que dissolve este material, tendo este efeito aumentado com o aumento da temperatura, polaridade, força iônica e pH da fase móvel, de modo que a fase móvel estando saturada com fase estacionária, não irá reagir com a fase estacionária contida na coluna. Pode ser usada também para reter impurezas da fase móvel a fim de preservar a coluna (CECCHI, 2003; JARDIM et al., 2006).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- **Coluna de guarda**

Colocada entre o injetor e a coluna analítica, esta possui normalmente de 2 a 5 cm e tem o mesmo diâmetro interno e fase estacionária da coluna analítica. É utilizada para prevenir que impurezas e compostos fortemente retidos não contaminem a coluna de separação, aumentando assim o seu tempo de uso, portanto a coluna de guarda deve ser renovada com certa frequência, pois satura rapidamente. Devido ao seu pequeno tamanho, em relação ao tamanho da coluna analítica, o custo das diversas trocas desta ainda é muito menor do que uma nova analítica, que é deteriorada rapidamente quando não se usa a coluna de guarda (CECCHI, 2003; JARDIM et al., 2006).

- **Coluna analítica**

A separação na HPLC é efetuada dentro das colunas cromatográficas. Esta deve ser constituída de algum material inerte, de diâmetro uniforme, capaz de resistir às pressões que serão usadas. O material mais utilizado é o aço inoxidável, mas também podem ser constituídas de vidro reforçado e sílica fundida, sendo esta última mais utilizada na confecção de colunas capilares. As mais usadas apresentam diâmetro interno de 4,6mm, comprimento de 250mm e são preenchidas com partículas porosas com diâmetro de 5 $\mu$ m. A escolha da coluna é feita em função da sua capacidade, que é determinada pelas suas dimensões, material de empacotamento, comprimento e diâmetro interno. Dependendo do diâmetro interno as colunas podem ser classificadas de diferentes formas, como descreve a tabela 4 (CECCHI, 2003; JARDIM et al., 2006).

Tabela 4 - Classificação das colunas de separação (CECCHI, 2003; JARDIM et al., 2006).

<i>Nome</i>	<i>Comprimento (cm)</i>	<i>Diâmetro interno (mm)</i>	<i>Caudal (<math>\mu</math>l min<sup>-1</sup>)</i>	<i>Tamanho de partícula (<math>\mu</math>m)</i>
Colunas Rápidas	3-10	2-6	1.000-5.000	3
Convencional analítica	ou 5-30	2-6	1.000-3.000	3; 5; 10
<i>Small bore microbore</i>	ou 10-100	1-2	5-200	1; 3; 5
Capilar recheada	20-200	0,1-0,5	0,1-20	1; 3
Capilar semipermeável	10-10.000	0,02-0,1	0,1-2	1; 3
Capilar aberto	100-10.000	0,01-0,075	0,05-2	a
Preparativa	>20	>10	>1.000	>10

a: Filme líquido ligado nas paredes.

Estas colunas podem ser separadas em colunas analíticas e colunas preparativas (VALENTE et al., 1983).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

As colunas analíticas são destinadas à separação de pequenas quantidades de material, não existindo, na maioria dos casos, o objetivo de isolar, para fins de identificação ou outros, os materiais separados, mas somente a necessidade de detectá-los para fins qualitativos ou quantitativos. Os tubos das colunas são preenchidos com a fase estacionária conveniente, geralmente sílica ou seus derivados de granulometria três, cinco, sete ou 10 micra, ou mesmo, nas tendências modernas, de um micrometro de diâmetro médio. Podendo o comprimento variar de três a 60 cm e o diâmetro interno de 0,1 até 8mm, sendo as de 0,1 até 0,5mm chamadas de colunas capilares.

As colunas preparativas são utilizadas quando se quer separar e recuperar os componentes de uma amostra em quantidade suficiente para depois serem utilizadas. Apresentam diâmetros de 10 até 80cm e alturas de um até quatro metros, operando a pressões de algumas centenas de atmosferas. São destinadas à produção em escala industrial, sendo dirigidas nos seguintes principais tópicos: preparação e isolamento de compostos para fins de identificação, preparação de padrões puros, materiais de alto valor e de difícil purificação por outros métodos, por exemplo, compostos opticamente ativos, derivados de isótopos ou isômeros de interesse científico, farmacêutico ou bélico (CIOLA, 1998).

### G) Detectores

Tendo como função monitorizar o fluxo da fase móvel na saída da coluna, o detector mede de forma contínua propriedades físicas ou físico-químicas da amostra, ou da solução que a contém enviando um sinal, registado por um processador de dados ou por um registador conveniente, que é, geralmente, diretamente proporcional à concentração do componente na amostra. A interpretação desse registo produz dados qualitativos e quantitativos sobre a amostra e os seus constituintes.

O detector ideal é aquele que apresenta as seguintes características:

- ter alta sensibilidade: detectar pequenas quantidades de amostra;
- ser estável: insensível a variações de temperatura e de fluxo, no caso de eluições com gradiente;
- linearidade: o sinal deve manter uma relação linear com a concentração da amostra;
- uma leitura contínua;
- resposta universal: capaz de trabalhar com todos os tipos de amostra (JARDIM, 2006);
- baixo limite de detecção;

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- seletividade, exatidão e precisão (MCMASTER, 1994; SKOOG, 2002).

Os detectores dividem-se em duas grandes classes: detectores de propriedades macroscópicas, que são aqueles que medem as alterações de propriedades físicas provocadas pelo soluto na fase móvel; e detectores de propriedades do soluto, que são aqueles que respondem a uma dada propriedade química ou física do soluto e são, idealmente, independentes da fase móvel (VOGEL, 1981; NETO et al., 2003).

O número de técnicas de detecção aplicadas em HPLC é enorme (tabela 5), mas os detectores geralmente utilizados são: de absorção no UV e no visível, de fluorescência, de índice de refração e eletroquímicos (COLLINS et al., 1997; VOGEL, 1981; NETO et al., 2003).

Tabela 5 - Detectores utilizados na HPLC (VOGEL, 1981; HARRIS, 2005).

<i>Detector</i>	<i>Limite de detecção (ng)</i>	<i>de Gradiente</i>	<i>Aplicação</i>
Ultravioleta	0,1-1	Sim	Seletivo
Índice de refração	100-1000	Não	Universal
Espalhamento de luz	0,1-1	Sim	Alta massa molar
Eletroquímico	0,01-1	Não	Seletivo
Fluorescência	0,0001-0,01	Sim	Seletivo
Espectrometria de massas	0,1-1	Sim	Universal
Infravermelho com transformada de Fourier	1000	Sim	Seletivo

Nos detectores espectrofotométricos o seu funcionamento baseia-se na absorvância da luz por parte da amostra ao passar através dela qualquer radiação eletromagnética; normalmente isto ocorre do ultravioleta até o infravermelho, num dado comprimento de onda. E a resposta deste detector será seletiva, porque só detectará os compostos que absorvem no comprimento de onda em que opera o detector. Existem dois tipos de detectores de luz ultravioleta; o de comprimento de onda variável, que é de aplicação mais variada e sensível, cobrindo a faixa de 190 a 800nm, e o chamado fotométrico que funciona com um ou dois comprimentos de onda fixos, operando em comprimento de onda de 254 e de 280nm. Alguns compostos absorvem na região visível do espectro eletromagnético e podem ser analisados por um detector que funciona nesta região do espectro, sendo chamado de detector de absorção no visível (PATONAY, 1992).

A fase móvel utilizada deve ser cuidadosamente selecionada porque a intensidade de emissão depende totalmente do meio em que se encontra a amostra (MCMASTER, 1994; PERES, 2002).

Um tipo de detector comum mais usado na HPLC é o arranjo de diodos. Um arranjo de diodos consiste numa série de fotodiodos detectores posicionados lado a lado num cristal de silício de modo que cada comprimento de onda difratado pela grade atinge um ponto deste arranjo, e conseqüentemente um detector. Este detector permite que a absorvância de uma amostra

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

em todos os comprimentos de onda seja determinada de modo simultâneo. O seu princípio é baseado na absorção de luz ultravioleta ou visível, por parte da amostra.

Outro fator importante para estes detectores é que têm sensibilidades diferentes para diferentes comprimento de onda, de modo que é necessário que se especifique em que região do espectro se vai trabalhar, mas a resolução espectral depende do tipo e do número de diodos que compõe o arranjo (SKOOG, 2002).

### H) Registo de dados

Para registar ou manipular os dados obtidos pelos detectores na HPLC pode se usar simplesmente um registador ou, de uma maneira sofisticada, um integrador ou mesmo um microcomputador (SKOOG et al., 2002; JARDIM et al., 2006).

O integrador fornece o tempo de retenção de cada pico, a área de cada um e a área total de todos eles. Para aumentar a versatilidade, exatidão e precisão da HPLC utilizam microcomputadores, que além de processar os dados obtidos pelo detector, armazenado-os, podem controlar a composição da fase móvel, o caudal que sai da bomba, a injeção da amostra, a temperatura da coluna, podendo diagnosticar possíveis problemas (JARDIM et al., 2006; SKOOG et al., 2002).

### 2.2.5. Identificação e quantificação

A identificação dos componentes de uma amostra é feita através da comparação dos cromatogramas obtidos com padrões, nestes padrões o componente em questão é eluído nas mesmas condições da amostra a ser analisada, tendo a formação de um pico em um determinado tempo chamado de tempo de retenção, sendo assim os componentes são identificados pelo tempo de retenção. Os cromatogramas (Figura 10) são gráficos do tempo em minutos pela resposta do detector (SKOOG et al., 2002).

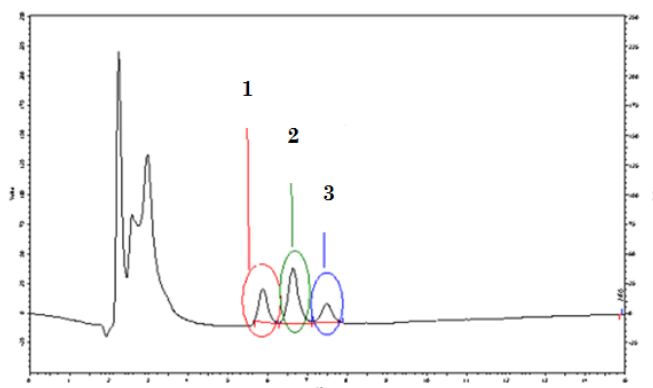


Figura 10 - Cromatograma típico da separação de compostos, por HPLC.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Os padrões são obtidos comercialmente e são analisados em diferentes concentrações, formando assim uma curva de calibração, esta trata-se de um gráfico da concentração do componente pela área do pico obtido. Através desta pode-se quantificar os componentes da amostra quando se obtém a área dos picos (SKOOG et al., 2002).

### 2.2.6. Análise qualitativa

Um cromatograma fornece apenas uma peça de informação qualitativa acerca de cada espécie em uma amostra, a saber, o seu tempo de retenção ou a sua posição sobre a fase após certo período de eluição. Deve-se notar que um simples cromatograma não indica o número total dos compostos existentes na amostra. A análise deve ser repetida com outras fases móveis e em outras colunas, a fim de se conseguir o maior número de picos e mesmo assim deve-se tomar cuidado com o detector utilizado. É importante observar que os cromatogramas podem não levar à identificação positiva das espécies presentes na amostra, mas fornecem evidência segura da ausência de certos compostos.

Assim, se a amostra não produz um pico no mesmo tempo de retenção que um determinado padrão usado em condições idênticas, pode-se considerar que o composto em questão está ausente (ou sua presença ocorre em nível de concentração abaixo do limite de detecção do procedimento) (SKOOG et al., 2002).

### 2.2.7. Análise quantitativa

A cromatografia quantitativa em coluna está baseada na comparação da altura ou da área do pico do analito com a de um ou mais padrões. Se as condições forem controladas apropriadamente, estes parâmetros variam linearmente com a concentração. A altura de um pico cromatográfico é obtida ligando-se as linhas de base dos dois lados do pico por uma linha reta e medindo-se a distância perpendicular desta linha ao pico. É importante observar, no entanto, que as alturas dos picos estão relacionadas inversamente com as suas larguras. Assim resultados precisos são obtidos com as alturas de picos apenas se as variações nas condições da coluna não alterarem as larguras dos picos durante o período de tempo requerido para obtenção dos cromatogramas para a amostra e o padrão. As variáveis que devem ser bem controladas são a temperatura da coluna, a velocidade de fluxo do eluente e a velocidade de injeção da amostra (COLLINS et al., 1997).

As áreas dos picos são independentes dos efeitos de alargamento, portanto, as áreas constituem uma variável analítica mais satisfatória do que as alturas dos picos. Por outro lado, as alturas dos picos são medidas mais facilmente e, no caso de picos estreitos, determinadas com maior precisão. Mas a maioria dos instrumentos cromatográficos modernos está equipada com integradores eletrônico digitais que permitem o cálculo preciso das áreas

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

dos picos. Se um destes equipamentos não estiver disponível, pode-se fazer uma estimativa manual. Um método simples, que funciona com picos simétricos de larguras razoáveis, é multiplicar a altura do pico pela sua largura à meia altura. Outros métodos podem ser aplicados, mas em geral, técnicas manuais de integração fornecem resultados reprodutíveis em cerca de 2 a 5 %. Os integradores digitais são mais precisos (CIOLA, 1998).

O método mais direto para análises cromatográficas quantitativas envolve a preparação de uma série de soluções padrão de composições próximas da solução desconhecida. Os cromatogramas dos padrões são então obtidos e as alturas ou as áreas dos picos lançadas em gráfico em função da concentração. A curva obtida com esses dados deve ser uma reta que passe pela origem. As análises serão realizadas considerando esta curva. Para maior exatidão, a padronização deve ser refeita com frequência (SKOOG et al., 2002).

A maior precisão em cromatografia quantitativa é obtida com o uso de padrões internos porque são evitadas as incertezas produzidas na injeção da amostra. Neste procedimento, uma quantidade de uma substância medida cuidadosamente, que atua como padrão interno, é introduzida em cada padrão e na amostra. A razão entre as áreas (ou as alturas) do pico do analito e do pico do padrão interno (ou alturas) funciona como parâmetro analítico. Para que esse método tenha sucesso, é necessário que o pico do padrão interno seja bem separado dos picos de todos os outros componentes da amostra. Por outro lado, o pico do padrão deve ser próximo do pico do analito. Com um padrão interno adequado, precisões relativas melhores do que 1% podem ser obtidas. Já para a padronização externa injetam-se volumes exatamente iguais de amostras que contêm diferentes concentrações ou massas dos compostos de interesse. Com o tamanho dos picos obtidos (medidos em área ou altura do pico), constrói-se um gráfico de área ou altura de pico em função das massas analisadas (CIOLA, 1998).

### 2.2.8. Aplicações

A HPLC tem uma ampla gama de aplicação, alguns exemplos mais comuns são:

- Vitaminas hidrossolúveis como as do Complexo B como B5, B1, B2, B6 e niacina (MORESCHI et al., 2007; PRESOTO et al., 2008);
- Vitaminas lipossolúveis, como  $\alpha$ -tocoferol, precursor da Vitamina E;  $\beta$ -caroteno, precursor da vitamina A e a vitamina K (JAKOB et al., 2000; OTLES et al., 2005; GIMENO et al., 2000);
- Antocianinas (LIMA et al., 2006);
- Carotenóides (DELLA LUCIA, et al., 2008);
- Compostos fenólicos (ABE et al., 2007);
- Lipídios (VILA NOVA, 2005; BAGGIO; BRAGAGNOLO, 2008);

- Açúcares (DRUZIAN; DOKI; SCAMPARINI, 2005);
- Hidrolisados protéicos (BIZZOTTO, 2006; BIASUTTI, 2008).

### 2.2.9. Parâmetros cromatográficos

A seguir estão descritos os parâmetros cromatográficos utilizados para avaliar a separação de analitos por cromatografia.

- Fator de retenção (k)

O fator de retenção é determinado pela razão entre a fração de tempo em que as moléculas do analito ficam retidas na fase estacionária e a fração em que percorrem a coluna na fase móvel, de acordo com a Equação (1) (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 1993):

$$k = \left( \frac{t_R - t_M}{t_M} \right) = \frac{t'_R}{t_M} \quad (1)$$

$t_R$  = tempo de retenção de um analito, que é o tempo decorrido desde a injeção até o ponto máximo do pico;

$t_M$  = tempo de retenção de um analito não retido;

$t'_R$  = tempo de retenção ajustado.

Os valores ideais de k para dois componentes devem variar entre 1 e 10, e para múltiplos componentes são aceitos valores entre 0,5 e 20 (COLLINS *et al.*, 2006; LANÇAS, 1993).

- Resolução (Rs)

A resolução refere-se à separação de dois picos adjacentes e pode ser obtida pela Equação (2) (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 1993): A resolução é calculada a partir da distância que separa os pontos máximos dos picos e da soma das larguras de suas respectivas bases ou largura a meia altura.

$$R_S = 2 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{b1} + W_{b2}} \right) = 1,177 \left( \frac{t_{R2} - t_{R1}}{W_{h1} + W_{h2}} \right) \quad (2)$$

Onde:

$t_{R1}$  e  $t_{R2}$  = tempo de retenção de dois picos adjacentes;

$W_{b1}$  e  $W_{b2}$  = largura dos picos na base, em unidades de tempo;

$W_{h1}$  e  $W_{h2}$  = largura dos picos a meia-altura, em unidades de tempo.

Quando  $R_S = 1$ , os dois picos são razoavelmente separados, com somente 2% de sobreposição se as quantidades dos dois componentes forem iguais. Maiores valores de  $R_S$  indicam melhor separação:  $R_S = 1,25$  é suficiente para fins quantitativos e com  $R_S > 1,5$  tem-se 100% de separação para picos gaussianos (COLLINS V, 2006; LANÇAS, 1993).



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Fator de separação ( $\alpha$ )

O fator de separação está relacionado com a separação de dois picos adjacentes, sendo calculado pela razão entre os respectivos fatores de retenção que são, por sua vez, relacionados aos tempos de retenção ajustados, conforme a

Equação (3):

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t'_{R2}}{t'_{R1}} \quad (3)$$

O fator de retenção ( $k$ ) mede a seletividade de um sistema cromatográfico e, portanto, quanto mais seletivamente a fase estacionária reter o segundo componente que está sendo analisado, maior será o fator de separação ( $\alpha$ ).

Se  $\alpha = 1$ , indica que não há diferença termodinâmica entre os dois componentes de um dado sistema e eles não podem ser separados. Contudo,  $\alpha > 1$  não necessariamente indica que os dois picos estão totalmente separados, pois podem ser largos e estarem sobrepostos. Em consequência disto, um valor elevado de  $\alpha$  só implica em boa separação se os picos forem estreitos (COLLINS *et al.*, 2006).

- Curva de van Deemter

A curva de van Deemter é indicada, na caracterização cromatográfica de uma coluna, para determinar o caudal que se deve trabalhar a fim de obter a máxima eficiência ( $N$ ) da coluna. Essa relaciona-se com a velocidade linear ótima ( $\mu$ ), na qual a altura equivalente a um prato ( $H$ ) terá um valor mínimo e, portanto o valor de eficiência será máximo. As equações para cálculo de  $N$ ,  $H$  e  $\mu$  são apresentadas a seguir (equações 4, 5 e 6, respectivamente), onde  $L$  representa o comprimento da coluna cromatográfica (COLLINS *et al.*, 2006):

$$N = 5,545 \left( \frac{t_R}{W_h} \right)^2 \quad (4)$$

$$H = \frac{L}{N} \quad (5)$$

$$\mu = \frac{L}{t_M} \quad (6)$$

### 2.3. Pré-tratamento de amostras

As diversas técnicas de pré-tratamento de amostras têm por finalidade a recuperação do analito da matriz, eliminando-o de substâncias que interfiram na análise.

A concentração do analito a uma escala possível de ser quantificada realiza-se posteriormente à determinação do tipo de técnica e das condições de análise, de forma a tornar a matriz compatível com o sistema analítico. Em alguns casos, esta etapa serve também para modificar quimicamente o analito através de reações de derivatização.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A etapa de preparação da amostra é comumente manual e decisiva para a precisão e a exatidão do método, exigindo maior tempo e empenho por parte do operador na seleção dos procedimentos rápidos, com poucas etapas, capaz de produzir recuperações quantitativas e reprodutivas do analito e, de preferência, com possibilidade de automação (QUEIROZ et al., 2001). Dependendo do tipo de matriz, alguns analitos (*p.e.* gases e vapores) não requerem nenhum tipo de tratamento prévio, sendo analisados diretamente em equipamentos analíticos (*p.e.* cromatógrafo a gás). Outras matrizes podem envolver ampla gama de misturas de compostos orgânicos e inorgânicos de origem sintética ou biológica cuja preparação para análise vai depender de cada caso em particular. A escolha do tipo de tratamento utilizado é feita em função das características da matriz e do analito e das condições de análise utilizadas que incluem, principalmente, o tipo de técnica e de instrumentação disponíveis no local de trabalho.

### 2.4. Extração em fase sólida

A SPE (Extração em Fase Sólida, do inglês *Solid Phase Extraction*), na sua forma moderna, tem mais de 25 anos. Ela tem se tornado uma das mais comuns técnicas de concentração e *clean-up* da amostra usada pelos químicos analíticos.

Através dos anos, o uso da SPE tem crescido devido ao fato de que essa técnica atende as necessidades dos analistas em relação aos procedimentos de preparo da amostra, apresentando-se simples, relativamente barata, com boa recuperação dos analitos e adequada seletividade, reduzido uso de solventes orgânicos e capacidade de automação (MAJORS, 2001b).

A extração em fase sólida (SPE) envolve uma competição, onde a fase extractiva é o sólido. Esta técnica tem sido muito utilizada para remover ou concentrar substâncias de matrizes líquidas presentes em quantidade vestigial. Pode ser considerado como um meio de purificação de amostras antes da análise por cromatografia líquida, a fim de eliminar outras substâncias que compõem a matriz.

Este método depende de alguns factores tais como o tipo de resina utilizada, a concentração do analito, o volume da amostra e o fluxo com que a amostra atravessa o sorvente.

A SPE é um processo onde normalmente recupera-se quase todo o analito da matriz em uma única extração. Esta é uma técnica bastante aplicada em matrizes complexas e utiliza os mesmos materiais adsorventes usados na cromatografia líquida, dentre os quais se destacam os derivados de sílica C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub> e CN.

Uma grande variedade de adsorventes pode ser utilizada, desde fases de sílica modificadas de C<sub>8</sub> a C<sub>18</sub> (fases reversas), resinas poliméricas, alumina, carvão, sílica e ciano e outras (QUEIROZ et al., 2001).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Os mecanismos de retenção na SPE assemelham-se aqueles envolvidos na cromatografia líquida em coluna (POOLE et al., 2000), e dependendo do adsorvente e do modo como é utilizada, a SPE é dividida em modo reverso, modo normal e troca iônica. Nos casos das fases reversas (C8, C18 e CN), a retenção do analito acontece devido, primeiramente, às interações de van der Waals não polares, entre as ligações carbono-hidrogênio do analito com os grupos funcionais da superfície da sílica. Já no modo normal, as principais interações são entre grupos polares do analito e da fase extratora através de ligações de hidrogênio, interações  $\pi - \pi$  e dipolo-dipolo.

Finalmente, no modo troca iônica, interações eletrostáticas são as responsáveis pela extração seletiva do analito (SNYDER et al., 1997). A SPE conta com uma grande variedade de adsorventes disponíveis, que podem ser utilizados com os mais diversos tipos de matrizes e classes de compostos (QUEIROZ et al., 2001).

A extração com resinas poliméricas ocorre devido a adsorção dos analitos por meio de forças de van der Waals, que permitem uma dessorção fácil. As resinas poliméricas mais comumente utilizadas são as do copolímero poliestireno-divinilbenzeno (JUNKER-BUCHHEIT e WITZENBACHER, 1996).

Atualmente, a SPE tem ganhado aplicações específicas com o desenvolvimento de fases mais seletivas. Vários são os dispositivos utilizados para SPE dentre eles os mais utilizados são os cartuchos e os discos de extração (Figura 11).

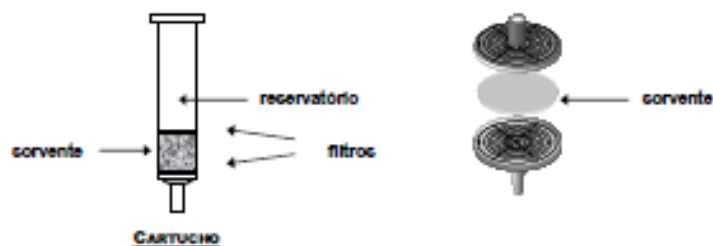


Figura 11 - Representação de um cartucho e um disco, usados em SPE (SNYDER et al., 1997).

