

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**

Rafaela Silva Lamarca

**Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica para Determinação
de Ácidos Fenólicos em Amostras de Azeite de Dendê (*Elaeis
guineensis*) por HPLC com Detecção Simultânea no UV e
Eletroquímica (*homemade*)**

**Juiz de Fora
2015**

Rafaela Silva Lamarca

Desenvolvimento de uma Metodologia Analítica para Determinação de Ácidos Fenólicos em Amostras de Azeite de Dendê (*Elaeis guineensis*) por HPLC com Detecção Simultânea no UV e Eletroquímica (*homemade*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial a obtenção do grau de Mestre em Química. Área de concentração: Química Analítica

Orientadora: Profa. Dra. Maria Auxiliadora Costa Matos

**Juiz de Fora
2015**

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Silva Lamarca, Rafaela.

Desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de ácidos fenólicos em amostras de azeite de dendê (*Elaeis guineensis*) por HPLC com detecção Simultânea no UV e eletroquímica (homemade) / Rafaela Silva Lamarca. -- 2015.
77 p. : il.

Orientadora: Maria Auxiliadora Costa Matos
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Instituto de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Química, 2015.

1. HPLC. 2. Detector eletroquímico. 3. Detecção ultravioleta. 4. Ácidos fenólicos. 5. Azeite de dendê. I. Costa Matos, Maria Auxiliadora, orient. II. Título.

*Dedico aos meus amados pais, meu
irmão e meu namorado.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, o mentor desta conquista e grande responsável por tornar este sonho realidade e por me dar forças quando eu achava que não mais as tinha.

Aos meus pais Lucília e José Rafael, pelo amor incondicional, carinho, confiança, por me apoiarem em todas as ocasiões e principalmente, por terem me dado os alicerces para que eu chegasse até aqui. Agradeço por sempre me incentivarem a sempre buscar o conhecimento, mesmo que para isso vocês tivessem que abrir mãos dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Ser sua filha é motivo de orgulho para mim. AMO VOCÊS!

Ao meu irmão Thiago, companheiro fiel, amigo de todas as horas, confidente, por sempre ter estado junto comigo e por diversas vezes ter me concedido o acalento de um abraço apertado e um ombro para que pudesse desabafar todas as minhas angústias. Você é como um filho para mim!

Ao meu namorado Douglas, parceiro, amigo, confidente, e por tornar mais alegres meus dias e por me compreender de maneira única, além de amar incondicionalmente. A sua presença alegra meus dias!

À minha querida orientadora, Maria Auxiliadora, pela grande amizade, por confiar em mim ao longo deste trabalho e principalmente por me permitir trabalhar com ela ao longo desses 5 anos, em que fui sua aluna de iniciação científica e mestranda. Você sempre se fará presente em minha vida.

Ao professor Renato, que foi mais que um amigo, foi um verdadeiro anjo “eletroanalítico”, sempre disposto a me ajudar em todas as etapas deste trabalho, sem o qual nunca teria conseguido levar adiante esta dissertação.

Aos meus avós, Ermelinda, Geraldo e Rita, que não puderam estar presentes na concretização desta conquista, mas que a todo momento estavam intercedendo junto à Deus por mim, para que eu percorresse dignamente os caminhos que me levariam ao meu tão sonhado título. Ao meu avô Sincero, minha eterna gratidão e carinho por sempre se lembrar de mim e principalmente, por orar quando eu mais necessitava, mesmo sem ao menos saber do quanto suas orações estavam me dando forças.

As minhas tias: Carmem, Rosimar, Nadir e principalmente a tia Gracinha obrigada pela torcida de sempre, pelo apoio e palavras motivadores, que me encorajavam cada dia mais a me tornar a mestre que hoje sou.

Aos meus amigos, Leonã, Dirlene e Adriane, por todo companheirismo e amizade sincera, sempre me aconselhando sabiamente e que sempre foram mais que um ombro amigo, foram irmãos

que a faculdade me concedeu a honra de possuir em minha vida. Ao Leonã, minha eterna gratidão pelas inúmeras vezes que me fez companhia até tarde na universidade e que sempre alegrava meu dia com um simples abraço de amigo.

Aos queridos amigos: Alice, Ângela, Aparecida, Fausto, Fernanda, Guilherme, Gustavo, Jemima, Jordana Abreu, Marcos, Mellina, Naira, Natália, Renata Sato, Roberto, Thaís e em especial, ao Bruno e Taimara que tornaram meus dias de trabalho mais prazerosos e descontraídos. Aos colegas do NEEM obrigado pelas inúmeras vezes em que me concederam o espaço para utilização de equipamentos.

Aos mestres do departamento de química, minha eterna gratidão por todos os conhecimentos compartilhados.

Aos técnicos: Fernando, Hilda, Gedair e Bárbara Lara, pelas prazerosas conversas entre os testes das aulas experimentais e trocas de tutorias.

Ao programa de pós-graduação em química pela oportunidade do aprendizado.

Agências de fomento, minha gratidão pelo suporte financeiro concedido ao longo de todo este caminhar.

E a todos que sempre torceram por mim, muito obrigada!

RESUMO

As substâncias fenólicas têm se tornado objeto de investigação, devido aos inúmeros benefícios à saúde humana e a influência na qualidade alimentícia. Neste trabalho determinou-se os ácidos fenólicos presentes no azeite de dendê, de fabricação artesanal e industrializado. Para estas análises utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC Agilent 1100 series), injetor manual com válvula *Rheodyne* de 20 μ L, coluna de fase Reversa C18 Inertsil ODS-3, coluna de guarda Inertsil ODS, detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas (UV-VIS MWD). Ao canal de resíduos do HPLC foi adaptada uma célula eletroquímica, com capacidade de 1,00 mL, sendo esta composta por três eletrodos: eletrodo de trabalho, carbono vítreo; eletrodo de referência, Ag/AgCl (KCl_{sat}) e eletrodo auxiliar de aço inox. As medidas eletroquímicas foram realizadas em um potenciostato μ Autolab type III, conectado a um microcomputador, utilizando o software GPES 4.9. As análises foram realizadas de forma simultânea em ambos detectores, em uma mesma injeção. A fase móvel otimizada foi capaz de separar os analitos totalmente, sendo esta composta pela mistura uma solução aquosa de H_3PO_4 pH 2,40 + $NaClO_4$ a 7 mmol.L⁻¹/isopropanol (87:13 v/v), por eluição isocrática. O comprimento de onda utilizado na detecção UV foi 225 nm. As medidas amperométricas foram realizadas no potencial de +1,1 V para todos os analitos. A recuperação das amostras foi realizada através da padronização interna, utilizando o ácido o-cumárico como padrão interno (PI) e o ácido m-cumárico como padrão *surrogate* (PS). A recuperação do PS foi superior a 75% em ambos detectores para todas as amostras. Os limites instrumentais para detecção UV variaram de 0,019 (ácido siríngico) a 0,029 mg.L⁻¹ (ácido ferúlico) e de quantificação 0,063 (ácido siríngico) a 0,095 mg.L⁻¹ (ácido sinápico); já para a detecção eletroquímica (DE) os limites de detecção encontraram-se na faixa de 0,015 (ácido p-cumárico) a 0,079 mg.L⁻¹(ácido ferúlico) e os de quantificação 0,050 (ácido p-cumárico) a 0,27 mg.L⁻¹(ácido ferúlico). As concentrações dos ácidos fenólicos nas amostras de azeite de dendê de fabricação artesanal, variaram de 0,12 a 10,3 mg.L⁻¹ (detecção UV) e de 1,0 a 11,0 mg.L⁻¹ (DE). Já as concentrações obtidas nas amostras de azeite de dendê industrializadas variaram de 0,21 a 14,7 mg.L⁻¹ (detecção UV) e de 3,0 a 11,9 mg.L⁻¹ (DE). O sistema HPLC-UV-DE mostrou-se promissor nas análises dos ácidos fenólicos nestas e em outras matrizes complexas.

Palavras- chaves: HPLC, Detector Eletroquímico, Detecção Ultravioleta, Ácidos Fenólicos, Azeite de Dendê.

ABSTRACT

Phenolic substances have become the subject of investigation due to the numerous benefits to human health and the influence in the food quality. In this work, the phenolic acids in homemade and industrialized palm oil were determined. For these analyzes, it was used a high performance liquid chromatograph (HPLC Agilent 1100 series) with a manual 20 μ L *Rheodyne* valve, a reverse phase column C18 Inertsil ODS-3, a guard column Inertsil ODS and a UV-VIS detector for multiple wavelengths (UV-VIS MWD). At the end of HPLC waste channel was adapted an electrochemical cell with a capacity of 1.00 mL, with a standard three-electrode configuration, consisting of glassy carbon working electrode, a Ag/AgCl (KCl_{sat}) reference electrode and stainless steel needle as counter electrode. The electrochemical measurements were made using a μ Autolab type III potentiostat, with its data acquisition software (GPES 4.9 version). The detections were performed sequentially, in the same injection. The optimal mobile phase was able to completely separate the analytes by isocratic elution, being composed of an aqueous solution of H_3PO_4 pH 2.40, containing 7mmol.L⁻¹ of NaClO_4 /isopropanol (87:13 v/v). The wavelength used for the UV detection was 225 nm. The amperometric measurements were performed at +1.1 V for all analytes. The recovery of the samples was performed using internal standardization, using o-coumaric acid as internal standard (PI) and m-coumaric acid as standard surrogate (PS). The recovery of PS was over 75% on both detectors for all samples. The instrumental limits for UV detection ranged from 0.019 (syringic acid) to 0.029 mg L⁻¹ (ferulic acid) and quantification limits from 0.063 (syringic acid) to 0.095 mg L⁻¹ (sinapic acid). In the same way, for electrochemical detection (ED) the instrumental limits was found in the range of 0.015 (p-coumaric acid) at 0.079 mg L⁻¹ (ferulic acid), and the quantification limits were between 0.050 (p-coumaric acid) and 0.27 mg L⁻¹ (ferulic acid). The concentration of phenolic acids in homemade palm oil samples ranged from 0.12 to 10.3 mg L⁻¹ (UV detection) and from 1.0 to 11.0 mg L⁻¹ (ED). The concentrations obtained in the industrialized palm oil samples varied from 0.21 to 14.7 mg L⁻¹ (UV detection) and from 3.0 to 11.9 mg L⁻¹ (ED). The HPLC-UV-ED system has shown promise in the analysis of these phenolic acids in this and other complex matrices.

Key-words: HPLC, Electrochemical Detector, Ultraviolet Detection, Phenolic acids, Palm Oil.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Estruturas dos principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos	19
Figura 2: Estrutura base dos flavonoides	20
Figura 3: Estrutura dos principais ácidos estudados	21
Figura 4: Principais estruturas dos ácidos estudados	23
Figura 5: Fotografia de um dendzeiro: (A) palmeira, (B) cacho e (C) fruto.	24
Figura 6: Corte do fruto Dendê	25
Figura 7: Detalhes do acoplamento da célula eletroquímica ao detector UV, ênfase na célula eletroquímica <i>homemade</i>	33
Figura 8: Imagens das amostras de azeite de dendê adquiridas	36
Figura 9: Fluxograma de tratamento das amostras.....	38
Figura 10: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos através da aplicação de diferentes potenciais para os ácidos fenólicos estudados na concentração de 10 mg.L ⁻¹ cada, diluídos em fase móvel composta por isopropanol e solução de H ₃ PO ₄ pH 2,40 + NaClO ₄ (7 mmol.L ⁻¹); proporções dos solventes (13:87).	44
Figura 11: Cromatograma da solução padrão MIX 10 mg.L ⁻¹ dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática com solução de H ₃ PO ₄ pH 2,15/ACN/MeOH (74,5:13:12,5 v/v), fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ . Tempo de eluição 30 min.	45
Figura 12: Cromatograma da MIX 10 mg.L ⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluições em gradientes exploratórios: (A) solução de H ₃ PO ₄ pH 2,40/ACN (100:0) em 0 min a (0:100) em 60 min, fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ ; (B) solução de H ₃ PO ₄ pH 2,40/MeOH (100:0) em 0 min a (0:100) em 60 min, fluxo 1,0 mL.min ⁻¹	47
Figura 13: Cromatograma da MIX 10 mg.L ⁻¹ dos ácidos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática, fluxo 1,0 mL.min ⁻¹ : (A) solução de H ₃ PO ₄ pH 2,40/ACN	

(79:21), tempo de eluição 20 min. (B) solução de H₃PO₄ pH 2,40/MeOH (64:36), tempo de eluição 25 min. 48

Figura 14: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente solução de H₃PO₄ pH 2,40/metanol: 1 a 10% de metanol em 5 min, 10 a 40% de metanol de 5 a 25 min, 40 % de metanol de 25 a 35 min, fluxo 1,0 mL.min⁻¹. Tempo de eluição 38 min. 49

Figura 15: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente exploratório de solução de H₃PO₄ pH 2,40 /isopropanol (100:0) em 0 min. a (0:55) em 30 min., fluxo 0,5 mL.min⁻¹. 50

Figura 16: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente solução de H₃PO₄ pH 2,40/isopropanol: 1 a 22% de isopropanol em 18 min, 22% isopropanol de 18 a 21 min, 22 a 24% de isopropanol de 21 a 23 min, fluxo 0,7 mL.min⁻¹. Tempo de eluição 34 min. 51

Figura 17: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática solução de H₃PO₄ pH 2,40 e NaClO₄ 7 mmol.L⁻¹ /isopropanol (87:13 v/v), fluxo 1,0 mL.min⁻¹. Tempo de eluição 43 min. 52

Figura 18: Cromatogramas obtidos para as soluções injetadas entre os 1^o e 12^o dia na condição otimizada de eluição isocrática com solução de H₃PO₄ pH 2,40 e NaClO₄ 7 mmol.L⁻¹ /isopropanol (87:13 v/v), fluxo 1mL.min⁻¹. 53

Figura 19: Gráfico dos testes com a porcentagem de recuperação para os seis analitos em estudo em ambos detectores, com a utilização da sonicação por ultrassom nos tempos, T0, T10 e T15 minutos. 55

Figura 20: Esquema de tratamento das amostras 57

Figura 21: Etapas dos tratamentos das amostras: (A) amostras após pesagem e adição de HCl pH 2; (B) etapa de extração com uso de n-hexano; (C) etapa de extração com acetato de etila; (D) parte orgânica removida para posterior rotaevaporação. 58

Figura 22: Curvas analíticas obtidas para os respectivos detectores ultravioleta (UV) e eletroquímico (DE) 61

Figura 23: Sobreposição das curvas analíticas para a faixa de concentração de 3 a 20 mg. L⁻¹ dos ácidos: (1) sirínico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. 62

Figura 24: Perfil das amostras analisadas por ambos detectores: (a) UV; (b) DE 68

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Equilíbrio químico.....	28
Esquema 2: Esquema da detecção simultânea UV e eletroquímica.....	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Condições experimentais para partição dos analitos e PS das amostras de azeite de dendê com a solução aquosa de HCl pH 2.	37
Quadro 2: Dados dos analitos analisados.....	46
Quadro 3: Teste t para ambos os detectores UV e DE.....	59
Quadro 4 : Teste t para ambos os detectores UV e DE nas amostras analisadas.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Curvas analíticas, FR, DPR_{FR} obtidos para os ácidos fenólicos estudados em presença de fase móvel composta de isopropanol e solução de H_3PO_4 pH 2,40 (13:87)..	60
Tabela 2: Limites de detecção e quantificação.....	63
Tabela 3: Cálculos dos estudos de repetitividade para ambas as detecções em estudo	64
Tabela 4: Médias das recuperações obtidas para amostras fortificadas (n = 3) e brancos fortificados (n = 3) em ambos os detectores quando foi utilizado a fortificação a 10 mg.L^{-1}	65
Tabela 5: Concentração (mg L^{-1}) dos ácidos fenólicos e recuperação do padrão surrogate nas amostras de azeite de dendê comerciais (A e B) e artesanais (C e D) determinados por HPLC com detector UV e detector eletroquímico homemade.....	67
Tabela 6: Comparação dos dados obtidos pelo método desenvolvido e o reportado pela literatura	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a Coeficiente angular da equação da curva analítica.

ACN Acetonitrila

BHA Butilhidroxianisol

BHT Butilhidroxitolueno

C_A Concentração do analito obtida na amostra original

C_{add} Concentração do analito adicionada a amostra fortificada

C_{AF} Concentração do analito obtida na análise na amostra fortificada

CPS Concentração do padrão *surrogate*

GC Cromatografia gasosa

CE Eletroforese capilar

Cam Concentração medida na amostra

D Coeficiente de difusão

DE Detector eletroquímico

DPR% Desvio padrão relativo percentual

EA Eletrodo auxiliar

ER Eletrodo de referência

ET Eletrodo de trabalho

PTFE Politetrafluoretileno

FM Fase móvel

HPLC Cromatografia líquida de alta eficiência

LC-MS Cromatografia líquida com espectrômetro de massa

LD Limite de detecção

LDL Lipoproteína de baixa densidade

LQ Limite de quantificação

Koc Coeficiente de partição

MeOH Metanol

MIX Mistura padrão contendo os 8 ácidos diluídos em fase móvel obtendo-se a concentração final de 10 mg.L^{-1}

MS Espectrômetro de massa

MWD Detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas

PI Padrão interno

PS Padrão *surrogate*

r Coeficiente de Pearson

R_i Percentagem de recuperação do analito

rpm Rotações por minuto

R% (PS) Percentual de recuperação do PS

S_A Sinal do analito

S_b Desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica

S_{PS} Sinal do padrão *surrogate*

THF Tetrahydrofurano

t_r Tempo de retenção

US Ultrassom

UV Ultravioleta

VIS Visível

SUMÁRIO

1) Introdução	18
1.1) Antioxidantes	18
1.2) Substâncias fenólicas	20
1.3) Dendê (<i>Elaeis guineensis</i>)	24
1.4) Técnicas analíticas empregadas para análises dos óleos vegetais	26
1.5) Cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa	27
1.5.1) Características físico-químicas da fase móvel	29
1.6) Amperometria	29
2) Objetivos	31
2.1) Objetivo geral	31
2.2) Objetivos específicos	31
3) Parte experimental.....	32
3.1) Reagentes	32
3.2) Instrumentação para a análise	32
3.3) Estudo da otimização da fase móvel.....	34
3.4) Estudo dos parâmetros para detecção eletroquímica	35
3.5) Preparo das soluções estoques e testes de estabilidade	35
3.6) As amostras de azeite de dendê	36
3.7) Otimização do método de extração das amostras	36
3.8) Avaliação do método	39
3.8.1) Curva analítica por padronização interna	39
3.8.2) Linearidade da curva analítica	40
3.8.3) Limites de detecção, quantificação instrumental e repetitividade	40
3.8.4) Avaliação da exatidão	41
3.8.4.1) Recuperação do padrão <i>surrogate</i>	41
3.8.4.2) Recuperação das amostras e brancos fortificados	42
3.8.5) Análise das amostras de azeite	43
4) Resultados e discussões	44
4.1) Parâmetros de análise para detecção eletroquímica	44
4.2) Estudo da otimização da fase móvel para HPLC	45

