UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

MARCIA OTTO BARRIENTOS

Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em materiais vegetais explorando cromatografia por injeção sequencial

Piracicaba
2015

MARCIA OTTO BARRIENTOS

Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em materiais vegetais explorando cromatografia por injeção sequencial

Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011

Dissertação apresentada ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente

Orientador: Prof. Dr. Fábio Rodrigo Piovezani Rocha

Piracicaba

2015

AUTORIZO A DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Seção Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Barrientos, Marcia Otto
Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em materiais vegetais explorando cromatografia por injeção sequencial / Marcia Otto Barrientos; orientador Fábio Rodrigo Piovezani Rocha. - - versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.
61 p. : il.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura da Universidade de São Paulo.

1. Ácido salicílico 2. Análise por injeção sequencial 3. *Clean-up* em linha 4. Cromatografia por injeção sequencial 5. Fluorescência 6. Materiais vegetais 8. Química analítica I. Título

CDU 543.068.3 + 543.544.5

Ao Juan, Aileen Marián e Janine...meus amores, minha vida!

Aos Jair e Maria Otto, meus pais.

Às famílias Otto e Barrientos.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter construído este caminho para mim, aberto as portas necessárias e até mesmo derrubado as paredes que surgiram.

A minha família que sonhou, deixou tudo e viveu cada momento comigo....os amo profundamente!

A família que ficou, sentiu a ausência e orou... meus pais, irmãos e cônjuges, sobrinhos. Vocês foram o alicerce deste período, obrigada por cada palavra de ânimo, por 'segurar as pontas'.

Aos amigos que me incentivaram acreditando em mim, sempre mandando mensagens neste período me fazendo sentir especial.

Aos meus alunos que, sendo desafiadores, me estimularam a continuar a estudar.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura e à Universidade de São Paulo pela infraestrutura e apoio institucional, oferecidos para o desenvolvimento das atividades de pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pelos auxílios e bolsa;

Ao doutor Fábio Rodrigo Piovezani Rocha pela oportunidade de participar de sua equipe, pela orientação e desafios propostos como aulas, apresentações, discussões. Tudo o que vivi e aprendi neste período foi porque houve um momento que você decidiu investir no meu potencial. Obrigada!

À doutora Wanessa Melchert por me conduzir nos princípios da análise em fluxo.

Aos companheiros do laboratório de química analítica pela convivência, explicações e sugestões. O suporte emocional recebido por quem já trilhou este caminho foi fundamental; obrigada doutoras Rejane, Lidiane e Daniela; foi um privilégio tê-las como amigas neste período. Eliézer você é muito estimado!

Aos técnicos do laboratório que sempre estiveram dispostos ao serem solicitados e demais funcionários deste laboratório e da pós graduação pela cordialidade e prestatividade.

Aos pesquisadores do Laboratório de Química Analítica "Henrique Bergamim Filho", Dr. Franciso J Krug e Dr. Elias A G Zagatto pela simpatia. À doutora Maria Fernanda Giné por compartilhar conhecimentos, histórias de vida e por confiar em mim. Foi uma honra ter estudado tão próximo à senhora. Ao Dr. Boaventura Reis que disponibilizou a solução ideal para cada necessidade solicitada tão prontamente e sempre esteve bem disposto compartilhando experiências expontaneamente.

Aos doutores Alex Batista, Rejane Frizzarin, Lidiane Nunes e Daniella Schweizer pela revisão da escrita, supervisão e auxílio em várias etapas do processo. Às companheiras de laboratório Andressa Adame, pela ajuda com a elaboração do projeto, e Carina Nascimento por me ensinar a operar os equipamentos e programas.

Agradeço aos que cederam amostras de soja para que esta pesquisa fosse desenvolvida: Dra. Carla Crispino, Dr. Marcelo Guerra, Kenia Carvalho e departamento de genética da ESALQ.

Aos amigos de Piracicaba que nos acolheram, não como estrangeiros mas, como de sua própria família. Muito obrigado IASD Morumbi, Paulista e Piracicaba Centro.

"Feliz é o dia em que aprendemos algo de novo."

Prof. Henrique Bergamin Filho

"Não se concentre tanto naquilo que você gosta de fazer a ponto de negligenciar o que precisa ser feito." *Max Luccado*

"Dificuldades são encontradas em todos os estudos; nunca, porém, pareis por causa de desânimo. Investigai, estudai e orai; enfrentai varonil e vigorosamente cada dificuldade; chamai em socorro o poder da vontade e a graça da paciência, e então cavai mais diligentemente, até que a gema da verdade se mostre a sua frente, límpida e linda, tanto mais preciosa por causa das dificuldades envolvidas em sua busca." *Ellen Gold White*

RESUMO

BARRIENTOS, M. O. **Desenvolvimento de procedimento analítico para a determinação de ácido salicílico em materiais vegetais explorando cromatografia por injeção sequencial.** 2015. 61 p. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

A cromatografia por injeção sequencial com extração em fase sólida (EFS) em linha foi explorada para a determinação de ácido salicílico em amostras vegetais. Uma mini coluna de polietileno, preenchida com sílica funcionalizada C18, foi utilizada para EFS, com tampão fosfato pH 5,2 como eluente. O eluato foi diretamente transferido para a separação cromatográfica em uma coluna monolítica C18, utilizando solução de acetonitrila/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v) como fase móvel. A detecção foi realizada por fluorescência com excitação em 298 nm e emissão em 406 nm. Os sinais analíticos foram baseados na altura do pico cromatográfico referente ao ácido salicílico em um tempo de retenção de 9.0 min. Os limites de detecção (99,7% de confiança) e quantificação foram estimados em 80 e 240 µg L^{-1}, respectivamente. A precisão foi estimada através do coeficiente de variação intradia (n = 10) em 0,99% e interdia (3 dias) em 3,6%. A resposta foi linear até 8,0 mg L^{-1} (r = 0,996). A resolução em relação aos demais componentes da matriz, o número de pratos e a altura equivalente a um prato foram estimados em 6,0; 3980 e 12,6 µm, respectivamente. Utilizando calibração pelo método das adições de padrão, foram estimadas recuperações entre 74,2 e 96,4% em 4 amostras de folhas de soja. Com estes resultados conclui-se que o procedimento é adequado à determinação de ácido salicílico nos materiais vegetais com a remoção de interferentes em linha, tendo as vantagens de ser um procedimento rápido (*ca.* 17 min por determinação), limpo (consumo de *ca.* 320 µL de acetonitrila por determinação), de custo relativamente baixo, suficientemente sensível e seletivo.

Palavras-chave: Cromatografia por injeção sequencial. Ácido salicílico. *Clean-up* em linha. Extração em fase sólida. Materiais vegetais. Soja. Fluorescência.

ABSTRACT

BARRIENTOS, M. O. **Development of an analytical procedure for the determination of salicylic acid in plant materials exploiting sequential injection chromatography.** 2015. 61 f. Dissertação (Mestrado) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2015.

Sequential injection cromatography with on-line solid phase extraction (SPE) was explored for the determination of salicylic acid in vegetable samples. A polyethylene column filled with C18-bonded silica was used for SPE, with a phosphate buffer pH 5.2 as eluent. The treated extract was directly sent towards chromatographic separation in a C18 monolithic column with an acetonitrile/acetate buffer solution, pH 4,75 (5:95, v/v) as mobile phase before fluorescence detection (excitation at 298 nm and emission at 406 nm). The analytical signals were based on peak height at the 9.0 min retention time. Limits of detection (99.7% confidence level) and quantification were estimated at 80 and 240 µg L^{-1}. Precision was estimated through intraday coefficient of variation (n = 10) at 0.99% and interday (3 days) at 3.6 %. A linear response up to 8.0 mg L^{-1} was estimated (r = 0.996). Resolution, number of plates and the height equivalent to one plate were estimated at 6.0, 3980 and 12,6 µm, respectively. With calibration by the standard additions method recoveries within 74.2 and 96.4 % were estimated to four soy leaves samples. Thus, the procedure is suitable for the determination of salicylic acid in the extracts with on-line removal of interferences, being a rapid (*ca.* 17 min per determination), clean (*ca.* 320 µL of acetonitrile by determination), inexpensive, and suitably sensitive and selective.

Keywords: Sequential injection cromatography. Salicylic acid. On-line clean-up. Solid-phase extraction. Vegetable materials. Soybean. Fluorescence.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura molecular do ácido salicílico 21

Figura 2. Fotografias de detalhes do sistema SIC.....29

Figura 3. Fotografia do sistema completo 29

Figura 4. Diagrama do módulo de análises para a determinação de AS em materiais vegetais 31

Figura 5. Espectros de excitação e emissão de fluorescência do AS 36

Figura 6. Efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência do AS 38

Figura 7. Cromatogramas de um extrato vegetal e solução de AS em diferentes proporções de fase móvel 39

Figura 8. Efeito do pH da fase móvel sobre a separação cromatográfica de um extrato vegetal.....40

Figura 9. Efeito do pH da fase móvel sobre a intensidade de fluorescência do AS 40

Figura 10. Cromatogramas de amostras e solução branco utilizando fase móvel CH_3CN/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v).....41

Figura 11. Cromatograma de extrato de material vegetal demonstrando a necessidade de segunda etapa da mesma eluição com FM. 43

Figura 12. Cromatogramas de extratos de materiais vegetais.....44

Figura 13. Intensidade de fluorescência de extratos obtidos em extração assistida por micro-ondas com três soluções extratoras 47

Figura 14. Efeito da temperatura e tempo de extração de AS com aquecimento assistido por micro-ondas.....48

Figura 15. Fotografia dos extratos aquosos de materiais vegetais.....48

Figura 16. Curva de calibração de AS 49

Figura 17. Curvas de calibração de AS em água e em meio de amostra 50

Figura 18. Fotografias dos extratos de materiais vegetais antes e após diluição 51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Procedimentos para separação e quantificação de AS 25