Em ambos dispositivos, a amostra é forçada a passar pelo material extrator pela aplicação de pressão em uma das extremidades do cartucho ou disco. Para realizar a análise simultânea de várias amostras e extrações mais rápidas, geralmente são utilizados sistemas extratores com vácuo (Figura 12) (HAGEN et al., 1990).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

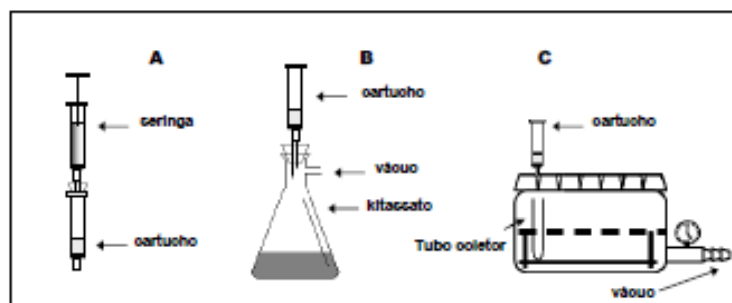


Figura 12 - Representação dos dispositivos utilizados na SPE. A: Seringa; B: kitassato; C- sistema extrator (SNYDER et al., 1997).

Os cartuchos são os dispositivos mais utilizados para a SPE devido a sua facilidade de utilizar, grande disponibilidade comercial e baixo custo (SNYDER et al., 1997).

Estes têm sido desenvolvidos por mais de vinte anos. Os primeiros cartuchos foram utilizados em 1978, cartuchos com formato de seringa em 1979 e como pré-coluna para acoplamento “on-line” com cromatografia líquida em 1980 (HENNION, 1999). Durante os últimos cinco ou seis anos tem crescido o desenvolvimento com melhoria do formato, automação e com a introdução de novos sorventes com capacidade de melhorar a extração de analitos polares (PICHON, 2000).

Os cartuchos de extração assemelham-se a seringas hospitalares sem o êmbolo, dentro das quais se encontra o material extrator acondicionado entre dois filtros (Figura 12). A porção da seringa acima do material extrator é chamada de reservatório e serve para acondicionar a amostra. Os cartuchos disponíveis comercialmente em geral, possuem reservatórios de 0,5 a 10 mL e recheios que variam de 35 mg a 2 g (SNYDER et al., 1997). O maior problema dos cartuchos é a variação apresentada entre fabricantes e mesmo entre lotes de uma mesma marca devido às diferenças de características entre as partículas extratoras usadas. Os cartuchos também apresentam eficiência mais baixa e maior consumo de solventes quando comparados aos discos (ROSSI e ZHANG, 2000).

A resina poliamida é usada para adsorver os compostos polares (grupos-OH, os compostos fenólicos) de soluções aquosas ou metanólicas no âmbito do mecanismo de fase reversa através de ligações fortes de hidrogénio entre o composto de grupos hidroxilo e grupos de amida da resina. É útil para extração de taninos, clorofila, ácidos húmicos, terpenóides farmacologicamente ativos, flavonóides, ácido gálico, ácido protocatecuico A-catecol e floroglucinol. Também é útil para a extracção de ácidos carboxílicos aromáticos, compostos nitroaromáticos e irreversivelmente retém quinonas. As suas características são as seguintes: Tamanho de partícula: 50-160 pm, pH: 4,5-7,5, Densidade: 0,2-0,3 cm<sup>3</sup>/g, teor de água: <5% (SUPELCO).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

As vantagens de extração por SPE estão na capacidade de suportar amostras em condições fortemente ácidas ou básicas e no seu baixo custo. As vantagens da SPE sobre a LLE são a necessidade de menos tempo para preparação de amostra e poder ser completamente automatizada, requerendo menor quantidade de solventes e permitindo maior selectividade.

Um problema associado à SPE é o facto de a fase necessitar de ser uniforme de modo a evitar baixas eficiências. Neste método o efeito de matriz pode se antever devido à competição que possa ocorrer entre o analito desejado e os demais componentes da matriz.

Em geral, as principais desvantagens da SPE são o maior tempo de execução e complexidade operacional quando realizada de forma manual. Além disso, destaca-se o custo adicional dos cartuchos e discos que são utilizados geralmente uma única vez (LORD e PAWLISZYN, 2000).

### 2.4.1. Desenvolvimento do método de SPE

Como etapas do desenvolvimento do método de extração em fase sólida, o analista tem que primeiramente seleccionar o tipo de sorvente que vai ser utilizado na análise em questão, de acordo com as características físico químicas dos analitos de interesse (HENNION, 1999).

Na SPE o analito de interesse, para ser extraído, é dividido entre a fase líquida, a qual está contida na fase sólida (sorvente) e o solvente de eluição. O analito de interesse na amostra terá menor ou maior afinidade pela fase líquida do sorvente, determinando assim o grau de retenção deste analito. Posteriormente este analito é extraído por um solvente orgânico no qual ele tenha maior afinidade que na fase líquida do sorvente.

Os mecanismos de retenção e eluição dos analitos pela fase sólida ocorrem através de forças intermoleculares entre o analito e a superfície da fase sólida, envolvendo interações tipo van der Waals, tipo eletrostáticas, dipolo - dipolo, dipolo - dipolo induzido, ião - dipolo, ião - ião e ligação de hidrogênio.

### 2.4.2. Processo da extração em fase sólida

A SPE pode ser descrita como sendo um processo cromatográfico simplificado, com o sorvente atuando como fase estacionária. A fase móvel é a água da amostra aquosa durante a etapa de extração ou o solvente orgânico durante a etapa de dessorção (eluição). Altos fatores de enriquecimento são obtidos quando os analitos são fortemente retidos pelo sorvente na presença de água e quando eles têm baixa retenção com o solvente orgânico usado para dessorção.

Para a realização da SPE, utilizando-se por exemplo  $C_{18}$ , são necessárias quatro etapas, as quais estão demonstradas na Figura 13. Elas devem ser otimizadas de forma a obter-se uma recuperação máxima (SIMPSON e WELLS, 2000; WELLS, 2000b).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

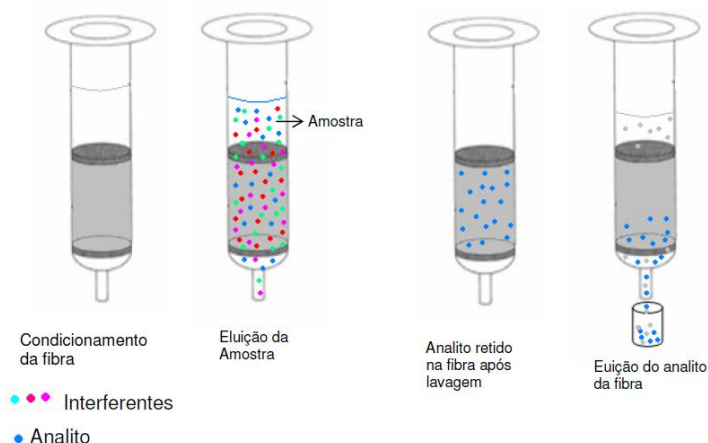


Figura 13 - Etapas de operação do sistema de preparo da amostra por SPE.

A fase líquida é eluída sob pressão ou vácuo e o processo consiste de cinco etapas:

1. Ativação do sorvente através da passagem de um solvente que condicione a superfície do sólido, removendo quaisquer substâncias que estejam presas.
2. Remoção do solvente responsável pela ativação.
3. Aplicação da amostra:
  - 3.a) O analito de interesse e os interferentes ficam retidos na fase sólida.
  - 3.b) O analito de interesse fica retido e parte dos interferentes passam pela fase sólida.
  - 3.c) O analito de interesse passa pelo sólido e os interferentes ficam retidos na fase sólida; neste caso a fração de interesse é imediatamente coletada.
4. A fase sólida é lavada com um solvente apropriado, retirando os interferentes da matriz ou parte delas, sem eliminar os analitos de interesse (no caso 3a), no caso 3b a fase sólida não precisa ser lavada com um solvente apropriado para a remoção dos interferentes.
5. Eluição do analito de interesse do sorvente com um solvente apropriado.

O procedimento geral é transportar a solução que contém o analito por uma resina ou sorvente pré-condicionada que possui afinidade com o analito que se quer analisar. Os analitos são retidos na resina e de seguida por meio de uma solução extrai-se os analitos praticamente sob a forma concentrada.

### A. Condicionamento do sorvente

Cada sorvente de SPE requer o seu condicionamento com o objetivo de se ativar ou se preparar para reter o analito. No caso dos materiais a base de sílica quimicamente modificada, o preparo da coluna para receber a amostra é feito pela ativação ou

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

humedecimento com um solvente conveniente, e por condicionamento com água. A limpeza prévia com solvente orgânico serve também para remover contaminação indesejável que possa estar presente no cartucho. O condicionamento efetivo, ou seja, a preparação do sorvente para as mesmas condições da amostra é realizado com água ou solução tampão. Essa etapa é um pré-requisito para a adsorção reprodutível do analito.

### B. Retenção dos compostos desejados

A amostra é percolada através do cartucho de extração condicionado. Nessa etapa, o composto se distribui entre a amostra líquida e a superfície do sorvente, por simples adsorção à superfície ou através da penetração na superfície, e um equilíbrio é estabelecido.

Em cromatografia de fase reversa é bem conhecido que compostos hidrofóbicos são bem retidos com água como fase móvel. A escolha do sorvente é guiada pela natureza aquosa das amostras, pelo volume necessário para se conseguir a detecção desejada, e a natureza dos compostos. Água não deve eluir os compostos de interesse. Melhores sorventes são então os de fase reversa (principalmente sílicas alquil modificadas, copolímeros apolares e sorventes à base de carbono) para compostos de interesse.

Nesse processo, os analitos de interesse concentram-se no sorvente e frequentemente são adsorvidos junto com outros componentes da matriz da amostra (SIMPSON e WELLS, 2000; WELLS, 2000b).

### C. Limpeza do cartucho de SPE

Antes da eluição, alguns destes componentes interferentes da matriz podem ser removidos da superfície do sorvente pela aplicação de um solvente de lavagem.

Cada passo de lavagem envolve outra distribuição entre o analito e as espécies co-retidas, o sorvente e o líquido que passa através dele. Pode-se controlar cada passo selecionando-se cuidadosamente as condições de lavagem, eluição e carregamento da amostra. Pode ser usada uma mistura simples de tampão com água ou contendo uma pequena quantidade de solvente orgânico (SIMPSON e WELLS, 2000; WELLS, 2000b).

### D. Eluição dos analitos adsorvidos

Na última etapa da SPE, os analitos de interesse são desorvidos com um pequeno volume de solvente adequado. Essa etapa é realizada com maior sucesso utilizando-se um solvente que tenha a maior força eluotrópica para o sorvente que está sendo usado, ao mesmo tempo minimizando o volume de solvente de eluição e maximizando o efeito de concentração da SPE. No entanto, outros fatores como a compatibilidade do solvente com a instrumentação analítica usada para a determinação final, ou o desejo de se reduzir posteriores manuseamentos da amostra tais como a troca de solvente, podem também ditar a seleção do solvente. O solvente deve ser seletivo o bastante para que a interação entre o analito e o sorvente seja enfraquecida e a distribuição do analito através do eluente ocorra. Portanto, para que haja uma excelente escolha do solvente é necessário conhecer as características

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

químicas do analito e informações suficientes no que se refere à estrutura, solubilidade, polaridade, entre outras propriedades.

Para sorventes de fase reversa, a série eluotrópica é bem conhecida para solventes orgânicos e o poder de eluição diminui dentro da série hexano, THF (tetrahidrofurano), acetato de etila, diclorometano, acetona, acetonitrilo e metanol. Um solvente apolar, forte, como o hexano pode não efetuar a eluição totalmente se existir uma camada de água adsorvida na superfície do sorvente. Solventes polares ou capazes de ligação hidrogénio com a água adsorvida podem ser mais efetivos. Por isso, metanol ou acetonitrilo são normalmente preferidos devido a sua miscibilidade com água (SIMPSON e WELLS, 2000; WELLS, 2000b).

Misturas de solventes miscíveis podem também ser usadas para se adquirir um balanço hidrofílico-hidrofóbico (BARCELÓ e HENNION, 1997; SIMPSON e WELLS, 2000).

O caudal de eluição deve ser baixo e o volume mínimo é cerca de 2 vezes o do sorvente, isto é, de 2 a 5 mL para cartuchos de 500 mg. Quanto menor o volume de dessorção, maior o fator de pré-concentração. A dessorção é mais eficiente se for feita com 2 ou 3 alíquotas de 1 mL ao invés de uma alíquota única com 2 ou 3 mL (BARCELÓ e HENNION, 1997).

### 2.4.3. Volume de “Breakthrough”

O volume de “breakthrough” pode ser definido como sendo o volume máximo de amostra que pode ser percolado por um tubo de extração sem que ocorram perdas do analito de interesse e portanto diminuição da sua recuperação, ou seja, é o volume que permite que uma recuperação teórica igual a 100% seja obtida.

O volume de “breakthrough” depende das interações entre o analito, o solvente da amostra e o tipo de sorvente e, para fase reversa, ele depende da hidrofobicidade do analito e da massa de sorvente usada. Este é um parâmetro importante em SPE, pois indica qual o volume máximo de amostra que pode pré-concentrar, sendo que dois fatores podem ser responsáveis pelo volume de breakthrough: retenção insuficiente do analito pelo sorvente e sobrecarga do sorvente.

### 2.4.4. Análise por HPLC

A maioria dos métodos de extração em fase sólida desenvolvidos para análise de compostos polares utilizam a HPLC ou cromatografia gasosa.

A detecção feita na região do ultra-violeta (UV) e num único comprimento de onda ou em vários comprimento de onda utilizando um detector por arranjo de diodos (DAD), é frequentemente utilizada em HPLC (WELLS, 2000a).



### 2.5. Caracterização da cortiça

A Taxonomia de Lineu (Carlos Lineu, séc. XVIII) baptizou o sobreiro com o nome latim *Quercus suber*, que é uma árvore que se supõe existir há cerca de 30 milhões de anos, pertencendo à família das Fagáceas e ao género *Quercus*.

A cortiça, revestimento exterior do tronco e ramos do Sobreiro (*Quercus suber* L.), é um produto natural que, desde há muitos séculos, tem despertado o interesse das pessoas para diversos fins devido às suas propriedades físicas, mecânicas e químicas.

A cortiça, produzida em equilíbrio com a natureza no âmbito de um dos mais ricos, complexos e estáveis ecossistemas das regiões mediterrâneas, vem demonstrando a sua inesgotável utilidade enquanto matéria-prima renovável de características incomparáveis e insubstituíveis (Ministério da Agricultura, 2000).

#### 2.5.1. A química da cortiça

A composição química da cortiça ainda não é totalmente conhecida. Dada a grande variação de métodos analíticos para a determinação dos diferentes componentes da cortiça, assim como o facto das cortiças analisadas serem diferentes, a sua composição química média indicada na literatura difere de autor para autor. De facto, a constituição química deste material natural depende de vários factores tais como a origem geográfica, as condições de solo e clima, a origem genética, a dimensão e idade da árvore, condições de crescimento, entre outros (PEREIRA, 1988; CONDE *et al.*, 1998; CONDE *et al.*, 1999).

A constituição química das paredes celulares da cortiça pode ser dividida em dois tipos de componentes: os componentes estruturais (suberina, lenhina e polissacarídeos) e os componentes não estruturais (extractáveis) (FORTES *et al.*, 2004).

Os componentes estruturais estão relacionados com as funções de estrutura e suporte e incluem celulose, hemicelulose, lenhina, suberina e polissacáridos. No que diz respeito aos extractivos, representam o conjunto de substâncias que podem ser dissolvidas utilizando solventes orgânicos ou aquosos, incluindo ceras (reforço de impermeabilização) e fracção fenólica e polifenólica (possível efeito de protecção contra ataques por organismos biológicos) (SILVA *et al.*, 2005).

De facto, a suberina é o principal constituinte estrutural da cortiça. É uma estrutura polimérica extensa, assegurada por ligações éster entre os seus monómeros (polímero de poliéster) (Figura 14). Existem basicamente três tipos de monómeros na suberina: o glicerol, os monómeros alifáticos ácidos de cadeia longa e os compostos aromáticos (normalmente

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

fenólicos, dos quais o ácido ferúlico é o mais importante). A suberina constitui uma barreira protectora, impedindo a passagem de água e de gases (CARVALHO, 1987).

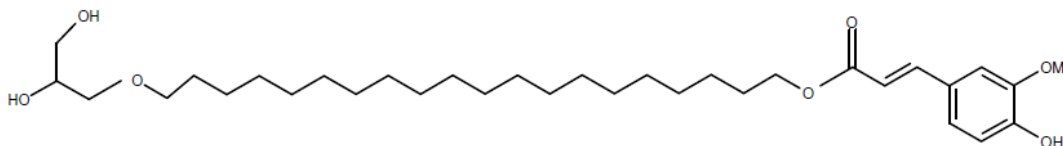


Figura 14 - Suberina: éster glicerol- $\omega$ -hidroxiácido-ácido ferúlico.

Esta substância, que condiciona grande parte das características e propriedades da cortiça, é praticamente infusível, é insolúvel na água, no álcool e na grande maioria dos solventes usuais, sendo só atacada pelas soluções alcalinas que a despolimerizam (FENGEL *et al.*, 1989).

O estudo da composição química da cortiça teve início no séc. XVIII com os trabalhos de Brugnatelli. Desde essa data até aos dias de hoje, têm sido desenvolvidos um grande número de trabalhos sobre a composição química da cortiça (GIL, 1995). Na tabela 6 estão representados os principais resultados da quantidade relativa dos diferentes componentes da cortiça, publicados na 2ª metade do século XX.

Tabela 6 - Resumo dos principais resultados publicados sobre a composição química da cortiça.

<b>Autores</b>	<i>Fierz-David e Ulrich, 1945</i>	<i>Guillemonat, 1960</i>	<i>Carvalho, 1968</i>
<b>Composição</b>	Suberina 50%	Suberina 45%	Suberina 50,4%
	Lenhina 12%	Lenhina 27%	Lenhina 18.0%
	Celulose 11%	Polissacarídeos 12%	Polissacarídeos 13.5%
	Extractáveis 27%	Extractáveis 11%	Extractáveis 15.8%
	- ceras 7%	- ceróides 5%	- em éter 7.2%
	- extractos de álcool 20%	- taninos 6%	- em etanol 3.2%
		Cinzas e outros 5%	- em água 5.4%
			Cinzas 2.3%

<b>Autores</b>	<i>Holloway, 1972</i>	<i>Pereira, 1988</i>
<b>Composição</b>	Suberina 37.8%	Suberina 39.4%
	Polifenóis solúveis em água 31.6%	Lenhina 23.0%
	Lenhocelulose 14.8%	- insolúvel 21.8%
	Extractáveis 15.8%	- solúvel 1.2%
	- em clorofórmio 6.7%	Polissacarídeos 19.9%
	- em metanol 4.4%	Extractáveis 14.2%
- em água 4.7%	- em diclorometano 5.4%	

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

		- em etanol 4.8% - em água 4.0% Cinzas 1.2%
<b>Autores</b>	<i>Amaral, 1990</i>	<i>Rosa et al. , 1994</i>
<b>Composição</b>	Suberina 39% Polifenóis solúveis em água 23% celulose 10% hemicelulose.12% Extractáveis (ceras e taninos) 14% Cinzas 2%	Suberina 41.2% Lenhina 25.5% - insolúvel 24.2% - solúvel 1.3% Polissacarídeos 19.8% Extractáveis 13.7% (em diclorometano, em etanol e água)

Os valores médios indicados podem ter variâncias elevadas, dado a cortiça ser um material natural cuja constituição é influenciada por diversos factores: tipo de solo, clima, condições vegetativas, idade da árvore, tipo de exploração florestal e, ainda, por poderem ser relativos a diferentes tipos de cortiça e métodos de análise (GIL, 1993).

De acordo com os dados mais recentes, a cortiça amadia em média, é constituída por 39-41% de suberina, 23-25% de lenhina, 20% de polissacarídeos, 14% de extractáveis e 1% de cinzas (PEREIRA, 1988; ROSA *et al.*, 1994).

### 2.5.2. Extracção de compostos fenólicos da cortiça

Os componentes não estruturais da cortiça são compostos de pequena massa molecular, solúveis e fáceis de remover por simples dissolução em solventes de polaridade adequada, sendo por isso designados por compostos extractáveis. Aproximadamente 14% da cortiça corresponde a compostos extractáveis (PEREIRA, 1988).

Os compostos extractáveis da cortiça incluem muitas famílias de compostos: n-alcanos, n-alcanóis, ceras, triterpenos, ácidos gordos, glicerídeos, esteróis, fenóis e polifenóis. Normalmente, classificam-se em dois grupos: um constituído por lípidos, solubilizados por solventes de baixa polaridade como, por exemplo, o diclorometano; outro constituído por compostos fenólicos extraídos com solventes polares como, por exemplo, o álcool e a água.

Os compostos fenólicos extraídos com etanol e água incluem compostos fenólicos simples (fenóis, ácidos benzóicos e ácidos cinâmicos) e principalmente poliméricos (taninos) (VAREA *et al.* 2001). Os ácidos fenólicos são os polifenóis de baixo peso molecular mais abundantes na

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

cortiça (CONDE et al., 1998; CONDE et al., 1997). Considerando os valores médios globais, o componente maioritário deste grupo é o ácido elágico, seguido, por ordem decrescente de abundância, pelo ácido 3,4-dihidroxibenzoico, o ácido vanílico e o ácido gálico; os ácidos cinâmicos (ferúlico e cafeico) apresentam-se em concentrações mais baixas. Os aldeídos cinâmicos e benzóicos, e as cumarinas são os componentes minoritários (CONDE et al., 1997).

Os componentes inorgânicos são englobados no que geralmente se denomina por cinzas. Ou seja, o resíduo da combustão completa da matéria orgânica, sendo constituídos principalmente por cálcio (60% m/m das cinzas), seguindo-se o fósforo, o sódio, o potássio e o magnésio (NETO, 2005).

Os compostos extractáveis solúveis em água constituem cerca de 4,0% (m/m) da cortiça e consistem em fenóis simples e polifenóis (PEREIRA, 1988).

Dos compostos fenólicos extractíveis da cortiça, Conde *et al.*, (1997) identificou ácidos fenólicos (gálico, protocatechuico, vanílico, cafeico, ferúlico e elágico), aldeídos fenólicos (protocatechuico, vanilina, coniferaldeído e sinapaldeído) e cumarinas (esculetina e escopoletina).

### 2.5.3. Água de cozedura

As águas residuais da indústria da cortiça resultam da ebulição de pranchas de cortiça (a casca exterior da *Quercus suber* L.), que é a principal etapa de processamento de cortiça, e, assim, largamente utilizado pela indústria do setor nos países do Mediterrâneo, como a Espanha e Portugal (BENÍTEZ et al., 2003).

A cozedura da cortiça é efectuada com o objectivo de melhorar as propriedades das pranchas, tornando-as mais flexíveis e suaves, e remover impurezas (e.g. organismos vivos) (GERALDES, et al., 2009).

A água originada pelo processo de cozedura das pranchas de cortiça apresenta uma composição complexa (Machado, 2005). O seu encaminhamento para o meio receptor sem tratamento prévio é problemático devido à grande variedade de compostos orgânicos e fenólicos dissolvidos, cor característica (castanho escuro), baixo pH, elevada toxicidade (dos compostos fenólicos), baixa biodegradabilidade e elevada temperatura (Machado, 2005; Bernardo et al., 2011). Usualmente os efluentes gerados por este tipo de indústria apresentam também valores elevados de Sólidos Suspensos Totais (SST), Carência Bioquímica de Oxigénio (CBO) e Carência Química de Oxigénio (CQO), bem como cheiro e cor intensos (MINHALMA e PINHO, 2001a; GUEDES et al., 2003; PERES et al., 2004; SILVA et al., 2004; MACHADO, 2005).

Como foi referido anteriormente, as águas de cozedura de cortiça são misturas complexas de extractos vegetais, que apresentam concentrações elevadas de compostos fenólicos tais como ácidos fenólicos, taninos, 2,4,6-tricloroanisol (TCA), pentaclorofenol, ácido benzóico e ácidos

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

cinâmicos (BENÍTEZ et al., 2008). Segundo Minhalma e Pinho (2001a), os ácidos fenólicos que existem em maior quantidade na água de cozedura de cortiça são os ácidos gálico, protocatéuico, vanílico, siríngico, ferúlico e elágico.

### 2.5.4. Valorização de efluentes da indústria corticeira

A indústria corticeira encontra-se fortemente implementada em Portugal, apresentando um elevado volume de produção. De cada lote de pranchas de cortiça que são cozidas, resultam elevadas quantidades de água, que têm que ser tratadas antes de serem encaminhadas para os cursos de água e que representam um elevado custo para esta indústria.

A presença de compostos fenólicos nestas águas dificulta o seu tratamento biológico e químico, visto apresentarem moléculas de elevada complexidade difíceis de degradar (*e.g.* ácido tânico), baixo pH e compostos com toxicidade relativamente aos microrganismos utilizados no tratamento biológico, limitando a sua biodegradabilidade (MINHALMA e PINHO, 2001a; MINHALMA e PINHO, 2001b; MENDONÇA et al., 2004; ACERO et al., 2005; DIAS-MACHADO et al., 2006; TEIXEIRA et al., 2009).