<i>4.3) Testes de estabilidade das soluções trabalho</i>	52
<i>4.4) Otimização do método de extração das amostras</i>	54
<i>4.5) Avaliação do método</i>	59
4.5.1) Padronização interna - Estudo das curvas analíticas	59
4.5.2) Limites de detecção e quantificação instrumental e repetitividade	63
4.5.3) Estudo da exatidão (recuperação) das amostras fortificadas e padrão surrogate	64
4.5.4) Análise das amostras.....	65
5) Conclusões	71
Referências	73

1) Introdução

1.1) Antioxidantes

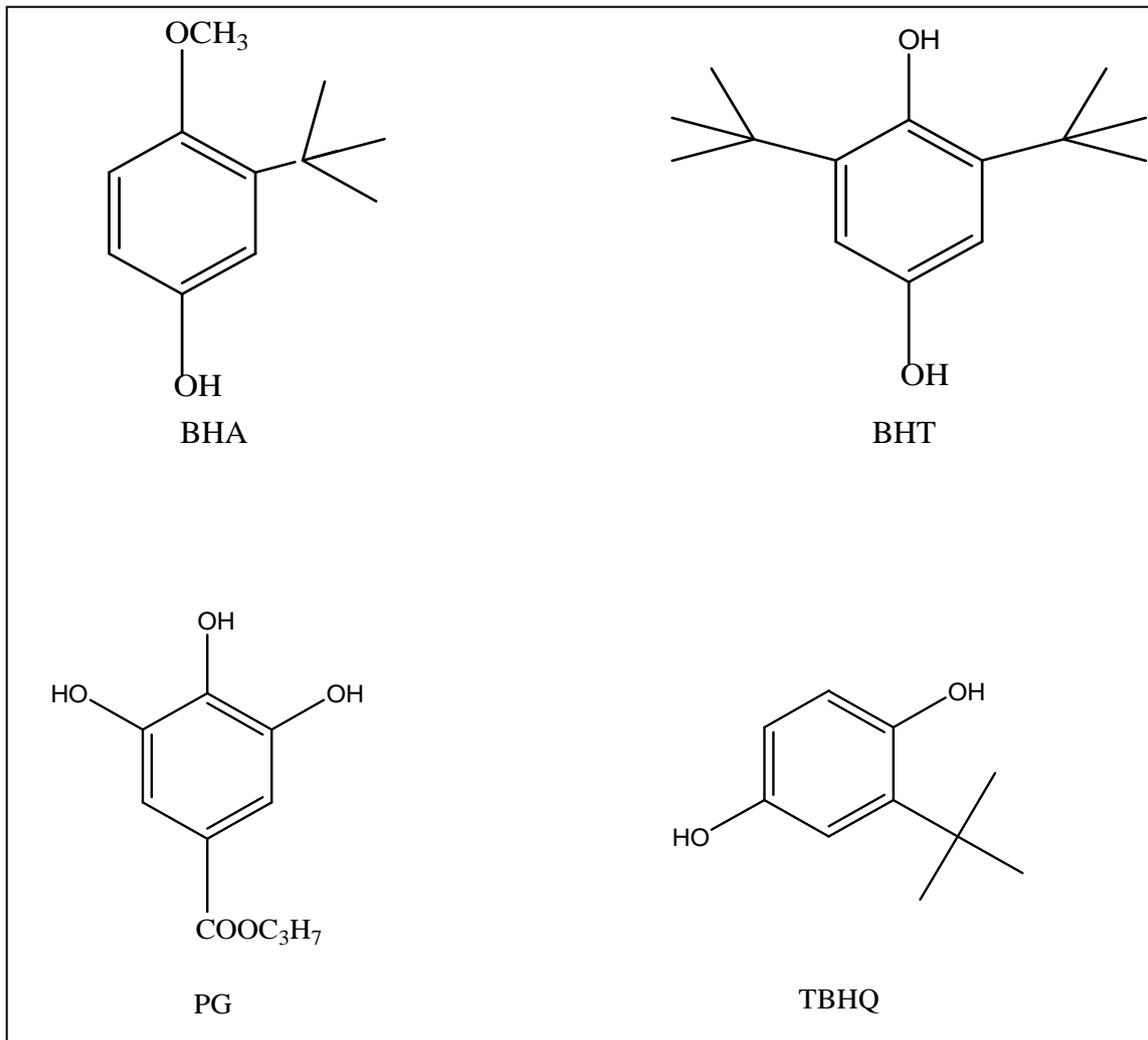
O envelhecimento humano tem um papel crucial nas alterações celulares e teciduais dentro do organismo, levando à incidência de doenças graves e até mesmo a morte (ANDRADE *et al.*, 2007; SOUNDARARAJAN & SREENIVASAN, 2012). Vários fatores são determinados como os precursores de tal processo, dentre eles, hereditariedade, qualidade do estilo de vida, hábitos alimentares, condições ambientais e genéticas, gerando assim os chamados danos oxidativos.

Diversos estudos apontam que o principal causador destes danos oxidativos celulares são os radicais livres. Estes contêm um ou mais elétrons desemparelhados existindo independentemente no meio (GUTTERIDGE, 1995). É justamente esse elétron não emparelhado que lhe confere alta reatividade, pois faz com que ele se ligue a qualquer outro elétron muito facilmente, provocando assim as chamadas reações em cadeia (LI *et al.*, 2014; SOUSA *et al.*, 2007). Estes são encontrados em várias fontes externas como, por exemplo, poluentes atmosféricos, fumo, dentre outros (BAGCHI, 1998).

Os radicais livres não só promovem a oxidação em compostos biológicos, mas também a oxidação lipídica em alimentos, fazendo com que estes percam qualidade nutricional, apresentem odor e sabor desagradáveis, além da redução do tempo de prateleira e formação de compostos potencialmente tóxicos (SOARES, 2002).

No entanto, as oxidações lipídicas podem ser evitadas através da inserção de substâncias antioxidantes sintéticas em alimentos que visam impedir ou cessar as reações oxidativas (LUZIA & JORGE, 2010; SOARES, 2002). Dentre os diversos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria alimentícia, destacam-se como os principais: butilhidroxianisol (BHA), butilhidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e butil hidroquinona terciária (TBHQ) (figura 1), que embora amplamente utilizados ainda geram controvérsias frente à comunidade científica, pois têm sido associados a estes, efeitos indesejáveis em animais, como por exemplo, carcinomas, hiperplasias gastrointestinais e redução dos níveis de hemoglobina de causas ainda desconhecidas (LIU & YAO, 2007; RAMALHO & JORGE, 2006).

Figura 1: Estruturas dos principais antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos



Fonte: Próprio autor, 2015.

A ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) regulamenta como teor máximo de antioxidantes sintéticos permitidos em óleos e gorduras de 0,01 g/100g para BHT e PG e, 0,02 g/100g para BHA e TBHQ. Com isso vários estudos têm buscado formas de substituir estes antioxidantes sintéticos por naturais ou até mesmo associá-los de forma a garantir melhores resultados sem comprometer a saúde humana (RAMALHO & JORGE, 2006).

Assim, os antioxidantes naturais são uma boa forma de prevenir a oxidação em alimentos e células, além de evitar danos carcinogênicos e mutagênicos em tecidos e órgãos. Dentre os antioxidantes naturais mais encontrados, destacam-se os compostos fenólicos, tocoferóis e os extratos de plantas (BROINIZI *et al.*, 2007; RAMALHO & JORGE, 2006). As substâncias

fenólicas podem ser encontradas nas suas formas livres ou ligadas de polifenóis, ácidos fenólicos e flavonoides (SENEVIRATNE & DISSANAYAKE, 2008).

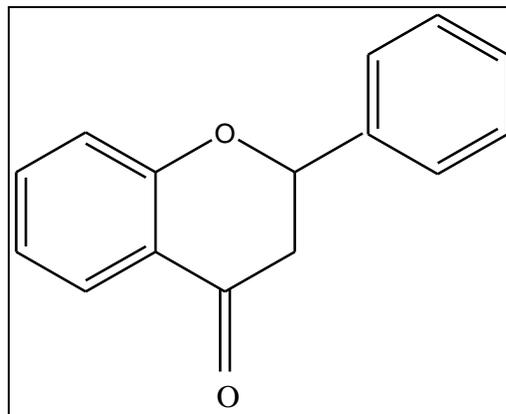
1.2) Substâncias fenólicas

As substâncias fenólicas têm se tornado objeto de estudos em várias comunidades acadêmicas, devido aos inúmeros benefícios à saúde humana e a influência na qualidade alimentícia. Englobam desde moléculas simples, até moléculas com alto grau de polimerização que agem sequestrando os radicais livres ou quelando os metais, agindo desta forma nas etapas iniciais dos processos oxidativos (SOARES, 2002; SOUSA *et al.*, 2007).

A família das substâncias fenólicas dividem-se em dois grandes grupos: flavonoides e derivados e os ácidos fenólicos e cumarinas (SOARES, 2002).

Os flavonoides (figura 2) e derivados caracterizam-se por possuírem em sua estrutura quinze átomos de carbonos arranjados em três anéis, sendo dois fenólicos (DORNAS *et al.*, 2007). O grupo dos flavonoides subdivide-se nas seguintes classes: antocianidinas, flavona, flavonóis, auronas, chalconas e isoflavonas que lhes conferem cor e aromas característicos (BRAVO, 1998 *apud* DORNAS *et al.*, 2007).

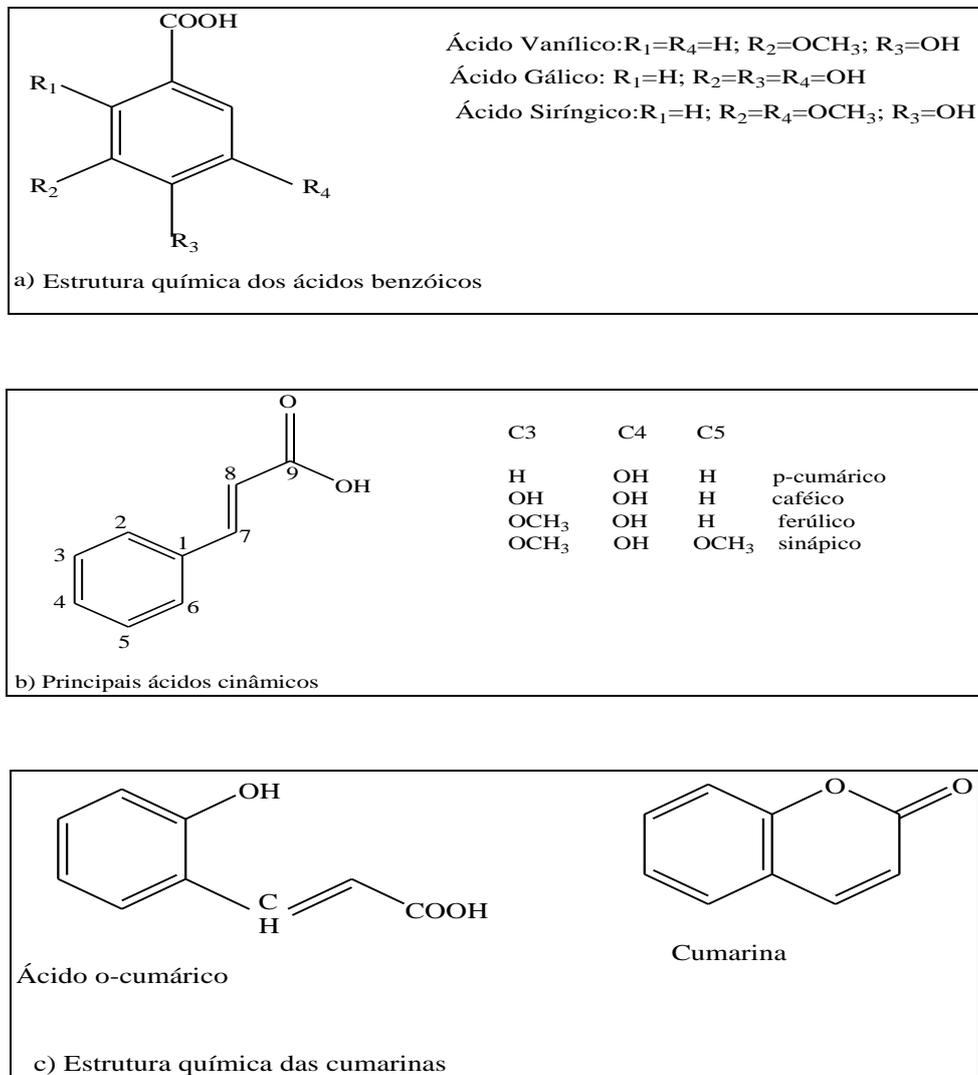
Figura 2: Estrutura base dos flavonoides



Fonte: Próprio autor, 2015.

Os ácidos fenólicos apresentam um anel benzênico, um grupamento carboxílico, grupo(s) hidroxila e/ou metoxila que lhes confere importantes propriedades antioxidantes naturais, tanto para alimentos quanto para organismos (NEO *et al.*, 2010; RAMALHO & JORGE, 2006). São divididos em três grandes grupos a qual englobam os ácidos benzóicos, cinâmicos e as cumarinas (SOARES, 2002). No primeiro grupo encontra-se os derivados dos ácidos benzóicos que apresentam 7 carbonos em sua estrutura (figura 3a), no segundo grupo há os derivados dos ácidos cinâmicos com 9 carbonos na estrutura (figura 3b) e o último e terceiro grupo é formado pelas cumarinas (figura 3c) que são derivadas do ácido cinâmico pela ciclização da cadeia lateral do ácido o-cumárico (RAMALHO & JORGE, 2006).

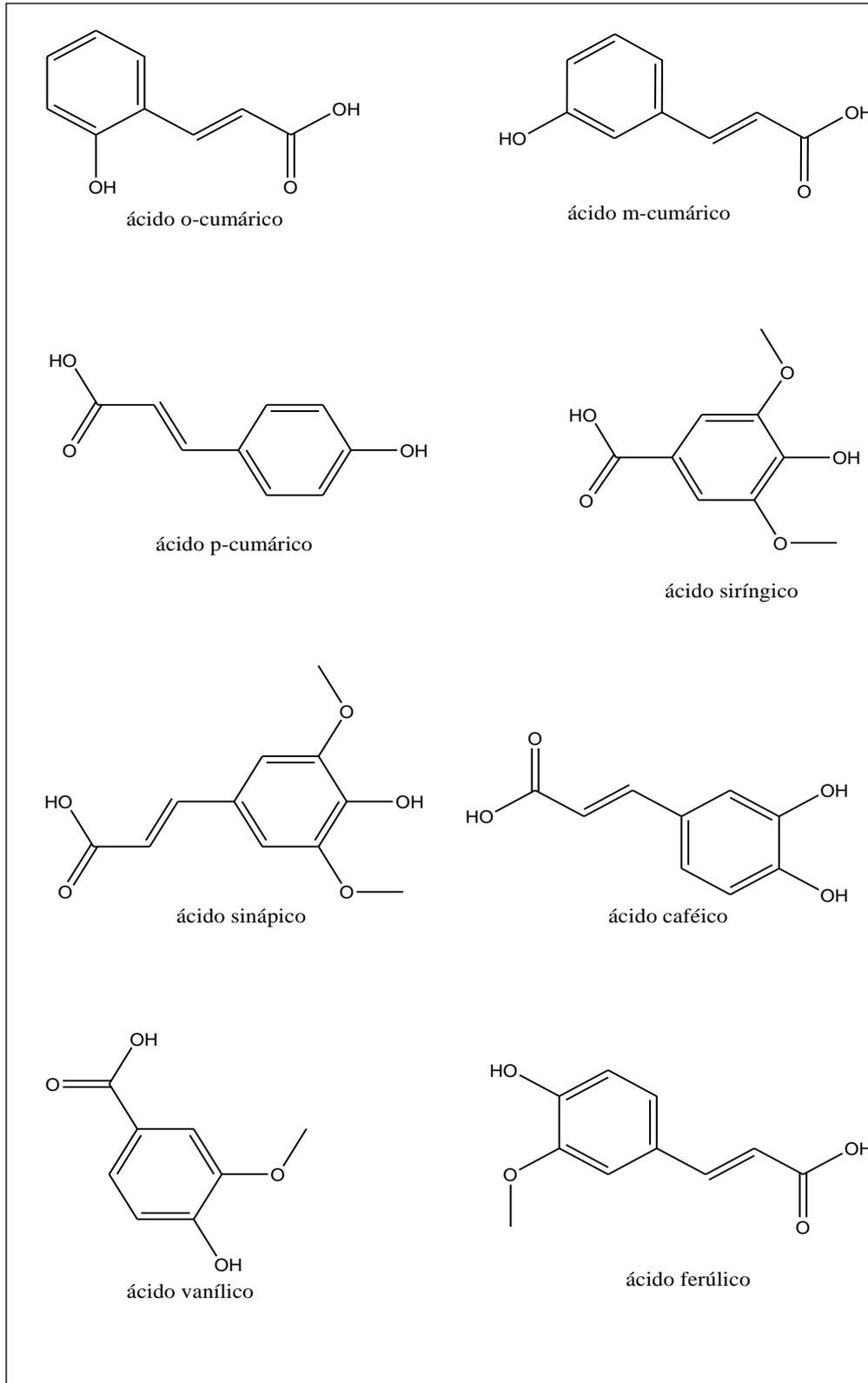
Figura 3: Estrutura dos principais ácidos estudados



Fonte: Adaptado de SOARES, 2002.

Os ácidos fenólicos naturais também são encontrados nos azeites, em especial no de dendê e oliva extra-virgem conferindo-lhes alto valor antioxidante e organoléptico, caracterizando-os como os principais azeites estudados no mundo inteiro (SENEVIRATNE & DISSANAYAKE, 2008). Várias culturas fazem uso da tradicional dieta do mediterrâneo, que é rica em substâncias fenólicas, pois acreditam que estas poderiam melhorar a qualidade de vida da sua população, além de oferecer uma diminuição nos riscos de doenças coronarianas (PEREZ-JIMENEZ *et al.*, 2005; RUBIO-SENENT *et al.*, 2013). Desta forma vários estudos de diferentes comunidades científicas apontam que os principais ácidos fenólicos envolvidos na atividade antioxidante em alimentos são os ácidos: caféico, ferúlico, p-cumárico e clorogênico (SOARES, 2002).

No presente trabalho foram estudados os principais ácidos fenólicos elucidados na literatura, sendo eles: caféico, ferúlico, sinápico, siríngico, vanílico, p-cumárico, além dos padrões interno (o-cumárico) e *surrogate* (m-cumárico) (figura 4).

Figura 4: Principais estruturas dos ácidos estudados

Fonte: Próprio autor, 2015.