Tabela 2. Rotina de operação do sistema de injeção sequencial para a determinação de AS em materiais vegetais 32

Tabela 3. Programas de aquecimento para a extração de AS em folhas de soja assistida por micro-ondas 34

Tabela 4. Relação entre a viscosidade de solventes e a intensidade de fluorescência.....37

Tabela 5. Otimização dos volumes utilizados no *clean-up* de amostra e transferidos para a separação cromatográfica 42

Tabela 6. Recuperação de AS adicionado em 4 extratos de folhas de soja.....50

Tabela 7. Recuperações obtidas pelo método de adições de analito nos extrados de materiais vegetais 51

Tabela 8. Características analíticas de procedimentos cromatográficos para a determinação de AS em materiais vegetais 52

Tabela 9. Concentração de AS nas amostras de folhas de soja 53

Tabela 10. Quantidade de AS em diferentes amostras vegetais 54

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AS	Ácido salicílico
C12	Sílica funcionalizada com dodecadecilsilano
C18	Sílica funcionalizada com com octadecilsilano
CLC	Cromatografia líquida capilar
CV	Coeficiente de variação
DAD	Detecção espectrofotométrica por arranjo de diodos
EFS	Extração em fase sólida
ELL	Extração líquido-líquido
ESI	Ionização por eletrospray
FE	Fase estacionária
FL	Fluorescência
FM	Fase móvel
GC	Cromatografia a gás, do inglês *gas chromatography*
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *high performance liquid chromatography*
MS	Espectometria de massas, do inglês *mass spectrometry*
MW	Micro-ondas, do inglês *microwave*
PEEK	Poli(éter-éter-cetona), do inglês *Polyetheretherketone*
PFA	Perfluoroalcoxi
RP	Fase reversa, do inglês *reversed phase*
SIA	Análise por injeção sequencial, do inglês s*equencial injection analysis*
SIC	Cromatografia por injeção sequencial, do inglês *sequential injection chromatography*
TFA	Ácido trifluoracético, do inglês *trifluoroacetic acid*
TFM	Teflon® modificado
UV/Vis	Espectrofotometria no ultravioleta/visível
US	Ultrassom

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 21

1.1. Ácido salicílico em materiais vegetais 21

1.2. Cromatografia por injeção sequencial 26

2. OBJETIVO 27

3. PARTE EXPERIMENTAL 28

3.1. Materiais e métodos 28

3.1.1. Equipamentos e acessórios 28

3.1.2. Reagentes e soluções 30

3.1.3. Sistema de cromatografia por injeção sequencial com EFS em linha 30

3.1.4. Preparo de amostras 33

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES 36

4.1. Fluorescência do ácido salicílico 36

4.2. Cromatografia por injeção sequencial com EFS em linha 38

4.3. Extração de AS em materiais vegetais 45

4.4. Características analíticas 49

4.5 Quantificação de AS nas amostras 53

5. CONCLUSÕES 55

REFERÊNCIAS 56

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ácido salicílico em materiais vegetais

O ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzóico), Figura 1, desempenha um papel importante em várias áreas (*e.g.* medicina, cosmética, farmacêutica, química e agrícola) como princípio ativo, conservante e solubilizante. Faz parte de um grupo de compostos denominados contaminantes emergentes [1], por não terem valores regulamentados de quantidades máximas toleradas no ambiente, nem procedimentos analíticos recomendados por órgãos de controle. Os primeiros registros da utilização do ácido salicílico (AS) como princípio ativo datam de 1500 A.C. com o uso das folhas do salgueiro pelos egípcios. Seu isolamento, em 1829, por Henry Leroux e produção, em 1838, por Raffaele Piria contribuiram para popularizar sua aplicação [2].

O AS apresenta solubilidade de 2,20 g L^{-1} a 25 ºC [3], dois hidrogênios ionizáveis - hidrogênio carboxílico (pK_1 = 2,98) e hidrogênio fenólico (pK_2 = 13,7) e coeficiente de partição octanol/água (log K_{ow}) de 2,26 [4]. O AS apresenta estrutura ressonante de elétrons π típica de moléculas aromáticas [5], o que lhe confere fluorescência.

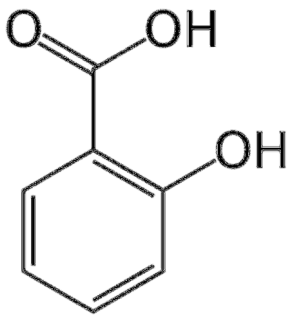


Figura 1 - Estrutura molecular do ácido salicílico

O AS atua como um fitohormônio, com papel de sinalizador endógeno em mecanismos fisiológicos nas plantas [6,7,8,9,10]. Os níveis de AS nos vegetais são influenciados por maturação, estresse mecânico e osmótico, ataques de patógenos, herbívoros, defensivos agrícolas, temperatura e irradiação UV [11,12]. As funções do AS foram pesquisadas em diferentes espécies de plantas e constatou-se que ele tem ação direta no crescimento [10], maturação [11], resposta fotossintética [12] e de

mecanismos de proteção [13] aos estresse abiótico [14] e biótico [15]. Na reação aos ataques patogênicos desenvolve a síndrome de resistência adquirida de forma local e sistêmica [16,17,18,19]. Sua utilização exógena, em culturas como arroz, soja, feijão e milho, tem sido amplamente pesquisada para aumentar os mecanismos de defesa e a resistência destas culturas; contudo, sintomas de fitotoxicidade foram observados na aplicação de concentrações superiores a 1 mmol L^{-1} [14,20,21].

O AS foi quantificado em flores e folhas com 2 a 4 semanas de idade em 34 espécies, dentre estas algodão, milho, feijão, tomate, tabaco e amendoim, em quantidades entre 0,01 e 5,05 µg g^{-1}. AS foi também quantificado em folhas de soja (1 µg g^{-1}) e arroz (37,19 µg g^{-1}) [19]. Em plantas de batata, a presença endógena do AS foi detectada em diferentes partes, como raízes, caules, flores, tubérculos, cascas dos tubérculos e folhas, tanto na forma livre, quanto conjugada. Em folhas de batata com uma semana de idade e cultivadas com pouca luz foram encontrados 11,2 ng g^{-1} de AS livre e naquelas com 9 a 10 semanas que cresceram com maior quantidade de luz foi detectado 1000 ng g^{-1} [20].

Os compostos fenólicos encontrados em vegetais são formados a partir da fenilalanina e subdividem-se em ácidos fenólicos (ácidos hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos), taninos condensados e hidrolisáveis, flavonóides (*e.g.* antocianinas, chalconas, flavonas, flavononas, isoflavonas e xantonas) e outros como alquilresorcinóis, capsaicinóides, cumarinas, lignanas e estilbenos [21]. Encontram-se também compostos clorofílicos, terpenos, graxas e gorduras [22]. O AS ocorre em plantas nas formas livre e conjugada [23]. O AS é produzido na forma livre, que é ativa, porém a maior parte é transformada em derivados glicosilados e/ou metilados, formas inativas destinadas ao armazenamento pelas plantas. O AS conjugado pode ser novamente convertido para a forma livre atendendo às necessidades bioquímicas da planta [24]. Optou-se por determinar a forma livre de AS por ser a forma ativa e devido à baixa biodisponibilidade do AS conjugado [25]. A determinação do AS total requer hidrólise ácida ou alcalina, seguida de neutralização da solução. A quantificação do AS conjugado é calculada por diferença entre o AS total e o livre [20,22,26].

Devido à complexidade da matriz, os procedimentos analíticos para a determinação de AS em vegetais envolvem etapas de extração e limpeza (*clean-up*) da amostra, para posterior separação cromatográfica.

O método convencional de extração de ácidos fenólicos de amostras vegetais é moroso e utiliza solventes de diferentes polaridades (*e.g.* clorofórmio, éter dietílico, dimetilformamida, acetato de etila, acetona e metanol) em volumes elevados e sob refluxo. Como alternativa, têm-se utilizado extrações assistidas por ondas ultrassônicas e radiações de micro-ondas, alcançando rendimentos superiores ao do método convencional, além de economizar reagentes e serem mais rápidos [27,28].

A etapa de limpeza da amostra é necessária para a remoção dos compostos potencialmente interferentes, de modo que o analito possa ser quantificado com confiabilidade. Esta é usualmente uma etapa crítica de um procedimento analítico e varia de acordo com a matriz vegetal e tipo de analito [29]. Extração líquido-líquido (ELL) foi adotada no primeiro procedimento para o *clean-up* de materiais vegetais visando determinação de AS [30]. Este processo requer solventes orgânicos apolares, ou levemente polares, como ciclopentano, hexano, isopropanol e acetato de etila. Apesar de ser eficiente e amplamente utilizada, a ELL frequentemente emprega elevados volumes de solventes orgânicos e necessita de extrações sucessivas para se atingir alta eficência de extração, caracterizando-o como um procedimento trabalhoso, demorado e de difícil automação [31,32]. Alternativamente, a extração em fase sólida (EFS) é comumente utilizada e permite superar alguns destes inconvenientes [22].

A EFS permite remover componentes da matriz e concentrar o analito. Usualmente, são obtidos altos fatores de enriquecimento em uma única extração, além de evitar o consumo ou consumir menores volumes de solventes orgânicos [32]. Na determinação de AS, o adsorvente C18 permite a remoção de compostos apolares potencialmente interferentes, como óleos, ceras, esteróis e clorofilas [33]. Outro aspecto positivo da EFS é a possibilidade da sua implementação em linha, trazendo vantagens como a redução do consumo de amostra e solventes, além da redução no tempo de tratamento da amostra. Adicionalmente, a automação frequentemente diminui riscos de contaminações e perdas do analito, especialmente quando realizada em um sistema fechado.