Estudos portugueses e espanhóis efectuados na última década nesta área focam-se, essencialmente, no cumprimento da legislação em vigor. As suas propostas assentam no tratamento das águas de processo recorrendo a tratamentos químicos (*e.g.* oxidação química, processos fotoquímicos e precipitação química) e biológicos (*e.g.* sistema de lamas activadas e biodegradação pela flora natural) com capacidade de degradar a matéria orgânica existente (BENÍTEZ et al., 2003; GUEDES et al., 2003; MENDONÇA, 2004; PERES et al., 2004; SILVA et al., 2004; ACERO et al., 2005; BENÍTEZ et al., 2005; DIAS-MACHADO et al., 2006; PINTOR et al., 2011).

A Associação Portuguesa de Cortiça (APCOR) e a Associação Portuguesa dos Industriais de Curtumes (APIC), criaram um programa denominado Reciclar, que tem como principais objectivos tratar e valorizar os resíduos provenientes da indústria corticeira, de modo a garantir uma correcta gestão ambiental dos efluentes gerados, sem geração de lamas e aliciando a indústria para o cumprimento da legislação ambiental em vigor (Directiva do Conselho 91/271/CEE, 1991), e transformando os resíduos num produto subsidiário, com vista à sua aplicação por outras indústrias.

O reaproveitamento do conteúdo fenólico presente nas águas de cozedura das pranchas de cortiça permite à indústria corticeira minimizar os custos do tratamento de efluentes, obter um produto com valor comercial representando uma fonte de receita e melhorar a eficácia do tratamento biológico.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Teixeira, et al. (2009), têm desenvolvido trabalho no sentido da extracção de compostos fenólicos das águas de cozedura através da aplicação de membranas específicas levando à possível reutilização dos efluentes.

O objectivo é obter um concentrado do conteúdo fenólico destas águas, através de técnicas de separação por membranas (e.g. nanofiltração ou ultrafiltração), que será modificado recorrendo a técnicas químicas e biológicas para que possa ser aplicado na indústria de curtumes, substituindo, assim, os taninos comerciais adquiridos por importação (APCOR, <http://www.apcor.pt/>; BENÍTEZ et al., 2008; TEIXEIRA et al., 2009).

Os processos de membrana têm provado ser extremamente eficientes quando aplicados ao tratamento de águas residuais de cortiça, não só porque eles reduzem selectivamente o teor de poluentes, o que permite a utilização de um processo biológico para o tratamento da corrente de permeado, ou, eventualmente, a sua reutilização, mas também porque eles oferecem a oportunidade de recuperar alguns compostos do fluxo rejeitado, que poderiam ser aplicados noutras indústrias (GERALDES et al, 2009; TEIXEIRA et al, 2009).

No entanto, as águas residuais de cortiça são compostas por matéria orgânica de diferentes pesos moleculares e nenhum estudo relata nenhuma informação sobre a caracterização das frações de águas residuais da cortiça, em termos de composição e biodegradabilidade, o que deve ser uma questão crucial para estabelecer as condições mais adequadas para atingir o objectivo de obter um efluente mais facilmente biodegradável, ou reutilizável, no processo, em simultâneo com a recuperação de alguns dos seus componentes (GERALDES et al, 2009).

### 2.5.5. Processos alternativos

Apesar da importância das matérias-primas agro-florestais na economia Portuguesa, o aproveitamento dos seus resíduos não tem merecido grande atenção. Praticamente não têm outra utilização que não seja a de combustíveis, a despeito de poderem constituir uma interessante fonte de produtos químicos.

O crescente interesse na exploração de recursos renováveis, maioritariamente nas áreas de energia e materiais, é um dos principais resultados científicos e tecnológicos da última década, e esta tendência parece ter seguimento no futuro próximo. As forças que sustentam isto são questões estratégicas e económicas, e que nos dias de hoje não podem ser ignorados os problemas relacionados com a situação dos produtos secundários das indústrias agrícolas e florestais, que produzem grande quantidade de resíduos.

As operações de preparação e processamento das pranchas de cortiça dão origem a uma grande quantidade de aparas e refugo. Por exemplo, na manufactura das rolhas, apenas 25% da massa de cortiça é aproveitada para este fim. Para os actuais desperdícios, como pó, aparas de cortiça, águas de cozedura, depósitos nas condutas de saída das autoclaves no fabrico de aglomerado expandido, dever-se-á encontrar uma utilização, a qual, devido ao

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

modo de apresentação dos desperdícios, parece ter de ser principalmente de natureza química (PEREIRA, 1979).

O aproveitamento químico da cortiça como fonte de produtos orgânicos torna-se uma possibilidade que permitirá diminuir os resíduos e assim aumentar a rentabilidade económica da indústria corticeira global.

O estudo da utilização da cortiça e desperdícios como fonte de produtos químicos necessita do conhecimento, o mais exacto possível, dos constituintes da cortiça e respectivas quantidades.

### 2.6. Compostos fenólicos

Compostos fenólicos pertencem à classe de compostos que inclui diversidade de estruturas simples e complexas, com pelo menos um anel aromático no qual, ao menos um hidrogénio é substituído por um grupo hidroxilo (Figura 15) (ESCARPA e GONZALES, 2001).

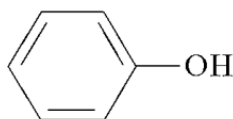


Figura 15 - Estrutura benzénica (fenólica) C6 com grupo hidroxilo (OH).

#### 2.6.1. Classificação, distribuição e propriedades dos compostos fenólicos

##### a. Classificação

Quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem no mínimo um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos. Além da função hidroxilo podem estar presentes outros grupos funcionais, como ésteres e glicosídios.

São classificados de acordo com o tipo de esqueleto principal (C6), que constituirá o anel benzénico e com a cadeia substituinte (CX) ESCARPA e GONZALES, 2001).

##### b. Distribuição

Compostos fenólicos estão amplamente distribuídos em vegetais e em microorganismos. As plantas são capazes de sintetizar uma grande diversidade de compostos com baixo peso molecular, denominados metabólitos secundários, que podem apresentar um papel essencial no metabolismo vegetal (ESCARPA e GONZALES, 2001).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Os compostos fenólicos presentes nas plantas são sintetizados tipicamente durante o seu desenvolvimento, apresentam a função de protegê-las de infecções e agressões de microrganismos e servem como filtros de radiação UV, além disso, contribuem com o aroma, adstringência, cor e estabilidade oxidativa das mesmas (NACZK e SHAHIDI, 2004).

A sua estrutura base apresenta um anel aromático ao qual pode estar ligado um grupo hidroxilo (fenóis) ou vários (polifenóis), o que origina uma grande diversidade de compostos.

Cerca de 8.000 diferentes compostos fenólicos são encontrados na natureza, que englobam desde moléculas simples até moléculas com alto grau de polimerização, além disso, estes compostos, podem ser encontrados nos vegetais na forma livre ou ligados a moléculas de açúcares.

As principais formas de classificação os dividem segundo suas cadeias carbônicas, magnitude de suas massas moleculares e distribuição na natureza. De acordo com a cadeia carbônica, os polifenóis são distribuídos em 12 classes que engloba desde moléculas com apenas um anel aromático até moléculas poliméricas com diversas unidades de compostos fenólicos menores.

Os compostos fenólicos podem ser divididos em várias classes, destacando-se os ácidos fenólicos, flavonóides e taninos, como antioxidantes fenólicos mais disseminados na natureza (Angelo e Jorge, 2007).

### c. Propriedades

Contribuem no sabor, odor e coloração de diversos vegetais sendo muito usados, os compostos fenólicos, como flavorizantes (aldeído cinâmico e vanilina) e corantes na indústria alimentícia, na cosmeceutica.

Enfatizam-se, também a atividade antioxidante dos derivados fenólicos (*Ilex paraguariensis* - erva mate, *Camellia sinensis* - chá, dentre outros) e a atividade antibacteriana, antiviral e antifúngica dos ésteres do ácido caféico (*Echinaceae purpurea*, *Plantago major*) (ANGELO e JORGE, 2007).

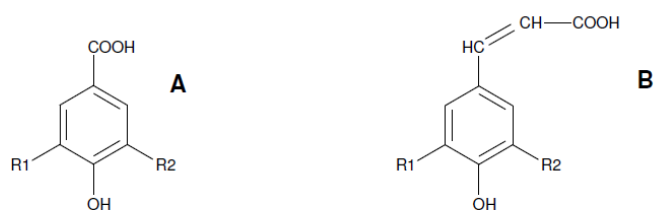
## 2.6.2. Caracterização de alguns compostos fenólicos extraídos da cortiça

### 2.6.2.1. Ácidos fenólicos

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em ácidos benzóicos e em ácidos cinâmicos de acordo com o número de átomos de carbono (Figura 16) (CHATONNET et al., 1990; SINGLETON, 1995).



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC



Ácidos benzóicos (A)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Gálhico	OH	OH
Vanílico	OCH <sub>3</sub>	H
Siríngico	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Ácidos cinâmicos (B)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<i>p</i> -Cumárico	H	H
Ferúlico	OCH <sub>3</sub>	H
Cafeico	OH	H

Figura 16 - Estrutura dos ácidos fenólicos (A- ácidos benzóicos; B-ácidos cinâmicos) (CHATONNET et al., 1990; SINGLETON, 1995).

### 2.6.2.2. Aldeídos fenólicos

Um aldeído é um composto químico orgânico que se caracteriza pela presença, na sua estrutura, do grupamento H–C=O, ligado a um radical alifático ou aromático.

Os aldeídos fenólicos podem ser classificados segundo dois critérios: pelo número de átomos de carbono em benzóicos (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) e em cinâmicos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), ou pelo número de grupos metoxilo em guaiacilo (monometoxilados) e em siríngilo (bimetoxilados) (Figura 17). Podem encontrar-se na forma livre e ligados aos constituintes da parede celular, designadamente à lenhina (CHATONNET et al., 1992).



Aldeídos benzóicos (A)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Vanilina	OCH <sub>3</sub>	H
Siringaldeído	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>
Aldeídos cinâmicos (B)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Coniferaldeído	OCH <sub>3</sub>	H
Sinapaldeído	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>

Figura 17- Estrutura dos aldeídos fenólicos (A- aldeídos benzóicos; B - aldeídos cinâmicos) (CHATONNET et al., 1992).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

O benzaldeído ou aldeído benzóico (fórmula  $C_6H_5-CHO$ ) é um composto orgânico formado por um anel de benzeno com um grupo aldeído.

- A vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído) é um aldeído benzóico substituído com um grupo metoxilo e um grupo hidroxilo na posição 3 e 4, respectivamente. A sua estrutura química pode ser visualizada na figura seguinte.

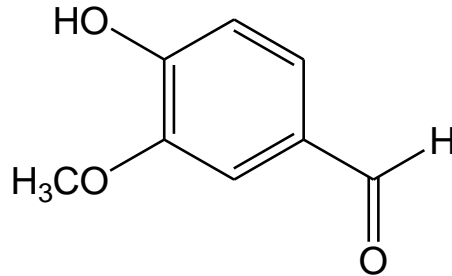


Figura 18 - Estrutura química da vanilina.

- O 3,4-dihidroxibenzaldeído é um aldeído benzóico substituído com dois grupos hidroxila na posição 3 e 4. A sua estrutura química pode ser visualizada na figura seguinte.

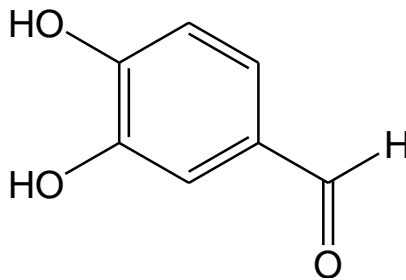
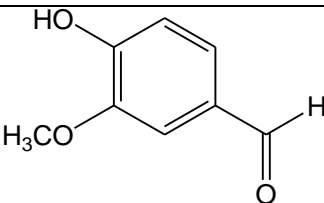
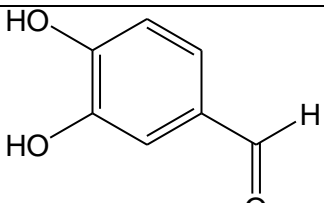




Figura 19 - Estrutura química do 3,4-dihidroxibenzaldeído.

As características químicas dos compostos utilizados neste trabalho, a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído, são apresentadas na tabela seguinte.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 7 - Características química da vanilina e do 3,4-dihidroxibenzaldeído.

Características	Composto	
	Vanilina	3,4-dihidroxibenzaldeído
Marca	Merck	Aldrich
Formula Química	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Estrutura Química		
Sinónimo	4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído	Protocatechualdehyde
Peso Molecular	152,14 g/mol	138,12 g/mol
Grau de pureza	>99%	≥97%
Aspecto	-	Pó de cor bege
Identificação dos perigos	Símbolo de perigosidade	Símbolo de perigosidade
	 irritante	 irritante
	Frase(s) - R R 36: irritante para os olhos	Frase(s) - R R36/37/38 : Irritante para os olhos, vias respiratórias e pele.
	Frase(s) - S	Frase(s) - S S26: Em caso de contacto com os olhos, lavar imediata e abundantemente com água e consultar um especialista.

A Vanilina (4-hidroxi-3-metoxibenzaldeído, figura 22) é o principal componente da baunilha natural, que é um dos materiais mais utilizados aromatizantes e importante em todo o mundo. A fonte de baunilha é o feijão, ou vagem, da orquídea tropical *Vanilla* (principalmente *Vanilla planifolia* Andrews, syn. *V. fragrans* (Salisb. Ames)).

A Vanilina de fato ocorre em pequenas quantidades noutras plantas, incluindo produtos comerciais, como o tabaco, no entanto, as vagens da orquídea *Vanilla* ainda permanecem a única fonte comercial de vanilina natural. Apesar de mais de 12000 toneladas de vanilina serem produzidas todos os anos, a menos de 1% desta é vanilina natural de baunilha, o restante é sintetizada muito mais barata por meio de processos químicos.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Ela tem uma vasta gama de aplicações na indústria alimentar, não alimentar, nas fragrâncias e como aromatizante em preparações farmacêuticas. É um dos recursos de sabor mais amplamente utilizados em produtos de confeitaria, alimentos e bebidas.

Esta também é muito útil para a síntese de vários produtos químicos farmacêuticos. Historicamente, a produção de vanilina foi a sua extracção directa a partir de grãos de baunilha. No entanto, para satisfazer os mercados que estão constantemente em ascensão, novas rotas de produtos químicos foram desenvolvidas. Um caminho possível para a produção de vanilina com base na biomassa é através de oxidação controlada de lignina.

A aplicação de vanilina pode ser datada desde o ano 1300 na Mesoamérica. Tradicionalmente, a vanilina foi utilizada como agente aromatizante, agente de prevenção, sono e afrodisíaco. Além disso, a vanilina também é um poderoso agente anti-microbiano. Como a vanilina é amplamente utilizado em alimentos que poderia ser usado como um conservante natural e, portanto, excluindo assim a necessidade de adicionar um outro conservante. A propriedade mais intensamente estudada da vanilina é a sua propriedade anti-mutagénica. Ohta et al. (1985) estudaram a primeira propriedade anti-mutagénica de vanilina e descobriram que a vanilina pode melhorar a reparação recombinatória na *Escherichia coli*. Como anti-mutagénica poderá reduzir a taxa de mutação, foi também descoberto que a vanilina pode ser capaz de prevenir e tratar o cancro, que é uma doença relacionada com mutações.

Muitas técnicas de HPLC foram desenvolvidas durante os últimos 20 anos, focando a quantificação não só de vanilina, mas de também outros produtos químicos importantes presentes no extracto de baunilha, tais como álcool p-hidroxibenzil, ácido p-hidroxibenzóico, p-hidroxibenzaldeído, vanilina de etilo e outros menos importante.

Da literatura revista, apenas Ehlers (1999) desenvolveu uma técnica rápida para a quantificação da vanilina de 6,7 minutos de tempo de retenção, mas apenas porque outros compostos de extracto de baunilha foram incluídos na quantificação. O comprimento de onda de determinação foi considerado 278 nm, o que não é o comprimento de onda máximo de vanilina, e pode-se esperar que este processo de quantificação não é muito sensível e preciso.

Recentemente, Scharrer e Mosandi (2001) desenvolveram uma técnica de HPLC para a vanilina e outros componentes importantes presentes no extracto de baunilha, mas referente a vanilina o seu tempo de retenção foi de 26 minutos e esta componente foi quantificada a 275 nm.

Relativamente ao 3,4-di-hidroxibenzaldeído, os efeitos protetores da inibição dos danos do DNA e da apoptose induzida por ROS (espécies reactivas de oxigénio) ainda não foram relatados. Portanto, é importante para entender o mecanismo da inibição do 3,4-di-hidroxibenzaldeído purificada a partir da cevada em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induzido por stress oxidativo, causando danos de DNA e apoptose, uma vez que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é o principal mediador do stress oxidativo e um agente mutagénico potente (ANDRÉ et al., 2007). Além disso, a avaliação dos

seus efeitos inibitórios sobre os danos oxidativos do DNA e apoptose é necessário para a utilização medicinal como agente quimiopreventivo do cancro.

### 2.7. Validação de métodos analíticos

Para garantir que um novo método analítico gere informações confiáveis e interpretáveis sobre a amostra, ele deve ser submetido a uma avaliação denominada de validação (RIBANI, 2004). A validação deve garantir, por meio de estudos experimentais, que o método atenda às exigências das aplicações analíticas, assegurando a confiabilidade dos resultados (INMETRO, 2003).

A validação de um método é um processo contínuo, que começa no planeamento da estratégia analítica e continua ao longo de todo seu desenvolvimento e implantação. Um processo de validação bem definido e documentado oferece às agências reguladoras evidências objetivas de que os métodos e os sistemas são adequados para o uso desejado. A documentação da validação deve conter: a especificação dos requisitos, as características de desempenho obtidas, os critérios de aceitação dos valores obtidos das características de desempenho em comparação com os requisitos e a afirmação da validade dos resultados quanto ao atendimento ao uso pretendido (INMETRO, 2003).

A validação de um método que utiliza técnicas cromatográficas pode ser considerada como a soma de diferentes etapas de validação a serem incluídas no processo analítico. Em geral, a validação do método envolve a execução e a interpretação de uma série de experimentos planeados a fim de avaliar as características do método. Desta forma, todas as variáveis de um método devem ser consideradas, tais como: procedimento de amostragem, preparação da amostra, separação cromatográfica, detecção e avaliação dos dados (LANÇAS, 2004).

Os parâmetros para validação de métodos têm sido definidos em diferentes grupos de trabalho de organizações nacionais ou internacionais. Infelizmente, algumas definições são diferentes entre as diversas organizações. O que se pode observar é que não há um procedimento normatizado que estabeleça como executar a validação de métodos instrumentais de separação (RIBANI *et al.*, 2004; LANÇAS, 2004).

Os estudos de validação envolvem a avaliação de características de desempenho do método em condições experimentais definidas de forma a garantir a sua aplicabilidade ao nível do intervalo de concentrações e tipos de amostras. Os parâmetros analíticos normalmente utilizados para validação são: selectividade, linearidade e intervalo dinâmico, sensibilidade, limite de detecção, limite de quantificação, precisão, exatidão e robustez (RIBANI *et al.*, 2004).

### 2.7.1. Selectividade

A selectividade avalia a capacidade de um método analítico medir a substância a analisar na presença de componentes como impurezas, produtos de degradação, ou outros compostos que possam estar presentes na matriz da amostra. Uma forma de avaliar a selectividade num método analítico de HPLC é comparar uma amostra com matriz isenta da substância a analisar com uma amostra onde a substância a analisar foi adicionada (adição de padrão). Com este estudo pretende-se verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção da substância de interesse, que deverá estar bem separada dos restantes compostos da amostra (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### 2.7.2. Linearidade e intervalo dinâmico

A linearidade de um procedimento analítico de HPLC corresponde à capacidade de fornecer resultados instrumentais, proporcionais à concentração da substância a analisar na amostra através de uma relação linear. A linearidade é melhor avaliada por inspecção visual de um gráfico onde se representam os sinais de resposta (área dos picos) em função da concentração da substância a analisar em soluções padrão. Os parâmetros da regressão obtidos pelo método dos mínimos quadrados (o declive, a ordenada na origem e o coeficiente de correlação) traduzem a relação linear dos dados experimentais, permitindo extrair informação sobre o método analítico. O coeficiente de correlação dá informação sobre a qualidade da curva obtida, indicando menor dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor incerteza dos parâmetros da regressão linear, quanto mais próximo o valor for de 1,0. Um coeficiente de correlação maior que 0,999 é considerado um ajuste ideal dos dados na regressão linear. A sensibilidade, que é um parâmetro que traduz a variação da resposta em função da concentração da substância a analisar, pode ser expressa pela inclinação da curva de regressão linear de calibração (declive), que depende da natureza da substância a analisar e da técnica de detecção utilizada. Do estudo da linearidade define-se o intervalo dinâmico do método, que corresponde ao intervalo de concentrações das soluções padrão de calibração onde o sinal mostra dependência linear, estando também dependente dos limites de detecção e quantificação, bem como, dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras. O limite superior do intervalo dinâmico, em geral, é o limite da linearidade que depende do sistema de resposta do equipamento de medição mas, que pode ser também definido em função dos níveis de concentração da substância a analisar nas amostras. A quantificação do composto a analisar pode ser obtida através dos seguintes métodos de calibração: i) padrões externos; ii) padrão interno; iii) sobreposição da matriz; iv) adição de padrão (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

#### i) Calibração com padrões externos.

No método de calibração com padrões externos prepara-se uma série de soluções padrão da substância a ser analisada com diferentes concentrações; os cromatogramas das soluções padrão são obtidos e as áreas dos picos são relacionadas, numa representação gráfica, com as

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

concentrações da substância e, por regressão linear, traduzidas por uma equação de recta. A área do pico da substância a ser analisada na amostra é, posteriormente, comparada com os resultados das soluções padrão de calibração para determinação da concentração. Este método é sensível a erros de preparação e de injeção das soluções (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### ii) Calibração com padrão interno.

O método de calibração com padrão interno consiste na preparação das soluções padrão da substância a analisar em diversas concentrações conhecidas, às quais se adiciona um composto denominado padrão interno de concentração constante, o qual não existe na amostra. Após análise destas soluções, constrói-se um gráfico, relacionando a razão de áreas (área da substância/ área do padrão interno) em função da concentração da substância. À amostra também se adiciona a mesma quantidade de padrão interno. Após análise da amostra diluída, através da razão de áreas obtidas no cromatograma obtém-se a concentração da substância na amostra. O padrão interno deve ser um composto similar à substância a ser quantificada, não reagir com a substância ou outra espécie da matriz, não fazer parte da amostra e, na análise por HPLC, ter um tempo de retenção que permita estar separada e com boa resolução, de todas as outras substâncias presentes na amostra (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### iii) Calibração com sobreposição de matriz.

O método de sobreposição de matriz consiste na adição do padrão da substância a analisar em diversas concentrações a uma matriz semelhante à da amostra ou mesmo em matriz da amostra isenta da substância a analisar. O gráfico de calibração relaciona as áreas dos picos obtidas com as concentrações dos padrões da substância. O método de sobreposição da matriz pode ser utilizado em simultâneo com o método de calibração de padrões externos ou de padrão interno. Este método é usado para compensar o efeito da matriz ou de possíveis interferências no método analítico mas, também de grande importância quando a matriz da amostra pode interferir no desempenho de passos experimentais, como por exemplo, pré-concentração, extracção e separação. Na análise de amostras, nas quais pode ocorrer o efeito da matriz e não se tem disponível uma matriz isenta da substância a analisar para utilizar o método de sobreposição da matriz, deve-se utilizar o método de calibração por adição de padrão (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### iv) Calibração por adição padrão.

O método de calibração por adição de padrão consiste na preparação de soluções de mistura de uma solução padrão da substância a analisar em diversas concentrações e da amostra, em quantidades constantes. Estas amostras com adição de padrão são utilizadas para a obtenção dos cromatogramas. Constrói-se uma curva analítica relacionando as áreas dos picos da substância em função das quantidades da substância adicionada à amostra (padrão). O ponto onde a recta corta o eixo das ordenadas corresponde à área do pico da substância que está a

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

ser determinada, sem qualquer adição do padrão. O método de adição padrão é trabalhoso, mas importante quando a amostra é muito complexa, quando as interações com a matriz são significativas e quando houver dificuldade de encontrar um padrão interno adequado ou uma matriz isenta da substância de interesse. Este método é usado como recurso final quando não se pode usar o método de calibração com padrões externos e padrão interno (usados quando não se suspeita que a matriz da amostra cause erros sistemáticos) e o método de calibração com sobreposição da matriz (usado para compensar o efeito da matriz). Globalmente, os métodos de quantificação devem ser seleccionados de forma a fornecer a melhor exatidão e precisão possível (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### 2.7.3. Limite de detecção (LD)

O limite de detecção é a concentração mínima da substância a analisar que pode ser detectada pelo método com precisão e exatidão adequadas e pode ser calculado baseado em parâmetros da curva analítica. A expressão seguinte permite determinar o limite de detecção:

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{s}{m}\right) \quad (7)$$

onde:  $s$  é o desvio padrão da resposta, que pode ser o desvio padrão do branco, da ordenada da origem da equação da recta ou da equação da recta da regressão linear;  $m$  é o declive ou coeficiente angular da curva analítica. Estes dados são obtidos da curva de calibração usando soluções padrão de calibração com matriz semelhante ou igual às das amostras e com concentrações da substância a analisar próximas do limite de detecção (RIBANI et al., 2004).