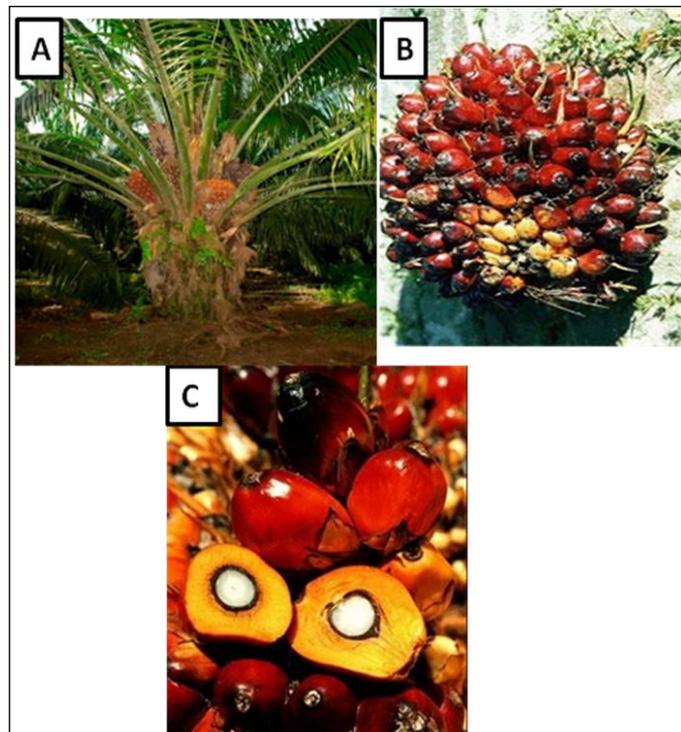
1.3) Dendê (*Elaeis guineensis*)

Originário do oeste africano, o *Elaeis guineensis* foi introduzido no Brasil e nos países tropicais no século XV pelos portugueses (SAMBANTHAMURTHI & SUNDRAM & TAN, 2000).

O dendezeiro se adaptou ao clima do Brasil, tendo sido encontrado mais pronunciadamente nos estados do Pará e Bahia. Produzido no território Brasileiro, em solos com profundidades que variam de 20 a 60 cm, este apresenta grande potencial de produção geralmente em torno de 20 a 22 toneladas de cachos frescos por hectare por ano, que originam cerca de 4,0 a 5,0 toneladas de óleo de palma por hectare por ano. A palmeira necessita de bastante água e insolação para seu crescimento, onde a falta destes fatores faz com que elas tenham baixo crescimento da planta e consequentemente baixa produção (BASTOS, 2001; SILVA, 2006).

O fruto obtido do dendezeiro (figura 5C) necessita de aproximadamente cinco meses e meio para seu completo amadurecimento, que o faz mudar da cor verde para vermelho-alaranjado fato atribuído a maior concentração de carotenoides (SILVA, 2006).

Figura 5: Fotografia de um dendezeiro: (A) palmeira, (B) cacho e (C) fruto.



Fonte: Adaptada de Embrapa, 2015.

A palmeira da *Elaeis guineensis* (figura 5A) produz dois principais tipos de óleos que são o óleo de palma, que deriva do mesocarpo do fruto (polpa) e o óleo de palmiste, que é produzido com o endosperma do fruto (amêndoa) (Figura 6) (CURVELO, 2010).

Figura 6: Corte do fruto Dendê



Fonte: Adaptado de MPOB/Nature, 2015.

O óleo de palma hoje é produzido em 42 países, totalizando uma área de 11 milhões de hectares plantados no mundo (TEIXEIRA *et al.*, 2013). O óleo extraído da polpa do seu fruto, óleo de palma ou azeite de dendê, é um dos 17 principais óleos produzidos no mundo inteiro, perdendo somente para o óleo de soja, ocupando assim a segunda colocação na produção mundial (SAAD *et al.*, 2007). A crescente expansão no consumo do azeite de dendê vem sendo mais pronunciada pelos mercados orientais (DE CARVALHO & RODRIGUES ALVES & REIS, 2006).

O óleo extraído da palmeira oferece um elevado valor nutricional, é rico em micronutrientes como ferro, manganês, zinco, cobre além dos macronutrientes potássio, nitrogênio, cálcio e magnésio; ele vem se destacando também como um reservatório natural dos ácidos fenólicos que estão sendo cada dia mais procurados por grande parte da população (SILVA, 2006; SAAD *et al.*, 2007). Além dos micro e macronutrientes, traços de metais como, por exemplo, cobre e chumbo, podem ser encontrados no óleo de palma, devido ao processo de beneficiamento do fruto ou nos tanques de armazenamento do óleo (CYPRIANO & MATOS & MATOS, 2008).

O óleo de palma processado pode ser usado tanto para a obtenção de óleo de cozinha quanto na fabricação de detergentes. Quando seu uso for destinado à alimentação, o óleo de palma apresenta como principal finalidade oferecer uma coloração característica nos alimentos, graças ao seu elevado teor de carotenos, além de poder ser usado em dietas suplementares (MORTENSEN, 2005). Os compostos fenólicos encontrados no azeite de dendê apresentam características importantes como, por exemplo: capacidade de neutralizar os radicais livres, diminuir a produção de lipoproteínas de baixa densidade (LDL), inibir a agregação de plaquetas, além da alta atividade antimicrobiana (DE MARCO *et al.*, 2007).

Usado por grande parte do nordeste brasileiro, o óleo de palma é um importante “reservatório de qualidade de vida”, uma vez que seu uso apresenta a capacidade de promover a inibição dos processos oxidativos de células e tecidos. Em longo prazo pode se tornar também, uma alternativa eficaz na produção de combustível biodegradável (SILVA, 2006).

1.4) Técnicas analíticas empregadas para análises dos óleos vegetais

Dentre as principais técnicas utilizadas para determinação dos ácidos fenólicos em amostras de óleos vegetais, destacam-se: Eletroforese Capilar (CE), Cromatografia Gasosa (GC) e a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC).

Diferentes métodos baseados nestas técnicas são descritos na literatura para determinação de ácidos fenólicos em diversos tipos de matrizes, mas em quase todos os trabalhos publicados, o uso dos padrões *surrogate* e interno não são citados, além de não ter sido analisado separadamente todo o elenco de analitos proposto neste trabalho.

A utilização do padrão *surrogate* (PS) é importante na verificação de perdas decorrentes do preparo das amostras, tendo em vista, que este é adicionado logo após a pesagem das mesmas, passando por todo o processo de extração, sendo utilizado no cálculo da concentração final obtida. O padrão interno (PI), também utilizado neste trabalho, é adicionado na solução da amostra que será injetada no cromatógrafo e visa corrigir variações do sinal analítico devido às mudanças nas condições de análises, além de ser decisivo na para o cálculo da recuperação do PS. Ambos PS e PI, quando utilizados para esta finalidade, devem apresentar características semelhantes aos analitos a

serem utilizados, não devem estar presentes na matriz a ser analisada, tão pouco, coeluir com as substâncias de interesse.

Muitos trabalhos descritos pela literatura referem-se à análise de outros dois óleos vegetais (azeite de oliva e óleo de coco), onde é calculado o teor total dos ácidos fenólicos, normalmente expressos em termos de ácido gálico, ao invés de quantificá-los separadamente.

Nas análises envolvendo o óleo de coco a técnica mais difundida é HPLC com detector por fluorescência (SENEVIRATNE & HAPUARACHCHI & EKANAYAKE, 2009) enquanto para as análises de azeite de dendê as técnicas mais utilizadas são: HPLC-UV e LC-MS (NEO *et al.*, 2010).

DE MARCO *et al.*, 2007 determinou substâncias fenólicas em águas residuais oriundas da produção do azeite de oliva por HPLC-UV. RUBIO-SENENT *et al.*, 2013; SENEVIRATNE & HAPUARACHCHI & EKANAYAKE, 2009; TSIMIDOU & PAPADOPOULOS & BOSKOU, 1991, quantificaram os ácidos fenólicos, também por HPLC-UV e/ou HPLC-DAD, presentes no azeite de oliva. No entanto, nenhum destes trabalhos utilizaram a técnica da padronização interna.

Muitas técnicas supracitadas utilizadas na quantificação das substâncias fenólicas envolvem a quantificação de fenóis totais através de métodos espectrofotométricos na região do visível, onde através do reagente de Folin-Ciocalteu realiza-se a extração dos fenólicos e os quantifica através de uma curva com padrões que podem ser de ácido gálico, catequina ou hidroxitirosol (FARHAT *et al.*, 2013; CABRAL *et al.*, 2009; ISSAOUI *et al.*, 2010; MELO *et al.*, 2008; QIU & LIU & BETA, 2010). Nestes casos, normalmente a concentração dos fenólicos é expressa em termos destes ácidos.

Técnicas eletroanalíticas também têm sido empregadas na determinação de alguns antioxidantes, como por exemplo, ácido ascórbico, flavonoides, resveratrol (ALVES *et al.*, 2010).

1.5) Cromatografia líquida de alta eficiência por fase reversa

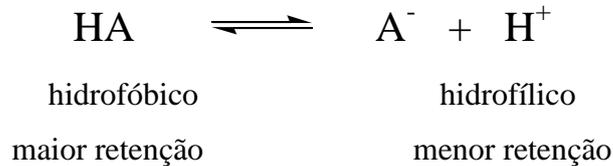
Diversos métodos de separação têm sido empregados a fim de promover uma separação eficiente dos analitos, dentre eles a cromatografia. A cromatografia é um método físico-químico de separação que consiste na partição dos componentes da mistura entre duas fases, conhecidas como fases móvel e estacionária, que estão em contato profundo. Existem inúmeras formas de se promover o processo cromatográfico, variando as fases móvel e estacionária. Uma técnica tem-se destacado nas últimas décadas e consiste no emprego de altas pressões para forçar os analitos a

passarem por uma coluna cromatográfica recheada, com diâmetro interno da ordem de micrômetros, esta técnica é conhecida cromatografia líquida de alta eficiência (COLLINS & BRAGA & BONATO, 2006).

A separação na cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) pode ser realizada por fase normal ou fase reversa (SNYDER & KIRKLAND & GLAJCH, 1997). Na fase normal a fase móvel apresenta caráter hidrofóbico, ou seja, menos polar, enquanto a fase estacionária apresenta caráter mais polar (hidrofílico). Quando se utiliza a separação por fase reversa, a principal característica é que a fase móvel terá caráter mais hidrofílico quando comparada com a fase estacionária que é mais hidrofóbica. Esta mudança de polaridade da fase estacionária ocorre graças à natureza dos grupos funcionais que a preenchem.

Na separação por fase reversa considerando que os analitos a serem estudados apresentam caráter ácido fraco (HA), esquema 1, é necessária a supressão da ionização dos mesmos, de forma que os compostos se apresentem na forma neutra de caráter mais hidrofóbico, tendo assim mais afinidade pela fase estacionária que também é apolar (hidrofóbica).

Esquema 1: Equilíbrio químico



Fonte: Próprio autor, 2015.

Nesta separação, deve-se sempre estar atento a supressão da ionização dos analitos, tendo em vista que a coluna não apresenta a capacidade de reter ânions e muito menos cátions, ela retém somente compostos com característica neutra. Desta forma o equilíbrio deve estar sempre deslocado para a esquerda (esquema 1), para que ocorra a sua separação dos componentes de interesse na amostra.

1.5.1) Características físico-químicas da fase móvel

Alguns critérios importantes devem ser seguidos antes da escolha do solvente adequado para ser utilizado na cromatografia líquida, a fim de não comprometer a vida útil do equipamento e dos dados obtidos. Destacam-se como mais importantes (COLLINS & BRAGA & BONATO, 2006):

- Apresentar alto grau de pureza, pois solventes impuros podem ser detectados pelo equipamento, promovendo mudanças na linha base, além de provocar obstrução de canais.
- Dissolver a amostra sem dissolver os componentes presentes, já que se necessita que a fase móvel seja capaz de transportar os analitos pela coluna sem provocar sua desintegração.
- Não dissolver a fase estacionária, tendo em vista que é através dela que ocorre as interações com os analitos.
- Apresentar baixa viscosidade, para não promover a degradação dos canais do equipamento.

1.6) Amperometria

As técnicas eletroquímicas têm-se destacado frente a outros métodos analíticos, por possuírem baixos custos instrumentais, facilidade de operação, baixos limites de detecção, alta sensibilidade, além de em muitos casos, não haver necessidade de etapas longas de preparo de amostras. Dentre as técnicas eletroquímicas disponíveis, os métodos voltamétricos, em especial a amperometria, têm ganhado destaque para as análises de uma infinidade de compostos, pois na amperometria o potencial é mantido constante ao longo da análise, sendo medido somente a corrente faradaica do processo de oxidação ou redução de algum composto eletroativo. Já a corrente

capacitiva, que é intrinsecamente atrelada à polarização do eletrodo, tende a tornar-se negligenciável com o decorrer do tempo (DOS SANTOS *et al.*, 2011).

A velocidade com que o analito se difunde através da solução rumo à direção do eletrodo de trabalho é proporcional a diferença de concentração dos analitos entre as duas regiões (HARRIS, 2005; SKOOG, 2006). Desta forma, a concentração do material eletroativo é diretamente proporcional a corrente de difusão faradaica medida (BRETT & BRETT, 1996).

2) Objetivos

2.1) *Objetivo geral:*

Desenvolver um método analítico para determinação dos ácidos siríngico, vanílico, caféico, sinápico, p-cumárico e ferúlico, em amostras de azeite de dendê por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção simultânea no UV e eletroquímica com acoplamento *homemade*.

2.2) *Objetivos específicos:*

- Otimizar a composição da fase móvel e demais parâmetros para análise no HPLC com detecção simultânea nos detectores UV e eletroquímico;
- Estudar o comportamento eletroquímico dos ácidos fenólicos frente ao eletrodo de carbono vítreo;
- Otimizar as condições para o processo de extração dos analitos, padrões interno e *surrogate* com e sem uso de ultrassom;
- Quantificar os ácidos fenólicos nas amostras de azeite de dendê por HPLC-UV e comparar a eficácia do acoplamento do detector eletroquímico após o detector UV a fim de validar o método de análise;
- Análise de amostras de azeite de dendê de fabricação artesanal e industrial.

3) Parte experimental

3.1) Reagentes

Todos os solventes utilizados apresentavam grau de pureza HPLC, sendo estes: metanol e isopropanol (adquiridos da Vetec), ácido fosfórico concentrado 85% m/m (adquirido da Tedia Company Inc., USA). O reagente perclorato de sódio monohidratado ($\text{NaClO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) utilizado como eletrólito suporte foi de grau P.A. da marca Spectrum. O ácido clorídrico concentrado 37% m/m P.A. foi adquirido da Vetec. Os padrões de alta pureza foram adquiridos pela Sigma-Aldrich, sendo eles os ácidos: caféico, ferúlico, p-cumárico, o-cumárico, m-cumárico, sinápico, siríngico e vanílico. No preparo das soluções foi utilizada água deionizada ultrapura (Milli- Q – Quantum Ex).

3.2) Instrumentação para a análise

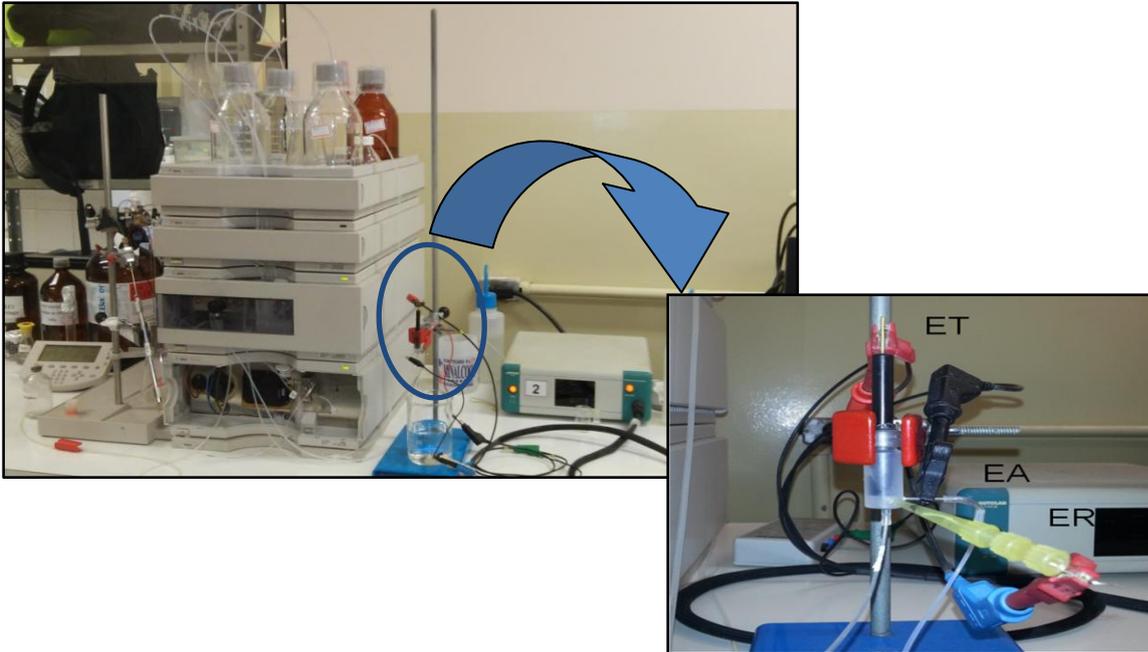
Para a otimização da extração das amostras utilizou-se um banho ultrassônico Unique, modelo USC2850, com dois cristais piezelétricos, operando a frequência de 25 kHz e potência de 120 W.

A separação dos analitos foi realizada em um HPLC Agilent 1100 series (*software* Agilent Chemstation LC Systems, USA), injetor manual com válvula Rheodyne de 20 μL , coluna de fase Reversa C18 Inertsil ODS- 3 (4,6 mm x 150 mm, 5 μm), coluna de guarda Inertsil ODS-3 (3,0 mm x 10 mm, 5 μm), detector UV-VIS de múltiplos comprimentos de ondas (UV-VIS MWD).

Para as medidas eletroquímicas foram utilizados um potenciostato $\mu\text{Autolab}$ (EcoChemie, Utrecht, Holanda) type III, conectado a um microcomputador, utilizando o software GPES 4.9.

Uma célula eletroquímica em fluxo com capacidade de 1,00 mL (figura 7) constituída de três eletrodos foi confeccionada no laboratório, sendo o eletrodo de carbono vítreo usado como eletrodo de trabalho (ET); eletrodo de referência (ER) foi $\text{Ag}/\text{AgCl}_{(\text{KCl, Sat})}$ e o eletrodo auxiliar (EA) foi aço inox. A escolha pelo ET, levou em consideração a melhor eletroatividade dos analitos frente ao mesmo.

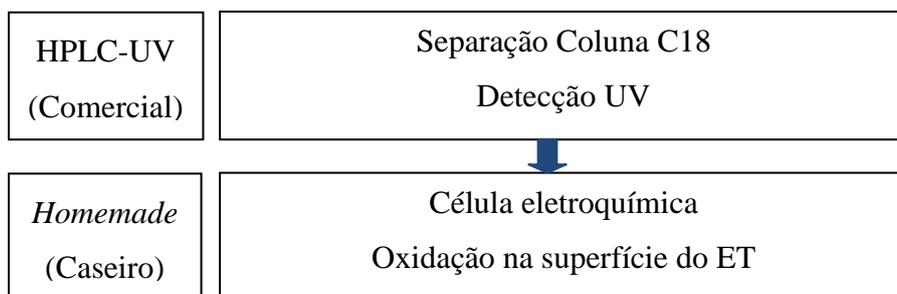
Figura 7: Detalhes do acoplamento da célula eletroquímica ao detector UV, ênfase na célula eletroquímica *homemade*.