Devido às baixas concentrações de AS em amostras vegetais, sua determinação exige técnicas analíticas altamente sensíveis. Dentre estas técnicas destacam-se a cromatografia a gás (GC) e a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) acoplada a sistemas de detecção por espectrometria de massas (MS) ou fluorescência (FL). Usualmente determina-se 2 ou mais ácidos fenólicos em uma análise [8,31,34]. Diferentes procedimentos para a separação e quantificação do AS em vegetais envolvendo etapas de extração, *clean-up* e separação cromatográfica são descritos na Tabela 1.

Tabela 1 - Procedimentos para separação e quantificação de AS

Amostra	Extração*	*Clean-up*	Separação	Fase móvel	Detecção	Ref.
Amendoim (grãos)	CH_3OH 90%/US	EFS Strata X	HPLC–C18	Gradiente - A: 0,1% TFA aquoso B: 0,1% TFA em CH_3CN	UV/Vis	25
Arabidopsis (folhas)	CH_3OH 10% em ácido acético 1%	-	HPLC-C18	Gradiente A: 5% CH_3CN, 0,1% CHOOH em meio aquoso B: 94,9% CH_3CN, 0,1% COOH e 5% H_2O	MS/MS	9
Arabidopsis (folhas)	CH_3OH	EFS Oasis HBL	Eletroforese capilar	H_2O	UV/Vis	35
Batata (folhas)	CH_3OH 90%	ELL	HPLC-C18	Isocrática - 20% CH_3OH, 5% CH_3CN e 75% citrato de sódio 20 mmol L^{-1} pH 3,75	FL	20
Café (folhas)	CH_3OH/US	ELL	HPLC-C12	Gradiente - A: 0,5% CHOOH B: CH_3CN	MS	31
Cana de açúcar (folhas)	H_2O/MW	-	HPLC-C18	Gradiente - A: 0,5% CH_3COOH B: 0,5% CH_3COOH em CH_3OH	MS	36
Cereais	CH_3OH 70%/US	EFS Oasis® HBL	HPLC–C18	Gradiente - A: CH_3OH B: H_2O/CH_3COOH (99:1, v/v)	UV/Vis	26
Choupo ou Álamo (folhas)	CH_3OH/HCl 0,1%	-	CLC–C18	Gradiente - A: 1% NH_4OH/5 mmol L^{-1} NH_4CH_3COO B: 1% NH_4OH/5 mmol L^{-1} NH_4CH_3COO em CH_3OH	MS/MS	37
Milho (folhas)	Acetona 70% em ácido cítrico 50 mmol L^{-1}	ELL	GC	Hélio	MS	34
Pepino	$CH_3OH/H_2O/CH_3COOH$ (90:9:1 em volume)	-	HPLC-C18	Gradiente - A: 0,05% CH_3COOH B: CH_3CN	MS	38
Tabaco (folhas)	-	-	-	-	Bioluminescência	39
Tabaco (folhas)	Acetona 70% em ácido cítrico 50 mmol L^{-1}	ELL	GC	Hélio	MS	34
Tomate (folhas)	$CH_3OH/HCCl_3$ (9:1, v/v)	-	GC	Hélio	MS	40
Waxberry (*Myrica rubra*)	Acetato de etila	-	HPLC–C18	Isocrática - 0,1% CHOOH/CH_3CN (70:30, v/v)	UV/Vis	41
34 espécies (folhas e flores)	CH_3OH 90%	ELL	HPLC-2 colunas: fenil e C18	Isocrática - 45% H_2O 55% CH_3OH com 0,025% H_3PO_4 (m/v)	FL	19

ELL: extração líquido-líquido, GC: cromatografia a gás, MS: espectrometria de massas, EFS: extração em fase sólida, FL: fluorescência, HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência, C18: sílica funcionalizada com octadecilsilano, C12: sílica funcionalizada com dodecadecilsilano, TFA: ácido trifluoracético, UV/Vis: espectrofotometria no ultravioleta/visível, CLC: cromatografia líquida capilar, MW: micro-ondas, US: ultrassom.
*Quando não indicada, foi utilizada agitação com vórtex; todos os procedimentos utilizam centrifugação.

1.2. Cromatografia por injeção sequencial

A cromatografia por injeção sequencial é uma técnica de separação baseada no acoplamento de colunas capazes de operar a baixa pressão (*e.g.* monolíticas ou de núcleo fundido) a sistemas de análises por injeção sequencial (SIA) [42]. Desta forma, a SIC combina o potencial de separações cromatográficas à versatilidade para o gerenciamento de soluções (*e.g.* diluições, pré-concentração, limpeza da amostra e derivação pré ou pós-coluna) inerente aos sistemas SIA. Os volumes e as vazões da amostra e da fase móvel são programáveis por uma bomba tipo seringa e por uma válvula seletora. O equipamento de SIC é de menor custo que aquele de HPLC e tem pequeno porte, podendo ser facilmente transportado e acoplado a diferentes detectores.

Em SIC, o tempo de retenção do analito geralmente não excede 8 min, devido às limitações do volume da seringa e da vazão. Eluições em tempos maiores requerem que a seringa seja novamente preenchida. Eluição isocrática e colunas monolíticas são usuais nas separações; no entanto, têm sido também exploradas duas fases móveis manipuladas por duas válvulas seletoras, visando implementar eluição por etapas [43]. Outra potencialidade foi demonstrada pelo *clean-up* e pré-concentração em linha explorando coluna de troca iônica; melhor desempenho na separação de sulfonamidas foi obtido com coluna de núcleo fundido em comparação à monolítica [44]. A aplicabilidade da SIC tem sido ampliada com a utilização de técnicas como cromatografia micelar [45] e pré-concentração na coluna cromatográfica [46].

Desde a proposição da SIC, em 2003, por Satínský et al., a maioria das aplicações referem-se a análises farmacêuticas [47,48,49,50,51]. Em trabalhos recentes, são encontradas aplicações em amostras ambientais [44], alimentos e fluidos biológicos [43]. Na análise de plantas, SIC foi utilizada apenas para a separação de 7 fenólicos em especiarias, como orégano e alecrim [42].

2. OBJETIVO

O objetivo deste trabalho foi o desenvolvimento de um procedimento analítico alternativo para a determinação de AS, considerando que os procedimentos usuais envolvem a extração do analito e limpeza da amostra com solventes orgânicos e separação cromatográfica. Particularmente, buscou-se um procedimento mais simples e rápido, com a redução de custos, menor consumo de reagentes e diminuição na geração de efluentes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. Materiais e métodos

3.1.1. Equipamentos e acessórios

Extração em fase sólida e separação cromatográfica foram realizadas em um sistema de cromatografia por injeção sequencial SIChrom™ (FIAlab Instruments®), Figura 2a. Este equipamento é composto por uma válvula seletora de oito portas construída em aço inox (C5H, Valco Instrument Co.), Figura 2b, e por uma bomba tipo seringa com reservatório de 4,0 mL (Figura 2c). Uma válvula seletora de oito portas de média pressão (C5H, Valco Instrument Co.) foi acoplada ao sistema SIChrom™ para a EFS em linha. Os dispositivos foram controlados por um microcomputador por meio de programa fornecido pela FIALab® (FIAlab 5.9®). Tubos *PEEK* com 0,25 e 0,5 mm de diâmetro foram utilizados no transporte das soluções. Uma mini coluna de polietileno (30,0 mm x 1,5 mm d.i.), Figura 2d, preenchida com *ca.* 70,0 mg de sílica funcionalizada com octadecilsilano (C18) foi utilizada para o *clean-up* das amostras (Figura 2e); telas de poliéster de 270 mesh foram inseridas nas extremidades da mini coluna para a retenção do material adsorvente. Coluna monolítica (Onyx™ Phenomenex® C18, 50,0 mm x 4,6 mm) acoplada a uma pré coluna (Onyx™ Phenomenex® C18, 5,0 mm x 4,6 mm) foi utilizada para a separação cromatográfica.

As medidas de fluorescência foram realizadas em um espectrofluorímetro Cary Eclipse (Varian) equipado com uma cubeta de fluxo de quartzo com 10 mm de caminho ótico e volume de 40 µL. Uma fotografia do sistema completo é apresentada na Figura 3.

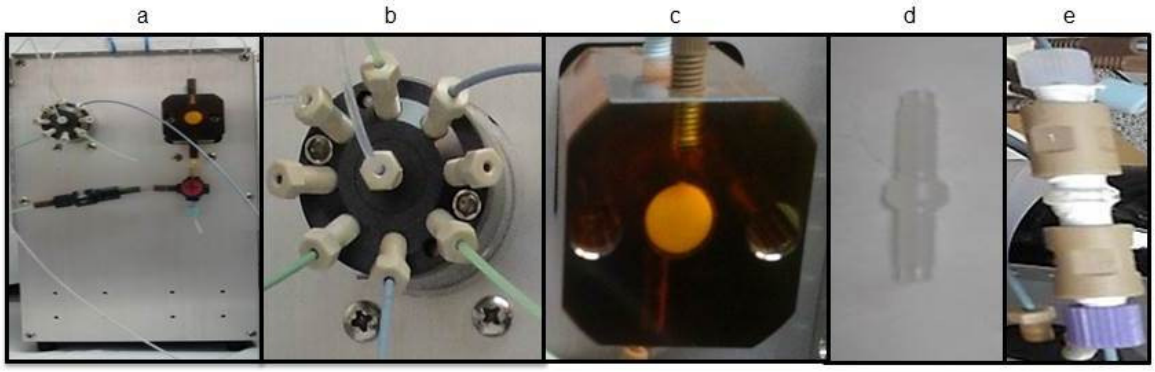


Figura 2 - Fotografias de detalhes do sistema SIC. (a) parte frontal; (b) válvula seletora C5H; (c) reservatório da bomba tipo seringa; (d) suporte de polietileno utilizado para a coluna de EFS e (e) mini coluna instalada no sistema