Aceita-se geralmente como LD a concentração que gera um sinal três vezes maior que o ruído do sistema ou que produza um sinal igual a  $3s$ , em que  $s$  é o desvio padrão do ruído medido utilizando-se o branco. É possível ainda determinar o LD pelo método visual e pelo método utilizado em parâmetros da curva analítica (LANÇAS, 2004).

### 2.7.4. Limite de quantificação (LQ)

O limite de quantificação é a menor concentração da substância a analisar que pode ser determinada com um nível aceitável de precisão e exatidão. O LQ é calculado usando os mesmos parâmetros definidos no cálculo do limite de detecção:

$$LQ = 10 \times \left(\frac{s}{m}\right) \quad (8)$$

Este limite, após ter sido determinado, deve ser testado para averiguar se a exatidão e precisão obtidas são satisfatórias (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

Observa-se também que tanto o LD e o LQ são influenciados diretamente pelas condições cromatográficas, devendo então ser asseguradas, através da conformidade do sistema, as melhores condições cromatográficas possíveis e também qualidade e tempo de uso da coluna cromatográfica (RIBANI et al., 2004; LANÇAS, 2004).



### 2.7.5. Precisão

A precisão avalia a dispersão de resultados de uma série de medições repetidas a uma mesma amostra, a amostras semelhantes ou a uma solução padrão, em condições definidas. É normalmente avaliada usando o valor do desvio padrão relativo (DPR%, também conhecido como coeficiente de variação, CV%), em circunstâncias específicas de medição, como a repetibilidade, a precisão intermédia e a reprodutibilidade.

$$DPR(\%) = \left(\frac{s}{\bar{x}}\right) \times 100 \quad (9)$$

onde,  $s$  é o desvio padrão absoluto e  $\bar{x}$  é a média aritmética das medições. Normalmente, métodos que determinam substâncias em macro quantidades requerem um DPR% de 1 a 2%. Em métodos de análise de quantidades residuais, aceitam-se DPR% até 20%, dependendo da complexidade da amostra (RIBANI et al., 2004). Os critérios experimentais usados na avaliação da precisão são a seguir referidos para: i) repetibilidade; ii) precisão intermédia; iii) reprodutibilidade (RIBANI et al., 2004).

#### i) Repetibilidade.

A repetibilidade avalia a dispersão dos resultados de medições sucessivas usando o mesmo método sob as mesmas condições de medição, ou seja, usando o mesmo procedimento, com o mesmo técnico e equipamento analítico e usando as mesmas condições experimentais do mesmo laboratório. As repetições devem ser realizadas num curto intervalo de tempo. Para o estudo da repetibilidade, o Instituto Nacional de Metrologia e Qualidade Industrial do Brasil (INMETRO) recomenda sete ou mais repetições para o cálculo da estimativa do desvio padrão, enquanto que a “International Conference on Harmonisation” (ICH) e ANVISA sugerem que a repetibilidade seja verificada a partir de um mínimo de nove determinações para três níveis de concentrações (três repetições cada) ou a partir de um mínimo de seis determinações a uma concentração próxima do valor esperado (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

#### ii) Precisão intermédia.

A precisão intermédia é reconhecida como a mais representativa da variabilidade dos resultados num laboratório. Avalia o efeito das variações dentro do laboratório associadas a medições em diferentes dias ou com diferentes analistas ou com diferentes equipamentos ou com uma combinação destes factores. Para determinar a precisão intermédia de um método, efectua-se “n” medições de uma solução amostra e padrões, de vários níveis de concentração, em vários dias (de acordo com o número de ensaios descritos na medição da repetibilidade). A precisão intermédia é também avaliada através do valor do desvio padrão relativo (DPR%) dos resultados das análises repetidas nas condições acima referidas (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

#### iii) Reprodutibilidade.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A reprodutibilidade mede a precisão entre laboratórios, como nos estudos de colaboração entre laboratórios, e deve ser considerada em situações como a padronização de procedimentos analíticos. Para validar esta característica experimental, estudos semelhantes devem ser efectuados em laboratórios diferentes usando o mesmo lote da amostra homogénea e o mesmo desenho experimental para a validação do mesmo método analítico. Este estudo corresponde ao grau de concordância entre os resultados das medições de uma mesma amostra efectuadas sob diferentes condições (por exemplo, diferentes técnicos, laboratórios, equipamentos, etc.) (RIBANI et al., 2004).

### 2.7.6. Exatidão

A exatidão averigua a proximidade entre o resultado de um ensaio e o seu valor de referência aceite como verdadeiro. A exatidão, quando aplicada a uma série de resultados de ensaio, está dependente de erros sistemáticos. A ICH recomenda avaliar a exatidão com um mínimo de nove determinações e contendo no mínimo três níveis de concentração definidos de forma a abranger um intervalo estabelecido. Os processos mais utilizados para avaliar a exatidão de um método são: i) amostras de referência; ii) comparação de métodos; iii) ensaios de recuperação; iv) adição padrão (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

i) Amostras de referência certificadas.

As amostras de referência são adquiridas com um certificado que possui o valor de concentração de uma dada substância e uma incerteza associada. Os materiais de referência certificados são fornecidos por organismos reconhecidos e confiáveis. Os valores obtidos pelo laboratório (a média e a estimativa do desvio padrão de uma série de repetições da análise à substância de interesse) à amostra padrão devem ser comparados com os valores certificados do material de referência, para verificar a exatidão do método (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

ii) Comparação de métodos.

A comparação de métodos tem como objectivo, comparar resultados obtidos utilizando o método em desenvolvimento e os resultados adquiridos através de um método de referência. O grau de proximidade entre os resultados obtidos pelos dois métodos é avaliado pela exatidão do método testado em relação ao de referência. As análises são efectuadas utilizando os dois métodos (o método em desenvolvimento e o método de referência), sobre as mesmas amostras com repetições, num intervalo de concentrações em que se pretende validar o método (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

iii) Ensaios de recuperação.

A recuperação (ou factor de recuperação) é definida como a relação da quantidade da substância a analisar que é extraída e passível de ser quantificada em função da quantidade presente ou adicionada (valor conhecido). No processo de adição, em geral, usa-se uma solução padrão da substância a analisar que é adicionada à matriz similar à amostra (branco)

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

isenta da substância ou à amostra (fortificação, incorporação, termos provenientes do inglês “spiking”). Pelo facto de outros componentes da matriz poderem interferir na separação, detecção ou na quantificação da substância, efeitos dos componentes da matriz devem ser estudados. Dois pontos a ter em consideração neste procedimento de recuperação são que a substância adicionada não está, necessariamente, na mesma forma que a presente na amostra e é importante considerar que a eficiência do método varia em função da concentração da substância. Por este motivo, a recuperação deve ser avaliada no intervalo de concentrações esperado para a substância a analisar nas amostras. Este estudo pode ser realizado a três níveis de concentração por adição da substância padrão: próximo do limite de quantificação, próximo da concentração média e próximo da concentração máxima do intervalo dinâmico usado no método analítico.

A recuperação é calculada utilizando a seguinte expressão:

$$\text{Recuperação(\%)} = \left( \frac{C_1 - C_2}{C_3} \right) \times 100 \quad (10)$$

onde:

C1 = concentração determinada na amostra adicionada,

C2 = concentração determinada na amostra não adicionada,

C3 = concentração adicionada.

Os intervalos aceitáveis de recuperação para análise de resíduos geralmente estão entre 70 e 120%, com desvio padrão relativo até 20%. Porém, dependendo da complexidade do método analítico e da matriz da amostra, este valor pode ser de 50 a 120%, com desvio padrão relativo até 15% (RIBANI et al., 2004).

iv) Adição de padrão.

Quando for difícil ou impossível preparar um branco da matriz sem a substância a analisar, deve-se usar o método de calibração por adição de padrão. A descrição deste método já foi referida no estudo da linearidade no ponto iv) Calibração por adição padrão (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

### 2.7.7. Robustez

A robustez de um método analítico é a medida da capacidade do método em se manter inalterável no seu desempenho analítico face a pequenas variações nos seus parâmetros experimentais. Ou seja, um método diz-se robusto se for praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando este está a ser executado. A robustez de um método cromatográfico é avaliada, por exemplo, pela variação de parâmetros como a concentração do solvente orgânico, pH e força iónica da fase móvel em HPLC, programação da temperatura, natureza do gás de arraste em GC, bem como o tempo de extracção, agitação, etc. As mudanças introduzidas neste estudo reflectem as possíveis alterações que podem

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

ocorrer quando um método é transferido para outros laboratórios, analistas ou equipamentos (RIBANI et al., 2004; EMER e MILLER, 2005).

## Capítulo 3 - Parte Experimental

---

## Capítulo 3 - Parte Experimental

### 3.1. Reagentes

Todos os reagentes utilizados na parte experimental foram de grau analítico e todos os solventes foram de grau HPLC.

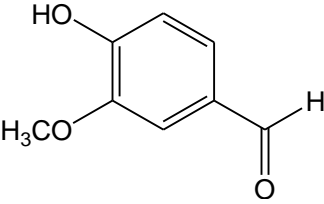
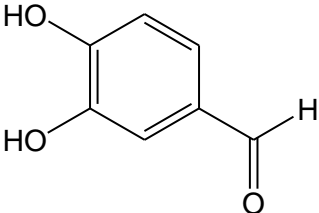
O etanol e o metanol utilizado para a preparação das soluções padrão foram de grau P.A. da marca Panreac e Aldrich, respectivamente.

Na composição da fase móvel foi utilizado metanol, grau de pureza cromatográfico (VWR), água ultrapura obtida por sistema de osmose reversa e filtrada em membranas de ultrafiltração de 0,45µm (sistema Milli-Q®), e ácido fosfórico, grau de pureza cromatográfico (ALDRICH). A fase móvel é filtrada através de uma membrana de 0,45 µm e desgaseificada por ultra-sons durante 10 minutos antes do seu uso.

### 3.2. Padrões cromatográficos

Os padrões cromatográficos seleccionados para este trabalho foram a Vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído. As características principais destes compostos estão representadas na tabela seguinte:

Tabela 8 - Características principais dos padrões cromatográficos.

<i>Características</i>	<i>Composto</i>	
	<i>Vanilina</i>	<i>3,4-dihidroxibenzaldeído</i>
Marca	Merck	Aldrich
Formula Química	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>
Estrutura Química		
Peso Molecular	152,14 g/mol	138,12 g/mol
Grau de pureza	>99%	≥97%
Aspecto	Pó de cor bege	

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

As soluções stock de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído são preparadas com uma concentração de 50 ppm, dissolvendo 5 mg de composto em 100 mL de água e metanol numa proporção 45:55 (v/v), respectivamente.

As soluções padrão de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído são preparadas por diluição adequada da solução stock, compreendendo uma gama de concentrações de 1 a 6 ppm. Posteriormente são filtradas, por um filtro de 0,45 µm, e armazenadas em frascos escuros.

### 3.3. Amostras

A amostra utilizada na determinação de compostos fenólicos por HPLC foi o concentrado obtido através de nanofiltração do efluente produzido na etapa inicial do processamento da cortiça destinada à remoção de contaminantes, designada como “cozimento”. A membrana utilizada foi a NF99 produzida pela DSS (Dinamarca), cuja selectividade pode ser caracterizada através do coeficiente de exclusão molecular entre 150-300 Da (ou seja, potencialmente todos os solutos com MM superior a este intervalo serão rejeitados numa percentagem entre 90 e 95%). O concentrado obtido corresponde a uma factor de concentração de 4,75 vezes, pois dos 38 litros de efluente processado obtiveram-se 30 l de permeado e 8 de concentrado.

### 3.4. Equipamentos

- Aparelho cromatográfico (Figura 20): Sistema LaChrom Elite<sup>®</sup> da VWR-Hitachi constituído por uma bomba de duplo pistão modelo L-213, um Detector de fotodíodos modelo L-2455, um forno de colunas modelo L-2300, um injector de loop 20 µL e Software EZChrom Elite para aquisição e processamento dos dados.

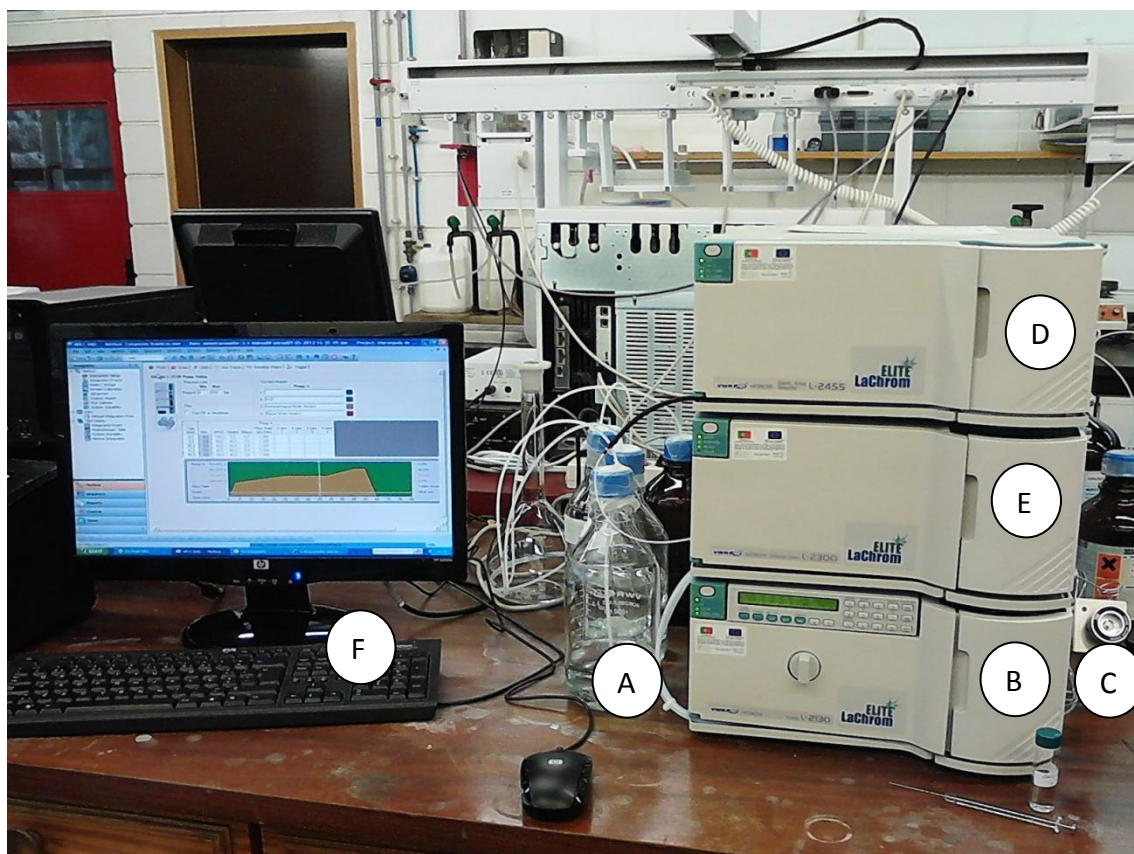


Figura 20 - Componentes de um sistema cromatográfico: (A) Fase móvel; (B) Bomba; (C) Injector; (D) Detector de fotodíodos; (E) Forno contendo a coluna cromatográfica; (F) Computador para aquisição e processamento de dados.

**Coluna (Figura 21):** coluna analítica de fase reversa LiChrospher® RP-18, 5µm (250 x 4mm);

Os LiChrospher® RP-18 são cartuchos de sílica gel em esferas com propriedades de fase inversa. Estão indicados para a separação de compostos alcalinos neutros, ácidos e fracos.

**Pré-coluna:** Purospher® STAR RP-18 endcapped

Os LiChrospher® RP-18 são cartuchos de sílica gel em esferas com propriedades de fase inversa. Estão indicados para a separação de compostos alcalinos neutros, ácidos e fracos.

**Purospher® STAR RP-18 endcapped**

As colunas HPLC Purospher® STAR RP-18 endcapped são de utilização universal. Não importa se as suas amostras são quelantes básicos, neutros, metálicos ou de outro formato. A coluna Purospher® STAR RP-18 endcapped apresenta estabilidade e permite a máxima flexibilidade no desenvolvimento de métodos. Os métodos de robustez podem ser desenvolvidos em todo o espectro de pH desde 1,5 a 10,5, possibilitando, assim, a utilização da gama completa de temperaturas e fases móveis.

- Elevada eficácia de separação;



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Robustez imbatível e excelente estabilidade do pH;
- Para resultados totalmente reprodutíveis;
- Trabalhar com amostras de todo o tipo sem registo de picos;
- Gama de aplicações extremamente vasta;
- Vida longa da coluna.



Figura 21 - Componente de um sistema cromatográfico: Coluna.

### O detector de fotodíodos ("diode array") L-2455 (Figura 22)

Detector de fotodíodos ("diode array") extremamente sensível, com elevada resolução espectral e ampla gama de comprimentos de onda.

Princípio de funcionamento: fotómetro de feixe único com monocromador gradeado e detectores de fotodíodos ("diode array") com 1024 díodos.

- Fontes de luz: lâmpada de deutério e tungsténio, bem como lâmpada de mercúrio integrada para calibração dos comprimentos de onda;
- Comprimento de onda: 190 a 900 nm;
- Controlo e processamento de dados 3-D através do EZChrom Elite.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC



Figura 22 - Componente de um sistema cromatográfico: Detector de fotodíodos.

### Forno de colunas L-2300 (Figura 23):

Forno de colunas de elevado desempenho com funções de aquecimento e arrefecimento, excelente estabilidade térmica e rápida regulação da temperatura. Princípio de funcionamento: aquecimento Peltier com convecção mecânica.

- Gama de temperaturas: temperatura ambiente -15 a +65 °C;
- Capacidade: 3 colunas (máx. 250-10 mm);
- Zona de pré-aquecimento do eluente;
- Controlo através do EZChrom Elite.



Figura 23 - Componente de um sistema cromatográfico: Forno de colunas.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A bomba L-2130 (Figura 24):

Bomba de duplo pistão, controlada por microprocessador e configurada de série com elevada constância de fluxo e controlo integrado da fiabilidade. Especialmente indicada para aplicações semimicro (2 mm d.i.) e para aplicações que vão desde as colunas de diâmetro normal até à cromatografia com fluxos elevados.

- Fluxo: 0,001-10 ml/min;
- Pressão máxima: 400 bar (5 ml/min), 200 bar (5-10 ml/min);
- Controlo através do EZChrom Elite, de outros sistemas de dados de cromatografia ou do display opcional;
- Possibilidade de trabalhar em gradiente com a aquisição dos acessórios de gradiente quaternário.



Figura 24 - Componente de um sistema cromatográfico: Bomba.

- Sistema SPE da SUPELCO: Sistema constituído por um distribuidor de vácuo de 12 portas Visiprep™ (Figura 25), uma bomba de vácuo KNF Laboport™ (Figura 26), uma fonte de vácuo (Figura 27) e tubos SPE de 3 mL com enchimento de DPA-6S Discovery® (Figura 28).

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC



Figura 25- Distribuidor de vácuo, modelo de 12 portas.



Figura 26 - Bomba de vácuo.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC



Figura 27 - Fonte de vácuo - frasco de polipropileno, uma rolha de borracha com um buraco, e duas mangueiras de vácuo de borracha.



Figura 28 - Tubo SPE de 3 mL com enchimento DPA-6S.

- Banho de Ultra-sons, FUNGILAB;
- Balança analítica, Delta Range® modelo METTLER AE 260;
- pHmetro, Metrohm modelo 827 pH lab;
- Evaporador rotativo, BÜCHI modelo rotavapor R-114 e waterbath B-480.

### 3.5. Material

- Balões volumétricos de 10mL, 100mL e 1000mL;
- Proveta de 1000mL para a preparação da fase móvel;
- Micropipetas de 20, 1000 e 5000  $\mu$ L, Eppendorf Research®;
- Seringa MicroLiter® # 710 100  $\mu$ L, HAMILTON;
- Seringa 5 mL, HSW Soft-Ject®;
- Filtros de seringa 25 mm - membrana de polipropileno 0,45 $\mu$ m, VWR®;
- Frascos de vidro âmbar de 15 mL, SUPELCO.

### 3.6. Método

#### ✓ Condições cromatográficas

Utilizou-se a metodologia de análise de HPLC pelo método de eluição por gradiente com coluna de fase reversa C<sub>18</sub> 5 $\mu$ m (250 x 4mm) à temperatura de 25°C, com um fluxo de eluição de 1mL min<sup>-1</sup> e numa faixa de comprimento de onda de 200 a 400nm. O início da validação analítica ocorreu com a injeção de 20  $\mu$ L dos padrões com uma concentração de 30 ppm (diluído em água - etanol, 45:55 (v/v)), a fim de definir o comprimento de onda de absorção máximo e o tempo de retenção para cada composto. De seguida, foi efectuada a injeção de 20  $\mu$ L de uma mistura dos dois padrões, com uma concentração de 50ppm de cada composto, de modo a verificar a separação destes.

Após o conhecimento da intensidade de resposta para cada composto e o aspecto do seu pico, iniciou-se o ajuste no gradiente da fase móvel, para que fossem obtidas as melhores condições do fluxo de solvente, temperatura do forno, tempo de retenção, resolução dos picos e duração da corrida cromatográfica.

A separação cromatográfica utilizou como fases móveis as misturas A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)) a uma temperatura de 25°C, usando o seguinte programa de gradiente: gradiente linear de 0% a 40% de B em 3 minutos, gradiente linear de 40% a 60% de B em 22 minutos, 60% de B isocrático em 18 minutos, gradiente linear de 60% a 80% de B em 12 minutos e por fim 80% de B isocrático em 5 minutos, este pode se facilmente visualizado na tabela 9. A coluna no fim foi equilibrada durante 10 minutos com a fase móvel inicial (A) ficando preparada para a próxima injeção.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 9 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Percentagem de solvente (%)</i>	
	<i>Solvente A</i>	<i>Solvente B</i>
0	100	0
3	60	40
25	40	60
43	40	60
55	20	80
60	20	80

### ✓ **Extracção em Fase sólida - Amostra**

O condicionamento dos cartuchos de SPE de fase reversa C<sub>18</sub> foi realizado com 5 mL de metanol. Equilibra-se o cartucho pela passagem de 10 mL de água Milli-Q. Ajusta-se o pH da amostra em 2 e força-se a amostra a percolar através do cartucho (12mL), com auxílio de uma bomba de vácuo. A extracção dos compostos fenólicos foi realizada pela passagem de 12 mL de acetonitrilo. Com os extractos recolhidos, foram evaporados à secura utilizando o evaporador rotativo, com pressão reduzida e uma temperatura que não excedeu os 35°C. Posteriormente ressuspendeu-se o resíduo com volume total de 0,5 mL de metanol e 0,5 mL de água Milli-Q e injectados 20 µL, em triplicado, no sistema de HPLC.

Os espectros dos padrões são utilizados para para confirmar a identidade dos analitos na amostra, comparando-se assim o espectro obtido com os espectros dos padrões.

## **3.7. Validação do método**

### **3.7.1. Selectividade**

A selectividade avaliou-se comparando as análises das injecções da fase móvel da HPLC e das soluções padrão de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído para comprovar a inexistência de interferentes. Com este estudo pretende-se verificar se nenhum interferente tem eluição no tempo de retenção da substância de interesse, que deverá estar bem separada dos restantes compostos da amostra.

A manutenção da linha base no tempo de retenção dos compostos é uma comprovação que não há interferentes.

### 3.7.2. Linearidade

A determinação da linearidade foi efetuada através da construção da curva de calibração com soluções padrão de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído de diversas concentrações: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ppm para a vanilina e 1, 2, 3, 4 e 5 ppm para o 3,4-dihidroxibenzaldeído. As soluções foram obtidas a partir da retirada de alíquotas de amostra da solução stock (50 ppm) dos compostos e diluídas com água e metanol numa proporção 45:55 (v/v), respectivamente, de modo a atingir as concentrações desejadas.

Cada solução foi aplicada no sistema cromatográfico em quadruplicado e as curvas de calibração foram construídas a partir das médias das áreas absolutas dos picos das quatro curvas que foram preparadas em quatro dias diferentes versus concentração.

A linearidade do método proposto foi avaliada usando o coeficiente de linearidade ( $R^2$ ) da curva de calibração.

### 3.7.3. Precisão

A precisão foi avaliada pela dispersão de resultados entre ensaios repetidos de uma solução amostra em 6 réplicas no mesmo dia (intra-ensaio) e entre as 3 réplicas de soluções amostras preparadas em 3 dias alternados (inter-ensaio).

#### Precisão intra-dia

Preparou-se seis soluções padrão de vanilina e outras seis soluções padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído, com uma concentração de 3 ppm.

Para cada uma das seis amostras, foi calculada a concentração experimental, calculando a média do dia e o desvio padrão obtêm-se um coeficiente de variação percentual.

#### Precisão inter-dia

Foram preparadas três soluções padrão de vanilina e outras três soluções padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído por dia, durante três dias, e o resultado das três amostras diárias são comparadas com a média do dia.

### 3.7.4. Exatidão

A avaliação da exatidão do método proposto foi baseada em teste de recuperação realizado com na amostra. O teste de recuperação consistiu na adição de quantidades conhecidas de solução padrão em alíquotas de amostras conforme mostra a tabela 10 e 11, seguida da análise em triplicado pelo método proposto.