Dados: ET (eletrodo de trabalho); EA (eletrodo auxiliar); ER (eletrodo de referência).
 Fonte: Próprio autor, 2015.

A célula eletroquímica foi adaptada à saída do detector UV. À medida que os analitos eram separados pela coluna cromatográfica eles seguiam rumo ao detector UV, onde foram detectados primeiramente; em seguida foram oxidados na superfície do eletrodo de carbono vítreo, sendo posteriormente conduzidos a um descarte através do orifício do eletrodo auxiliar de aço inox. Desta forma a detecção UV e eletroquímica eram realizadas praticamente de forma simultânea, uma vez que os dois detectores (comercial e caseiro) estavam afastados por cerca de 10 cm e era utilizada uma mesma injeção para quantificá-los (Esquema 2).

Esquema 2: Esquema da detecção simultânea UV e eletroquímica.



Fonte: Próprio autor, 2015.

3.3) *Estudo da otimização da fase móvel*

Tendo ciência dos princípios que regem a escolha da fase móvel e considerando que o trabalho foi desenvolvido numa coluna de fase reserva C18 (item 1.5.1), inicialmente estudou-se o pH da fase aquosa, baseando-se na limitação da coluna ($2 < \text{pH} < 8$), uma vez que as fases estacionárias à base de sílica sofrem hidrólise em $\text{pH} < 2$ e com fases móveis com alto percentual de água; já em $\text{pH} > 8$ a maioria das colunas à base de sílica, apresentam dissolução do suporte cromatográfico, resultando em baixa eficiência e no alargamento frontal do pico (COLLINS & BRAGA & BONATO, 2006).

Geralmente as separações por fase reversa utilizam uma fase aquosa com polaridade mais alta, que pode ser simplesmente água, solução ácida ou solução tampão, e mais uma fase orgânica, que deve ser um solvente com polaridade menor. A mistura destes solventes deve possuir polaridade similar a dos analitos.

Para os estudos da otimização da fase móvel foi preparada uma mistura padrão (MIX a 10 mg.L^{-1}) de cada um dos seis analitos estudados, mais PS e PI, diluídos em diversas composições de fase móvel e mais eletrólito suporte, a fim de estabelecer qual seria a mais viável para separação das substâncias fenólicas em questão. A identificação de cada analito foi realizada, injetando-se separadamente cada um, de modo a obter o tempo de retenção (t_r), que é relativo para cada composto.

Os solventes testados para compor a fase móvel, envolveram estudos anteriormente desenvolvidos pelo próprio grupo de pesquisa, além das seguintes composições:

- A) Acetonitrila, solução de H_3PO_4 ,
- B) Metanol, solução de H_3PO_4 ,
- C) Metanol, tetrahidrofurano (THF), solução de H_3PO_4 ,
- D) Isopropanol, solução de H_3PO_4 ,
- E) Isopropanol, tampão fosfato.

Após a determinação da composição da fase móvel, seguiu-se para o estudo do comprimento de onda a ser usado, sendo que este deveria apresentar maior absorvância para os analitos e mínima absorvância para interferentes.

3.4) *Estudo dos parâmetros para detecção eletroquímica*

Estabelecido que o eletrodo de carbono vítreo seria utilizado, devido a melhor resposta obtida para todos os ácidos fenólicos em questão, passou-se para a parte dos estudos do potencial de oxidação dos seis analitos mais os PI e PS. Para tanto, foram realizados voltamogramas hidrodinâmicos aplicando potenciais de + 0,4 a + 1,3 V a fim de verificar se as espécies eram eletroativas ou não. Os voltamogramas foram obtidos, preparando-se 2,00 mL de cada ácido fenólico individualmente mais PI e PS a 10 mg.L⁻¹ cada, estudados em fase móvel, em meio de eletrólito suporte (NaClO₄). Cada solução contendo um dos ácidos fenólicos foi submetido à agitação magnética. Após a homogeneização da solução, parou-se a agitação, aplicou-se um programa de potencial no intervalo de +0,4 a +1,3 V durante 50 segundos em cada potencial, no software GPES, utilizando para isso a amperometria convencional. Os voltamogramas hidrodinâmicos para cada analito foram construídos por meio dos sinais de correntes obtidos nos diferentes potenciais aplicados. A escolha do potencial levou em consideração a janela de potencial do eletrodo de carbono vítreo em meio orgânico.

3.5) *Preparo das soluções estoques e testes de estabilidade*

Foram preparadas soluções padrões estoques com concentração final de 1000 mg.L⁻¹ para cada um dos analitos e padrões internos e *surrogate*, todas diluídas em metanol grau HPLC. A escolha do diluente levou em consideração a solubilidade dos mesmos. Estas soluções foram filtradas com filtro de membrana de PTFE 0,45µm e conservadas a -6 °C. Posteriormente foram realizadas injeções de soluções diluídas a 10 mg.L⁻¹, em dias alternados, a fim de verificar por quantos dias as soluções estoques se manteriam estáveis para serem utilizadas.

3.6) As amostras de azeite de dendê

As amostras de azeite de dendê de fabricação artesanal e industrializada (figura 8) foram adquiridas no comércio da cidade de Salvador, BA, no verão de 2014. As amostras foram envoltas por um filme de papel alumínio e armazenadas sob refrigeração a 4 °C.

Figura 8: Imagens das amostras de azeite de dendê adquiridas



Fonte: Próprio autor, 2015.

3.7) Otimização do método de extração das amostras

Algumas amostras necessitam de um pré-tratamento a fim de que haja liberação dos analitos da matriz. Inicialmente o tratamento das amostras foi adaptado da metodologia descrita por DE MARCO *et al.*, 2007 que otimizou os parâmetros por extração líquido-líquido para recuperar substâncias fenólicas de águas residuais oriundas da produção do azeite de oliva.

Para maior eficiência do processo de extração dos analitos e recuperação do padrão *surrogate* nas amostras de azeite de dendê, foram avaliadas condições com e sem irradiação de ultrassom durante a etapa que envolve a hidrólise dos analitos com solução aquosa de ácido clorídrico pH 2.

Os recipientes contendo as amostras foram posicionados sobre os cristais piezelétricos do banho ultrassônico. As condições testadas envolveram agitação manual e o uso do ultrassom nos

tempos de 10 e 15 min, sendo que foram avaliadas as recuperações dos analitos e dos ácidos propostos como padrões *surrogate* e interno.

Para este estudo foi selecionada uma amostra de azeite de dendê comercial (identificação Y), onde foram otimizadas quantidades de amostras extraídas e volumes de solventes utilizados.

Cerca de 3 mL da amostra foram pesadas diretamente em tubos de centrífuga, totalizando 12 amostras que foram divididas em três grupos de quatro amostras: 1 amostra e 3 amostras fortificadas com analitos. Em três amostras de cada grupo foram adicionadas alíquotas da solução padrão dos analitos e da solução padrão *surrogate*, para obter a concentração final de 10 mg.L⁻¹ e 20 mg.L⁻¹ respectivamente. Foram adicionados 3 mL de solução aquosa de HCl pH 2,0 em cada tubo. Em seguida, cada grupo, composto de quatro amostras, foi submetido a uma condição experimental, designadas como T0, T10 e T15, conforme esquema quadro 1.

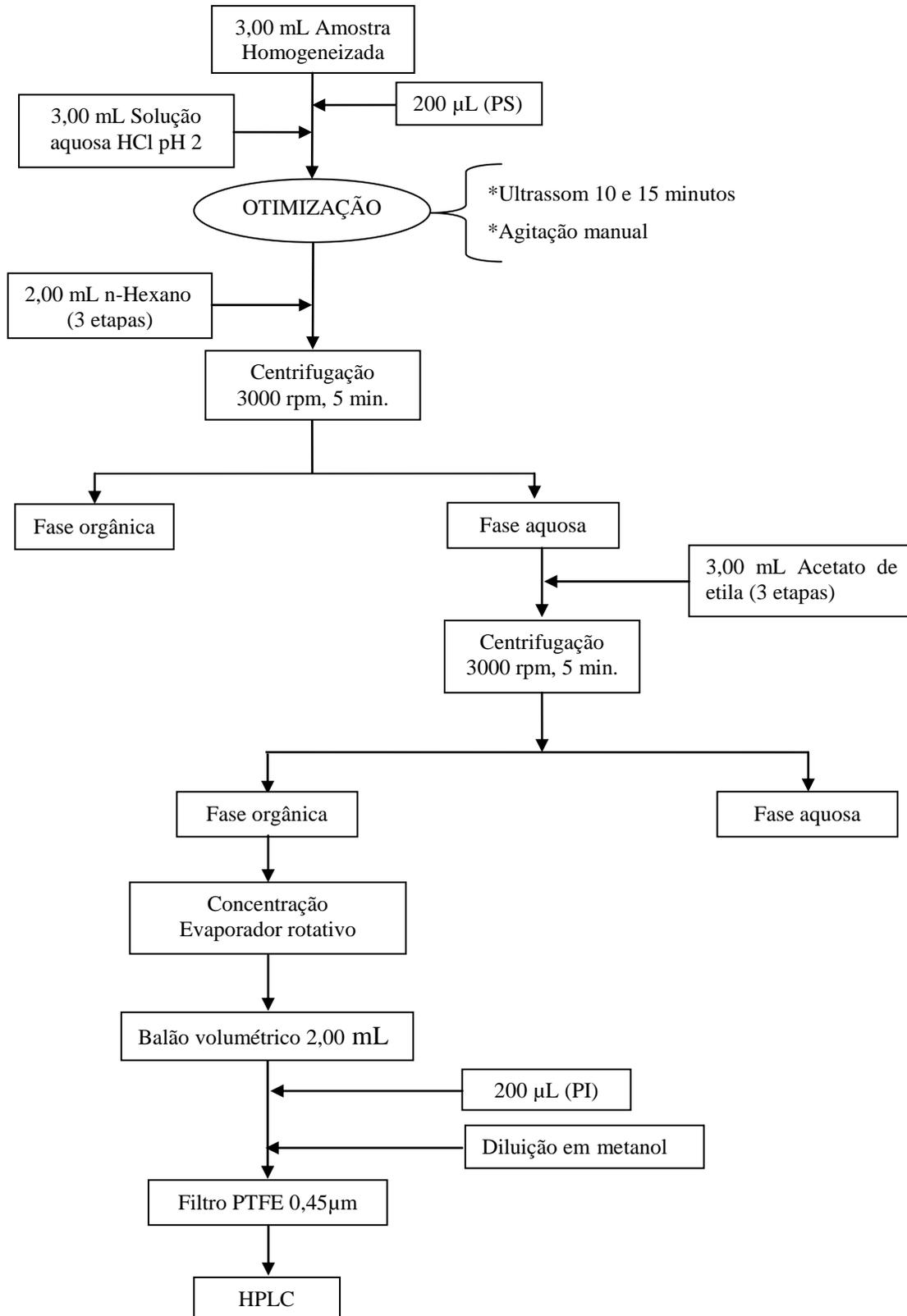
Quadro 1: Condições experimentais para partição dos analitos e PS das amostras de azeite de dendê com a solução aquosa de HCl pH 2.

Amostra	Condição experimental		
	Agitação manual	Ultrassom	
	T0	T10 (10 min)	T15 (15 min)
Amostras fortificadas	A1	B1	C1
	A2	B2	C2
	A3	B3	C3
Amostra sem fortificar	ASF	BSF	CSF
Branco	Branco1	Branco 2	Branco 3

Fonte: Próprio autor, 2015.

Todas as amostras foram extraídas 3 vezes com 2 mL de n-hexano grau HPLC. Todas as frações hexânicas foram descartadas. A fase aquosa foi então extraída 3 vezes com 3 mL acetato de etila grau HPLC, os extratos foram combinados e evaporados em evaporador rotativo. A fração residual foi resuspensa em metanol, transferida para balão volumétrico 2,00 mL, que teve o volume completado após adição da alíquota do padrão interno. Para cada condição experimental foi analisada a amostra em branco. O fluxograma mais detalhado é apresentado na Figura 9.

Figura 9: Fluxograma de tratamento das amostras



Fonte: Próprio autor, 2015.

3.8) Avaliação do método

Após a otimização do método de análise por HPLC-UV-DE procedeu-se a avaliação do método obtendo-se as curvas analíticas através da técnica de padronização interna com uso do padrão *surrogate*, sendo os parâmetros analisados: resposta linear, limite de detecção, limite de quantificação, repetitividade, sensibilidade, exatidão e precisão, através de estudo recuperação do método, incluindo análise de replicatas e brancos do método, nos dois modos de detecção, UV e eletroquímico.

3.8.1) Curva analítica por padronização interna

As soluções padrões das curvas analíticas foram diluídas em fase móvel, em triplicatas, a partir de uma solução padrão mistura intermediária com concentração 100 mg.L^{-1} de cada analito e das soluções intermediárias do padrão *surrogate* a 200 mg.L^{-1} e padrão interno a 200 mg.L^{-1} onde foram adicionados volumes pré-determinados a fim de se obter a concentração final desejada. As soluções intermediárias foram preparadas diluindo-se em fase móvel as soluções estoques de 1000 mg.L^{-1} . As curvas analíticas ($y = ax + b$), sendo y o sinal e x a concentração, abrangeram o intervalo de concentração de $3,0$ a $20,0 \text{ mg.L}^{-1}$ com volume injetado de $20 \mu\text{L}$.

Baseando-se no trabalho já publicado pelo próprio grupo de pesquisa (SANTOS *et al.*, 2011), realizaram-se algumas modificações a cerca das concentrações de PS e PI e avaliou-se a possibilidade de se usar como padrão *surrogate*, o ácido m-cumárico e como padrão interno, o ácido o-cumárico, para isto, certificou-se que ambos não faziam parte da matriz a ser analisada, já que quando utilizados para as finalidades já especificadas acima, eles não podem fazer parte do conjunto a ser estudado e tão pouco coeluir com os demais analitos em estudo, devendo estar o mais separados possível do elenco a ser estudado.

3.8.2) Linearidade da curva analítica

Tomando por base trabalhos publicados na literatura, a exemplificar (RIBANI *et al.*, 2004), um coeficiente de Pearson (r) maior que 0,999 indica evidências de um ajuste ideal dos dados analisados para uma regressão linear. Quanto mais próximo de 1,0 mais ajustados se encontram os coeficientes de regressão da curva analítica obtida.

Com isso, além dos valores do coeficiente de regressão, outro parâmetro de controle avaliado foi o desvio padrão da resposta do método em função da concentração dos analitos (3,0 a 20,0 mg.L⁻¹ incluindo o branco da curva) para ambos os detectores (equação 1). O fator de resposta (Fr) é um parâmetro, que avalia se a resposta do método encontra-se linear, ou seja, se é proporcional a concentração dos analitos. Desta forma o Fr não deve variar entre os níveis de concentração da curva analítica, sendo recomendado que o mesmo não deva ser maior ou igual a 15 % (LAUENSTEIN & CANTILLO, 1996).

$$Fr = \left[\frac{S_A \times C_{PS}}{S_{PS} \times C_A} \right] \quad (\text{Equação 1})$$

Sendo:

S_A = sinal do analito

S_{PS} = sinal do padrão *surrogate*

C_A = concentração do analito

C_{PS} = concentração do padrão *surrogate*

3.8.3) Limites de detecção, quantificação instrumental e repetitividade

O limite de detecção do método (LD) representa a menor quantidade ou concentração do analito na amostra que pode ser confiavelmente distinguida de zero, não sendo esta, necessariamente quantificada (RIBANI *et al.*, 2004). Os valores dos limites de detecção (LD) e

quantificação (LQ) foram calculados a partir das curvas analíticas obtidas para os analitos nos dois modos de detecção através da razão entre o valor do desvio padrão do coeficiente linear (S_b) e o coeficiente angular das respectivas curvas analíticas (a), equações 2 e 3.

$$LD = 3 \times \left(\frac{S_b}{a} \right) \quad (\text{Equação 2})$$

$$LQ = 10 \times \left(\frac{S_b}{a} \right) \quad (\text{Equação 3})$$

Sendo:

S_b = desvio padrão do coeficiente linear da equação da curva analítica

a = coeficiente angular da equação da curva analítica

Foram realizados também ensaios experimentais, a fim de avaliar a repetitividade. Para estas análises utilizou-se 5 réplicas de uma mesma amostra, extraídas no mesmo dia, as quais foram fortificadas de modo a obter a concentração final de 6 mg.L⁻¹ para cada analito, mais os padrões interno e *surrogate* na concentração final de 20 mg.L⁻¹ cada.

A repetitividade pode ser expressa através do desvio padrão relativo percentual (DPR %) sendo uma das formas de avaliar a precisão do método. Quanto menores estes valores, melhores são os indícios de que os valores obtidos aproximam-se dos valores ditos como reais.

3.8.4) Avaliação da exatidão

3.8.4.1) Recuperação do padrão *surrogate*

Os padrões interno e *surrogate* foram utilizados para avaliação da recuperação e quantificação dos analitos. O PS foi adicionado logo após a pesagem das amostras de azeite de

dendê e passou por todas as etapas de tratamento da amostra, sendo desta forma, decisivo na verificação das variações obtidas no processo de extração. Já o PI foi adicionado pouco antes de completar o balão volumétrico de 2,00 mL e conseqüentemente, antes de injetar a amostra no HPLC e visou fazer correções obtidas de flutuações entre o sinal analítico com o pico de referência para auxiliar na identificação dos picos dos analitos, além de ser decisivo no cálculo da recuperação do PS.

A percentagem de recuperação do padrão *surrogate* nas amostras, amostras fortificadas, brancos e brancos fortificados foi calculada com a expressão da Equação 4.

$$R\%(PS) = \left[\frac{Cam(PS) \times Cadd(PI)}{Cam(PI) \times Cadd(PS)} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 4})$$

Sendo:

R é a percentagem de recuperação do PS

Cam é a concentração obtida na análise da amostra

Cadd é a concentração adicionada na amostra

PS padrão *surrogate*

PI padrão interno

3.8.4.2) Recuperação das amostras e brancos fortificados

Para avaliação da exatidão do método proposto, analisou-se a recuperação obtida com a extração em replicatas de branco fortificado (n=3) e de amostras fortificadas (n=3). A fortificação do branco e das amostras foi realizada através da adição do MIX de padrões de modo a obter a concentração final de 10 mg.L⁻¹ dos analitos e de 20 mg.L⁻¹ para PS e PI, nas soluções injetadas no HPLC.