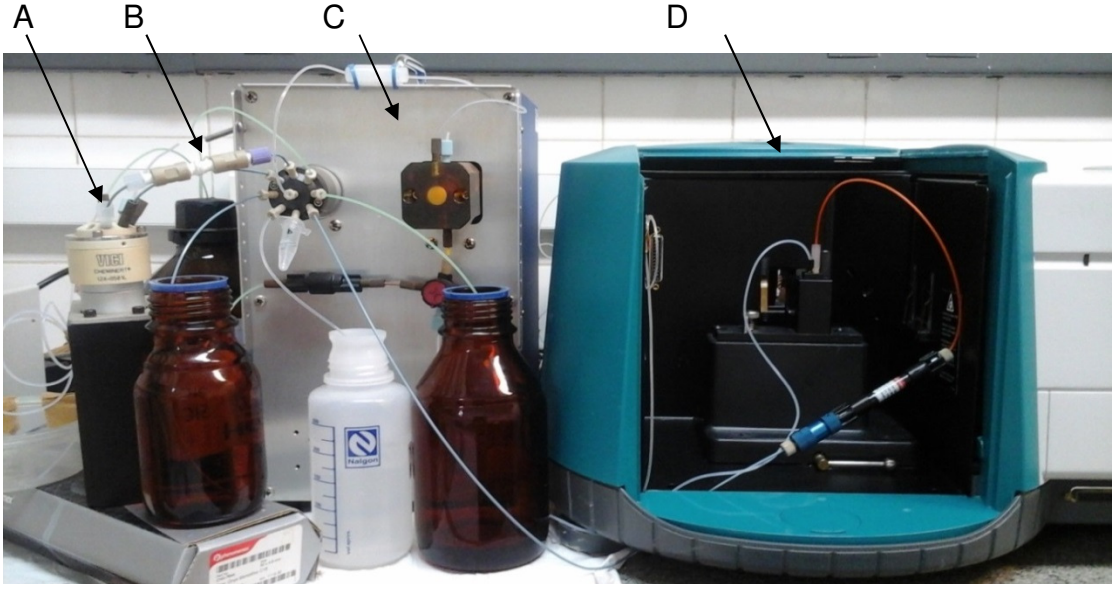


Figura 3 - Fotografia do sistema completo. (A) válvula seletora adicional; (B) mini coluna para EFS (30,0 mm x 1,5 mm); (C) SIChrom^{TM}; (D) espectrofluorímetro

No preparo das amostras foi utilizada uma estufa de circulação forçada (FANEM) e um moinho criogênico (Freezer Mill, modelo 6800, SPEX) com frasco cilíndrico de polietileno com duas tampas de inox. Para a extração de AS, foi utilizado um forno de micro-ondas (Ethos – 1600, Milestone) com 10 frascos fechados de PFA. Uma centrífuga para tubos (modelo Q222T, Quimis) foi utilizada para a separação das partículas sólidas. Uma balança (AX 304, Mettler Toledo) e um pHmetro digital (2mp, TEC) foram utilizados no preparo das soluções. Em todo

trabalho, tubos graduados de polietileno de 15 e 50 mL foram utilizados para manipulação e preservação de extratos e soluções a 4 ºC.

3.1.2. Reagentes e soluções

Todas as soluções foram preparadas com água deionizada (resistividade > 18,2 MΩ cm), reagentes de grau analítico e solventes grau HPLC. Ácido salicílico (Merck) foi utilizado para o preparo de soluções estoque 1,000 g L^{-1}, sendo as outras soluções obtidas a partir de diluições. Acetato de sódio (Merck) e ácido acético glacial (Merck) foram utilizados para a preparação de tampão acetato 0,2 mol L^{-1}, pH 4,75. Acetonitrila (Merck) foi utilizada para o preparo da fase móvel - acetonitrila/tampão acetato (0,2 mol L^{-1}, pH 4,75), 5:95 (v/v) e para a limpeza da coluna cromatográfica. Metanol (Merck) foi utilizado para ambientação e limpeza da mini coluna de EFS. O eluente (tampão fosfato 0,2 mol L^{-1}, pH 5,2) foi preparado a partir de $NaH_2PO_4.H_20$ (Merck), com pH ajustado com HCl. Nos experimentos iniciais e otimização do procedimento foram utilizados ácido cítrico, ácido fosfórico 85%, acetona e etanol (todos provenientes da Merck) e cartucho Supelclean LC-18 (1g).

3.1.3. Sistema de cromatografia por injeção sequencial com EFS em linha

Na descrição do diagrama do módulo de análises (Tabela 2), o código V_xP_y é utilizado para indicar a porta *y* da válvula *x* (Figura 4). A rotina operacional otimizada para a determinação de AS em materiais vegetais utilizando *clean-up* por EFS em linha, separação cromatográfica e detecção por fluorescência é mostrada na Tabela 2. Todos os experimentos foram realizados em triplicata e as medidas foram baseadas em altura de pico cromatográfico, da mesma forma que outros trabalhos utilizando SIC [42,44,52]. Todas as medidas fluorimétricas em SIC foram realizadas com comprimentos de onda de excitação e emissão de 298 e 406 nm e com fendas de emissão e excitação correspondentes à resolução espectral de 20 nm. As soluções de referência e amostras foram mantidas em tubos tipo Eppendorf® (1,5 mL). Durante as medidas, os tubos foram mantidos abertos para evitar a diminuição da pressão interna com a retirada de alíquotas das soluções.

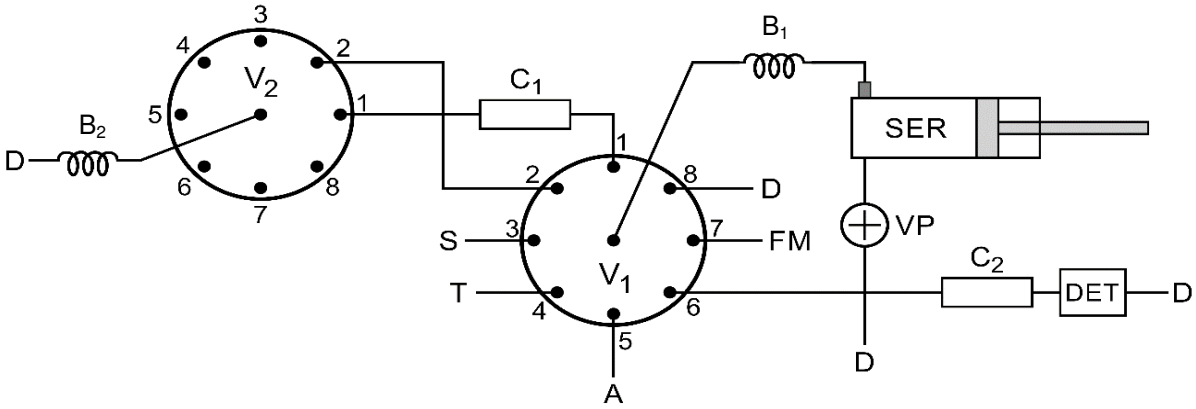


Figura 4 - Diagrama do módulo de análises para a determinação de AS em materiais vegetais. A = amostra; FM = fase móvel acetonitrila/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v); S = metanol; T = tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} pH 5,2; B_1, B_2 = bobinas de retenção de 90 e 80 cm, respectivamente; C_1 = mini coluna para EFS (30,0 mm x 1,5 mm); C_2 = coluna monolítica C18 (50,0 mm x 4,6 mm) acoplada a pré-coluna C18 (5,0 mm x 4,6 mm); SER = bomba tipo seringa; V_1, V_2 = válvulas seletoras; VP = válvula de segurança (500 psi); DET = espectofluorímetro; D = descarte

Tabela 2 - Rotina de operação do sistema de injeção sequencial para a determinação de AS em materiais vegetais

Etapa	Válvula	Op. bomba	Solução	Volume (µL)	Vazão (mL min^{-1})	Tempo (s)	Atividade
1	V_1P_4	aspirar	T	450	4,2	16,1	
2	V_1P_5	aspirar	A	50	0,6	16,1	
3	V_1P_1; V_2P_1	dispensar	A + T	190	0,6	30,5	*clean-up*
4	V_1P_2; V_2P_2	aspirar	AT	20	0,6	13,3	condicionamento
5	V_1P_8	dispensar	AT + T	330	4,2	16,1	limpeza
6	V_1P_7	aspirar	FM	3920	4,2	67,1	
7	{ V_1P_2 V_2P_2	aspirar	AT	30	0,6	14,5	
8	V_1P_6	dispensar	FM + AT	3950	0,6	406,1	eluição
9	V_1P_7	aspirar	FM	2500	4,2	47,1	
10	V_1P_6	dispensar	FM	2500	1,2	136,6	eluição/limpeza
11	V_1P_4	aspirar	T	450	4,2	18,1	
12	{ V_1P_1 V_2P_1	dispensar	T	450	0,6	56,5	limpeza
13	V_1P_4	aspirar	T	450	4,2	18,1	
14	{ V_1P_1 V_2P_1	dispensar	T	450	0,6	56,5	limpeza
15	V_1P_4	aspirar	T	400	4,2	17,1	
16	{ V_1P_2 V_2P_2	dispensar	T	400	0,6	51,5	limpeza

A = amostra; AT = amostra pré-tratada; T = tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} pH 5,2; FM = acetonitrila/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v); V_xP_y = porta y da válvula x.

Para o *clean-up* das amostras em linha, aspirou-se 450 µL de tampão fosfato e 50 µL de amostra para a bobina B_1 (etapas 1 e 2); destes, 190 µL foram dispensados através da mini coluna C_1 (etapa 3) e o eluato foi coletado na bobina B_2. Aspirou-se então 20 µL do eluato através do percuso de 12 cm entre V_1P_2 e V_2P_2 (etapa 4) para condicionamento do percurso. O volume de 190 µL foi otimizado para exceder à zona mais concentrada de AS o suficiente para que o volume de 20 µL aspirados para ambientação do percurso entre V_2P_2 e V_1P_2 chegue à zona de maior concentração de onde será retirada a alíquota (30 µL) que passará por separação cromatográfica. Foram descartados 330 µL (etapa 5), sendo 20 µL do eluato dispersos em 310 µL do tampão. A bobina B_2 não ficou em contato com a solução descartada sendo esgotada e limpa nas etapas 12, 14 e 16.