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 10 - Recuperação da solução padrão de vanilina adicionada à amostra.

	Concentração (ppm)			Recuperação (%)
	Amostra	Adicionado	Total	
Solução 1	2,51	1	3,51	Encontrado (média n=3)
Solução 2	2,51	2	4,51	
Solução 3	2,51	3	5,51	

Tabela 11 - Recuperação da solução padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído adicionada à amostra.

	Concentração (ppm)			Recuperação (%)
	Amostra	Adicionado	Total	
Solução 1	1,93	1	2,93	Encontrado (média n=3)
Solução 2	1,93	2	3,93	
Solução 3	1,93	3	4,93	

É feita a análise comparativa do percentual obtido das médias (n=3) das três amostras experimentais com o da amostra padrão teórica. O referido parâmetro foi determinado pela média obtidas nas três concentrações correlacionadas a 100%, obtendo um coeficiente de variação também calculado.

O percentual de recuperação (%R) foi calculado, conforme a equação 10.

$$\%R = \frac{(C_a - C_{na})}{C_p} \times 100 \quad (10)$$

Onde:

$C_a$  = Concentração de composto encontrado na amostra adicionada de padrão;

$C_{na}$  = Concentração de composto encontrado na amostra não adicionada de padrão;

$C_p$  = Concentração de padrão.

### 3.7.5. Robustez

A robustez foi avaliada por alteração do caudal para 0,8 e 1,2 mL min<sup>-1</sup>, modificação da temperatura da coluna para 30 e 35°C, foram também através de modificações na composição da fase móvel inicial A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)) com programa de gradiente. Relativamente à modificação na composição da fase móvel, foi testada a seguinte:

A: água - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)) e B: ACN - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)), com o programa de gradiente indicado na tabela seguinte.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 12 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído, na avaliação do parâmetro de robustez.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Solvente A (%)</i>	<i>Solvente B (%)</i>
0	96	4
55	84	16
70	82	18
90	80	20
120	80	20

Todos os resultados obtidos a partir destas alterações nas condições cromatográficas foram comparados com resultados de análises obtidos em condições normais.

### 3.7.6. Determinação do limite de detecção (LD) e limite de quantificação (LQ)

O Limite de detecção e o limite de quantificação foram calculados usando-se as equações (7) e (8) respectivamente:

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{s}{m}\right) \quad (7)$$

$$LQ = 10 \times \left(\frac{s}{m}\right) \quad (8)$$

Onde  $s$  é o desvio padrão da curva e  $m$  é o coeficiente angular da curva analítica.

## **Capítulo 4 - Análise de Resultados**

---

## Capítulo 4 - Análise de Resultados

### 4.1. Determinação do comprimento de onda de máxima absorção de cada composto

Inicialmente pesquisas bibliográficas foram realizadas para a obtenção de informações sobre métodos já desenvolvidos. Trabalhos anteriores relataram a utilização de comprimentos de onda de 280 nm, que poderia ser utilizado como parâmetro inicial para o desenvolvimento do método cromatográfico.

Na figura 33 são apresentados os espectros de absorção na região do UV e o comprimento de onda de absorção máximo, respectivamente, obtidos na faixa de 200 a 400 nm para os compostos estudados (vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído), utilizando para tal fim um detector por arranjo de diodos. Confirmando-se assim o comprimento de onda seleccionado para o desenvolvimento do estudo.

Os espectros de absorção obtidos no HPLC-DAD para soluções padrão individuais dos compostos (vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído) na concentração de 30 ppm foram utilizados para se obter o comprimento de onda máximo de cada composto e também para confirmar a identidade dos analitos na amostra, comparando-se assim o espectro obtido com os espectros dos padrões.

Com base nos espectros, foram escolhidos os comprimentos de onda máximo para cada composto, os quais foram monitorizados em casa análise. A melhor absorção para ambos os compostos foi detectada em 280 nm, como mostra na figura 29.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

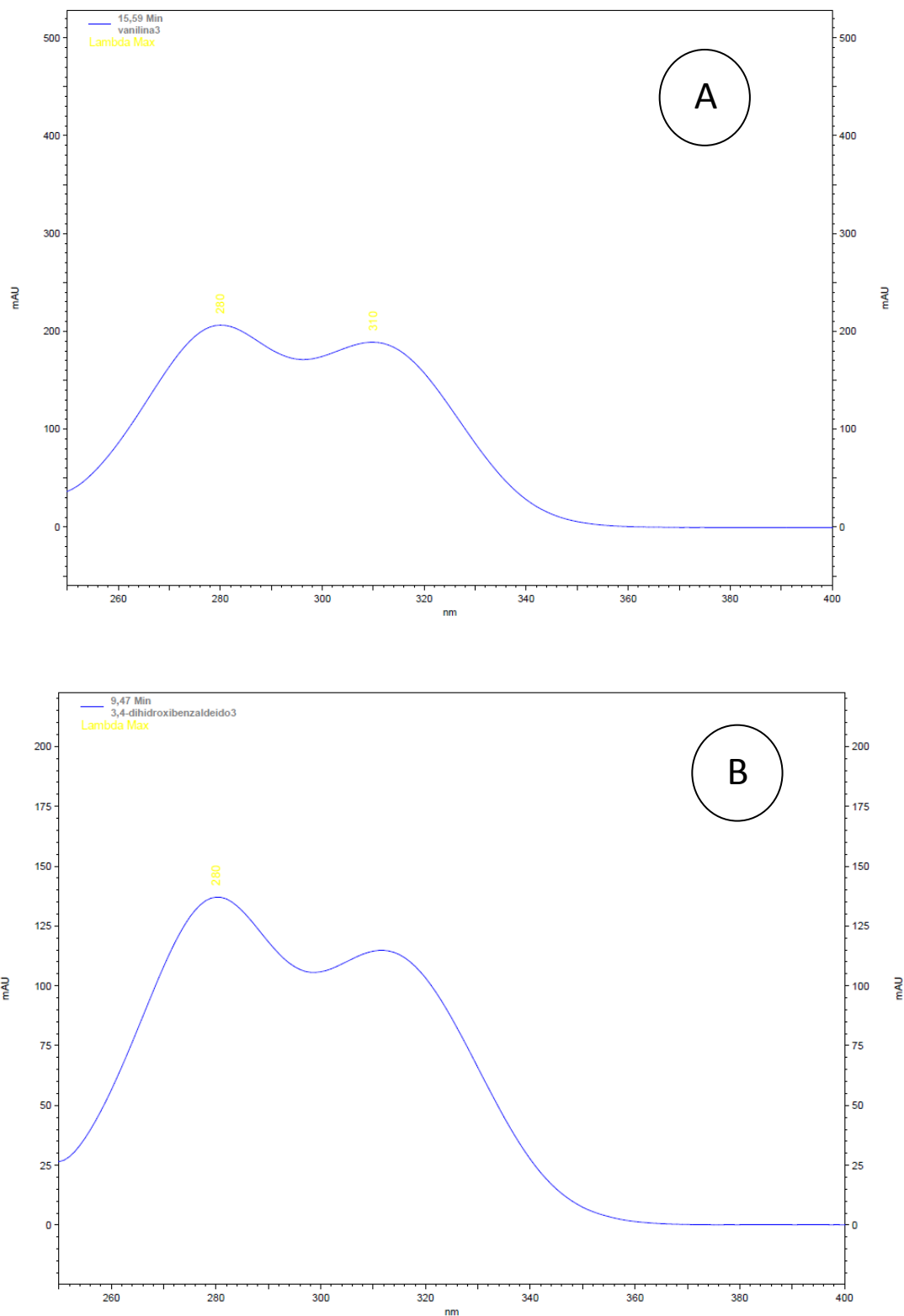


Figura 29 - Espectros de absorção, de 200 a 400 nm, obtidos por HPLC-DAD para os padrões: (A) Vanilina e (B) 3,4-dihidroxibenzaldeído, com uma concentração de 30 ppm.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Durante o desenvolvimento do método de quantificação por HPLC, várias condições foram testadas até ser determinada uma que pudesse quantificar a vanilina e o 3,4-dihidroxibenzaldeído e amostras em condições vantajosas, com precisão e exatidão.

Parâmetros como composição da fase móvel, caudal da fase móvel e concentração das soluções padrão foram analisados através de testes com diversas condições de análise.

### 4.2. Escolha da fase móvel, caudal e temperatura do forno

Várias fases móveis foram testadas em diferentes proporções tais como:

1. A: água - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)) e B: ACN - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)), com o programa de gradiente indicado na tabela seguinte.

Tabela 13 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído, na avaliação do parâmetro de robustez.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Percentagem de solvente (%)</i>	
	<i>Solvente A</i>	<i>Solvente B</i>
0	96	4
55	84	16
70	82	18
90	80	20
120	80	20

2. A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)), com o programa de gradiente indicado na tabela seguinte.

Tabela 14 - Gradiente da fase móvel utilizado no sistema cromatográfico para a determinação de Vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído.

<i>Tempo (min)</i>	<i>Percentagem de solvente (%)</i>	
	<i>Solvente A</i>	<i>Solvente B</i>
0	100	0
3	60	40
25	40	60
43	40	60
55	20	80
60	20	80

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Fez-se também testes de variação da temperatura da coluna (25 a 35 °C) e caudal (0,8 a 1,2 ml min<sup>-1</sup>).

Após os testes experimentais, entre as composições apresentadas, optou-se por utilizar A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)), como fase móvel, o que proporcionou boa resolução dos picos, melhor separação dos analitos, menos interferências e rapidez na análise (tempo de corrida igual a 17 minutos), com tempo de retenção da vanilina de 15,59 minutos e com tempo de retenção do 3,4-dihidroxibenzaldeído de 9,47 minutos. Dos cromatogramas analisados, a aplicação da temperatura do forno a 25°C é a melhor opção para a análise, pois verifica-se melhor resolução dos picos.

Os fluxos muito baixos (0,6 mL min<sup>-1</sup>), o tempo de análise torna-se excessivo. Com maiores valores de fluxo (1,2 mL min<sup>-1</sup>) a pressão do sistema torna-se grande e os compostos começam a eluir rapidamente, coelindo com as interferências iniciais. Então, conclui-se que o melhor fluxo a ser utilizado é de 1 mL min<sup>-1</sup> pois permite melhores separações dos compostos a pressão e tempo de análise mais baixos.

As melhores condições cromatográficas obtidas para a separação e detecção dos compostos estudados estão demonstrados na tabela 15.

Tabela 15 - Condições cromatográficas utilizadas para a quantificação dos compostos por HPLC-DAD.

Vanilina	Coluna	Merck C18 (250 x 4mm, 5µm) acoplada a uma coluna de guarda Merck (4 x 4mm, 5µm)
	Tipo de eluição	Gradiente
	Fase móvel	(A) ácido fosfórico 0,01M; (B) água-metanol-ácido fosfórico (70:28:2)
	Fluxo da fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup>
	Detecção	280 nm
	Volume de injeção	20µL
	Tempo da corrida	17 minutos
	Temperatura do forno	25°C
3,4-dihidroxibenzaldeído	Coluna	Merck C18 (250 x 4mm, 5µm) acoplada a uma coluna de guarda Merck (4 x 4mm, 5µm)
	Tipo de eluição	Gradiente
	Fase móvel	(A) ácido fosfórico 0,01M; (B) água-metanol-ácido fosfórico (70:28:2)
	Fluxo da fase móvel	1 mL min <sup>-1</sup>
	Detecção	280 nm
	Volume de injeção	20µL
	Tempo da corrida	11 minutos
	Temperatura do forno	25°C

### 4.3. Determinação do tempo de retenção de cada composto

Os picos e os respectivos compostos (vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído) foram identificados injectando, separadamente, no sistema sob as mesmas condições e observando o tempo de retenção, como é mostrado nas figuras 30 e 31 para a Vanilina, nas figuras 32 e 33 para o 3,4-dihidroxibenzaldeído e na tabela 16.

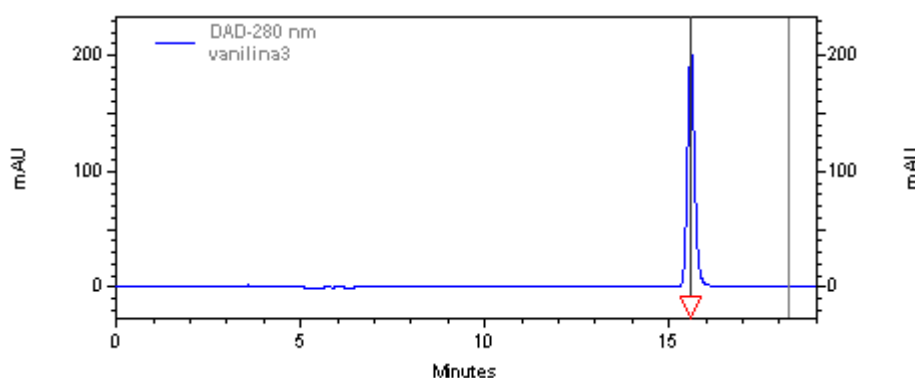


Figura 30 - Cromatograma típico de uma solução padrão de vanilina com uma concentração de 30 ppm, mostrando o tempo de retenção do composto ( $t_R = 15,59$  minutos).

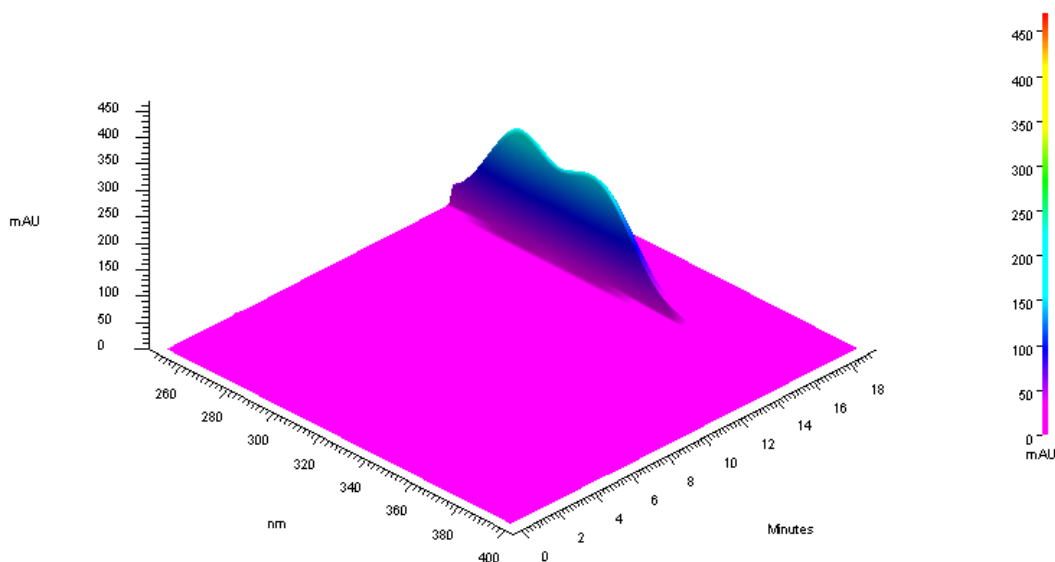


Figura 31 - Cromatograma 3D típico de uma solução padrão de vanilina com uma concentração de 30 ppm, demonstrando o tempo de retenção do composto ( $t_R = 15,59$  minutos), o comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 280$  nm) e a intensidade do pico.



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

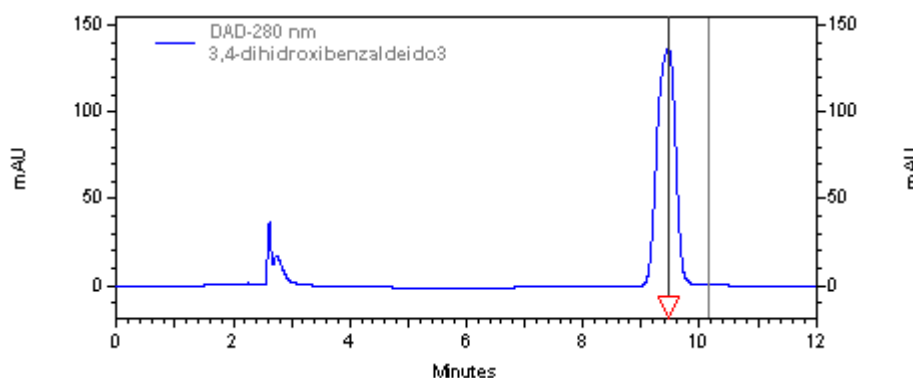


Figura 32 - Cromatograma típico de uma solução padrão de 3,4-dihidroxi benzaldeído com uma concentração de 30 ppm, mostrando o tempo de retenção do composto ( $t_R = 9,47$  minutos).

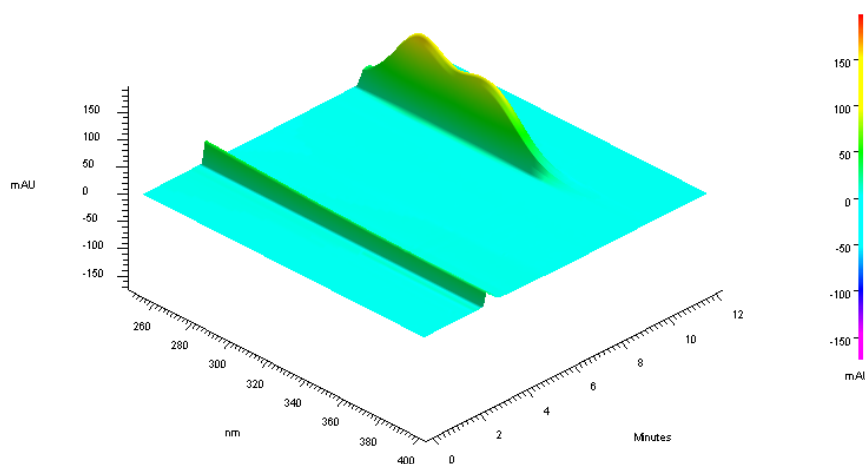


Figura 33 - Cromatograma 3D típico de uma solução padrão de 3,4-dihidroxi benzaldeído com uma concentração de 30 ppm, demonstrando o tempo de retenção do composto ( $t_R = 9,47$  minutos), o comprimento de onda de absorção máximo ( $\lambda_{m\acute{a}x} = 280$  nm) e a intensidade do pico.

Tabela 16 - Tempos de retenção obtidos por HPLC para os padrões de vanilina e 3,4-dihidroxi benzaldeído com concentração de 30 ppm.

Composto	Tempo de retenção (min)
Vanilina	15,59
3,4-dihidroxi benzaldeído	9,47

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Com estas condições, o perfil de um cromatograma típico de separação dos dois compostos pode ser observado na figura 34, obtido com a injeção de 20uL de uma solução analítica contendo 50 ppm de cada compostos.

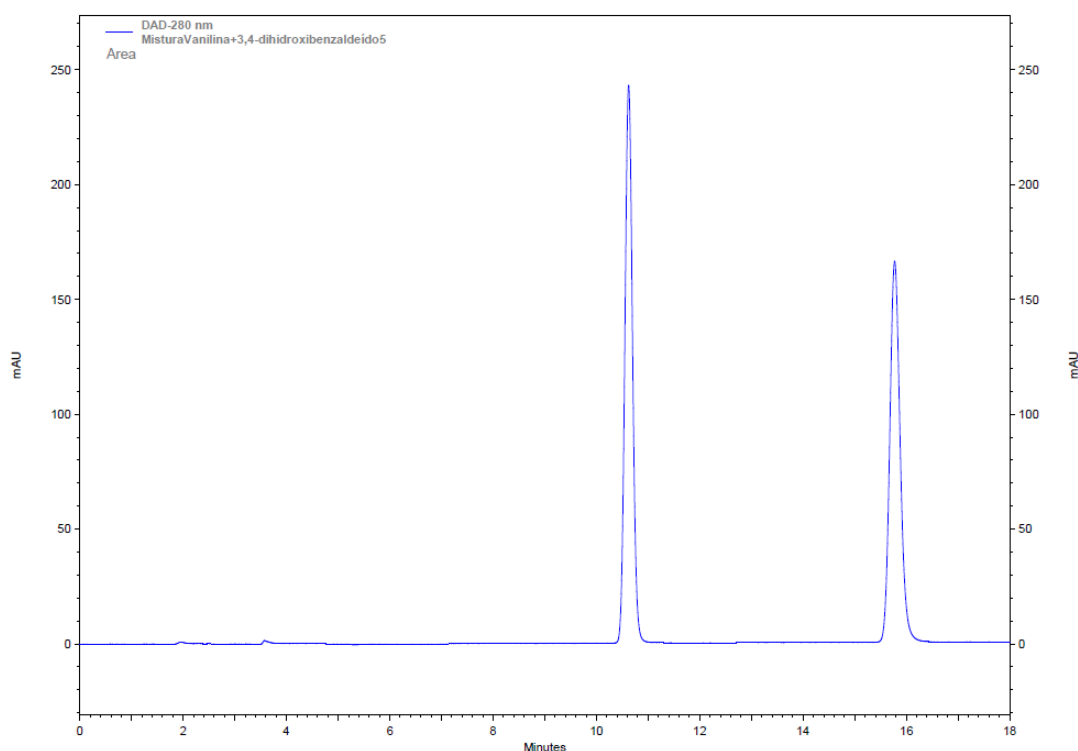


Figura 34 - Cromatograma típico de uma solução mistura de vanilina (C= 50ppm) e 3,4-dihidroxibenzaldeído (C= 50ppm).

### 4.4. Validação do método

#### 4.4.1. Seletividade

O método de validação para HPLC apresentou seletividade, pois verifica-se que no tempo de retenção dos compostos em estudo o cromatograma da injeção de uma amostra com fase móvel - branco, manteve a sua linha de base, não apresentando nenhum interferente.

Desta forma, trabalhadas as variantes oferecidas pela HPLC na construção do método, como a utilização de uma coluna de fase reversa, a sua temperatura, o gradiente da fase móvel, e as variações no comprimento durante a corrida, obteve-se cromatogramas com picos de resolução otimizada para os compostos de interesse, como pode ser visualizado na figura 35.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

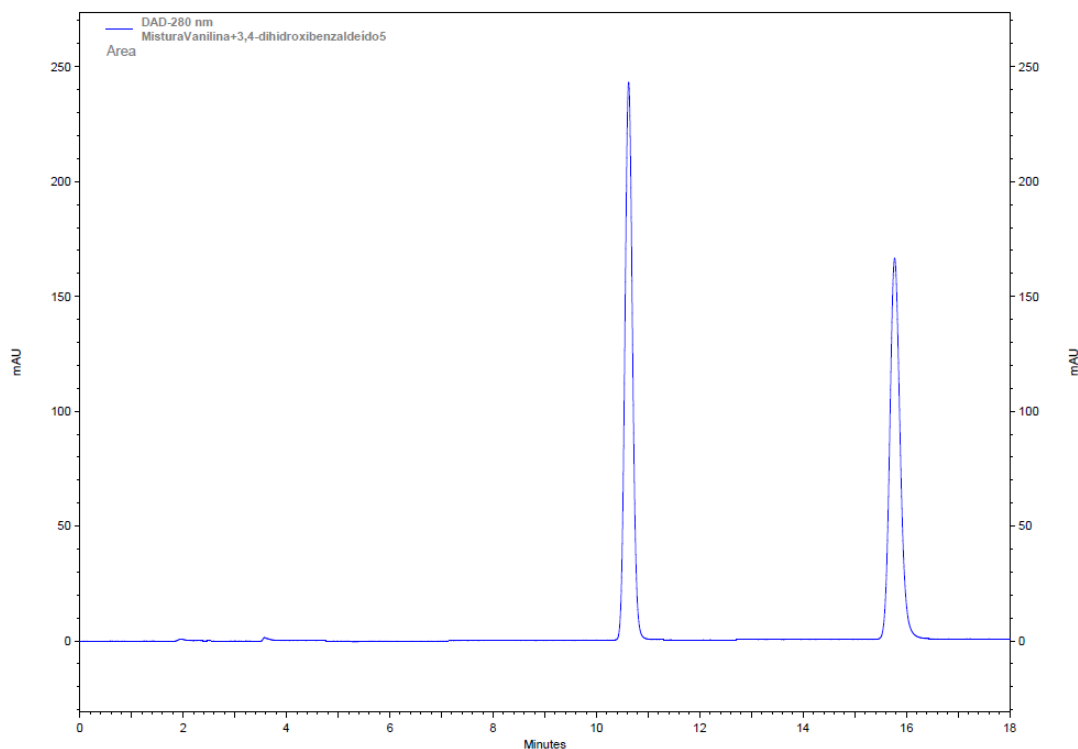


Figura 35 - Cromatograma típico de uma solução mistura de vanilina (C= 50ppm) e 3,4-dihidroxibenzaldeído (C= 50ppm).

### 4.4.2. Linearidade

A determinação da linearidade foi efetuada através da construção da curva de calibração com soluções padrão de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído de diversas concentrações: 1, 2, 3, 4, 5 e 6 ppm para a vanilina (Gráfico 1) e 1, 2, 3, 4 e 5 ppm para o 3,4-dihidroxibenzaldeído (Gráfico 2).