A percentagem de recuperação dos analitos nas amostras e brancos fortificados foi calculada com a expressão da equação 5.

$$Ri\% = \left[\frac{C_{AF} - C_A}{C_{add}} \right] \times 100 \quad (\text{Equação 5})$$

Sendo:

Ri é a percentagem de recuperação do analito

C_{AF} é a concentração do analito obtida na análise na amostra fortificada

C_A é a concentração do analito obtida na amostra original

C_{add} é a concentração do analito adicionada a amostra fortificada

3.8.5) Análise das amostras de azeite

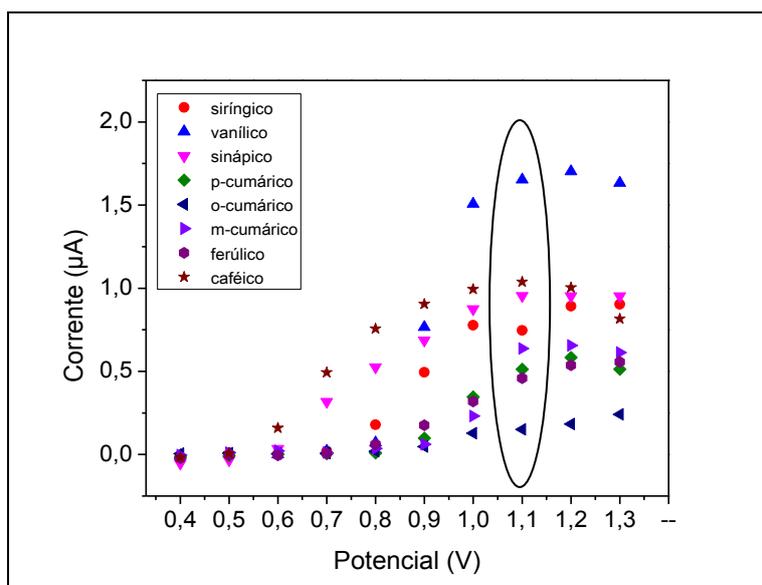
A metodologia proposta foi aplicada para análise das amostras de azeite de dendê industrial e artesanal com determinação simultânea em ambos os detectores, utilizando os padrões *surrogate* (ácido m-cumárico) e interno (ácido o-cumárico) no preparo das amostras, sendo possível então, realizar de forma individual a determinação de todos os ácidos fenólicos presentes nas amostras de azeite de dendê industrial e artesanal.

4) Resultados e discussões

4.1) Parâmetros de análise para detecção eletroquímica

De acordo com os potenciais aplicados à célula eletroquímica, pode-se verificar que algumas espécies começam a ser oxidadas a partir de um potencial de + 0,70 V e quando esse potencial alcançou um valor de + 0,80 V, os ácidos caféico, sinápico e siríngico foram oxidados na célula eletroquímica e, portanto já poderiam ser detectados ao passo, que no potencial de + 1,10 V todas as espécies foram oxidadas (figura 10). Sendo escolhida, portanto para a análise eletroquímica a amperometria aplicando um potencial de + 1,10 V, pois neste potencial foi verificado uma maior estabilidade da corrente faradaica para a grande maioria dos ácidos fenólicos.

Figura 10: Voltamogramas hidrodinâmicos obtidos através da aplicação de diferentes potenciais para os ácidos fenólicos estudados na concentração de 10 mg.L⁻¹ cada, diluídos em fase móvel composta por isopropanol e solução de H₃PO₄ pH 2,40 + NaClO₄ (7 mmol.L⁻¹); proporções dos solventes (13:87).



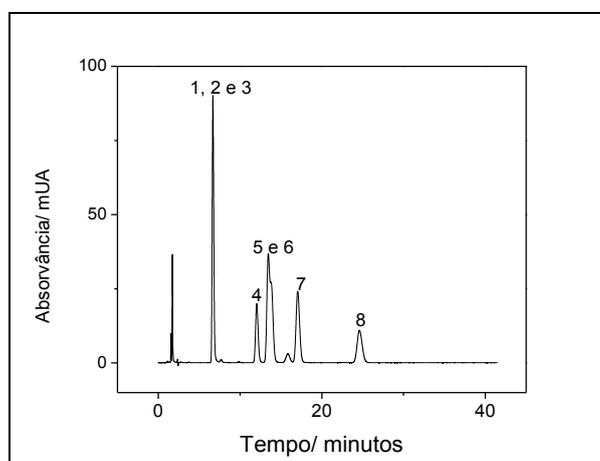
Fonte: Próprio autor, 2015.

A variação da corrente obtida nos voltamogramas hidrodinâmicos de cada ácido fenólico dependeu do coeficiente de difusão (D) de cada analito, que é uma propriedade intrínseca para cada espécie, estabelecida como uma medida da mobilidade das substâncias em dado meio, sendo diretamente relacionado com a massa molecular (SKOOG *et al.*, 2006). Os analitos que apresentavam maiores D, deslocavam-se mais rapidamente rumo ao eletrodo de carbono vítreo, sendo rapidamente oxidados na superfície do eletrodo, resultando desta forma, em maiores correntes faradáicas e maiores eletroatividades.

4.2) Estudo da otimização da fase móvel para HPLC

Os testes iniciais foram baseados em uma metodologia já descrita pelo grupo (SANTOS *et al.*, 2011) que envolvia a separação de três dos seis ácidos fenólicos estudados mais os PS e PI por eluição isocrática, com uma fase móvel trifásica composta por acetonitrila/metanol/solução de H_3PO_4 pH 2,15 (13:12,5:74,5 v/v). Quando tentou-se reproduzir este método para os seis ácidos fenólicos em estudo mais PS e PI, a separação não foi completa, fato que pode ser explicado pela grande similaridade estrutural de alguns analitos que coeluíram (figura 11).

Figura 11: Cromatograma da solução padrão MIX 10 mg.L^{-1} dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática com solução de H_3PO_4 pH 2,15/ACN/MeOH (74,5:13:12,5 v/v), fluxo de $1,0 \text{ mL.min}^{-1}$. Tempo de eluição 30 min.



Fonte: Próprio autor, 2015.

A fim de estabelecer uma nova condição para separação dos ácidos fenólicos e levando em conta os pKa dos analitos (quadro 2), determinou-se qual pH deveria ser trabalhado a fim de suprimir a ionização dos mesmos e obter boa resolução e sensibilidade na análise. Para isto o pH escolhido foi 2,40, pois neste a grande maioria dos analitos apresentavam maiores coeficientes de partição em meio ácido, havia também predomínio da forma protonada das substâncias de interesse apresentando deste modo a capacidade de serem retidos pela coluna de fase reversa C18.

Quadro 2: Dados dos analitos analisados

Composto	Fórmula	Massa molar (g.mol ⁻¹)	pKa	Coefficiente de partição (K _{oc}) em pH 2	Solubilidade molar em água a pH 2
Ácido caféico	C ₉ H ₈ O ₄	180,16	4,58	54,4	0,055
Ácido ferúlico	C ₁₀ H ₁₀ O ₄	194,18	4,58	79,2	0,020
Ácido o-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,51	84,9	0,028
Ácido m-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,38	75,8	0,031
Ácido p-cumárico	C ₉ H ₈ O ₃	164,16	4,65	83,5	0,029
Ácido sinápico	C ₁₁ H ₁₂ O ₅	224,21	4,53	82,6	0,013
Ácido siríngico	C ₉ H ₁₀ O ₅	198,17	4,33	118,0	0,035
Ácido vanílico	C ₈ H ₈ O ₄	168,15	4,45	121,0	0,052

Fonte: SCIFINDER, 2015.

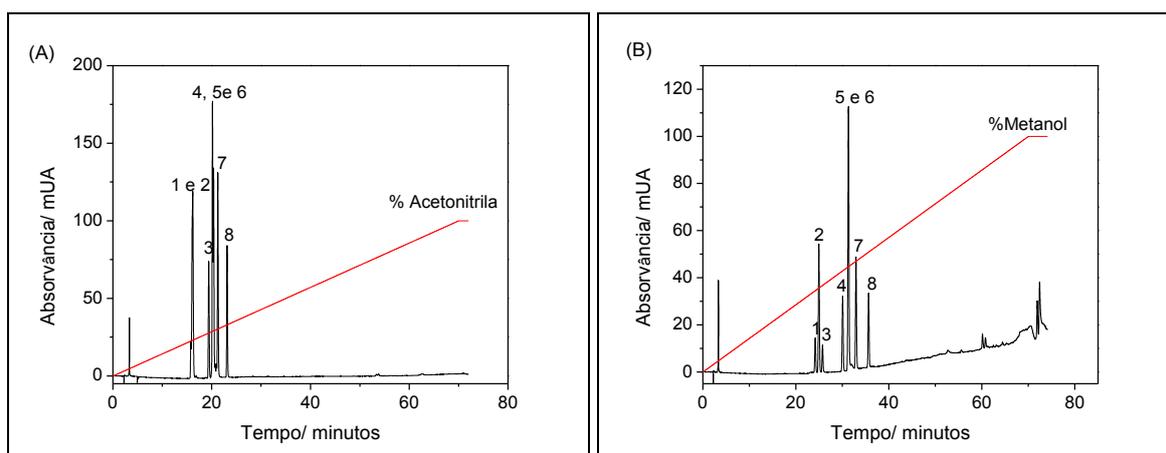
Foram realizados os gradientes exploratórios para cada uma das seguintes fases móveis binárias: a) solução de H₃PO₄/acetonitrila; b) solução de H₃PO₄/metanol; c) solução de H₃PO₄/isopropanol. A partir da avaliação dos cromatogramas obtidos para estas três condições foram propostas diferentes proporções dos solventes.

O detector Agilent UV-VIS MWD do sistema HPLC permite monitorar simultaneamente até cinco comprimentos de onda, portanto durante a execução destes experimentos foram também avaliados o comprimento de onda para detecção na região do UV, buscando maior sensibilidade, mínima interferência e estabilidade do sinal da linha base. Para abordagem deste item são apresentados os resultados obtidos para detecção no comprimento de onda com melhor resultado, ou seja, 225 nm.

O gradiente exploratório é utilizado para obter uma perspectiva geral da ordem de eluição dos analitos e em qual porcentagem de solvente orgânico haverá maior possibilidade de separação dos analitos. Este gradiente foi realizado no tempo de 60 minutos em fluxo constante, fazendo os solventes variarem de 0 a 100 % linearmente.

Nos cromatogramas obtidos para os gradientes exploratórios verificou-se que a eluição das substâncias de interesse ocorreu entre 22 e 33 % para a acetonitrila e entre 34 e 51 % para o metanol, sendo também observada uma melhor separação quando foi utilizado metanol (figura 12).

Figura 12: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluições em gradientes exploratórios: (A) solução de H₃PO₄ pH 2,40/ACN (100:0) em 0 min a (0:100) em 60 min, fluxo 1,0 mL.min⁻¹; (B) solução de H₃PO₄ pH 2,40/MeOH (100:0) em 0 min a (0:100) em 60 min, fluxo 1,0 mL.min⁻¹.



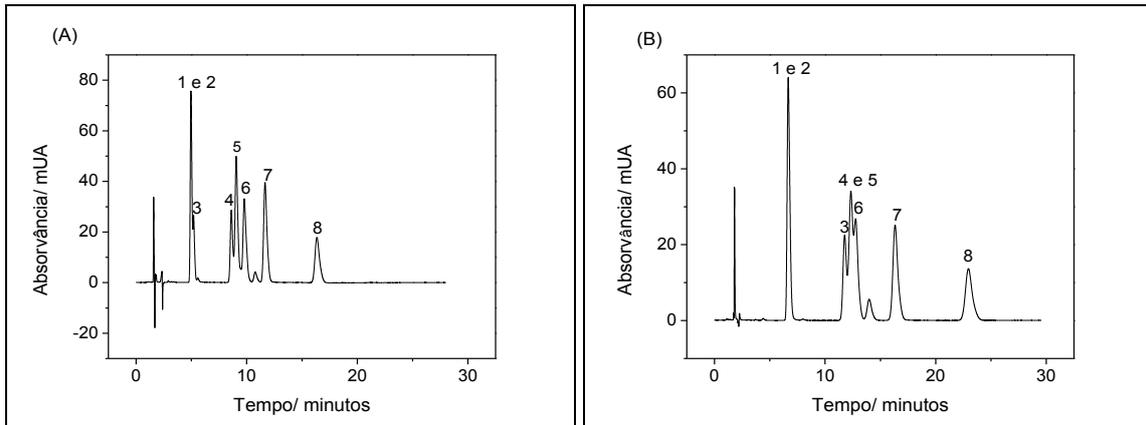
Fonte: Próprio autor, 2015.

A partir destes resultados foram testadas condições de eluição isocrática, variando-se a porcentagens de acetonitrila (10 a 30 %) e metanol (20 a 50 %), porém estes experimentos não apresentaram separações satisfatórias para as substâncias de interesse. Na figura 13 são apresentados os cromatogramas para as melhores condições obtidas para cada solvente.

A eluição por gradiente necessita de um intervalo de tempo entre as injeções, necessário para retornar a condição inicial de análise e estabilizar o sinal, mesmo que os tempos de retenção das substâncias de interesse sejam reproduzíveis. Dependendo da variação na composição da fase

móvel e das substâncias que a compõe, este processo pode demandar certo tempo, tornando a análise muito demorada, por isso utiliza-se na grande maioria das vezes, a eluição isocrática.

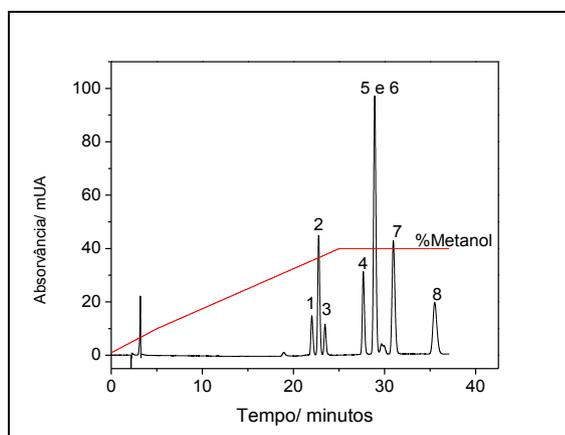
Figura 13: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática, fluxo 1,0 mL.min⁻¹: (A) solução de H₃PO₄ pH 2,40/ACN (79:21), tempo de eluição 20 min. (B) solução de H₃PO₄ pH 2,40/MeOH (64:36), tempo de eluição 25 min.



Fonte: Próprio autor, 2015.

Das condições de eluição por gradiente testadas, a melhor condição (solução de H₃PO₄ pH 2,40/MeOH), ainda apresentou coeluição dos picos dos ácidos p-cumárico e ferúlico (figura 14).

Figura 14: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente solução de H₃PO₄ pH 2,40/metanol: 1 a 10% de metanol em 5 min, 10 a 40% de metanol de 5 a 25 min, 40 % de metanol de 25 a 35 min, fluxo 1,0 mL.min⁻¹. Tempo de eluição 38 min.

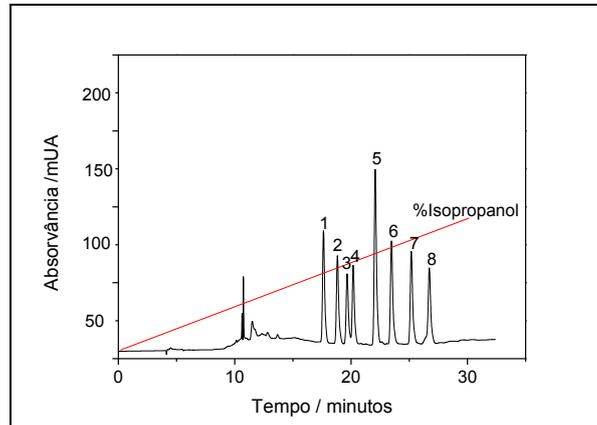


Fonte: Próprio autor, 2015.

Para promover a separação destes analitos, o THF foi adicionado à fase móvel em pequenas percentagens (0,5 a 3,0 %) apenas na região que apresentava coeluição, a fim de tornar o meio menos polar. Além da separação não ter sido satisfatória, mesmo em pequenas proporções, o THF apresentou absorvância considerável na região de interesse do UV, diminuindo a sensibilidade do método e causando elevação significativa da linha de base, sendo, portanto inviável.

Após os testes descritos anteriormente, como não havia verificado a separação total dos analitos, realizou-se a troca do solvente orgânico por um de polaridade diferente aos já trabalhados e novamente efetuou outro gradiente exploratório, para a fase móvel composta de solução de H₃PO₄ pH 2,40/ isopropanol (figura 15) no tempo de 30 minutos, fazendo a proporção de isopropanol variar de 0 a 55 % linearmente, sob um fluxo constante e menor do que os outros gradientes testados, a fim de não comprometer a integridade do sistema devido a rápida elevação da pressão quando este solvente é empregado. A eluição das substâncias de interesse ocorreu entre 28 e 46 % de isopropanol.

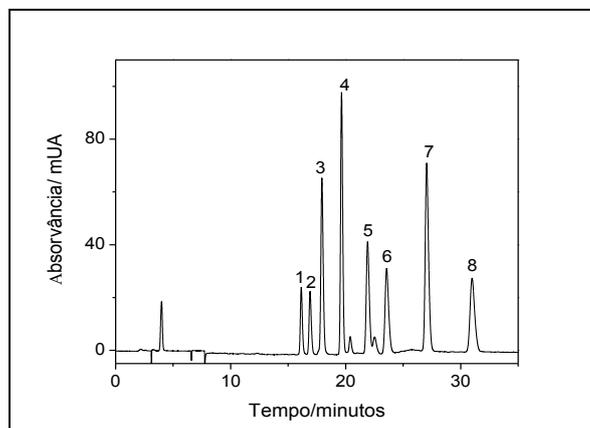
Figura 15: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente exploratório de solução de H₃PO₄ pH 2,40 /isopropanol (100:0) em 0 min. a (0:55) em 30 min., fluxo 0,5 mL.min⁻¹.



Fonte: Próprio autor, 2015.

Análises com eluições isocráticas e por gradientes foram realizadas, variando-se a porcentagens de isopropanol de 20 a 40 %. A separação completa dos analitos foi alcançada por gradiente de eluição com uma mistura de solução de H₃PO₄ pH 2,40/ isopropanol em 34 min (figura 16). No entanto, ao realizar injeções consecutivas o tempo de retenção não foi reprodutível. Tendo em vista que é através da comparação dos tempos de retenção com padrões que os analitos são identificados na amostra, esta condição tornou-se inviável. A substituição da solução de H₃PO₄ por solução tampão fosfato, com mesmo valor de pH, não foi capaz de evitar o deslocamento dos tempos de retenção (tr). A princípio o uso da solução tampão seria mais eficiente no controle do pH do meio nas condições de equilíbrio, além suprimir a desprotonação dos analitos, sendo possivelmente melhor para reprodução das condições de equilíbrio e consequentemente os tr.

Figura 16: Cromatograma da MIX 10 mg.L⁻¹ dos ácidos (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição em gradiente solução de H₃PO₄ pH 2,40/isopropanol: 1 a 22% de isopropanol em 18 min, 22% isopropanol de 18 a 21 min, 22 a 24% de isopropanol de 21 a 23 min, fluxo 0,7 mL.min⁻¹. Tempo de eluição 34 min.



Fonte: Próprio autor, 2015.