Após o *clean-up* da amostra, condicionamento e limpeza de percursos, foram aspirados 30 µL de amostra pré tratada e inseridos na coluna cromatográfica, seguidos de eluição com 6420 µL de FM, volume dividido em duas injeções sequenciais devido à capacidade do reservatório da bomba de seringa (etapas 6 a 10). Etapas de condicionamento e limpeza da coluna C_2 (9 e 10) e da coluna C_1 e reator B_2 (11 a 16) foram inseridas na rotina preparando o sistema para a medida seguinte [53]. As etapas 13 e 14 referem-se a repetições das etapas 11 e 12.

Um condicionamento prévio ao início dos experimentos foi realizado no sistema para a retirada de possíveis bolhas. Assim, duas alíquotas de 450 µL de tampão fosfato foram injetadas na mini coluna C_1 e uma alíquota de 400 µL no percurso entre as portas V_1P_2 e V_2P_2, semelhante às etapas 11 a 16 da Tabela 2. Os volumes foram fracionados para evitar a introdução de tampão fosfato na seringa e consequente mistura com a FM. Foram também utilizados 2500 µL de FM para condicionamento da coluna C_2, como nas etapas 9 e 10.

3.1.4. Preparo de amostras

Quatro amostras de folhas de soja, *Glycine max* (L.) Merril, foram analisadas pelo procedimento desenvolvido. A amostra 1 eram folhas de soja verdes não-transgênica (cultivar IAC 100), cultivadas em casa de vegetação (ESALQ/USP) e colhidas em 21/03/2014. Folhas de soja de origem e maturação incertas, moídas criogenicamente em 2008, compõem a amostra 2. As amostras 3 e 4 são compostas

por folhas de soja colhidas com 122 dias, em campo de plantação da ESALQ/USP, em 07/04/2014. Estas amostras apresentavam dois níveis de maturação, uma verde (amostra 3) e outra amarela (amostra 4).

Após a colheita, as folhas de soja foram lavadas em água corrente para a retirada de terra, seguida de água deionizada e secagem sob papel absorvente por 5 dias. A secagem foi completada em estufa de circulação forçada a 50 ºC por 3 dias em sacos de papel craft perfurados. As amostras secas foram cominuídas em moinho criogênico utilizando um programa de 1 ciclo de 20 impactos s^{-1} por 2 min [54]. A cominuição por criogenia foi realizada para preservar a integridade do analito que se degrada a temperaturas acima de 120 ºC [55].

O processo de extração assistido por radiação micro-ondas foi escolhido baseado em propostas anteriores para extração de AS e de compostos fenólicos [27,28,36,55,56,57], sendo a eficiência avaliada com base na intensidade de fluorescência emitida pela amostra 2. Foram avaliados 3 extratores: água deionizada e soluções aquosas de etanol 50 %(v/v) e acetona 70 %(v/v). Após a escolha da solução extratora, foram avaliados diferentes programas de aquecimento para a extração de AS (Tabela 3). Os programas 3-5 referem-se a modificações na temperatura máxima alcançada no procedimento previamente descrito [28]. Os resultados foram comparados com a intensidade de fluorescência de uma solução de AS 1,0 mg L^{-1} nas mesmas condições.

Tabela 3 - Programas de aquecimento para a extração de AS em folhas de soja assistida por micro-ondas

	Tempo de irradiação (s)	**Temperatura máxima (ºC)**	**Tempo de ventilação (s)**	**Referência**
1	300	67	300	27
2	10	50	300	57
3	4 x 60	50	3 x 60 e 600	28
4	4 x 60	75	3 x 60 e 600	28
5	4 x 60	100	3 x 60 e 600	28

As extrações em forno de micro-ondas foram realizadas com 500,0 mg do extrato seco para cada 10 mL de extrator. As pesagens foram realizadas diretamente nos frascos de digestão (TFM®), não havendo assim perda de material por transferência. Os frascos de TFM® foram acondicionados individualmente em cilindros de proteção de PEEK, fechados e fixados no rotor instalado na cavidade do forno de micro-ondas.

Após otimização, o procedimento recomendado consiste de extração com água, em um programa de aquecimento com 4 ciclos de 1 min, intercalados por 1 min com o magnetron desligado, seguido por tempo de ventilação de 10 min (programa 3, Tabela 3). Durante o aquecimento, a temperatura no interior dos frascos variou entre 46 ºC e 53 ºC. Após o processo, o extrato foi quantitativamente transferido para frascos de polietileno de 50 mL. A sedimentação das partículas sólidas foi acelerada por centrifugação a 5000 rpm por 5 min. Os sobrenadantes foram vertidos para tubos de polietileno de 15 mL com tampa, filtrados através de filtro 0,45 µm (Hydrophilic PVDF, Millipore Millex – HV), e mantidos a 4 ºC até as medidas analíticas. As partículas sólidas sedimentadas foram descartadas. Deste extrato utilizou-se alíquotas de 1 mL para as diluições em água no momento das análises.

4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1. Fluorescência do ácido salicílico

Visando obter máxima sensibilidade para a detecção de AS por fluorescência, foram inicialmente avaliadas as características espectrais e o efeito do meio (solvente e pH). Os espectros de excitação e emissão de fluorescência do AS (Figura 5) são similares aos descritos na literatura [19,58] com o comprimento de onda de excitação em 298 nm e maior intensidade de emissão em 406 nm. Estes comprimentos de onda foram utilizados em todos os experimentos posteriores.

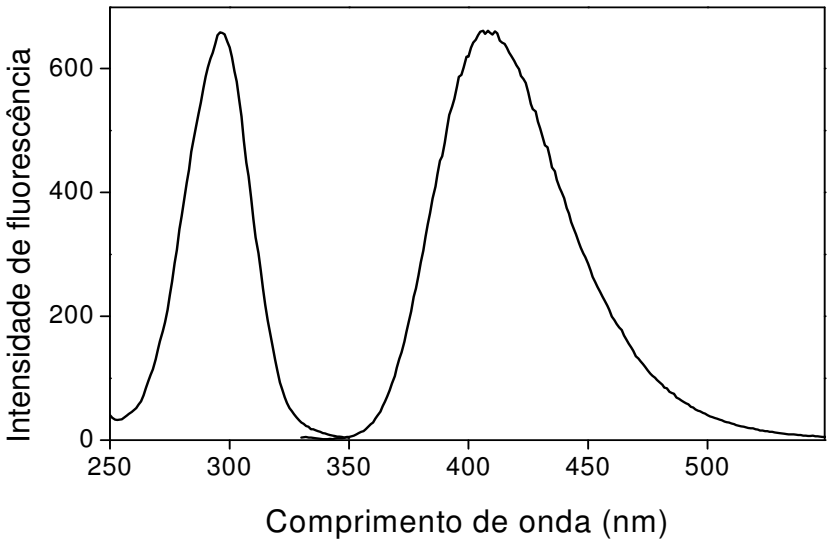


Figura 5 - Espectros de excitação e emissão de fluorescência do AS 1,0 mg L^{-1} em meio aquoso, obtidos com fenda com resolução espectral de 5 nm

Vários fatores podem afetar a fluorescência de uma espécie, como o solvente (polaridade e viscosidade) e o pH do meio. Em solventes puros, o rendimento quântico de fluorescência aumenta com a viscosidade [59], porém isto não se aplica a misturas de solventes. Dentre os solventes avaliados, a água apresentou maior intensidade de fluorescência para o AS por ter maior viscosidade (Tabela 4). No entanto, AS apresentou maior intensidade de fluorescência em soluções aquosas de acetonitrila, sendo a intensidade de emissão inversamente proporcional à fração de

acetonitrila. Esse aspecto é interessante tendo em vista a perspectiva de utilizar uma solução aquosa de acetonitrila como fase móvel para a separação cromatográfica.

Tabela 4 - Relação entre a viscosidade de solventes e a intensidade de fluorescência (AS 1 µg L^{-1}, fenda referente à resolução de 20 nm)

Solvente	**Viscosidade (20 ºC) g(cm s) x 10^{-3}**	**Intensidade**
Água	1,003	240,7
Metanol	0,597	118,1
Acetonitrila	0,316	82,2
Acetonitrila/água (15/85, v/v)	—	534,2
Acetronitrila/água (35/65, v/v)	—	429,6

A intensidade de fluorescência de AS 1,0 mg L^{-1} foi maior na forma de salicilato (Figura 6) porque, em geral, substituintes doadores de elétrons no anel aromático aumentam a intensidade relativa de fluorescência [5]. Em pH 4,0, 90% do AS está na forma ionizada (pK_1 = 2,98), o que justifica o aumento de intensidade até este pH. O pH da solução de AS também influencia discretamente no comprimento de onda de emissão, sendo observada tendência de aumento com o pH.