Os valores experimentais obtidos para a construção da curva de calibração da vanilina e do 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC estão apresentados nas tabelas 17 e 18, respectivamente. Os parâmetros (**gama de linearidade, equação de calibração e coeficiente de correlação (R<sup>2</sup>)**) relativos à curva de calibração estão na tabela 19. Os valores dos tratamentos estatísticos dos dados experimentais obtidos para curva de calibração estão apresentados na tabela 20 e 21.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 17 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração da vanilina por HPLC.

Concentração (ppm)	Áreas absolutas				Média	CV (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4		
1	442566	452253	452348	470004	454292,75	2,52
2	764828	787700	782314	783611	779613,25	1,30
3	1161723	1175286	1152698	1173301	1165752	0,91
4	1476329	1500244	1461265	1499837	1484418,75	1,28
5	1837773	1887292	1825030	1858238	1852083,25	1,47
6	2160091	2207484	2167163	2226585	2190330,75	1,46

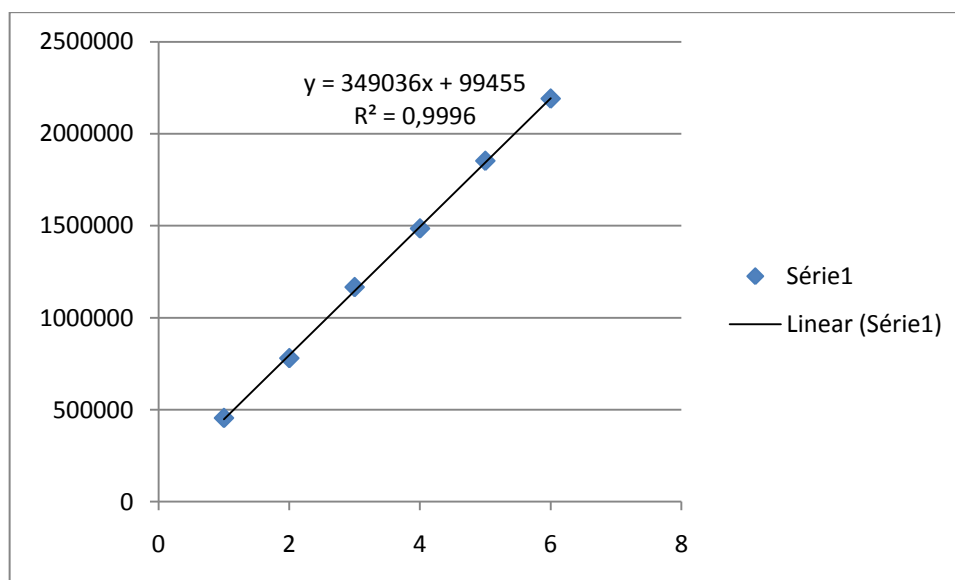


Gráfico 1 - Representação gráfica da curva de calibração da vanilina.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 18 - Áreas absolutas obtidas na determinação da curva de calibração do 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC.

Concentração (ppm)	Áreas absolutas				Média	CV (%)
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4		
1	793893	802326	774707	813187	796028,25	2,04
2	1174685	1179176	1157967	1184835	1174165,75	0,99
3	1501479	1553601	1504838	1536954	1524218	1,66
4	1862339	1899683	1913328	1956598	1907987	2,04
5	2254802	2311704	2287600	2330870	2296244	1,43

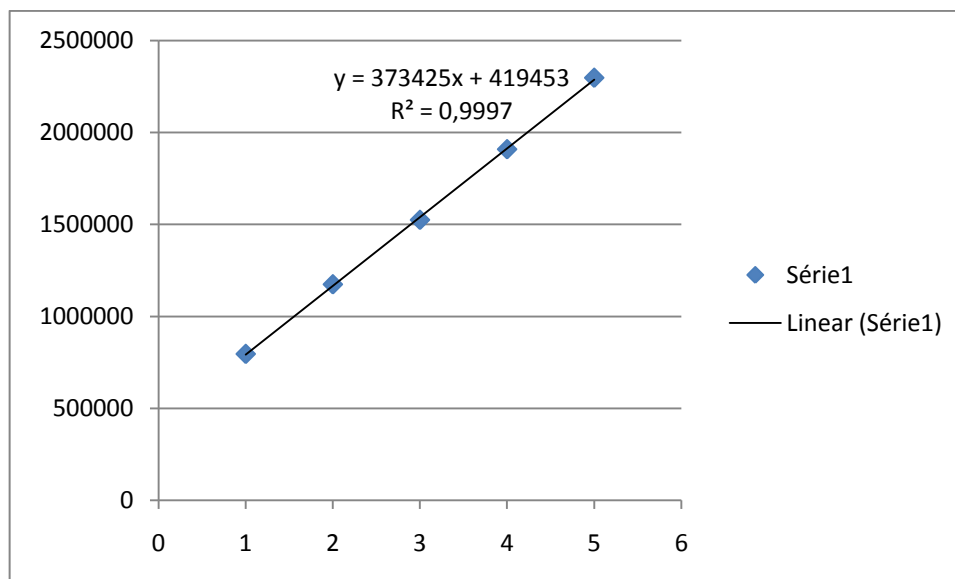


Gráfico 2 - Representação gráfica da curva de calibração do 3,4 dihidroxibenzaldeído.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 19 - Parâmetros relativos à reta de calibração do método analítico para quantificação de vanilina em HPLC.

<i>Parâmetro</i>	<i>Resultado para a Vanilina</i>	<i>Resultado para o 3,4-dihidroxibenzaldeído</i>
Faixa de linearidade	1-6 ppm	1-5 ppm
Eq. $y = mx + b$	$y = 349036x + 99455$	$y = 373425x + 419453$
Desvio Padrão $s$	15120	12006
Declive (m) $\pm$ desvio padrão	$349036 \pm 3614,3$	$373425 \pm 3796,6$
Ordenada na origem (b) $\pm$ desvio padrão	$99455 \pm 14075,6$	$419453 \pm 12591,9$
Coefficiente correlação ( $R^2$ )	0,9996	0,9997

Tabela 20 - Valores dos tratamentos estatísticos da vanilina em HPLC.

### ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	2,13196E+12	2,13196E+12	9326,033675	6,89361E-08
Residual	4	914412146,9	228603036,7		
Total	5	2,13287E+12			

Na avaliação da linearidade para a curva de calibração da vanilina, os resultados apresentaram boa correlação linear entre uma faixa de concentração de 1 ppm a 6 ppm. A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,9996, com a variação percentual entre as médias das áreas das três curvas de 0,91 a 2,52%. O tratamento estatístico (ANOVA) dos resultados obteve valores críticos de F para um  $P < 0,01$ , não apresentando diferença significativa entre as três curvas, como está representado nas Tabelas 17, 19 e 20 e no gráfico 1, não havendo desvio da linearidade.

Tabela 21 - Valores dos tratamentos estatísticos do 3,4-dihidroxibenzaldeído em HPLC.

### ANOVA

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	1,39446E+12	1,39446E+12	9674,237672	2,31678E-06
Residual	3	432426122,1	144142040,7		
Total	4	1,3949E+12			

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Na avaliação da linearidade para a curva de calibração do 3,4-dihidroxibenzaldeído, os resultados apresentaram boa correlação linear entre uma faixa de concentração de 1 a 5ppm. A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,9997, com a variação percentual entre as médias das áreas das três curvas de 0,99 a 2,04%. O tratamento estatístico (ANOVA) dos resultados obteve valores críticos de F para um  $P < 0,01$ , não apresentando diferença significativa entre as três curvas, como está representado nas Tabelas 18, 19 e 21 e no gráfico 2, não havendo desvio da linearidade.

### 4.4.3. Precisão

A precisão verificada para o padrão de vanilina no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas tabelas 22 e 23, respectivamente.

Tabela 22 - Precisão intra-dia do método para quantificação da vanilina por HPLC.

<i>Soluções</i>	<i>Concentração teórica (ppm)</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração experimental (ppm)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV (%)</i>
1	3	1141732	2,99			
2	3	1145272	3,00			
3	3	1143341	2,99	2,99	0,01	0,35
4	3	1142721	2,99			
5	3	1150119	3,01			
6	3	1139278	2,98			

Tabela 23 - Precisão inter-dia do método analítico para quantificação da vanilina por HPLC.

<i>Dia</i>	<i>Soluções</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração experimental (ppm)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV (%)</i>
1	1	1139275	2,98	2,98	0,0053	0,18
	2	1141657	2,98			
	3	1142934	2,99			
2	1	1140186	2,98	2,99	0,017	0,58
	2	1150014	3,01			
	3	1138897	2,98			
3	1	1137998	2,98	2,99	0,022	0,72
	2	1151487	3,01			
	3	1139024	2,98			
Inter-dia				2,99		0,092

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A precisão intra-dia refere-se a média de seis determinações (2,99; 3,00; 2,99; 2,99; 3,01 e 2,98) que foi igual a 2,99 com um coeficiente de variação de 0,35% (Tabela 22). A precisão inter-dia foi a média da média de três determinações diárias, por três dias (2,98; 2,99 e 2,99) que foi igual a 2,99 com um coeficiente de variação igual a 0,092% (Tabela 23). Os baixos valores de coeficiente de variação obtidos neste estudo confirmam a precisão do método analítico para quantificação de vanilina por cromatografia líquida.

A precisão verificada para o padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído no mesmo dia e em dias alternados estão representadas pelas tabelas 24 e 25, respectivamente.

Tabela 24 - Precisão intra-dia do método para quantificação do 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC.

<i>Soluções</i>	<i>Concentração teórica (ppm)</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração experimental (ppm)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV (%)</i>
1	3	1522974	2,96			
2	3	1521121	2,95			
3	3	1515324	2,93	2,92	0,028	0,94
4	3	1501246	2,90			
5	3	1500792	2,90			
6	3	1502978	2,90			



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 25 - Precisão inter-dia do método analítico para quantificação da vanilina por HPLC

<i>Dia</i>	<i>Soluções</i>	<i>Área</i>	<i>Concentração experimental (ppm)</i>	<i>Média</i>	<i>Desvio Padrão</i>	<i>CV (%)</i>
1	1	1529872	2,97	2,94	0,027	0,93
	2	1518671	2,94			
	3	1509478	2,92			
2	1	1499845	2,89	2,90	0,0050	0,17
	2	1500981	2,90			
	3	1503475	2,90			
3	1	1504398	2,91	2,90	0,0048	0,16
	2	1500856	2,90			
	3	1502365	2,90			
<b>Inter-dia</b>				2,91		0,92

A precisão intra-dia refere-se a média de seis determinações (2,96; 2,95; 2,93; 2,90; 2,90 e 2,90) que foi igual a 2,92 com um coeficiente de variação de 0,94% (Tabela 24). A precisão inter-dia foi a média da média de três determinações diárias, por três dias (2,94; 2,90 e 2,90) que foi igual a 2,91 com um coeficiente de variação igual a 0,92% (Tabela 25). Os baixos valores de coeficiente de variação obtidos neste estudo confirmam a precisão do método analítico para quantificação de 3,4-dihidroxibenzaldeído por cromatografia líquida.

### 4.4.4. Exatidão

A avaliação da exatidão do método proposto foi baseada em teste de recuperação realizado com a amostra. O teste de recuperação consistiu na adição de quantidades conhecidas de solução padrão em alíquotas de amostras conforme mostra as figuras 36, 37 e 38 e as tabelas 26 e 27.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

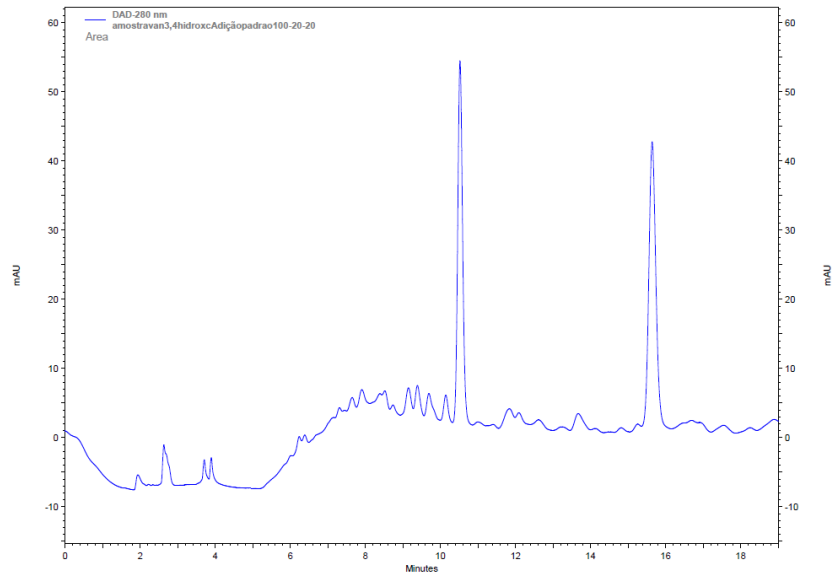


Figura 36 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 1 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos.

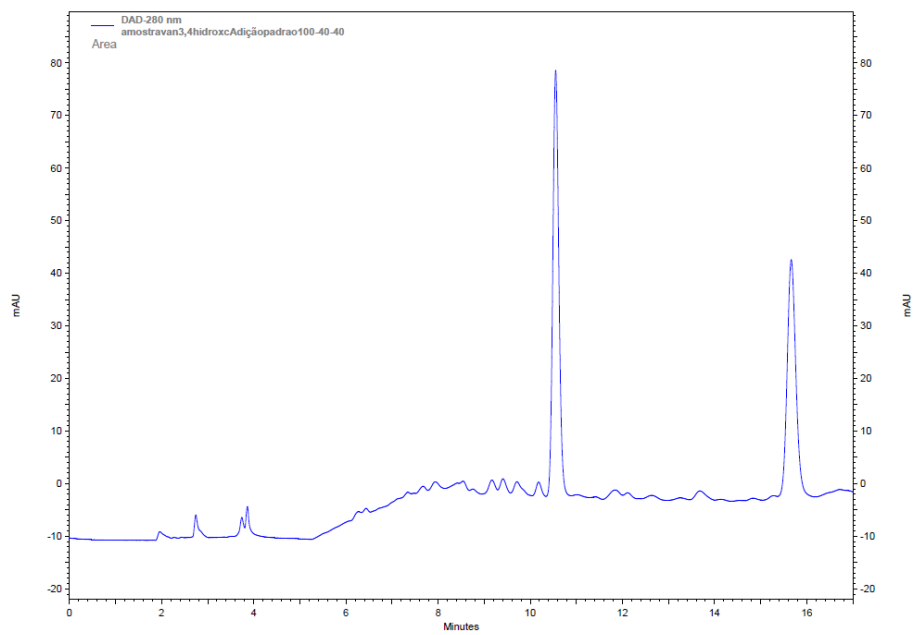


Figura 37 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 2 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

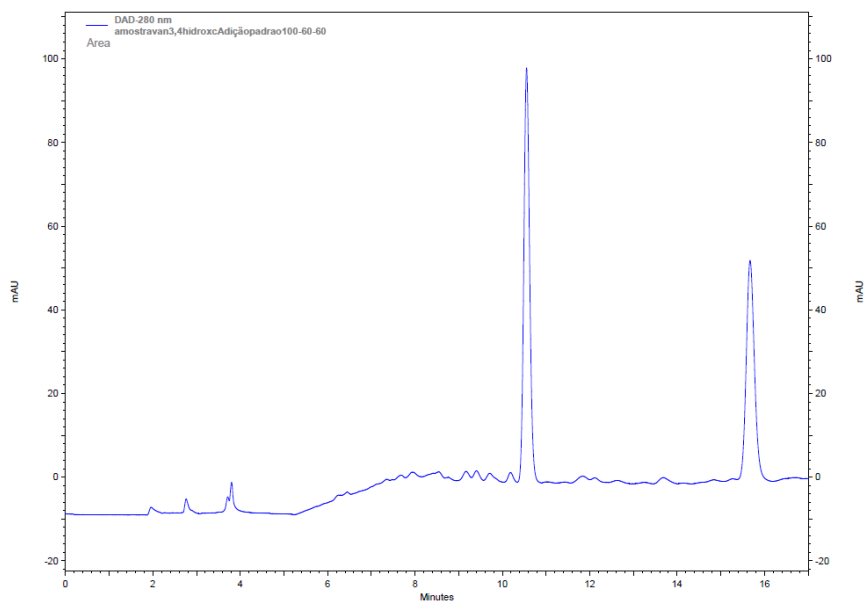


Figura 38 - Cromatograma relativo a adição de padrões de vanilina e de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 2 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos.

Tabela 26 - Parâmetros relativos a adição de padrão de vanilina com uma concentração de 1, 2 e 3 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos.

<i>Vanilina</i>					
Concentração de padrão adicionada à amostra (ppm)	Concentração da amostra (ppm)	Concentração teórica (ppm)	Área dos picos (n=3)	Concentração experimental (ppm)	Média
1	2,51	3,51	1243073	3,28	3,31
			1229111	3,24	
			1284957	3,40	
2	2,51	4,51	1561916	4,19	4,22
			1572387	4,22	
			1586348	4,26	
3	2,51	5,51	1886519	5,12	5,15
			1924913	5,23	
			1876048	5,09	

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 27 - Parâmetros relativos a adição de padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído com uma concentração de 1, 2 e 3 ppm a uma amostra com uma concentração conhecida dos compostos.

<i>3,4-dihidroxibenzaldeído</i>					
Concentração de padrão adicionada à amostra (ppm)	Concentração da amostra (ppm)	Concentração teórica (ppm)	Área dos picos (n=3)	Concentração experimental (ppm)	Média
1	1,93	2,93	1431435	2,71	2,78
			1498651	2,89	
			1446372	2,75	
2	1,93	3,93	1905685	3,98	3,88
			1831000	3,78	
			1872076	3,89	
3	1,93	4,93	2282844	4,99	4,95
			2245501	4,89	
			2271641	4,96	

A exatidão do método determinada para a vanilina foi de 84,5 % e está relacionada na Tabela 28.

Tabela 28 - Exatidão do método para quantificação de vanilina em HPLC.

<i>Soluções</i>	<i>Concentração (ppm)</i>				<i>Recuperação (%)</i>	<i>Média</i>	<i>CV%</i>
	<i>Amostra</i>	<i>Adicionado</i>	<i>Total</i>	<i>Encontrado (média n=3)</i>			
1	2,51	1	3,51	3,31	80	84,5	4,84
2	2,51	2	4,51	4,22	85,5		
3	2,51	3	5,51	5,15	88		

A exatidão foi de 84,5 % com um coeficiente de variação igual a 4,84% entre os resultados das análises das três diferentes concentrações, como pode ser visualizado na Tabela 28, demonstrando ser satisfatório para o método.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

A exatidão do método determinada para o 3,4-dihidroxibenzaldeído foi de 94,4% e está relacionada na Tabela 29.

Tabela 29 - Exatidão do método para quantificação de 3,4dihidroxibenzaldeído em HPLC.

Soluções	Concentração (ppm)				Recuperação (%)	Média	CV%
	Amostra	Adicionado	Total	Encontrado (média n=3)			
1	1,93	1	2,93	2,78	85	94,4	8,79
2	1,93	2	3,93	3,88	97,5		
3	1,93	3	4,93	4,95	100,7		

A exatidão foi de 94,4% com um coeficiente de variação igual a 8,79% entre os resultados das análises das três diferentes concentrações, como pode ser visualizado na Tabela 29, demonstrando ser satisfatório para o método.

### 4.4.5. Robustez

A robustez do método foi comprovada alterando diversas condições de análises e os dados estão apresentados na Tabela 30.

Tabela 30 - Dados relacionados à investigação da robustez do método de análise

Variável	Condições investigadas		Valor otimizado
Fluxo	0,8	Aumenta o tempo de retenção, o que implica grandes tempos de corrida.	1,0
	1,0	Tempo de retenção mais aceitável	
	1,2	Diminui o tempo de retenção mas os picos ficam sobrepostos nas interferências iniciais	
Temperatura	25	Temperatura mais aceitável.	25
	30	Verifica-se que há uma pequena diminuição da área do pico	
	35	Verifica-se que há uma pequena diminuição da área do pico	

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Percentagem de Solvente	A: água - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)) e B: ACN - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v))  Com programa de gradiente	Tempos de retenção elevados, o que implica grandes tempos de corrida.	A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v))  Com programa de gradiente
	A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v))  Com programa de gradiente	Tempos de retenção mais baixos, logo menor tempo de corrida.	

As análises de robustez mostraram que o método é capaz de sofrer pequenas alterações sem causar uma variação maior nos resultados obtidos para estas.

### 4.4.6. Limite de quantificação e limite de detecção

O limite de quantificação do método calculado e determinado experimentalmente para a vanilina foi de 0,43 ppm, mantendo-se a precisão e exatidão.

$$LQ = 10 \times \left(\frac{S}{m}\right)$$

$$LQ = 10 \times \left(\frac{15120}{349036}\right) = 0,43$$

O limite de detecção calculado para o método foi de 0,14 ppm.

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{S}{m}\right)$$

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{15120}{349036}\right) = 0,14$$

O limite de quantificação do método calculado e determinado experimentalmente para o 3,4-dihidroxibenzaldeído foi de 0,32 ppm, mantendo-se a precisão e exatidão.

$$LQ = 10 \times \left(\frac{S}{m}\right)$$

$$LQ = 10 \times \left(\frac{12006}{373425}\right) = 0,32$$

O limite de detecção calculado para o método foi de 0,11 ppm.

$$LD = 3,3 \times \left(\frac{S}{m}\right)$$

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

$$LD = 3,3 \times \left( \frac{12006}{373425} \right) = 0,11$$

O método para quantificação de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC desenvolvido e validado neste trabalho, mostrou-se, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, resultando em um método simples e confiável.

### 4.5. Determinação do teor dos compostos na amostra

A análise do teor de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído nas amostras por cromatografia líquida é mostrada nas tabelas 31 e 32, respectivamente. O cromatograma relativo à determinação dos compostos na amostra está representado na figura 39.

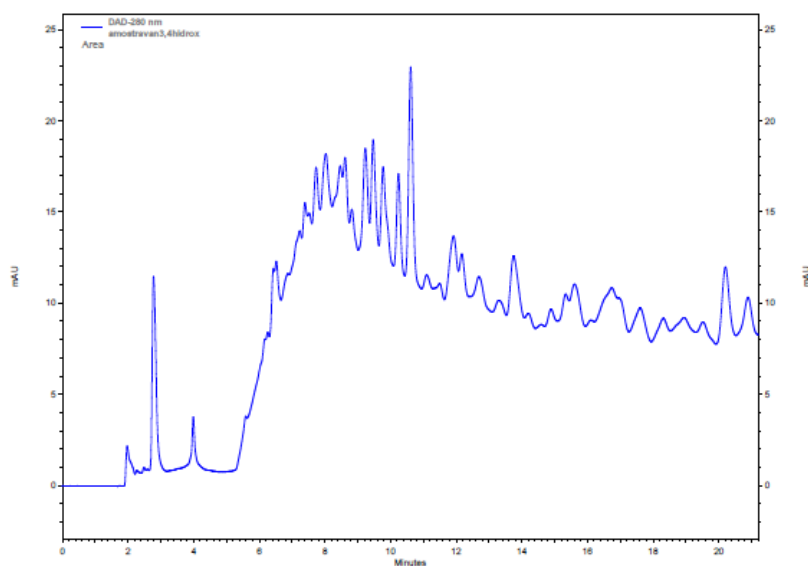


Figura 39 - Cromatograma obtido por HPLC através da amostra

Tabela 31 - Áreas dos picos obtidos por HPLC na análise dos compostos na amostra.

<i>Composto Identificado</i>	<i>Área</i>		
	<i>Amostra 1</i>	<i>Amostra 2</i>	<i>Amostra 3</i>
Vanilina	976890	982366	982549
3,4-dihidroxibenzaldeído	1142223	1134454	1139314

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

Tabela 32 - Cálculo da concentração dos compostos estudados presentes na amostra obtidos por HPLC.

<i>Composto Identificado</i>	<i>Concentração (ppm)</i>			<i>Média</i>	<i>DP</i>	<i>CV(%)</i>
	<i>Amostra 1</i>	<i>Amostra 2</i>	<i>Amostra 3</i>			
Vanilina	2,51	2,53	2,53	2,52	0,0092	0,36
3,4-dihidroxibenzaldeído	1,94	1,91	1,93	1,93	0,011	0,55

O teor de vanilina foi determinado a partir da média de três determinações diárias, por três dias (2,51; 2,53 e 2,53) que foi igual a 2,52 com um coeficiente de variação igual a 0,36% (Tabela 32).

O teor de 3,4-dihidroxibenzaldeído foi determinado a partir da média de três determinações diárias, por três dias (1,94; 1,91 e 1,93) que foi igual a 1,93 com um coeficiente de variação igual a 0,55% (Tabela 32).