A dificuldade na separação dos analitos quando se utilizou gradientes binários, foi ocasionada uma diferença de polaridade na fase móvel na condição inicial e final para eluição dos ácidos fenólicos em estudo. Outro aspecto é que devido à semelhança nas estruturas entre os ácidos fenólicos, dois grupos se destacavam sendo estes constituídos pelos ácidos sinápico, p-cumárico e ferúlico; e o outro grupo formado pelos ácidos siríngico, vanílico e caféico, que exigem condições mais brandas quanto à variação da porcentagem de solvente orgânico para serem totalmente separados. Desta forma para a realização da separação completa destes dois grupos, necessitaria de um longo tempo de análise.

Por fim, após estudos diminuindo consideravelmente a porcentagem de isopropanol para um intervalo não testada anteriormente (10 a 19% de solvente orgânico), a separação completa dos ácidos fenólicos estudados foi obtida por eluição isocrática com solução de H₃PO₄ pH 2,40 e isopropanol.

Como para a detecção eletroquímica, há necessidade da utilização do eletrólito suporte, realizaram-se cálculos de concentração de modo que este estivesse cerca de 50 a 100 vezes maior que a concentração dos analitos, a fim de que ele fosse atraído pelo campo elétrico, evitando o transporte de massa por migração. O eletrólito escolhido foi o perclorato de sódio na concentração de 7 mmol.L⁻¹ onde optou-se por o diluir na solução de H₃PO₄ que compõe a fase móvel. Desta

forma ficou estabelecida a melhor condição de fase móvel (figura 17) a ser empregada no presente trabalho:

Coluna: C18 Inertsil ODS- 3 (4,6 mm x 150 mm, 5 μ m),

Coluna de guarda: Inertsil ODS-3 (3mm x 10 mm, 5 μ m),

Eluição isocrática: solução de H_3PO_4 pH 2,4 e NaClO_4 a 7 mmol.L^{-1} /isopropanol (87:13v/v),

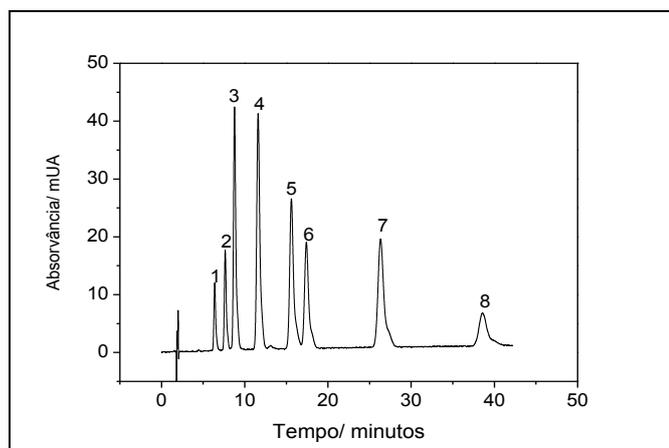
Fluxo da fase móvel: 1,0 mL.min^{-1} ,

Comprimento de onda para Detecção UV: 225 nm,

Potencial detecção eletroquímica: +1,10 V,

Tempo total de análise: 43 minutos.

Figura 17: Cromatograma da MIX 10 mg.L^{-1} dos ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico. Eluição isocrática solução de H_3PO_4 pH 2,40 e NaClO_4 7 mmol.L^{-1} /isopropanol (87:13 v/v), fluxo 1,0 mL.min^{-1} . Tempo de eluição 43 min.



Fonte: Próprio autor, 2015.

4.3) Testes de estabilidade das soluções trabalho

Durante os estudos da otimização da fase móvel foi observado que alguns analitos apresentaram um pequeno pico secundário além do pico principal, quando as soluções injetadas (soluções trabalho) foram preparadas alguns dias após o preparo da solução estoque. Esses picos secundários apresentavam discreto aumento de área com o decorrer do tempo. Houve então a

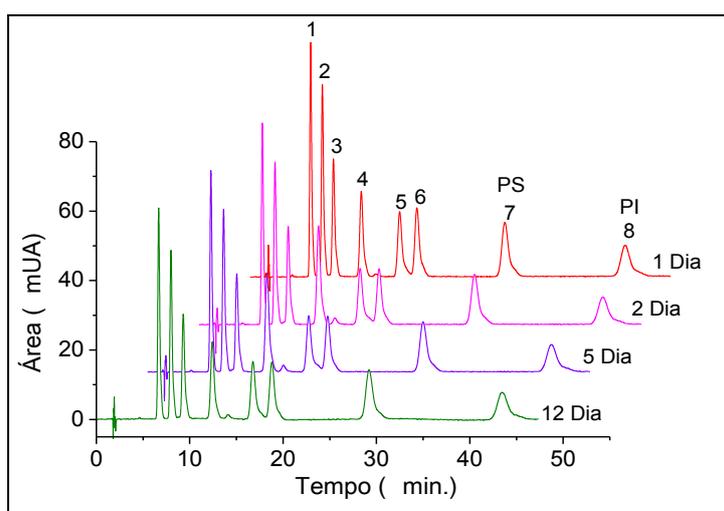
necessidade da realização deste experimento, a fim de verificar por até quantos dias as soluções estoques estariam em boas condições de uso, sem comprometer a integridade das análises.

Em trabalho anteriormente realizado por Santos e colaboradores, 2011 verificou-se que para os ácidos caféico, p-cumárico e ferúlico, o solvente empregado na diluição da solução trabalho foi o que mais influenciou no perfil do cromatograma. A diluição da solução trabalho em fase móvel, independente do solvente (MeOH, ACN ou FM) empregado para a diluição da solução intermediária na presente condição otimizada, foi decisivo para o estudo de estabilidade.

As soluções trabalho preparadas no mesmo dia das soluções estoques e em dias alternados, compreendendo até 12 dias, foram injetadas na condição otimizada para HPLC-UV-DE, avaliando-se o perfil dos cromatogramas, valores de área (pico principal e secundário) e concentração das substâncias de interesse.

Verificou-se que as soluções trabalho poderiam ser usadas por no máximo dois dias (figura 18), pois foi observado que neste período havia ausência de picos referentes a produtos da degradação, sem diminuição significativa de área do pico principal. Na figura 18 são apresentados os cromatogramas obtidos para as soluções injetadas entre os 1° e 12° dia após o preparo da solução estoque, onde se verifica aumento significativo do pico do produto de degradação do ácido sinápico.

Figura 18: Cromatogramas obtidos para as soluções injetadas entre os 1° e 12° dia na condição otimizada de eluição isocrática com solução de H_3PO_4 pH 2,40 e NaClO_4 7 mmol.L^{-1} /isopropanol (87:13 v/v), fluxo 1,0 mL.min^{-1} .



Dados: Ácidos: (1) siríngico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico.

Fonte: Próprio autor, 2015.

4.4) Otimização do método de extração das amostras

Ácidos fenólicos ocorrem nas plantas nas formas livres e ligadas. Os ácidos fenólicos livres estão localizados na camada exterior do pericarpo e são extraídos da matriz utilizando solventes orgânicos. Os ácidos fenólicos que se encontram conjugados a parede celular estão associados através de ligação éster ou éter. A hidrólise ácida ou básica é necessária para libertar estes compostos ligados a matriz celular.

Neste trabalho optou-se por utilizar a hidrólise ácida, tendo em vista que o ácido caféico é muito instável em meio alcalino. A hidrólise ácida é extremamente importante na extração destes analitos, tendo em vista que em meio ácido o coeficiente de partição de todos os analitos é superior a 50 (SCIFINDER, 2015), desta forma, eles serão liberados da parede celular, que pode conter quantidades significativas destes antioxidantes naturais (ZHAO *et al.*, 2006 apud JAMAL & IDRIS & ALAM, 2011). Esta etapa do processo é importante, pois muitos azeites de dendê, principalmente os de fabricação artesanal, apresentam duas fases de coloração bem intensa e característica. Na temperatura ambiente, a fase superior é líquida e a inferior de consistência pastosa que pode conter pequenas partículas da polpa do fruto dendê.

O uso do n-hexano no processo de extração das substâncias fenólicas foi necessário já que ele promove a separação das frações lipídicas e aquosas nas amostras. Logo em seguida sobre a fase aquosa adicionou-se acetato de etila que promove a remoção dos ácidos fenólicos de interesse, da porção aquosa (RUBIO-SENENT *et al.*, 2013).

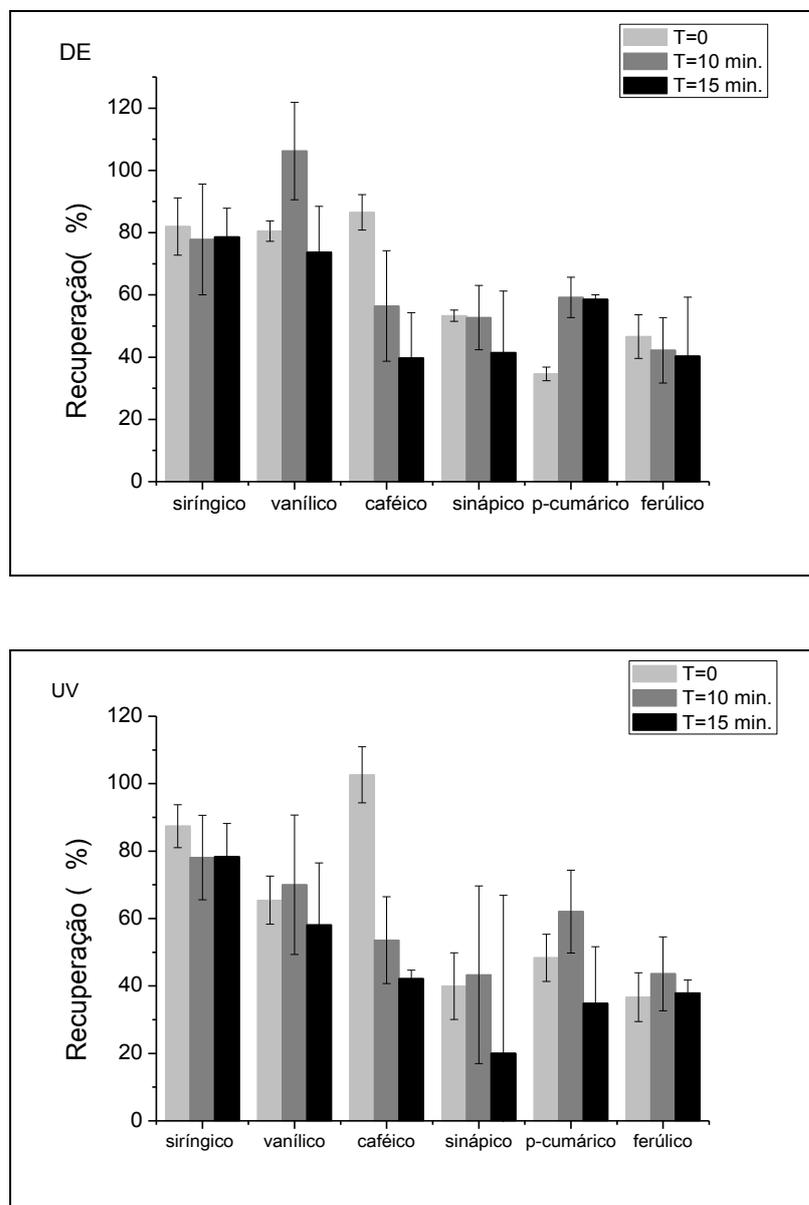
Com o intuito de promover maior eficiência na extração dos ácidos fenólicos dos resíduos de parede celular da palmeira *Elaeis*, que porventura estiverem presentes na fração pastosa das amostras de azeites, realizou-se estudos envolvendo o uso da sonicação por ultrassom e comparou com agitação manual.

A irradiação de ultrassom em soluções induz o fenômeno de cavitação acústica no meio líquido. Na interface sólido-líquido ocorrem crescimento e implosão de bolhas de cavitação que leva a formação de micro jatos com energia suficiente para causar fragmentação das partículas e aumento da área superficial para extração (KORN & PEREIRA & BORGES, 2005)

Para a realização destes experimentos, escolheu-se aleatoriamente uma das amostras de azeite de dendê, e a ela fez-se uma fortificação com solução padrão de todos os analitos e padrões interno e *surrogate*. As amostras foram extraídas com solução aquosa de HCl pH 2, na temperatura

ambiente, manualmente e por ultrassom por 10 e 15 min. As análises foram realizadas em triplicata e para comparação das técnicas utilizadas foram construídos os gráficos das médias das recuperações de cada ácido fenólico determinados com curva de calibração externa, em cada um dos detectores utilizados (figura 19).

Figura 19: Gráfico dos testes com a porcentagem de recuperação para os seis analitos em estudo em ambos detectores, com a utilização da sonicação por ultrassom nos tempos, T0, T10 e T15 minutos.



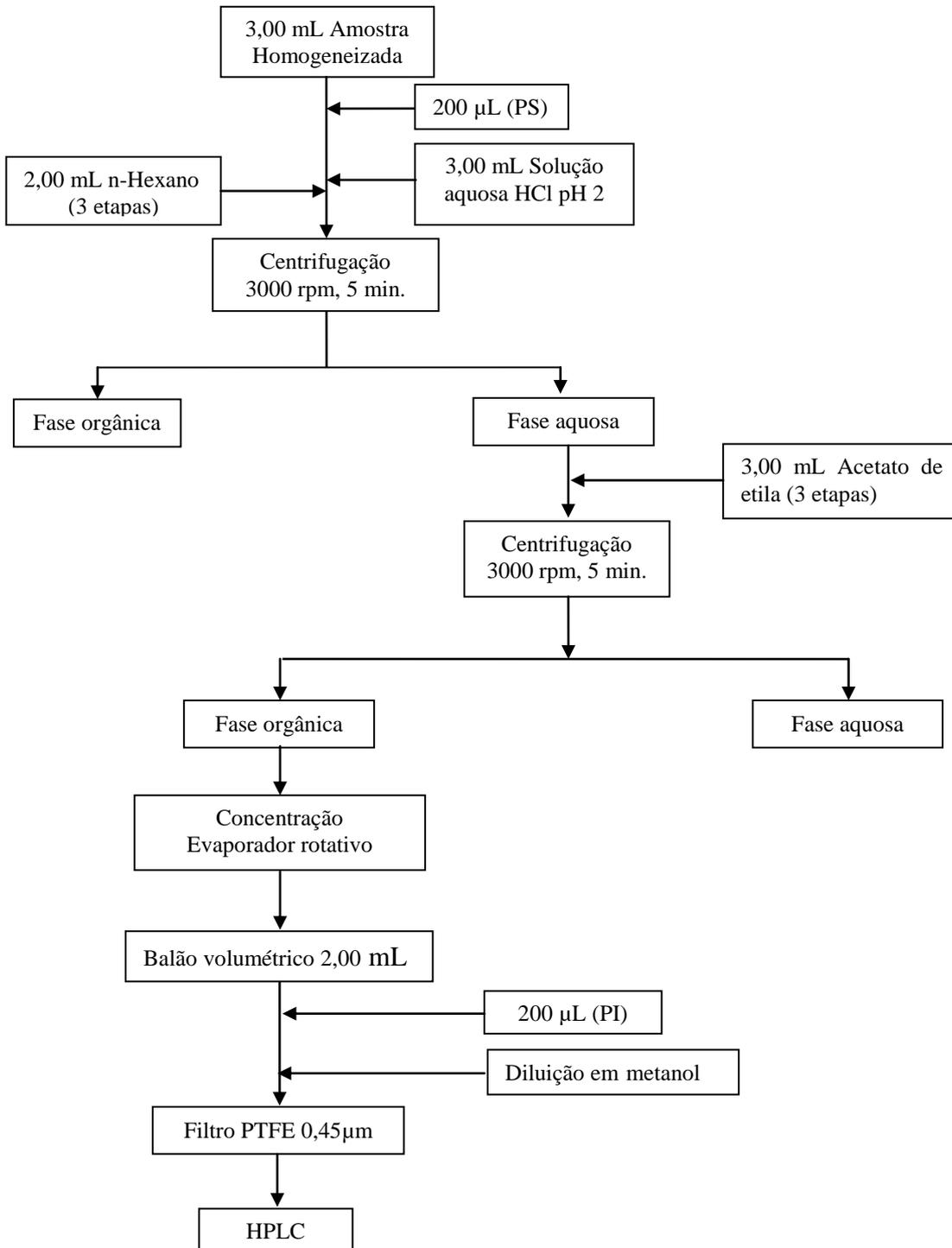
Fonte: Próprio autor, 2015.

Através do estudo das recuperações dos seis analitos foi verificado que a sonicação foi ineficaz para alguns analitos (ácidos caféico e sinápico), tendo em vista que a medida que foram aumentados os tempos de exposição das amostras a sonicação pelos cristais piezelétricos do ultrassom, maior foi a degradação dos analitos, sugerindo aumento de instabilidade sob forte cavitação. Fato este evidenciado pela presença dos picos secundários referentes a alguns analitos, nos cromatogramas obtidos para estas amostras. Nićiforović & Abramovič, 2014 relataram que sob forte agitação e aumento da temperatura os ácidos sinápico e caféico degradam rapidamente.

Uso do padrão m-cumárico como *surrogate* e o-cumárico com padrão interno foram avaliados através das análises das amostras sem fortificação e dos valores de recuperação destes ácidos nas amostras fortificadas. Os ácidos m-cumárico e o-cumárico não foram detectados nas amostras sem fortificação. Para todas as amostras fortificadas analisadas a média das recuperações e os (DPR%) para o padrão *surrogate* e padrão interno foram, respectivamente: 51,2% (5,8%) e 94,5% (3,1%) para detecção UV e para DE 51,2% (4,4%) e 89,3% (3,6%). Nos brancos analisados a média das recuperações e os (DPR%) para os padrões *surrogate* e internos foram, respectivamente 84,5% (9,9%) e 97,3% (2,6%) para UV e 83,1% (10,1%) e 95,0% (3,5%) para DE.

A extração manual foi selecionada para o tratamento das amostras e adaptando-se o método (DE MARCO *et al.*,2007) a cerca do volume de amostras extraídas, volume de solventes (n-hexano e acetato de etila), de solução de HCl pH 2,0 e uso do padrão m-cumárico como *surrogate* e o-cumárico com padrão interno. O esquema e as etapas do processo de tratamento das amostras encontram-se elucidado na figura 20 e 21.

Figura 20: Esquema de tratamento das amostras



Fonte: próprio autor, 2015.

Figura 21: Etapas dos tratamentos das amostras: (A) amostras após pesagem e adição de HCl pH 2; (B) etapa de extração com uso de n-hexano; (C) etapa de extração com acetato de etila; (D) parte orgânica removida para posterior rotaevaporação.



A



B



C



D

Fonte: Próprio autor, 2015

4.5) Avaliação do método

4.5.1) Padronização interna - Estudo das curvas analíticas

Analisando os coeficiente de Pearson (r), obtidos para as curvas analíticas em ambos os detectores, foi verificado que os mesmos apresentaram ajuste dos pontos, já que $r > 0,999$. Isto indicou ajuste dos pontos na faixa de concentração estudada, no caso de 3 a 20 mg.L^{-1} , para com a linha de regressão de acordo com RIBANI *et al.*,2004.