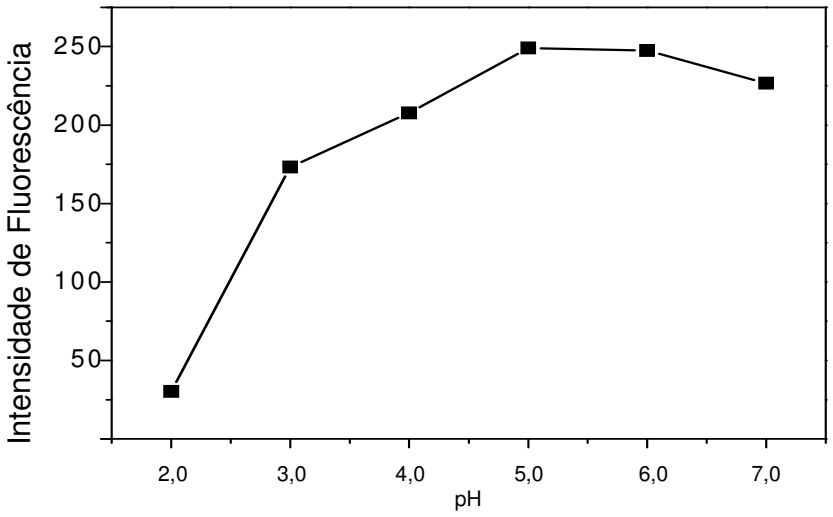


Figura 6 - Efeito do pH sobre a intensidade de fluorescência do AS. Solução de AS 1,0 mg L^{-1} em acetonitrila/água (35/65, v/v)

4.2. Cromatografia por injeção sequencial com EFS em linha

A otimização das condições operacionais do sistema SIC teve como objetivos maximizar eficiência de separação cromatográfica e a resposta analítica, tendo em vista a complexidade da matriz e as baixas quantidades esperadas de AS. Para isto, foram avaliados os efeitos da composição da fase móvel e do pH em eluição isocrática [42], os volumes inseridos nas colunas C_1 (EFS) e C_2 (separação cromatográfica) e a zona de maior concentração de AS após o *clean-up* para inserção na coluna cromatográfica.

Melhor resolução cromatográfica foi obtida com a diminuição da proporção de acetonitrila na fase móvel (Figura 7). Isto é esperado em cromatografia em fase reversa, devido à diminuição da força do eluente, aumentando a afinidade das espécies pela fase estacionária [60]. Esta condição também permite maximizar a resposta analítica, de acordo com os resultados apresentados na Tabela 4.

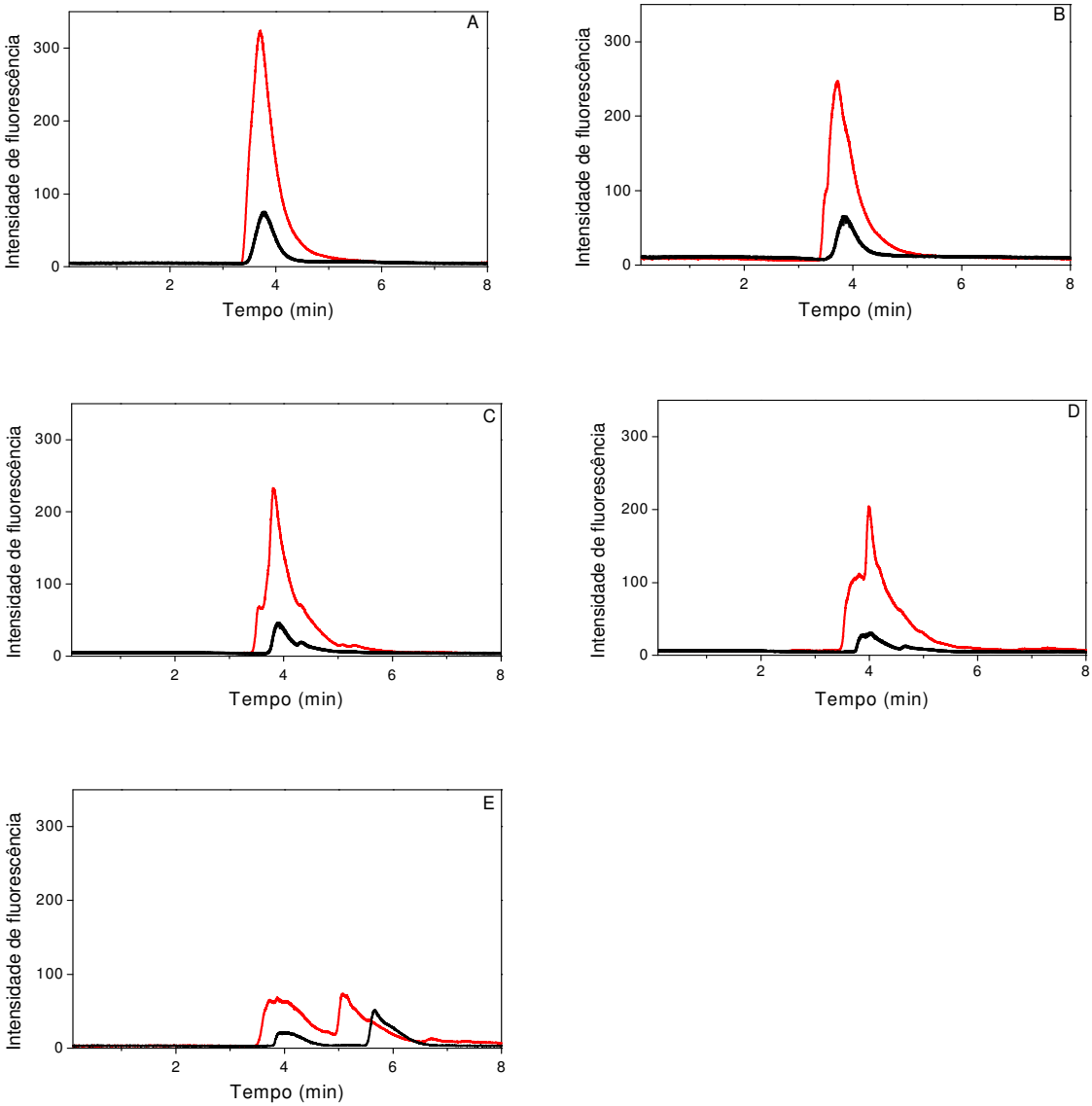


Figura 7 - Cromatogramas de um extrato vegetal (—) e solução de AS 1,0 mg L^{-1} (—) em diferentes proporções de fase móvel: Acetonitrila/ácido acético pH 3,0. A (75:25, v/v), B (55:45, v/v), C (35:65, v/v), D (25:75, v/v) e E (15:85, v/v)

Utilizando um extrato vegetal, observou-se que a separação cromatográfica não foi influenciada pela variação de pH do tampão acetato na faixa entre 4,0 e 6,0 (Figura 8).

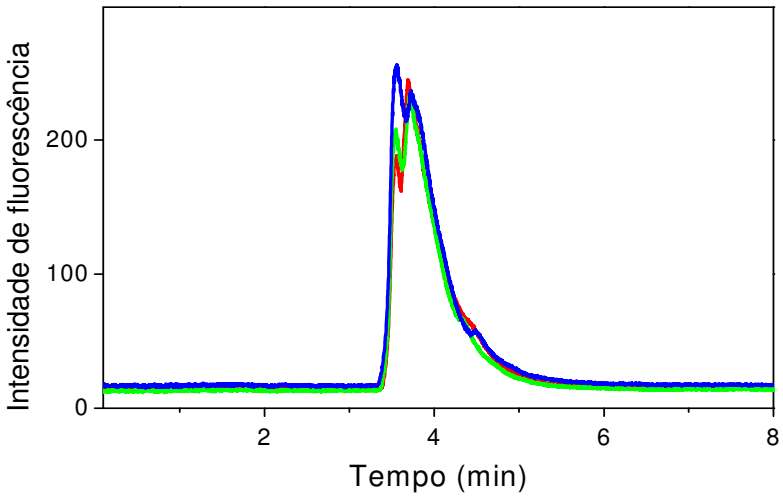


Figura 8 - Efeito do pH da fase móvel sobre a separação cromatográfica de um extrato vegetal. FM: CH_3CN/tampão acetato (45:55, v/v) (—) pH 4,0 (—) pH 5,0 (—) pH 6,0

A intensidade de fluorescência aumentou com o pH da solução tampão até pH 5,0 (Figura 9), que está *ca.* de 2 unidades de pH acima do pK_1 do AS, condição em que o analito encontra-se predominantemente na forma de salicilato [33]. Esta observação é concordante com informações da literatura que indicam a maior emissão de fluorescência pelo salicilato. Optou-se, então, por utilizar na FM tampão acetato pH 4,75 que corresponde à maior capacidade tamponante [59].

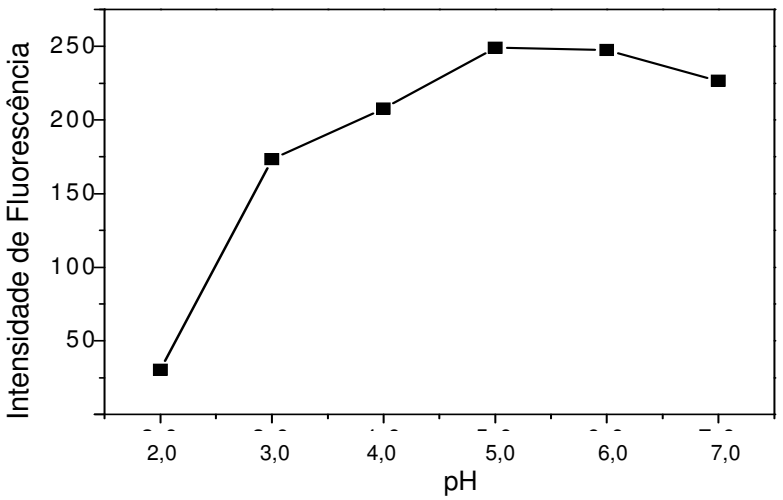


Figura 9 - Efeito do pH da fase móvel CH_3CN/tampão acetato (45:55, v/v) sobre a intensidade de fluorescência do AS. Volume de injeção: 10 µL AS 1,0 mg L^{-1}

Visando melhorar a eficiência de separação, a proporção de acetonitrila foi reduzida para 5 %, sendo avaliada a resposta para diferentes extratos (Figura 10). Nestas condições, verifica-se uma eficiente separação do analito das demais espécies fluorescentes presentes na matriz (resoluções próximas a 4,0 para o AS), portanto, estabeleceu-se como fase móvel acetonitrila/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v) . Esta composição da fase móvel apresenta características ambientalmente amigáveis com vantagens sobre outros estudos envolvendo amostras vegetais com utilização de coluna monolítica C18 (Tabela 1). Comumente são utilizadas frações de metanol ou acetonitrila superiores a 5%, tanto em eluição por gradiente, quanto isocrática.