## **Capítulo 5 - Conclusões e Perspectivas Futuras**

---

## Capítulo 5 - Conclusões e Perspectivas Futuras

Em conclusão, a melhor absorção para ambos os compostos fenólicos (vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído) foi detectada em 280 nm. Após vários testes experimentais, optou-se por utilizar A: ácido fosfórico 0,01M e B: água - metanol - ácido fosfórico 0,01M (70:28:2 (v/v)), como fase móvel, o que proporcionou boa resolução dos picos, melhor separação dos analitos, menos interferências e rapidez na análise (tempo de corrida igual a 17 minutos), com tempo de retenção da vanilina de 15,59 minutos e com tempo de retenção do 3,4-dihidroxibenzaldeído de 9,47 minutos. Dos cromatogramas analisados, a aplicação da temperatura do forno a 25°C é a melhor opção para análise, pois verifica-se melhor resolução dos picos. Conclui-se também que o melhor fluxo a ser utilizado é de 1 mL min<sup>-1</sup> pois permite melhores separações dos compostos a pressão e tempo de análise mais baixos. Com fluxos muito baixos (0,8 mL min<sup>-1</sup>), o tempo de análise torna-se excessivo. Com maiores valores de fluxo (1,2 mL min<sup>-1</sup>) a pressão do sistema torna-se grande e os compostos começam a eluir rapidamente, coelindo com as interferências iniciais.

O método de validação para HPLC apresentou seletividade, pois verifica-se que no tempo de retenção dos compostos em estudo o cromatograma da injeção de uma amostra com fase móvel - branco, manteve a sua linha de base, não apresentando nenhum interferente.

Na avaliação da linearidade para a curva de calibração da vanilina, os resultados apresentaram boa correlação linear entre uma faixa de concentração de 1 ppm a 6 ppm. A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,9996, com a variação percentual entre as médias das áreas das três curvas de 0,91 a 2,52%, o que representa um bom desempenho no trabalho efectuado. O tratamento estatístico (ANOVA) dos resultados obteve valores críticos de F para um P < 0,01, não apresentando diferença significativa entre as três curvas, não havendo desvio da linearidade.

Na avaliação da linearidade para a curva de calibração do 3,4-dihidroxibenzaldeído, os resultados apresentaram boa correlação linear entre uma faixa de concentração de 1 a 5ppm. A curva padrão obteve coeficiente de correlação de 0,9997, com a variação percentual entre as médias das áreas das três curvas de 0,99 a 2,04%, o que representa um bom desempenho no trabalho efectuado. O tratamento estatístico (ANOVA) dos resultados obteve valores críticos de F para um P < 0,01, não apresentando diferença significativa entre as três curvas, não havendo desvio da linearidade.

A precisão intra-dia, relativamente à vanilina, refere-se a média de seis determinações que foi igual a 2,99 com um coeficiente de variação de 0,353%. A precisão inter-dia foi a média da média de três determinações diárias, por três dias que foi igual a 2,99 com um coeficiente de

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

variação igual a 0,092%. Os baixos valores de coeficiente de variação obtidos neste estudo confirmam a precisão do método analítico para quantificação de vanilina por HPLC.

A precisão intra-dia, relativamente ao 3,4-dihidroxibenzaldeído, refere-se a média de seis determinações que foi igual a 2,92 com um coeficiente de variação de 0,94%. A precisão inter-dia foi a média da média de três determinações diárias, por três dias que foi igual a 2,91 com um coeficiente de variação igual a 0,92%. Os baixos valores de coeficiente de variação obtidos neste estudo confirmam a precisão do método analítico para quantificação de 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC.

A exatidão determinada para a vanilina e para o 3,4-dihidroxibenzaldeído foi de 84,5% e de 94,4% com um coeficiente de variação igual a 4,84% e a 8,79%, respectivamente, demonstrando ser satisfatório para o método.

As análises de robustez mostraram que o método é capaz de sofrer pequenas alterações sem causar uma variação maior nos resultados obtidos para estas.

O limite de quantificação do método calculado e determinado experimentalmente para a vanilina e para o 3,4-dihidroxibenzaldeído foi de 0,43 e 0,32 ppm, mantendo-se a precisão e exatidão. Por fim, o limite de detecção calculado para o método foi de 0,14 e 0,11 ppm, respectivamente.

Conclui-se assim que o método para quantificação de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC desenvolvido e validado neste trabalho, mostrou-se, seletivo, linear, preciso, exato e robusto, resultando em um método simples e confiável.

Neste contexto, foram efectuadas análises a amostras de concentrado obtido através de nanofiltração do efluente produzido na etapa inicial do processamento da cortiça destinada à remoção de contaminantes, designada como “cozimento”. O teor de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído foi determinado a partir da média de três determinações diárias, por três dias que foi igual a 2,524515 e a 1,925985, com um coeficiente de variação igual a 0,364942 % e a 0,545766%, respectivamente.

Numa perspectiva futura, o aproveitamento químico da cortiça como fonte de produtos orgânicos torna-se uma possibilidade que permitirá diminuir os resíduos e assim aumentar a rentabilidade económica da indústria corticeira global.

O estudo da utilização da cortiça e desperdícios como fonte de produtos químicos necessita do conhecimento, o mais exacto possível, dos constituintes da cortiça e respectivas quantidades.

## Referências Bibliográficas

---

## Referências Bibliográficas

ABE, L. T.; MOTA, R. V. da; LAJOLO, F. M. e GENOVESE, M. I. (2007). Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L.. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.27, n.2, p. 394-400.

ACERO, J. L.; BENÍTEZ, F. J.; LEAL, I. e REAL, F. J. (2005). Removal of Phenolic Compounds in Water by Ultrafiltration Membrane Treatments. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 40 (8), 1585 – 1603.

AMARAL FORTES, M., A Cortiça, *Colóquio/Ciências-Calloust Gulbenkian*, 1990, 35-60.

ANGELO, P. e JORGE, N. (2007). Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, 66 (1), 232-240.

APCOR, <http://www.apcor.pt/>. Consultado a 10/06/12

AQUINO-NETO, F.R e NUNES, D.S.S. (2003). *Cromatografia: princípios básicos e técnicas afins*. Rio de Janeiro: Interciência, p.187.

ARAÚJO, Julio M. A. *Química de Alimentos: teoria e prática*. 3ª ed. Viçosa: Editora UFV, 2004, p.416.

Associação Empresarial Portuguesa (AEP), 2000. *Manual de Boas Práticas Ambientais e Energéticas - Indústria da Cortiça*.

BAGGIO, S. R. e BRAGAGNOLO, N. (2008). Lipid fraction quality evaluation of Brazilian meat-based products. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.19, n.3, p. 463-470.

BARCELÓ, D. e HENNION M. C. (1997) Trace determination of pesticides and their degradation products in water. 3. ed. The Netherlands: *Elsevier*. p.542.

BENÍTEZ, J. F.; ACERO, J. L. e LEAL, A. I. (2008). Treatment of wastewaters from the cork process industry by using ultrafiltration membranes. *Desalination*, 229 (1-3), 156-169.

BENÍTEZ, F.; REAL, F.; ACERO, J.; LEAL, A. e GARCIA, C. (2005). Gallic acid degradation in aqueous solutions by UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> treatment, Fenton's reagent and the photo-Fenton system. *Journal of Hazardous Materials*, 126, 31-39.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

BENÍTEZ, F. J.; ACERO, J. L.; GARCIA, J. e LEAL, A. I. (2003). Purification of cork processing wastewaters by ozone, by activated sludge, and by their two sequential applications. *Water Research*, 37, 4081-4090.

BERNARDO, M.; SANTOS, A.; CANTINHO, P. e MINHALMA, M. (2011). Cork industry wastewater partition by ultra/nanofiltration: A biodegradation and valorisation study. *Water Research*, 45, 904-912.

BIASUTTI, E. A. R.; AFONSO, W. de O.; JUNIOR, C. de O. L.; COELHO, J.V.; SILVA, V. D. M.; SILVESTRE, M. P. C. (2008). Ação da pancreatina na obtenção de hidrolisados protéicos de soro de leite com elevado teor de oligopeptídeos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.44, n.1, p. 51-60.

BIZZOTTO, C. S.; CAPOBIANGO, M.; BIASUTTI, E. A. R.; SILVA, V. D. M.; JUNQUEIRA, R. G.; MARIALICE PINTO COELHO SILVESTRE, M. C. P. (2006). Hidrolisados protéicos de arroz com baixo teor de finilalanina, obtidos pela ação da corolase PP e uso do carvão ativado. *Ciência agrotécnica*, v.30, n.2, p. 308-316.

CARVALHO, J. (1987). Propriedades e composição química da cortiça. Instituto Superior Técnico, Lisboa.

CECCHI, Heloisa Máscia (2003). Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. 2ª ed. rev. Campinas: Editora da Unicamp, p.207.

CHATONNET, P.; DUBOURDIEU, D.; BOIDRON, J. (1992). Incidence des conditions de fermentation et d'élevage des veins blancs secs en barrique sur leur composition en substances par le bois de chene. *Sci. Aliment.*, 120, 665-685.

CHATONNET, P.; BOIDRON, J.; PONS, M. (1990). Elevage des vins rouges en futs de chene : evolution de certains composés volatils et de leur impact aromatique. *Sci. Aliment.*, 10, 565-587.

CIOLA, R. (2000). Fundamentos da Cromatografia a Líquido de Alto Desempenho. 1ªed. São Paulo: Editora Edgard Blucher Ltda, p.179.

COLLINS, Carol H. (1997). Princípios básicos de cromatografia. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7 ed. Campinas: Editora da UNICAMP, 1997. p.11-27.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (2006). Fundamentos de Cromatografia. Campinas: Editora Unicamp. p.453.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

COLLINS, C.H. (2006). 2006 - Cem anos das palavras cromatografia e cromatograma. *Química Nova*, São Paulo, 2006, v.29, n.4, p.889-890.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCÍA-VELLEJO, M.; FERNÁNDEZ de SIMÓN, B. e GONZÁLEZ-ADRADOS, J. (1997). Low molecular weight polyphenols in cork of *Quercus suber*. *J. Agric. Food Chem.*, 45, 2695-2700.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCÍA-VELLEJO, M. e GONZÁLEZ-ADRADOS, J. (1998). Chemical characterization of reproduction cork from Spanish *Quercus suber*. *J. Wood Chem.Technol.*, 18, 447-469.

CONDE, E.; CADAHÍA, E.; GARCÍA-VELLEJO, M. e FERNÁNDEZ de SIMÓN, B. (1998). Polyphenolic Composition of *Quercus suber* cork from different Spanish provenances. *J. Agric. Food Chem.*, 46, 3166-3171.

CONDE, E.; GARCÍA-VELLEJO, C. e CADAHÍA, E. (1999). Waxes composition of reproduction cork from *Quercus suber* and its variability throughout the industrial processing. *J. Wood Sci. Technol.*, 33, 229-244.

DELLA LUCIA, C. M.; CAMPOS, F. M.; MATA, G. M. S. C. e SANT'ANA, H. M. P. (2008). Controle de perdas de carotenóides em hortaliças preparadas em unidade de alimentação e nutrição hospitalar. *Ciência e saúde coletiva*, v.13, n.5, p. 1627-1636, 2008.

DIAS-MACHADO, M.; MADEIRA, L. M.; NOGALES, B.; NUNES, O. C. e Manaia, C. M. (2006). Treatment of cork boiling wastewater using chemical oxidation and biodegradation. *Chemosphere*, 64, 455-461.

DRUZIAN, J. I.; DOKI, C. e SCAMPARINI, A. R. P. (2005). Determinação simultânea de açúcares e polióis por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-IR) em sorvetes de baixas calorias ("diet"/ "light"). *Ciência Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.2, p. 279-284.

EMER, J. e MILLER, J.H.M. (editores), (2005). Method validation in pharmaceutical analysis: A guide to best practice. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Weinheim, ISBN: 3-527-31255-2.

ESCARPA, A. e GONZÁLEZ, M.C. (2001). Approach to the content of total extractable phenolic compounds from different food samples by comparison of chromatographic and spectrophotometric methods. *Analytica Chimica Acta*, 427, 119-127.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

FENGEL, D. e WEGNER, G. (1989): Wood-chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter de Gruyter. Berlin, New York.

FIERZ-DAVID, H.E. e ULRICH, C. (1945). Zur Kenntnis des Korkes. *Experimentia*, vol. I(5), 160.

FORTES, M. A.; ROSA, E. e PEREIRA, H. (2004) “A Cortiça”, Lisboa, IST, Instituto Superior Técnico Press.

GERALDES, V.; MINHALMA, M.; PINHO, M. N.; ANIL, A.; OZGUNAY, H.; BITLISLI, B. et al. (2009). Nanofiltration of cork wastewaters and their possible use in leather industry as tanning agents. *Polish J. of Environ. Stud.*, Vol. 18, No. 3, 353-357.

GIL, L. M. C. (1995). O conhecimento da química da cortiça: nota histórica. *CTCORK Magazine*, 1(1), 2-13.

GIL, L. M. C. (1993). A química da cortiça: ponto da situação, *Boletim da Sociedade Portuguesa de Química*, 50, 20-24.

GIMENO, E.; CALERO, E.; CASTELLOTE, A. I.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; DE LA TORRE, M. C. e LÓPEZ-SABATER, M. C. (2000). Simultaneous determination of a-tocopherol and b-carotene in olive oil by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, v.881, n.1-2, p.155-159.

GONÇALVES, Maria de Lurdes Sadler Simões (2001). Métodos instrumentais para análise de soluções: Análise Quantitativa. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. p.1050.

GUEDES, A. M.; MADEIRA, L. M.; BOAVENTURA, R. A. e Costa, C. A. (2003). Fenton oxidation of cork cooking wastewater— overall kinetic analysis. *Water Research*, 37, 3061-3069.

GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes e COLLINS, Carol H. (1997). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Introdução a métodos cromatográficos. 7ª ed. Campinas: Editora da UNICAMP. p.183-238.

HAGEN, D. F.; MARKELL, C. G.; SCHMITT, G. A. e BLENVINS, D. D.(1990). Membrane approach to solid-phase extractions. *Anal. Chim. Acta*, Amsterdam, v. 236, p. 157-164.

HARRIS, Daniel C. Análise Química Quantitativa (2005). 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC-Livros Técnicos e Científicos Editora S.A. 876p.

HENNION, M.C. (1999). Solid-phase extraction: method development, sorbents, and coupling with liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, v. 856, p.5.



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

HOLLOWAY, P. J. (1972). The composition of suberin from the corks of *Quercus suber* L. and *Betula pendula* Roth. *Chem. Phys. Lipids*, v.9, p.158-170.

INMETRO, Orientações sobre validação de métodos de ensaios químicos. DOQ-CGCRE-008, 2003.

JAKOB, E. e ELMADF, I. (2000). Rapid and simple HPLC analysis of vitamin K in food, tissues and blood. *Food Chemistry*, v.68, n.2, p.219-221.

JARDIM, Isabel Cristina Fontes Sales; GUIMARÃES, Luis Fernando Lopes; COLLINS, Carol H. (2006). Cromatografia líquida de alta eficiência. In: Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da UNICAMP. p.453.

JUNKER-BUCHHEIT, A.; WITZENBACHER, M. Pesticide monitoring of drinking water with the help of solid-phase extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 737, p. 67-74, 1996.

LANÇAS, F. M. (2004). Validação de Métodos Cromatográficos de Análise. São Carlos: RiMa. p.62.

LANÇAS, Fernando M. (1993). Cromatografia em fase gasosa. São Carlos: Acta. p.254.

LIMA, V. L. A. G. de; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S. do; GOMES, P. B. e GUERRA, N. B. (2006). Identificação de antocianidinas em acerolas do Banco Ativo de Germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.26, n.4, p. 927-935.

LORD, H. e PAWLISZYN, J. (2000). Microextraction of drugs. *J. Chromatogr. A.*, Amsterdam, v. 902, p. 17-63.

MACHADO, M. M. (2005). Degradação Biológica de Polifenóis - Isolamento e Caracterização de Bactérias Mesofílicas e Termofílicas de Água de Cozedura de Cortiça. Porto: Escola Superior de Biotecnologia da Universidade Católica Portuguesa.

MAJORS, R. E. (2001b). New designs and formats in solid-phase extraction sample preparation. In: LCGC. Europa,. Disponível em: <http://www.lcgceurope.com>. Consultado a 12-06-12.

MALDANER, L. e JARDIM, I.C.S.F. (2009). O estado da arte da cromatografia líquida de ultra eficiência. *Química Nova*, São Paulo, v.32, n.1, p.214-222.

MCMMASTER, M.C. HPLC: A practical user's guide. New York: VCH, 1994, 211p.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

MENDONÇA, E.; PEREIRA, P.; MARTINS, A. e AÑSELMO, A. M. (2004). Fungal Biodegradation and detoxification of cork boiling wastewaters. *Eng. Life Sci.*, 4 (2), 144-149.

MINHALMA, M. e PINHO, M. N. (2001a). Flocculation/Flotation/Ultrafiltration Integrated Process for the Treatment of Cork Processing Wastewaters. *Environ. Sci. Technol.*, 35, 4916-4921.

MINHALMA, M. e PINHO, M. N. (2001b). Tannic-membrane interactions on ultrafiltration of cork processing wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 22-23, 479-488

Ministério da Agricultura, d. D. (2000). O sobreiro e a cortiça - Um património universal, uma herança a preservar. Lisboa, Portugal: Direcção-Geral de Desenvolvimento Rural.

MORESCHI, E. C. P. e ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de (2007). Comparação de métodos de análise para o ácido pantotênico em alimentos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.2, p. 247-252.

NACZK, M. e SHAHIDI, F. (2004). Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, 1054, 95-111.

NETO, Francisco R. de A. e NUNES, Denise, da S. S. (2003). Cromatografia: Princípios básicos e técnicas afins. Rio de Janeiro: Interciência. p.187.

NETO, P. V. (2005). Compostos voláteis associados a defeitos de cortiça de *Quercus suber L.*: Estudo dos efeitos de matriz por micro-extracção em fase sólida na região de espaço de Cabeça. Tese de Mestrado, Universidade de Aveiro.

OTLES, S. e CAGINDI, O. (2007). Determination of vitamin K1 content in olive oil, chard and human plasma by RP-HPLC method with UV-Vis detection. *Food Chemistry*, v.100, n.3, p.1220-1222.

PATONAY, G. (1992). HPLC Detection: Newer methods. New York: VCH, 236p.

PEREIRA, H. (1988). Chemical composition and variability of cork from *Quercus suber L.* *Wood Sci. Technol.*, 22, 211-218.

PEREIRA, H., Constituição química da cortiça- Estado actual dos conhecimentos, *A cortiça - Boletim I. P. F*, 483, 1979, 259-264.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

PERES, J. A., HEREDIA, J. B. e DOMÍNGUEZ, J. R. (2004). Integrated Fenton's reagent-coagulation/flocculation process for the treatment of cork processing wastewaters. *Journal of Hazardous Materials*, B107, 115-121.

PERES, T.B. Noções básicas de cromatografia. *Biológico*. São Paulo, 2002,v.63, n.2, p.227-229.

PINCHON, V. (2000). Solid-phase extraction for multiresidue analysis of organic contaminants in water. *J. Chromatogr. A*, 885, 195-215.

PINTOR, A.; VILAR, V. e BOAVENTURA, R. (2011). Decontamination of cork wastewaters by solar-photo-Fenton process using bleaching wastewaters as H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> source. *Solar Energy*, 85, 579-587.

POMBEIRO, Armando (2003). Técnicas e Operações Unitárias em Química Laboratorial. 4ª ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p.1069.

POOLE, C. F.; GUNATILEKA, A. D. e SETHURAMAN, R. (2000). Contributions of theory to method development in solid-phase extraction. *J. Chromatogr. A.*, v. 885, p. 17-39.

PRESOTO, A. E. F. e ALMEIDA-MURADIAN, L. B. de (2008). Validação de métodos cromatográficos por clae para análise das vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e niacina naturalmente presentes em farinha de cereais. *Química Nova*. v.31, n.3, p. 498-502.

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

RIBANI, M. *et al.* (2004). Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. *Química Nova*, v. 27, p. 771-780.

RIBANI, M.; BOTTOLI, C.B.G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F. e MELO, L.F.C., (2004). Validação de métodos cromatográficos e electroforéticos”, *Química Nova*, 27, 5, pp. 771-780.

ROSA, M.E. e PEREIRA, H. (1994). The effect of long term treatment at 100°C-150°C on structure, chemical composition and compression behaviour of cork, *Holzforchung*, 48, 226-232.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

ROSSI, D. T. e ZHANG, N. (2000). Automating solid-phase extraction: current aspects and future prospects. *J. Chromatogr. A*, Amsterdam, v. 885, p. 97-113.

SCOTT, Raymond P. W. (2003). *Liquid Chromatography*. p101. Disponível em: <http://www.library4science.com>. Consultado a 20-07-2012.

SILVA, C. A., MADEIRA, L. M., BOAVENTURA, R. A. e COSTA, C. A. (2004). Photo-oxidation of cork manufacturing wastewater. *Chemosphere*, 55, 19-26.

SILVA, S.; SABINO, M.; Fernandes, E. M., CORRELO, V. e BOESEL, L. (2005). Cork: properties, capabilities and applications. *International Materials Reviews*, 50 (6), 345-365.

SIMPSON, N. J. K. e WELLS, M. J. M. (2000). Introduction to solid-phase extraction. In: *Solid-phase extraction: principles, techniques and applications*. New York: Marcel Dekker, Inc., p. 1-17.

SINGLETON, V. (1995). Maturation of wines and spirits: comparisons, facts, and hypotheses. *Am. J. Enol. Vitic.*, 46, 98-115.

SKOOG, D. A.; HOLLER, F. J. e NIEMAN, T. A. (2002). *Princípios de análise instrumental*. 5 ed. Porto Alegre: Bookman (SBQ), p. 598-676.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. e GLAJCH, J. L. (1997). *Practical HPLC method development*. 2.ed., New York: John Wiley Professio.

TEIXEIRA, A.; SANTOS, J. e CRESPO, J. (2009). Sustainable membrane-based process for valorisation of cork boiling wastewaters. *Separation and Purification Technology*, 66, 35-44.

TONHI, E.; COLLINS, K.E.; JARDIM, I.C.S.F. e COLLINS, C.H. (2002). Fases estacionárias para cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (clae- fr) baseadas em superfícies de óxidos inorgânicos funcionalizados. *Química Nova*, São Paulo, v.25, n.4, p. 616-623.

VALENTE, A.L.P.; COLLINS, C.H.; MANFREDI, J.E. (1983). Conceitos básicos de cromatografia líquida de alta eficiência. *Química Nova*, São Paulo, p.103-109.

VAREA, S.; GARCÍA-VALLEJO, M. C.; CADAHÍA, E. e SIMÓN, B. F. d. (2001). Polyphenols susceptible to migrate from cork stoppers to wine. *Eur. Food Res. Technol.* 213, 56-61.

VIEIRA, Henrique D. (2009). Análise de características da cortiça amadia relevantes para a sua qualidade industrial. Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa.

## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

VILA NOVA, C. M. V. M.; GODOY, H. T. e ALDRIGUE, M. L. (2005). Composição química, teor de colesterol e caracterização dos lipídios totais de tilápia (*Oreochromis niloticus*) e pargo (*Lutjanus purpureus*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.3, p. 430-436.

VOGEL, Arthur (1981). *Análise Química Quantitativa*. 5ª ed. São Paulo: Mestre Jou, p.462.

WELLS, M. J. M. e YU, L. Z. (2000a). Solid-phase extraction of acidic herbicides. *Journal of Chromatography A*, v. 885, p. 237-250.

WELLS, M. J. M. (2000b). Handling large volume samples: applications of SPE to environmental matrices. In: SIMPSON, N. J. K. (Ed.) *Solid-phase extraction: principles, techniques and applications*. New York: Marcel Dekker, Inc. p. 97-123.