Com relação aos desvios padrões relativos, entre os fatores de resposta, para ambos detectores, todos foram inferiores a 15%, sendo que estes variaram na detecção UV de 3,35% (ácido caféico) a 4,50% (ácido vanílico); já para DE os DPR% variaram de 2,40% (ácido caféico) a 12,0% (ácido sinápico), evidenciando um ajuste linear da curva analítica na faixa de concentração estudada.

Foram realizados testes estatísticos a fim de verificar se haviam semelhanças nas sensibilidades das detecções UV e DE, para tal empregou-se o teste t de Student aos pares nos fatores de resposta (FR) dos dois detectores, em cada nível de concentração de cada curva analítica, na qual foram comparados os valores de $t_{\text{crítico}}$, com os $t_{\text{calculados}}$. Desta forma verificou-se que haviam diferenças significativas entre os fatores para ambos detectores a 95% de confiabilidade, tendo em vista que os valores caíram em uma área de rejeição da gaussiana (quadro 3).

Quadro 3: Teste t para ambos os detectores UV e DE

Analitos	Teste t	
	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$
Ácido siríngico	2,77	20,0
Ácido vanílico	2,77	14,3
Ácido caféico	2,77	8,97
Ácido sinápico	2,77	8,51
Ácido p-cumárico	2,77	8,02
Ácido ferúlico	2,77	6,75

Fonte: Próprio autor, 2015

A tabela 1 com as respectivas equações das retas para ambos os detectores, elucida o comportamento dos ácidos fenólicos em estudo.

Tabela 1: Curvas analíticas, FR, DPR_{FR} obtidos para os ácidos fenólicos estudados em presença de fase móvel composta de isopropanol e solução de H_3PO_4 pH 2,40 (13:87)

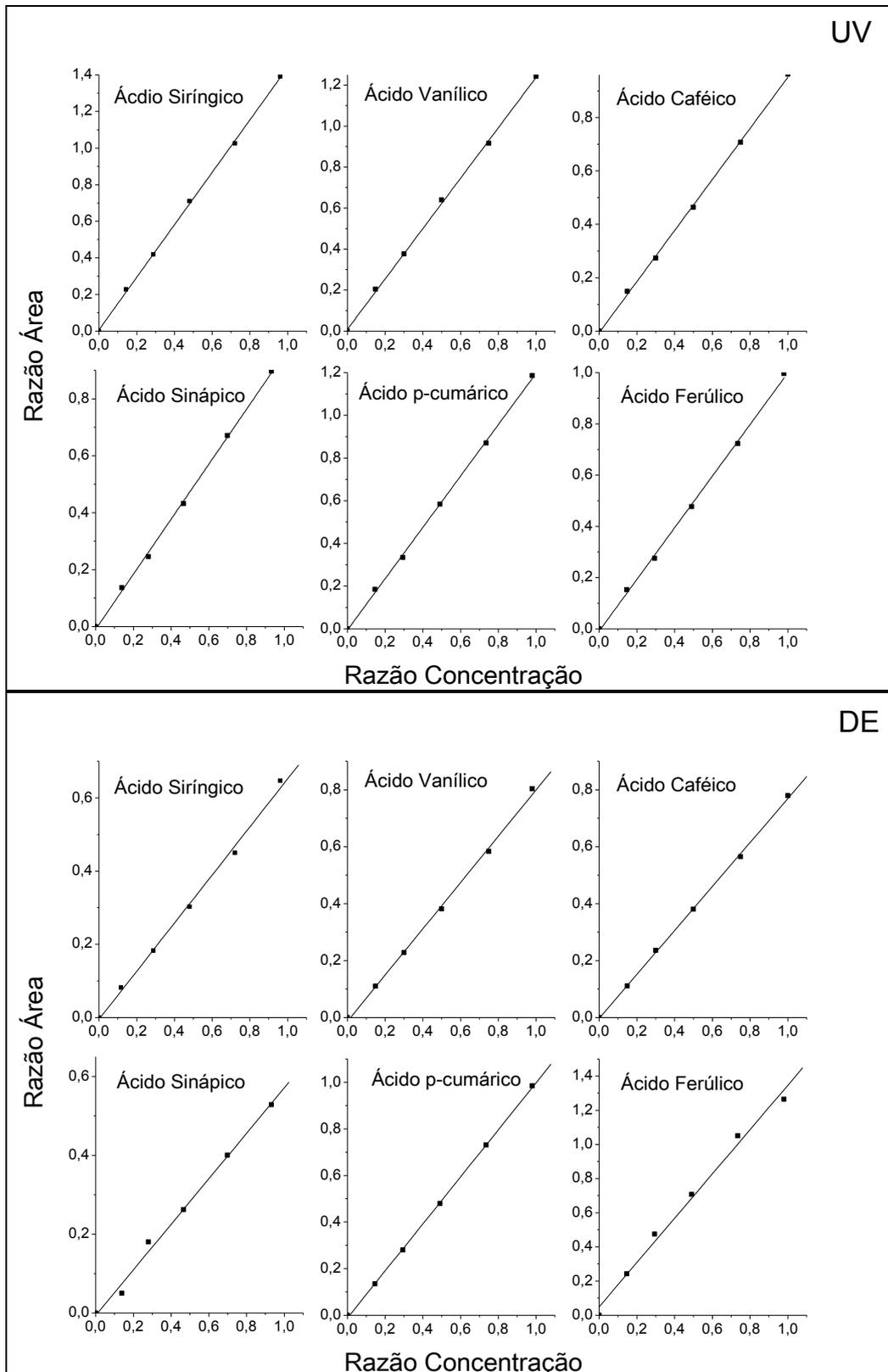
Analito	Deteccção UV			Deteccção DE		
	Equação da Reta	FR	DPR_{FR}	Equação da Reta	FR	DPR_{FR}
Ácido siríngico	$y = 1,4330x + 0,00933$ $r = 0,9998$	1,47	4,20	$y = 0,6570x - 0,003940$ $r = 0,9991$	0,625	6,03
Ácido vanílico	$y = 1,2284x + 0,0104$ $r = 0,9997$	1,27	4,50	$y = 0,8124x - 0,01204$ $r = 0,9995$	0,767	3,30
Ácido caféico	$y = 0,9563x - 0,00450$ $r = 0,9997$	0,947	3,35	$y = 0,7720x - 0,002010$ $r = 0,9998$	0,764	2,40
Ácido sinápico	$y = 0,9662x - 0,00800$ $r = 0,9995$	0,940	4,18	$y = 0,5771x - 0,005090$ $r = 0,9990$	0,557	12,0
Ácido p-cumárico	$y = 1,2019x - 0,00393$ $r = 0,9997$	1,19	3,60	$y = 1,009x - 0,01017$ $r = 0,9999$	0,969	3,58
Ácido ferúlico	$y = 1,0074x - 0,00731$ $r = 0,9994$	0,980	3,90	$y = 1,296x + 0,05132$ $r = 0,9990$	1,47	10,2

Dados: y = área analito/área do PS ; x = concentração analito ($mg.L^{-1}$) / concentração PS ($mg.L^{-1}$);
FR = Fator de resposta

Fonte: Próprio autor, 2015

As curvas analíticas obtidas para ambos os detectores podem ser verificadas pela figura 22.

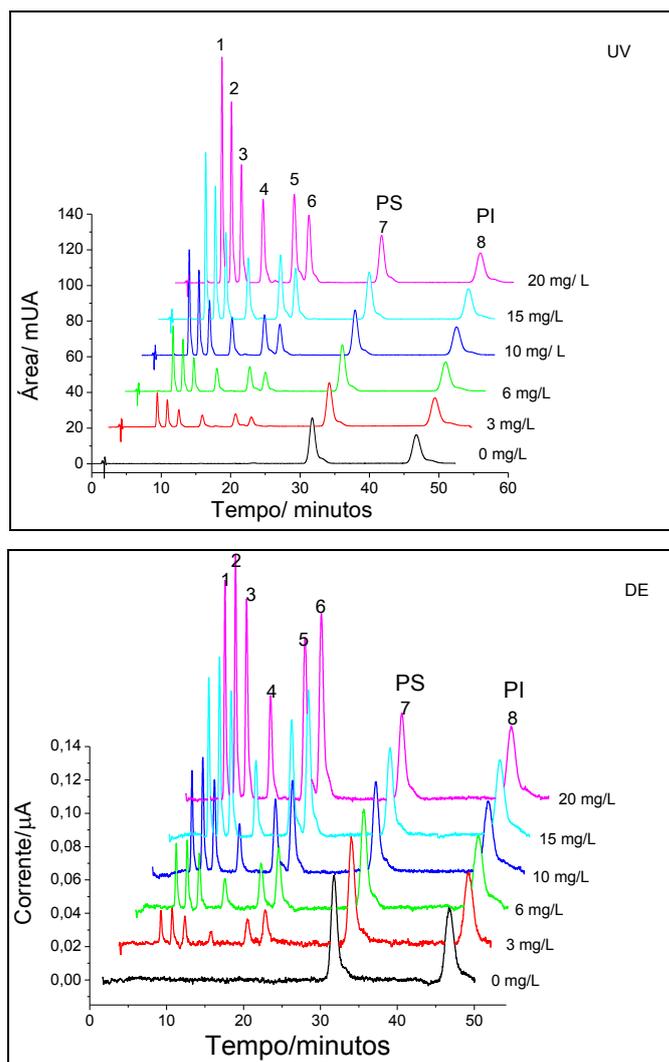
Figura 22: Curvas analíticas obtidas para os respectivos detectores ultravioleta (UV) e eletroquímico (DE)



Fonte: Próprio autor, 2015.

Baseando-se nos coeficientes de Pearson (r) para ambos os detectores, foi verificado que para a detecção UV as espécies que apresentaram melhor correlação linear foram os ácidos sirínico, vanílico, p-cumárico e caféico; já para a detecção DE, foi observado maior correlação para os ácidos p-cumárico, caféico e vanílico. Desta forma, a detecção que ofereceu melhor correlação para a grande maioria dos analitos foi a detecção UV, já que para esta foram verificados maiores valores de r , indicando melhores ajustes dos pontos. Esta diferença na sensibilidade dos ácidos fenólicos obtidos nas detecções UV e DE, devem-se também as diferenças entre ao D das espécies analisadas, que influenciam diretamente em como as espécies difundem-se em diferentes meios (figura 23).

Figura 23: Sobreposição das curvas analíticas para a faixa de concentração de 3 a 20 mg. L⁻¹ dos ácidos: (1) sirínico; (2) vanílico; (3) caféico; (4) sinápico; (5) p-cumárico; (6) ferúlico; (7) m-cumárico; (8) o-cumárico.



Fonte: Próprio autor, 2015.

4.5.2) Limites de detecção e quantificação instrumental e repetitividade

Os limites de detecção e quantificação foram calculados para ambos os detectores, onde pôde-se verificar que quando analisou-se o LD e LQ instrumental, foi observado que a grande maioria dos analitos estudados, mostraram-se mais sensíveis frente ao detector UV (tabela 2). Este fato baseia-se nas baixas correntes obtidas na DE que abrangem a faixa de 10^{-8} a 10^{-7} amperes. Essas baixas correntes influenciam diretamente no resultado dos dados obtidos, uma vez que as mesmas apresentam-se próximas a faixa de corrente limite do potenciostato utilizado neste trabalho, podendo assim apresentarem maiores instabilidades da linha de base, o que ocasiona a não determinação de certos analitos, que são facilmente confundidos com ruídos do sistema.

Tabela 2: Limites de detecção e quantificação

Analito	Instrumental			
	Detecção UV		Detecção DE	
	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)	LD (mg.L ⁻¹)	LQ (mg.L ⁻¹)
Ácido siríngico	0,019	0,063	0,047	0,160
Ácido vanílico	0,022	0,072	0,038	0,120
Ácido caféico	0,022	0,073	0,023	0,077
Ácido sinápico	0,025	0,084	0,062	0,210
Ácido p-cumárico	0,020	0,069	0,015	0,050
Ácido ferúlico	0,029	0,095	0,079	0,270

Fonte: Próprio autor, 2015.

Conforme mencionado anteriormente a avaliação da precisão do método foi realizada com base nas análises de replicatas dos experimentos e ensaio para análise da repetitividade do método, ou seja, através da análise dos respectivos DPR % dos analitos nas amostras fortificadas em estudo. Desta forma, baseando-se na curva de BOYER & HORWITZ & ALBERT, 1985; uma relação matemática pode expressar a dependência entre valores de DPR e a concentração da substância; valores até o máximo de 11% de DPR são considerados aceitáveis para o nível de concentração estudado.

Os maiores DPR% foram observados para os ácidos siríngico e sinápico em ambos detectores, fato justificado pela alta instabilidade dos mesmos, frente a variações de temperatura

(NIĆIFOROVIĆ & ABRAMOVIĆ, 2014). Observou-se com isso, que a maior precisão ocorreu quando utilizou-se a detecção UV, tendo em vista nos menores valores de desvio padrão relativo obtidos para esta detecção (tabela 3).

Tabela 3: Cálculos dos estudos de repetitividade para ambas as detecções em estudo.

Analitos	DE	UV
	DPR%	DPR%
Ácido siríngico	10,5	10,0
Ácido vanílico	8,78	6,61
Ácido caféico	9,02	8,11
Ácido sinápico	14,7	12,0
Ácido p-cumárico	6,49	3,50
Ácido ferúlico	5,65	3,84

Fonte: Próprio autor, 2015.

4.5.3) Estudo da exatidão (recuperação) das amostras fortificadas e padrão surrogate

Após análises dos dados obtidos para as amostras fortificadas, brancos e brancos fortificados foi realizado o estudo da exatidão (recuperação) do método proposto através da padronização interna, onde foi verificado que a média das recuperações das amostras fortificadas variaram de 31,0 a 153,0% para DE, e para detecção UV este variou de 36,0 a 106,0% conforme tabela 4, enquanto os menores DPR% foram observados em geral para a detecção UV. Estes menores DPR% indicam que mais preciso foram as replicatas obtidas. Como já relatado anteriormente, essa grande variação dos dados obtidos para o DE, pode ser atribuída às baixas correntes obtidas pela amperometria.

Em média, a recuperação do padrão *surrogate* (ácido m-cumárico), foi superior a 80% para ambos os detectores, demonstrando desta forma, uma boa exatidão quando utilizou-se a padronização interna associada no método desenvolvido.

Tabela 4: Médias das recuperações obtidas para amostras fortificadas (n = 3) e brancos fortificados (n = 3) em ambos os detectores quando foi utilizado a fortificação a 10 mg.L⁻¹

Analitos	Médias de recuperação, %							
	Detector Eletroquímico				Detector UV			
	AMF (n = 3)	DPR %	BF (n = 3)	DPR %	AMF (n = 3)	DPR %	BF (n = 3)	DPR %
Ácido siríngico	100,0	9,4	113,0	6,7	106,0	4,2	119,0	1,6
Ácido vanílico	153,0	3,3	90,0	6,7	101,0	5,0	110,0	5,4
Ácido caféico	100,0	7,6	41,0	16,0	82,0	1,4	44,0	3,5
Ácido sinápico	31,0	54,0	22,0	53,4	36,0	53,9	18,0	47,2
Ácido p-cumárico	67,0	10,3	80,0	4,1	69,0	6,4	82,0	3,1
Ácido ferúlico	80,0	13,1	61,0	8,1	67,0	8,7	71,0	3,9
Ácido m-cumárico (PS)	80,0		85,0		82,0		89,0	

Dados:

AMF: amostra fortificada

BF: branco fortificado

DPR%: desvio- padrão relativo percentual

Fonte: Próprio autor, 2015.

4.5.4) Análise das amostras

As médias das concentrações dos analitos obtidas nas amostras de fabricação artesanal e industrializadas analisadas encontram-se na tabela 5. Verifica-se uma similaridade entre os teores de antioxidantes nas diferentes amostras analisadas. Inicialmente acreditava-se que as amostras de fabricação industrializadas fossem apresentar menores teores dos antioxidantes, tendo em vista, que o processo de beneficiamento realizado pela indústria ao óleo de palma, pode ser decisivo na degradação das substâncias fenólicas contidas nesta matriz. Outro aspecto importante é a condição de conservação ou exposição dos produtos nas prateleiras do mercado varejista.

A média de recuperação para o PS nas amostras com determinação no UV variou de 79% a 102% e para a determinação no DE, os valores variaram de 75,9% a 91%. Os cromatogramas obtidos para a amostra A, em ambos os detectores, encontram-se elucidado na figura 24.

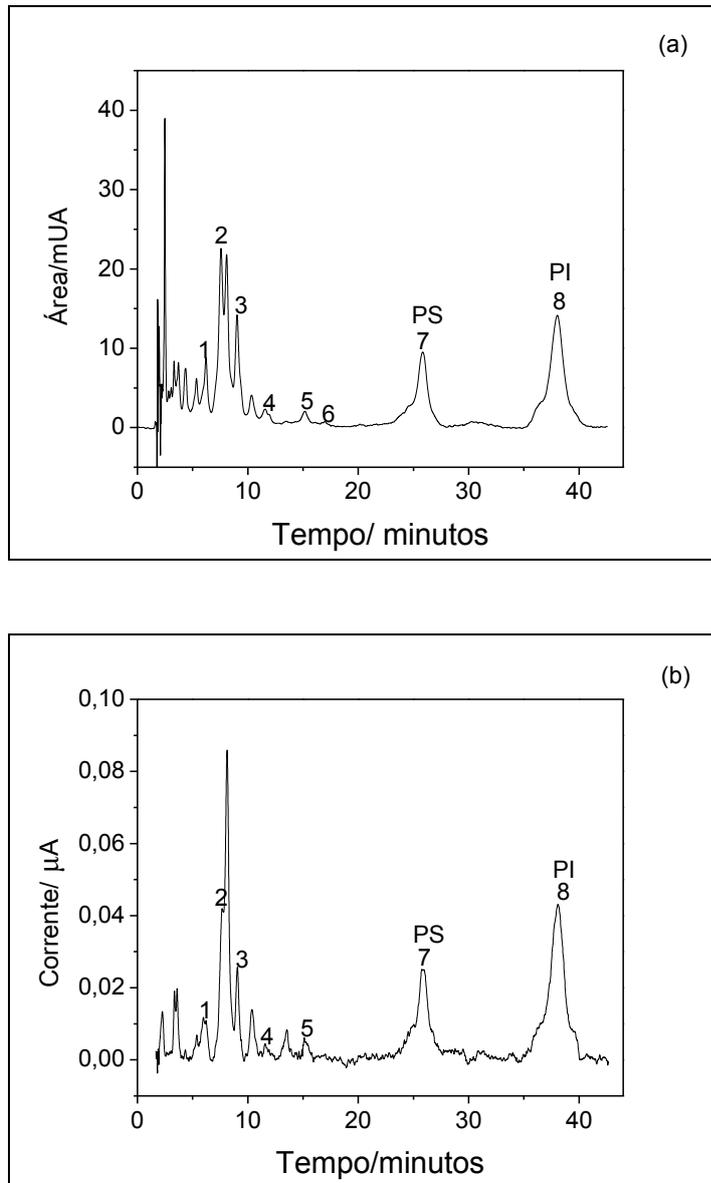
Tabela 5: Concentração (mg.L⁻¹)^a dos ácidos fenólicos e recuperação do padrão surrogate nas amostras de azeite de dendê comerciais (A e B) e artesanais (C e D) determinados por HPLC com detector UV e detector eletroquímico *homemade*.