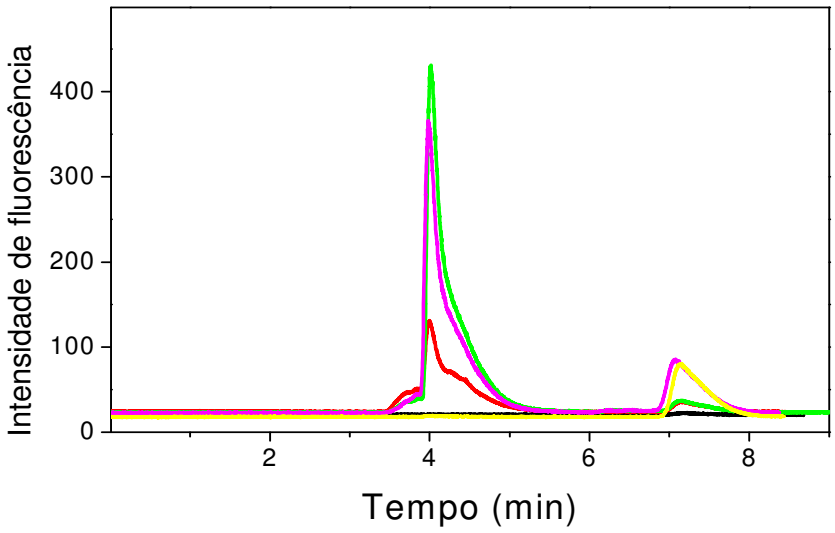


Figura 10 - Cromatogramas de amostras 1 (—), 2 (—) e 4 (—), AS 0,25 mg L^{-1} (—) e solução branco (—) utilizando fase móvel CH_3CN/tampão acetato pH 4,75 (5:95, v/v)

Visando melhorar a sensibilidade, foram avaliados os efeitos dos volumes referentes às etapas 2, 4 e 7 (Tabela 2) sendo, respectivamente, V_1 o volume de extrato inserido na mini coluna de EFS, a porção da amostra pré tratada utilizada na ambientação do percurso entre V_2P_2 e V_1P_2 (definida pelo volume V_2) e alíquota de amostra pré tratada inserida na coluna cromatográfica (V_3), Tabela 5.

Tabela 5 - Otimização dos volumes utilizados no *clean-up* de amostra e transferidos para a separação cromatográfica

V_1 (µL)	V_2 (µL)	V_3 (µL)	Intensidade
20	10	10	50 ± 1
30	10	10	75 ± 3
40	10	10	101 ± 1
40	10	15	120,2 ± 0,6
40	15	15	121 ± 2
40	20	15	130 ± 2
50	20	15	153 ± 2
50	20	30	326 ± 1

Os resultados referentes aos volumes V_1 e V_3 estão de acordo com o esperado, ou seja, aumento de resposta analítica com maiores volumes injetados. O volume V_3 foi o parâmetro mais efetivo (o sinal analítico foi duas vezes maior quando V_3 aumentou de 15 para 30 µL). O volume V_2 foi menos crítico, indicando que o gradiente de concentração na zona de amostra pré tratada por EFS não é muito intenso. As condições de máxima intensidade de sinal foram as últimas listadas na Tabela 5, com 50 µL de amostra inserida na mini coluna para EFS, 20 µL aspirados na etapa 4 (Tabela 2) para definir a porção central (menos dispersa) de amostra pré-tratada e 30 µL de amostra pré-tratada inseridos na coluna cromatográfica. Estas condições resultaram em aumento de 6,5 vezes de resposta analítica, sem afetar criticamente a separação cromatográfica (resolução e alargamento de banda).

O volume total inserido na mini coluna C_1 foi definido em 190 µL, este volume foi suficiente para o deslocamento da amostra pelo percurso entre a válvulas V_1 e V_2 (70,0 mm de tubos PEEK 0,25 mm diâmetro e mini coluna) e o posicionamento adequado da fração mais concentrada de analito, porque o eluato irá para a bobina B_2 e duas alíquotas serão aspiradas de retorno pela válvula V_1, a primeira para condicionamento do percurso e a segunda para ser inserida na coluna C_2. Esta alíquota necessita estar na zona de maior concentração de AS para se obter maior intensidade de sinal. Houve também a necessidade de ajuste do volume de limpeza da bobina de retenção B_1 para evitar a introdução da solução tampão na seringa,

que causaria a contaminação da fase móvel. O volume adequado para esta limpeza foi avaliado em 330 µL.

O tempo de retenção do analito aumentou durante as otimizações necessitando o aumento do volume de FM para eluição completa do AS (Figura 11), o que requereu uma segunda etapa da mesma eluição devido ao volume máximo dispensado pela seringa (4 mL).

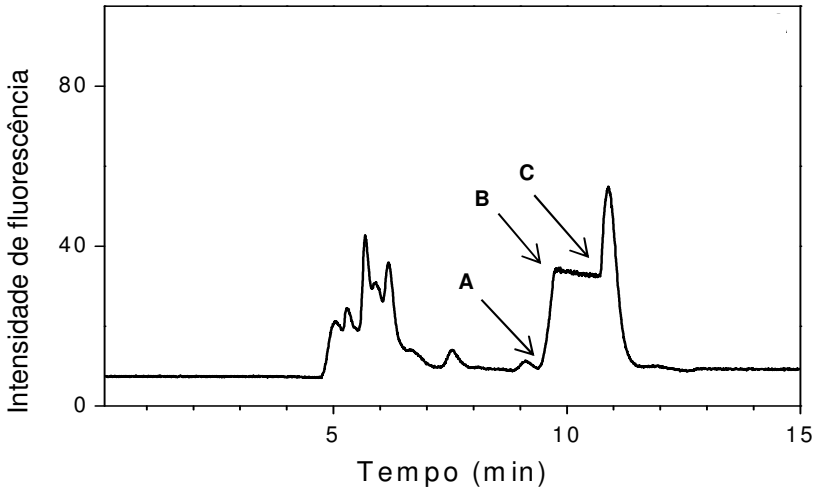
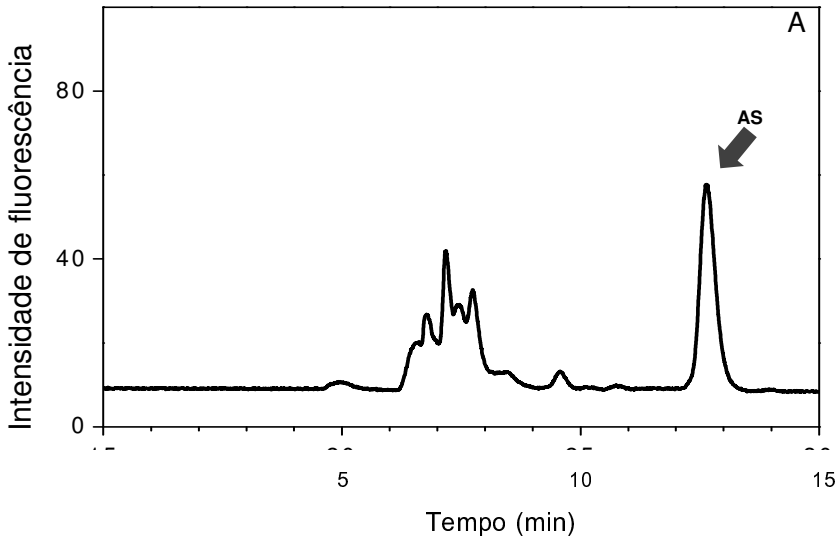


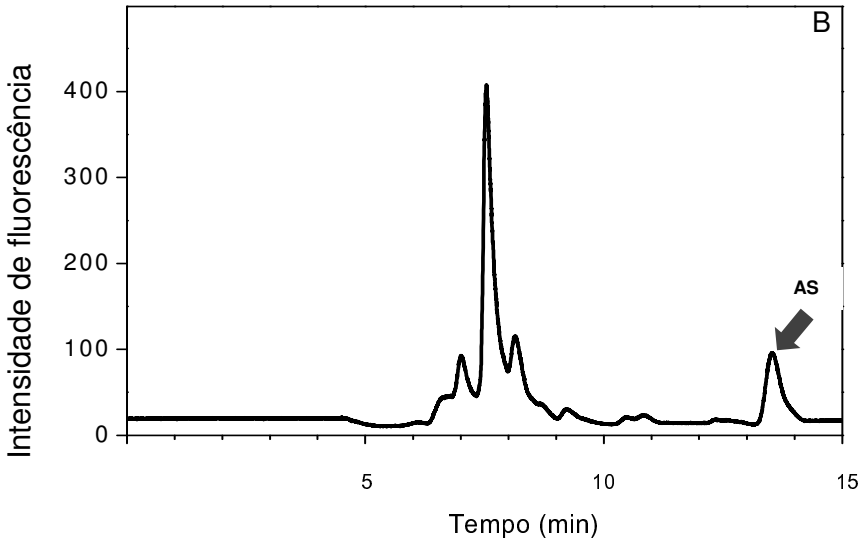
Figura 11 - Cromatograma de extrato de material vegetal demonstrando a necessidade de segunda etapa da mesma eluição com FM; **A**. Primeira etapa; **B**. Repreenchimento da seringa; **C**. Segunda etapa.