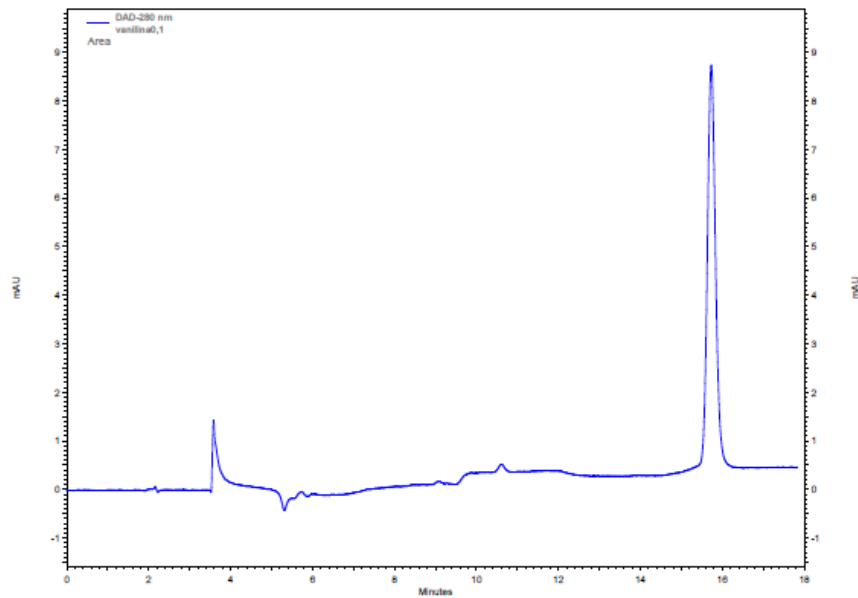
## **Anexos**

---

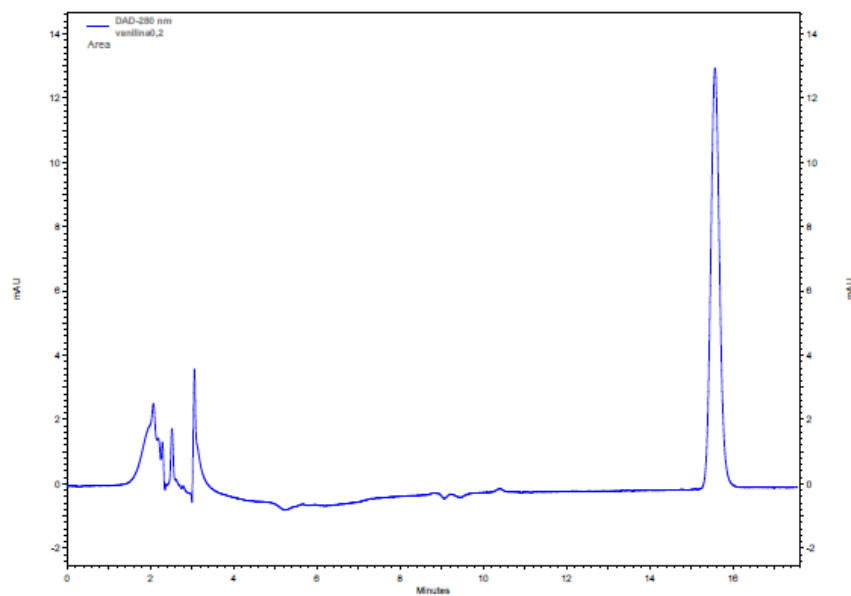
## Anexos

### Anexo A - Cromatogramas obtidos das soluções padrão de vanilina por HPLC

- Vanilina 1 ppm

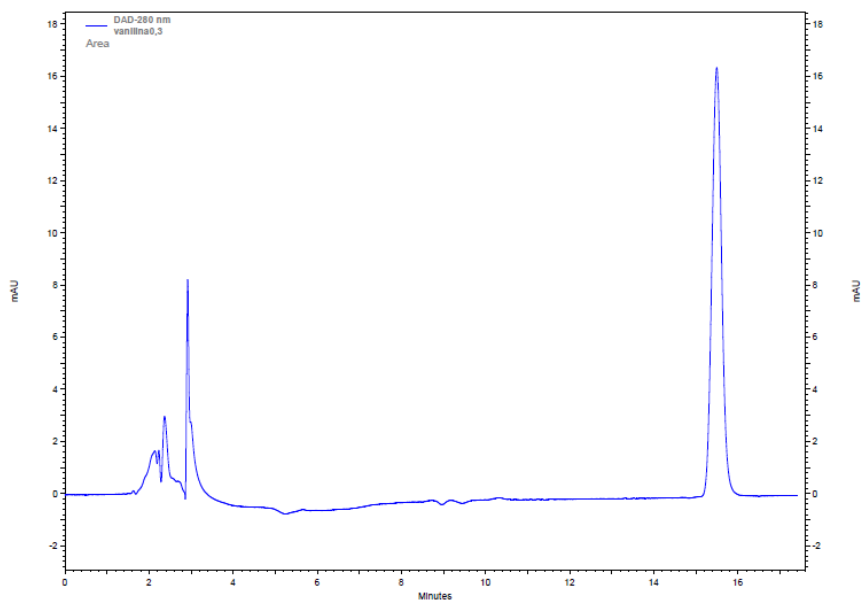


- Vanilina 2 ppm

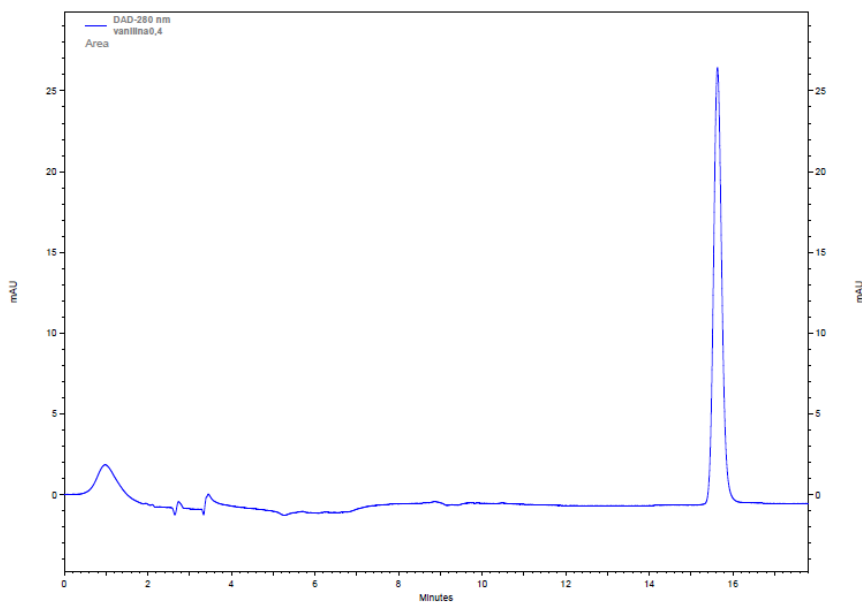


## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Vanilina 3 ppm



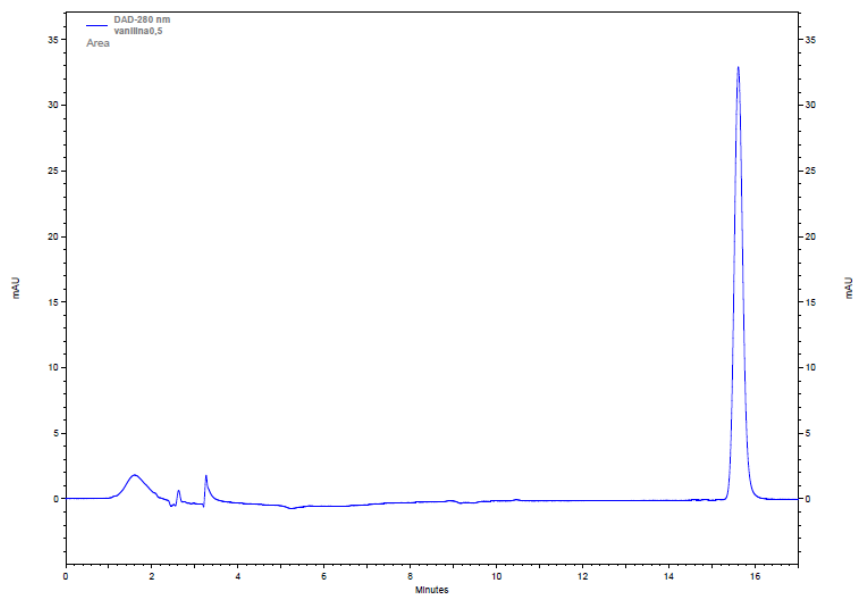
- Vanilina 4 ppm



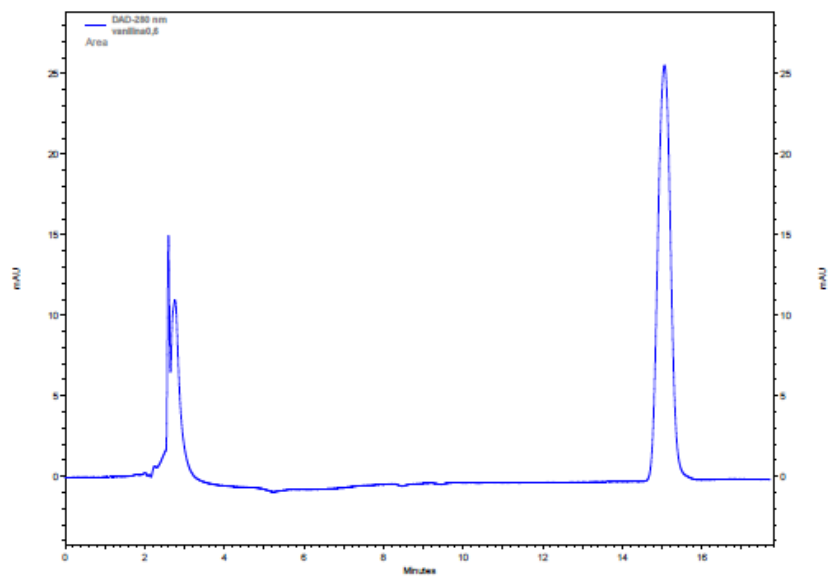


## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Vanilina 5 ppm



- Vanilina 6 ppm

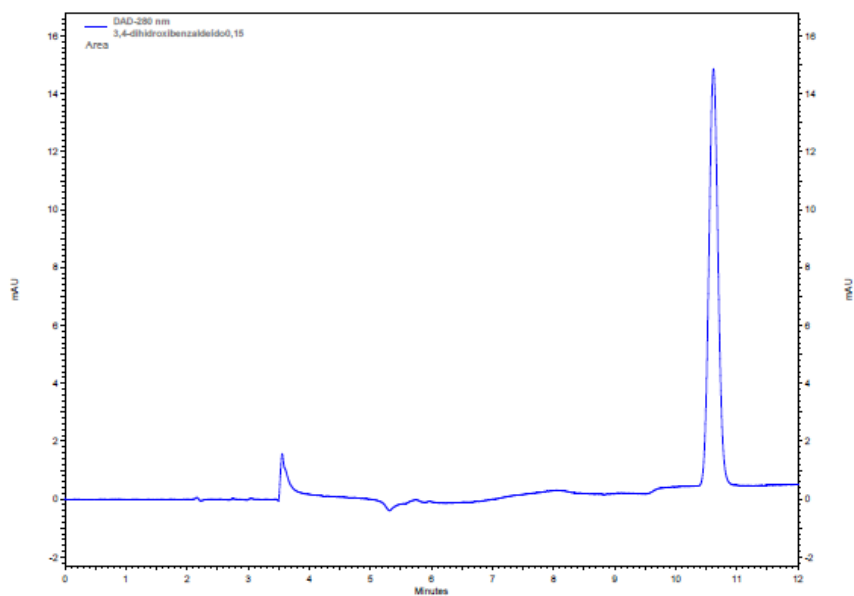


- Áreas absolutas obtidas através dos cromatogramas das soluções padrão de vanilina

Concentração (ppm)	Áreas absolutas			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
1	442566	452253	452348	470004
2	764828	787700	782314	783611
3	1161723	1175286	1152698	1173301
4	1476329	1500244	1461265	1499837
5	1837773	1887292	1825030	1858238
6	2160091	2207484	2167163	2226585

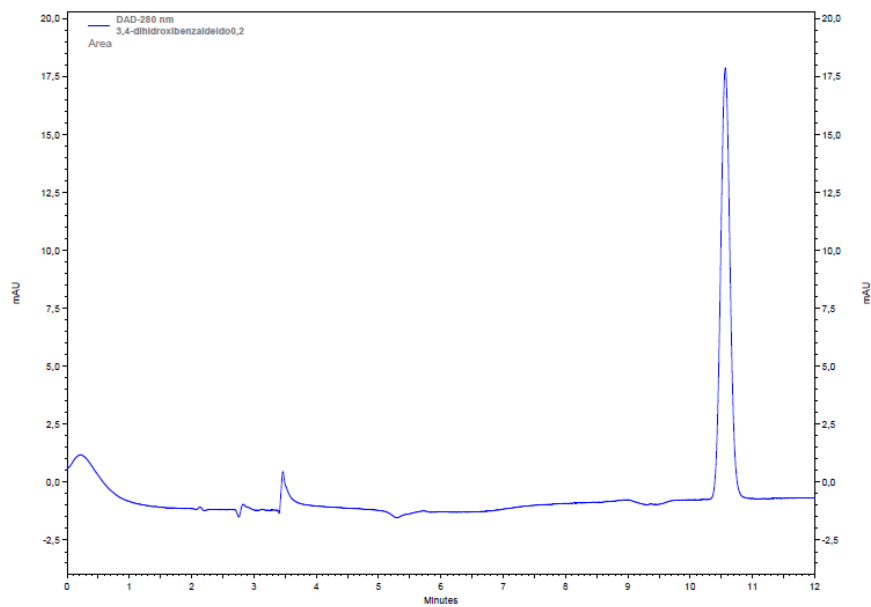
## Anexo B - Cromatogramas obtidos das soluções padrão de 3,4-dihidroxibenaldeído por HPLC

- 3,4-dihidroxibenaldeído 1 ppm

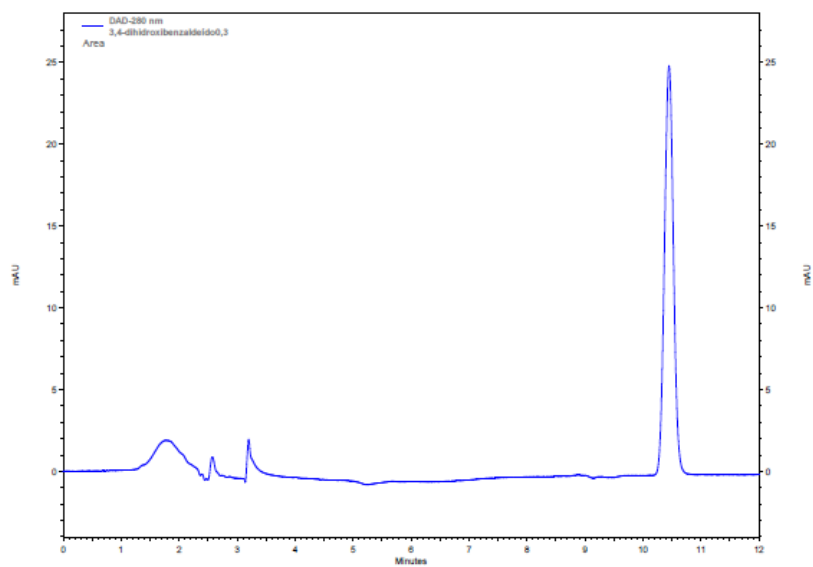


## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- 3,4-dihidroxibenzaldeído 2 ppm

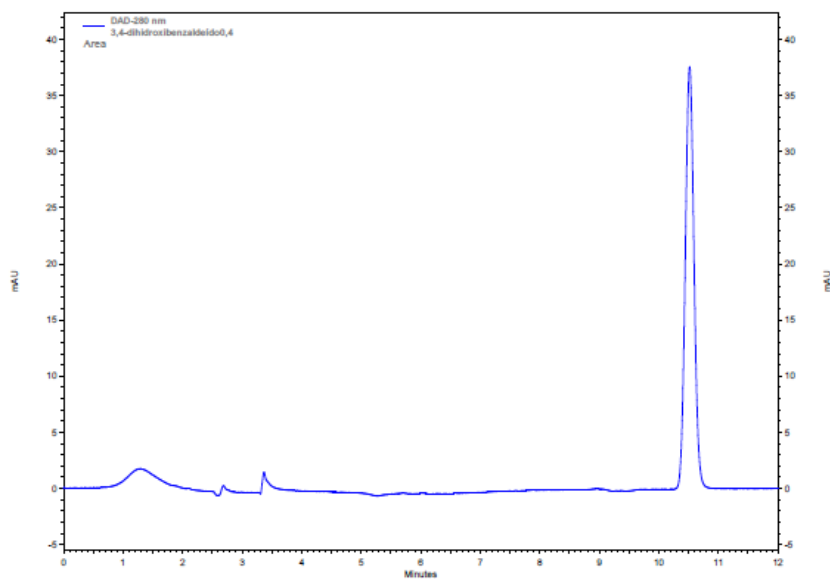


- 3,4-dihidroxibenzaldeído 3 ppm

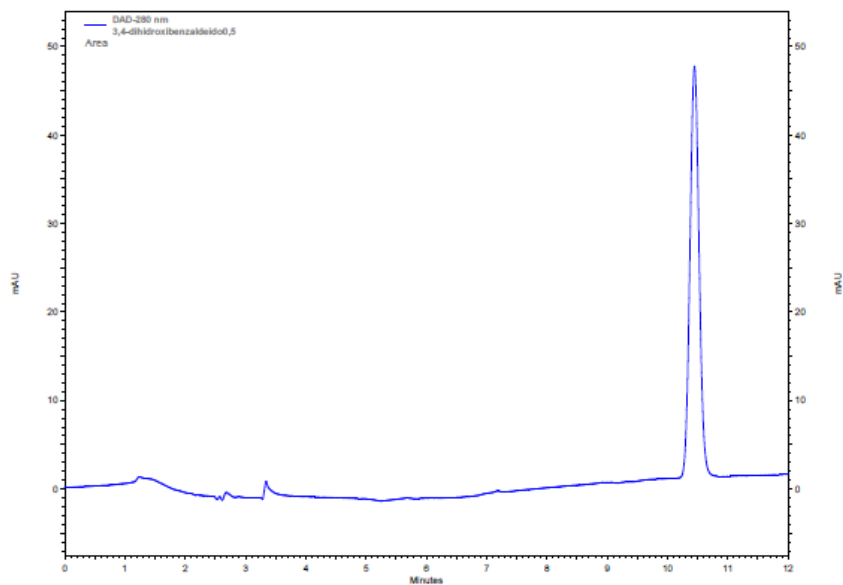


## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- 3,4-dihidroxibenzaldeído 4 ppm



- 3,4-dihidroxibenzaldeído 5 ppm



## Determinação de compostos fenólicos por HPLC

- Áreas absolutas obtidas através dos cromatogramas das soluções padrão de 3,4-dihidroxibenzaldeído

Concentração (ppm)	Áreas absolutas			
	Dia 1	Dia 2	Dia 3	Dia 4
1	793893	802326	774707	813187
2	1174685	1179176	1157967	1184835
3	1501479	1553601	1504838	1536954
4	1862339	1899683	1913328	1956598
5	2254802	2311704	2287600	2330870

## Anexo C - Resultados estatísticos

- Resultados estatísticos da curva de calibração da Vanilina

### SUMÁRIO DOS RESULTADOS

Estatística de regressão	
R múltiplo	0,999785616
Quadrado de R	0,999571277
Quadrado de R ajustado	0,999464096
Erro-padrão	15119,62423
Observações	6

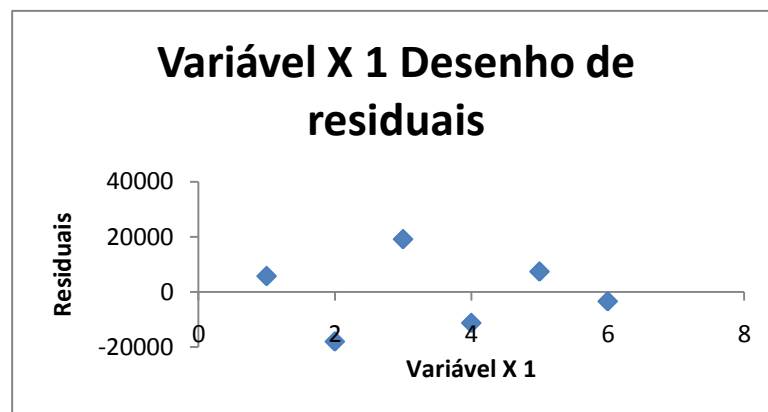
### ANOVA

	gl	SQ	MQ	F	F de significância
Regressão	1	2,13196E+12	2,13196E+12	9326,033675	6,89361E-08
Residual	4	914412146,9	228603036,7		
Total	5	2,13287E+12			

	Coefficientes	Erro-padrão	Stat t	valor P	95% inferior	95% superior	Inferior 95,0%	Superior 95,0%
Interceptar	99455	14075,6	7,066	0,0021	60375	138535	60375	138535
Variável X1	349036	3614,3	96,57	6,89E-08	339001	359071	339001	359071

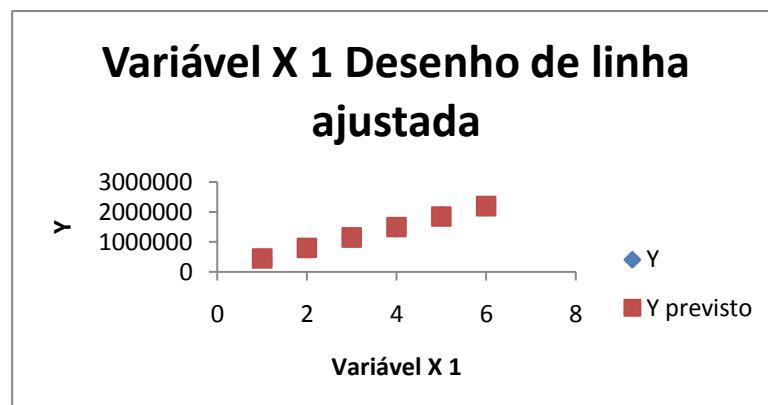
RESULTADO RESIDUAL

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>	<i>Residuais-padrão</i>
1	448491,3095	5801,440476	0,428992648
2	797527,5024	-17914,25238	-1,32468524
3	1146563,695	19188,30476	1,41889617
4	1495599,888	-11181,1381	-0,826799148
5	1844636,081	7447,169048	0,550687503
6	2193672,274	-3341,52381	-0,247091934



RESULTADOS DE PROBABILIDADE

<i>Percentil</i>	<i>Y</i>
8,333333333	454292,75
25	779613,25
41,66666667	1165752
58,33333333	1484418,75
75	1852083,25
91,66666667	2190330,75



- **Resultados estatísticos da curva de calibração do 3,4-dihidroxibenzaldeído**

**SUMÁRIO DOS RESULTADOS**

<i>Estatística de regressão</i>	
R múltiplo	0,999844985
Quadrado de R	0,999689994
Quadrado de R ajustado	0,999586659
Erro-padrão	12005,9169
Observações	5

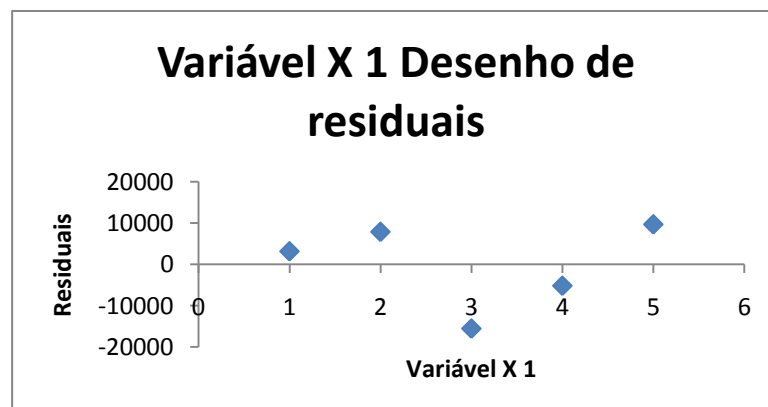
**ANOVA**

	<i>gl</i>	<i>SQ</i>	<i>MQ</i>	<i>F</i>	<i>F de significância</i>
Regressão	1	1,39446E+12	1,39446E+12	9674,237672	2,31678E-06
Residual	3	432426122,1	144142040,7		
Total	4	1,3949E+12			

	<i>Coefficientes</i>	<i>Erro-padrão</i>	<i>Stat t</i>	<i>valor P</i>	<i>95% inferior</i>	<i>95% superior</i>	<i>Inferior 95,0%</i>	<i>Superior 95,0%</i>
Interceptar	419453	12591,9	33,3	5,95E-05	379380	459526	379380	459526
Variável X 1	373425	3796,6	98,4	2,32E-06	361343	385508	361343	385508

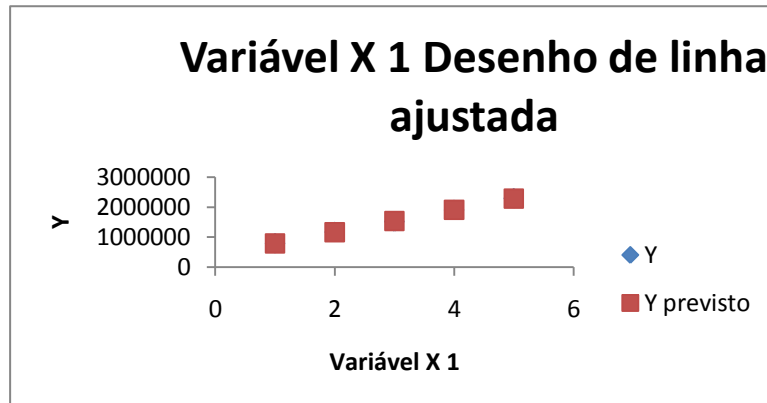
**RESULTADO RESIDUAL**

<i>Observação</i>	<i>Y previsto</i>	<i>Residuais</i>	<i>Residuais-padrão</i>
1	792878,05	3150,2	0,302978745
2	1166303,325	7862,425	0,75618934
3	1539728,6	-15510,6	-1,491772625
4	1913153,875	-5166,875	-0,496937751
5	2286579,15	9664,85	0,929542291



RESULTADOS DE PROBABILIDADE

Percentil	Y
10	796028,25
30	1174165,75
50	1524218
70	1907987
90	2296244



**Anexo D - Cromatograma obtido para uma solução mistura de vanilina e 3,4-dihidroxibenzaldeído por HPLC, utilizando como fase móvel - A: água - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)) e B: ACN - ácido fosfórico 0,01M (99:1 (v/v)), com programa de gradiente.**