Analito	Detector UV							
	Amostras							
	A	DPR%	B	DPR%	C	DPR%	D	DPR%
Ácido siríngico	2,2±0,1	3,7	3,4±0,7	20,7	1,1±0,1	4,8	2,2±0,3	11,6
Ácido vanílico	9,9±1,8	17,7	14,2±0,8	5,9	8,4±0,0 ₄	0,5	10,3±1,5	10,2
Ácido caféico	7,0±0,2	2,6	14,7±1,5	10,2	7,5±0,3	3,7	8,8±1,9	15,8
Ácido sinápico	1,0±0,2	17,3	2,6±0,3	13,4	2,7±0,2	6,6	1,6±0,0 ₈	4,5
Ácido p-cumárico	0,4±0,0 ₈	23,3	2,1±0,1	6,6	1,4±0,2	16,6	1,2±0,1	12,5
Ácido ferúlico	0,21	-	nd	-	0,12	-	nd	-
Recuperação PS	79		80		79		102	
Analito	Detector Eletroquímico							
	Amostras							
	A	DPR%	B	DPR%	C	DPR%	D	DPR%
Ácido siríngico	1,8±0,1	6,3	3,0±0,9	31,8	1,6±0,5	28,6	2,2±0,7	24,8
Ácido vanílico	8,8±0,2	1,8	11,9±1,4	12,0	11,0±3,7	33,9	8,7±1,0	11,0
Ácido caféico	6,8±0,2	2,1	9,9±1,0	9,7	11,2±3,2	28,9	8,4±0,7	6,2
Ácido sinápico	nd	-	nd	-	nd	-	1,3±0,4	23,7
Ácido p-cumárico	1,0±0,4	38,4	1,7±0,1	8,4	nd	-	1,0±0,4	31,2
Ácido ferúlico	nd	-	4,2	-	nd	-	nd	-
Recuperação PS	75		77		91		85	

Dados: ^a Resultados expressos como média ± desvio padrão DP de duplicata para as amostras A, B e C, e triplicata para amostra D, nd = valores abaixo do limite de detecção, Amostras comerciais: A e B, Amostras artesanais: C e D.

Fonte: Próprio autor, 2015.

Figura 24: Perfil das amostras analisadas por ambos detectores: (a) UV; (b) DE



Fonte: Próprio autor, 2015.

Os maiores valores de DPR% obtidos neste trabalho para algumas amostras analisadas, deveu-se a grande diferença entre os valores encontrados, tendo em vista, que o nível de concentração trabalhada era pequena e qualquer variação mínima nos dados, afeta a precisão.

Aplicou-se o teste t de *Student* aos pares a 95% de confiabilidade nas concentrações obtidas para ambos detectores, como forma de validar se o método desenvolvido apresentava divergências entre os detectores; conforme verifica-se no quadro 4, para todos os analitos o valor do $t_{\text{calculado}}$

foram menores que os valores de $t_{\text{crítico}}$. Esta evidência torna viável a utilização do HPLC como equipamento de separação e o acoplamento *homemade* do detector eletroquímico, como técnica para quantificação e confirmação das substâncias fenólicas em estudo.

Quadro 4 : Teste t para ambos os detectores UV e DE nas amostras analisadas

Analitos	Teste t	
	$t_{\text{crítico}}$	$t_{\text{calculado}}$
Ácido siríngico	3,18	0,35
Ácido vanílico	3,18	0,54
Ácido caféico	3,18	0,24
Ácido sinápico	3,18	2,77
Ácido p-cumárico	3,18	1,31
Ácido ferúlico	3,18	0,89

Fonte: próprio autor, 2015.

Os valores de concentração dos ácidos fenólicos determinados neste trabalho foram comparados com os valores reportados por Neo, Yun-Ping *et al.*, 2010 (tabela 6), que também determinou tais ácidos extraídos do mesocarpo do fruto do dendezeiro.

Tabela 6: Comparação dos dados obtidos pelo método desenvolvido e o reportado pela literatura

Autor	Lamarca, R.S.								Neo, Yun-Ping <i>et al.</i> , 2010.
Matriz	Amostras de azeite de dendê ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^a								Óleo extraído do mesocarpo do dendê ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) ^b
Técnica	HPLC-UV				DE				HPLC- DAD
Analitos	A	B	C	D	A	B	C	D	
Ácido siríngico	2,09	3,17	1,07	2,38	1,73	2,73	1,52	2,30	traços
Ácido vanílico	9,45	13,1	8,00	11,5	8,38	10,9	10,3	10,1	0,886
Ácido caféico	6,70	13,6	7,20	9,57	6,52	9,10	10,6	9,02	traços
Ácido sinápico	0,92	2,34	2,60	1,70	nd	nd	nd	1,50	na
Ácido p-cumárico	0,35	1,92	1,30	1,25	0,96	1,62	1,35	1,28	traços
Ácido ferúlico	0,10	nd	0,05	nd	nd	1,90	nd	nd	traços

Dados: ^a Resultados expressos como média de duplicata para as amostras A, B e C, e triplicata para amostra D,

^b Resultados expressos como média de quatro replicatas para as amostras obtidas a partir do mesocarpo,

na = ácidos fenólicos não analisados

nd = valores abaixo do limite de detecção

DE = detector eletroquímico

Fonte: Próprio autor, 2015.

5) Conclusões

Neste trabalho, desenvolveu-se uma metodologia analítica por cromatografia líquida de alta eficiência que permitiu a separação e quantificação dos ácidos siríngico, p-cumárico, vanílico, sinápico, ferúlico e caféico com detecção simultânea no UV e eletroquímica no estilo *homemade*.

O diferencial deste trabalho consistiu no acoplamento do detector eletroquímico *homemade* ao HPLC que permitiu determinar concomitantemente e em série com o MWD, espécies químicas com diferentes limites de detecção. Através da junção destas técnicas é possível em uma mesma análise determinar substâncias com características diferentes, que não sejam sensíveis no UV-VIS, mas que sejam eletroativas e vice-versa. Além disso, o uso do HPLC-MWD-DE *homemade* permite também a confirmação da análise, por exemplo, em casos de coeluição de substâncias desconhecidas, os analitos podem ter suas presenças confirmadas em uma mesma análise comparando-se os sinais e concentrações obtidos em ambos detectores.

A detecção eletroquímica *homemade* ofereceu uma melhor relação custo-benefício, principalmente quando comparado aos sistemas comerciais e ao próprio MWD. Na DE há a possibilidade de troca dos eletrodos conforme necessidade, uma vez que o acoplamento é realizado de forma manual, utilizando materiais de baixo custo e de fácil aquisição.

A avaliação do método empregando a padronização interna em ambos detectores foram realizadas; estudos no intervalo de linearidade da curva de 3 a 20 mg.L⁻¹ para cada ácido fenólico de forma individual foram avaliados, onde comparou-se os coeficientes de Pearson e fatores de resposta lineares, limites de detecção e quantificação, repetitividade, recuperação de ensaio com amostras fortificadas e brancos fortificados e recuperação do padrão *surrogate*.

Uso do ácido m-cumárico, como padrão *surrogate*, e do ácido o-cumárico, como padrão interno, foi estudado. Estes se mostraram eficientes e extremamente importantes no cálculo e monitoramento das variações do processo.

Para o tratamento da amostra foram avaliadas as condições com e sem irradiação de ultrassom durante a etapa que envolveu a hidrólise ácida dos analitos em amostras de azeite de dendê. O meio extrator influenciou desta forma, no rendimento da extração desta classe de substâncias e no processo de oxidação e degradação deles, sendo a hidrólise com solução aquosa de ácido clorídrico em pH 2, sem ultrassom o método mais eficaz para os ácidos mais instáveis, no presente caso, ácidos sinápico e caféico.

As concentrações dos ácidos fenólicos nas amostras de azeite de dendê de fabricação artesanal, variaram de 0,12 a 10,3 mg.L⁻¹ (detecção UV) e de 1,0 a 11,0 mg.L⁻¹ (DE). Já as concentrações obtidas nas amostras de azeite de dendê industrializadas variaram de 0,21 a 14,7 mg.L⁻¹ (detecção UV) e de 3,0 a 11,9 mg.L⁻¹ (DE). Os baixos valores obtidos dessas substâncias na matriz analisadas relaciona-se a rápida oxidação destes antioxidantes em exposições adversas.

O sistema de acoplamento do método HPLC-UV-DE mostrou-se promissor para determinação dos ácidos fenólicos nestas e em outras matrizes complexas, tendo em vista a similaridade entre os resultados obtidos pelos detectores.

Referências

- ALVES, Clayton Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova** v.33, n.10, p.2202–2210, 2010.
- ANDRADE, Cláudia Alexandra De *et al.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v.17, n.2, p.231–235, 2007.
- ANVISA - **Agência Nacional de vigilância sanitária**. Resolução n.4. Brasília, 1988. Disponível em:
<<http://portal.anvisa.gov.br/wps/content/anvisa+portal/anvisa/perguntas+frequentes/alimentos/a9fa1e00404f94f9a364ab89c90d54b4>>. Acesso em:17/02/2014.
- AULER, Lúcia Maria Laboissière de Alencar. **Desenvolvimento de uma Nova Fase Estacionária para Cromatografia por Troca Aniônica**. 2006. Tese doutorado- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006. Disponível em:
< <http://biq.iqm.unicamp.br/arquivos/teses/vtls000407869.pdf>>. Acesso em: 08 jan. 2015.
- BASTOS, Therezinha Xavier *et al.* Zoneamento de riscos climáticos para a cultura do dendêzeiro no estado do Pará. **Revista Brasileira de Agrometeorologia** v. 9, n. 3, (Nº Especial: Zoneamento Agrícola), p.564 -570, 2001.
- BAGCHI, K; PURI, S. Free radicals and antioxidants in health and disease. **Eastern Mediterranean Health Journal** v.4, n.2, p. 350-360, 1998.
- BOYER, K. W.; HORWITZ, W.; ALBERT, R. Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. **Analytical Chemistry**, v. 57, n. 2, p. 454-459, 1985.
- BROINIZI, Priscila Regina Bolelli *et al.* Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v.27, n.4, p. 902–908, 2007.
- BRETT, Ana Maria Oliveira; BRETT, Chistopher M. A. **Electroquímica- Princípios, métodos e aplicações**. Oxford University Press. Coimbra: Livraria Almedina, 1996.
- CABRAL, Ingridy Simone Ribeiro *et al.* Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da propólis vermelha brasileira. **Química Nova** v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.
- CYPRIANO, J. C.; MATOS, M. A. C.; MATOS, R. C. Ultrasound-assisted treatment of palm oil samples for the determination of copper and lead by stripping chronopotentiometry. **Microchemical Journal** v.90, p. 26–30, 2008.
- COLLINS, Carol H.; BRAGA, Gilberto L.; BONATO, Pierina S. **Fundamentos de cromatografia**. Campinas- SP: Editora Unicamp, 2006.

CURVELO, Fabiana Martins. **Uma imersão no tabuleiro da baiana: o estudo do óleo de palma bruto (*Elaeis guineensis*)**. 2010. Dissertação (mestrado em alimentos, nutrição e saúde) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

Disponível em:

<<https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/9544/1/Dissertacao%20Fabiana%20Curvelo.pdf>>.

Acesso em: 17 /02/ 2014.

DE CARVALHO, André Vieira; RODRIGUES ALVES, Bruno José; REIS, Veronica Massena. Resposta do dendezeiro à adição de nitrogênio e sua influência na população de bactérias diazotróficas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.41, n.1, p.293–300, 2006.

DE MARCO, Elena *et al.* Characterization and fractionation of phenolic compounds extracted from olive oil mill wastewaters. **Food Chemistry** v.104, p.858–867, 2007.

DORNAS, W. C. *et al.* Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada** v.28, n.31, p.241–249, 2007.

DOS SANTOS, Wallans Torres Pio *et al.* Análise por injeção em fluxo com detecção amperométrica de múltiplos pulsos: potencialidades e aplicações. **Química Nova** v.34, n.10, p.1753- 1761, 2011.

EMBRAPA- **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária** - Disponível em: <<https://www.embrapa.br/produtos-e-mercado/palma-de-oleo>>. Acessado em: 13/08/2015.

FARHAT, Mouna Ben *et al.* Characterization and quantification of phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia* species growing in different habitats. **Industrial Crops and Products** v.49, p. 904–914, 2013.

GUTTERIDGE, J. M. C. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical Chemistry** v.41, n.12, p.1819–1828, 1995.

HARRIS, D. C. **Análise Química Quantitativa**. 6 ed. Rio de Janeiro: LTC, 2005.

HORWITZ, W.; BOYER, K. W.; ALBERT, R. Interlaboratory Variability in Trace Element Analysis. *Analytical Chemistry*, v. 57, n. 2, p. 454-459, 1985.

ISSAOUI, Manel *et al.* Effect of the growing area conditions on differentiation between Chemlali and Chétoui olive oils. **Food Chemistry** v.119, n.1, p.220–225, 2010.

JAMAL, Parveen; IDRIS, Zulkarnain Mohamed; ALAM, Md Zahangir. Effects of physicochemical parameters on the production of phenolic acids from palm oil mill effluent under liquid-state fermentation by *Aspergillus niger* IBS-103ZA. **Food Chemistry** v.124, n.4, p.1595–1602, 2011.

KORN, M., PEREIRA, M. G., BORGES, S. S.; Algumas Aplicações Analíticas dos Ultra-sons. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Química**. v. 96, p.51- 56, 2005.

LAUENSTEIN, G. G.; CANTILLO, A. Y. (Editors). 1996. **Sampling and Analytical Methods of the National Status and Trends Program Mussel Watch Project: Update**.

LI, Sen *et al.* Research progress of natural antioxidants in foods for the treatment of diseases. **Food Science and Human Wellness**, 2014.

LIU, Qing; YAO, Huiyuan. Antioxidant activities of barley seeds extracts. **Food Chemistry** v.102, p.732–737, 2007.

LUZIA, Débora Maria Moreno; JORGE, Neuza. Potencial antioxidante de extratos de sementes de limão (*Citrus limon*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos** v.30, n.2, p. 489–493, 2010.

MELO, Enayde De Almeida *et al.* Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas** v.44, p.193–201, 2008.

MORTENSEN, A. Analysis of a complex mixture of carotenes from oil palm (*Elaeis guineensis*) fruit extract. **Food Research International** v.38, p.847–853, 2005.

NATURE - **International Weekly Journal of Science**. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v500/n7462/full/nature12309.html#close>>. Acessado em: 13/08/2015.

NEO, Yun Ping *et al.* Phenolic acid analysis and antioxidant activity assessment of oil palm (*E. guineensis*) fruit extracts. **Food Chemistry** v.122, n.1, p.353–359, 2010.

NIČIFOROVIĆ, NEDA; ABRAMOVIČ, HELENA. Sinapic Acid and Its Derivatives: Natural Sources and Bioactivity, **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**. v.13, p. 34 - 51, 2014.

PAPADOPOULOS, G., BOSKOU, D. Antioxidant effect of natural phenols on olive oil, **Journal American Oil Chemists' Society, Champaign** v.68, n.9, 669- 671, 1991.

PEREZ-JIMENEZ, Francisco *et al.* International conference on the healthy effect of virgin olive oil. **European Journal of Clinical Investigation** v.35, p.421–424 , 2005.

QIU, Yang; LIU, Qin; BETA, Trust. Antioxidant properties of commercial wild rice and analysis of soluble and insoluble phenolic acids. **Food Chemistry** v.121, n.1, p. 140–147, 2010.

RAMALHO, Valéria Cristina; JORGE, Neuza. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova** v.29, n.4, p. 755–760, 2006.

RIBANI, M. *et al.* Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova** vol. 27, N.5, p.771-780, 2004.

RUBIO-SENENT, Fátima *et al.* Phenolic extract obtained from steam-treated olive oil waste: Characterization and antioxidant activity. **LWT - Food Science and Technology** v.54, n.1, p.114–124, 2013.

SAAD, B. *et al.*; Determination of free fatty acids in palm oil samples using non-aqueous flow injection titrimetric method. **Food Chemistry** v.102, p.1407–1414, 2007.

SAMBANTHAMURTHI, R.; SUNDRAM, K.; TAN, Y. A. Chemistry and biochemistry of palm oil. **Progress in Lipid Research** v.39, n.6, p.507-558, 2000.

SANTOS, M. D. R. *et al.* Use of Ultrasound Bath in the Extraction and Quantification of Ester-Linked Phenolic Acids in Tropical Forages. **American Journal of Analytical Chemistry** v.02, n. July, p.344–351, 2011.

SCIFINDER- **Chemical Abstracts Service** - Disponível em: <<https://scifinder.cas.org/>>. Acessado em: 10/03/2015.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J.; GLAJCH, J. L. **Practical HPLC method development**, 2 ed.; Joh Wiley & Sons, Inc: New York, 1997.

SENEVIRATNE, K. N.; DISSANAYAKE, D. M. Variation of phenolic content in coconut oil extracted by two conventional methods. **International Journal of Food Science and Technology** v. 43, n. 4, p.597–602, 2008.

SENEVIRATNE, Kapila N.; HAPUARACHCHI, Chamil D.; EKANAYAKE, Sagarika. Comparison of the phenolic-dependent antioxidant properties of coconut oil extracted under cold and hot conditions. **Food Chemistry** v.114, n.4, p.1444–1449, 2009.

SILVA, José Stanley De Oliveira. **Produtividade de óleo de palma na cultura do dendê na Amazônia Oriental: Influência do clima e do material genético**. 2006. Dissertação (mestrado em fitotecnia)- Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2006.

SKOOG, Douglas A. *et al.* **Fundamentos de Química Analítica**. 8 ed. São Paulo: Cengage Learning, 2008.

SOARES, Sergio Eduardo. Ácidos fenólicos como antioxidantes, **Revista de Nutrição** v.15, n.1, p.71–81, 2002.

SOUNDARARAJAN, Vijayarathna; SREENIVASAN, Sasidharan. Antioxidant Activity of *Elaeis guineensis* Leaf Extract: An Alternative Nutraceutical Approach in Impeding Aging. **APCBEE Procedia** v.2, p.153–159, 2012.

SOUSA, Cleyton Marcos De M *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova** v.30, n.2, p.351–355, 2007.

SUN, Run-Cang; SUN, Xiao-Feng, ZHANG, Shi-Hong. Quantitative determination of hydroxycinnamic acids in wheat, rice, rye, and barley straws, maize stems, oil palm frond fiber, and fast-growing poplar wood. **J. Agric. Food Chem.** v. 49, n.11, 5122-5129, 2001.

TEIXEIRA, Camilo B. *et al.* Simultaneous extraction of oil and antioxidant compounds from oil palm fruit (*Elaeis guineensis*) by an aqueous enzymatic process. **Bioresource Technology** v.129, p.575–581, 2013.

TSIMIDOU, M.; PAPADOPOULOS, G.; BOSKOU, D. Determination of phenolic compounds in virgin olive oil by reversed-phase HPLC with emphasis on UV detection. **Food Chemistry** v.44, p.53–60, 1992.