Nestas condições, o procedimento gera 8 mL de efluente, aproximadamente o dobro do volume gerado em outras determinações por SIC [45]. Este aumento é justificado pela EFS em linha e pela necessidade de limpeza em diferentes partes do módulo de análises para evitar contaminação e permitir que o sistema esteja pronto para a próxima determinação. Mesmo com este volume de efluente, um reduzido volume de acetonitrila (320 µL) foi utilizado por determinação, portanto qualificando este procedimento como ambientalmente amigável. O baixo consumo de solvente orgânico foi especialmente devido à baixa proporção de solvente orgânico na fase móvel. Além disso, em SIC, o fluxo da FM é descontínuo (por exemplo, não se consome fase móvel durante a etapa de EFS), o que favorece ao menor consumo de solvente. A vazão da fase móvel não foi otimizada (o aumento poderia resultar em maior contra-pressão, podendo superar o valor limite de 500 psi para uso da bomba propulsora com segurança). Porém a vazão de 0,6 mL min $^{-1}$ está de acordo com a

utilizada na separação de ácidos fenólicos em amostras vegetais utilizando o sistema SIChrom^{TM} e RP-C18 [42]. O tempo de retenção do AS apresentou variação entre amostras em 6 e 9 min (Figura 12) sendo um indicativo de efeito de matriz. Desta forma, a indicação do pico foi sempre realizada pela técnica de adição de analito (spiking).

A resolução comparada ao pico das outras substâncias fluorescentes presentes nos extratos foi de 6,0, demonstrando alta eficiência de separação. Esta eficiência é parcialmente devida à baixa vazão, condição em que normalmente se alcança menor altura de prato. O número médio de pratos foi estimado em 3980, que corresponde a altura equivalente a um prato de 12,6 µm, estes valores demonstram um bom desempenho da coluna monolítica C18 curta para esta separação.





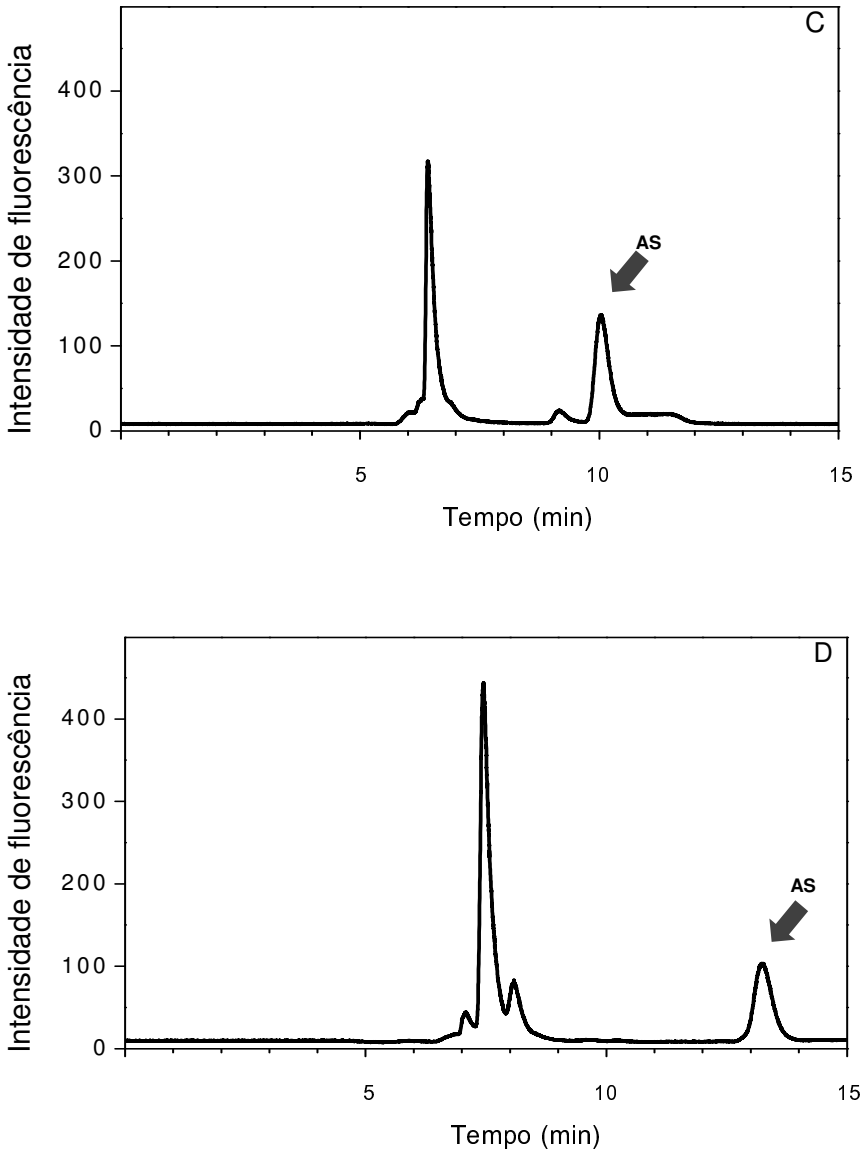


Figura 12 - Cromatogramas de extratos de materiais vegetais. **A**. Amostra 1 diluição de 1:3. **B**. Amostra 2 diluição de 1:2. **C**. Amostra 3 diluição de 1:3. **D**. Amostra 4 diluição de 1:5. O tempo 15 min corresponde ao início de um procedimento (tempo zero)

4.3. Extração de AS em materiais vegetais

A eficiência da extração do analito é influenciada pelo procedimento de preparo da amostra. A otimização deste deve considerar fatores como a natureza química do analito, compostos potencialmente interferentes, tamanho de partícula da amostra, tipo de extrator e alternativas para maximizar a interação amostra/extrator.

A extração de ácidos fenólicos em plantas é mais eficiente com solventes polares, sendo inversamente proporcional ao grau de polimerização destes compostos e sua interação com outros constituintes da matriz. O AS livre é usualmente extraído e analisado em meio neutro ou ácido [27]. Neste trabalho, optou-se pela extração assistida por micro-ondas, que reduz o tempo de extração e a quantidade de solvente utilizada, acrescenta-se a isto melhores rendimentos.

A eficiência de 3 soluções extratoras foi avaliada no sistema de extração com aquecimento por micro-ondas: água deionizada [27,28,57], etanol 50 %(v/v) [27] e ácido cítrico 50 mmol L^{-1} em água/acetona (30/70, v/v) [34] (Figura 13). Neste estudo, a extração com água aparentemente apresentou menor eficiência comparada às demais soluções extratoras. Isto está de acordo com o observado anteriormente na extração de fenólicos assistida por micro-ondas [27,28]. Entretanto, a maior intensidade de fluorescência da amostra após a extração em meio orgânico não é garantia de que houve maior extração de AS, porque outros compostos interferentes (*i.e.* que emitem fluorescência nas mesmas condições) podem ter sido extraídos nos diferentes meios pois este estudo foi realizado sem separação cromatográfica. A dificuldade de interpretação dos resultados é reforçada pelas baixas recuperações de AS adicionado ao extrato vegetal (entre 64 e 69%), o que indica um efeito de matriz e ressalta a necessidade da separação cromatográfica e do *clean-up* da amostra. Por outro lado, verifica-se maior resposta analítica para a solução de AS preparada em água, o que está de acordo com a discussão apresentada no item 4.1. Este fato, aliado à possibilidade da utilização de um solvente ambientalmente amigável e pouco volátil foi decisivo para a escolha da água como extrator de AS com extração assistida por micro-ondas.

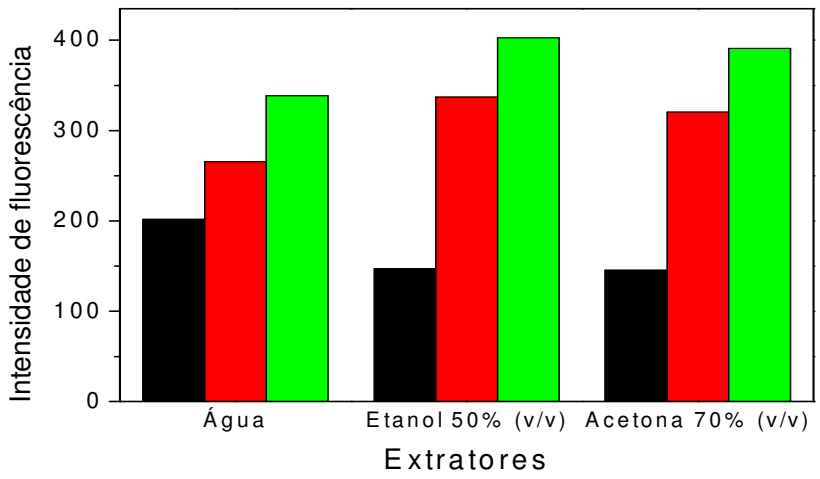


Figura 13 - Intensidade de fluorescência de extratos obtidos em extração assistida por micro-ondas com três soluções extratoras. (■) Solução de AS 1,0 mg L^{-1}, (■) amostra vegetal e (■) amostra vegetal enriquecida com 1,0 mg L^{-1} de AS. Estudo realizado sem separação cromatográfica

A temperatura e o tempo de irradiação de micro-ondas durante a extração com água foram otimizados nas condições estabelecidas na Tabela 3. Os extratos obtidos foram analisados por SIC com *clean-up* em linha por EFS, visando a determinação seletiva de AS. O objetivo deste estudo foi minimizar a extração de compostos interferentes sem afetar a extração de ácido salicílico. Desta forma, foram medidas as intensidades de fluorescência nos picos referentes ao AS (Figura 12-A, t_R = 8,5 min) e à banda de outros compostos fluorescentes extraídos dos materiais vegetais (Figura 12-A, t_R = 3 min). Os resultados são apresentados na Figura 14.

A temperatura máxima alcançada de 100 ºC está no intervalo de estabilidade do AS [55]. Observou-se menor extração de substâncias interferentes e maior intensidade de sinal de AS em baixas temperaturas (Figura 14) e em menores tempos de irradiação com micro-ondas. Estas espécies causam supressão do sinal de AS , absorvendo a radiação proveniente da fonte ou a fluorescência do AS (efeito filtro). Entretanto, não se pode descartar a menor eficiência de extração do analito nestas condições. Dentre os 2 métodos que utilizaram a temperatura de 50 ºC, o de extração em ciclos demonstrou um desempenho superior por reduzir a extração de interferentes. Pode-se observar a cor resultante dos extratos após esta extração (procedimento 3) na Figura 15.

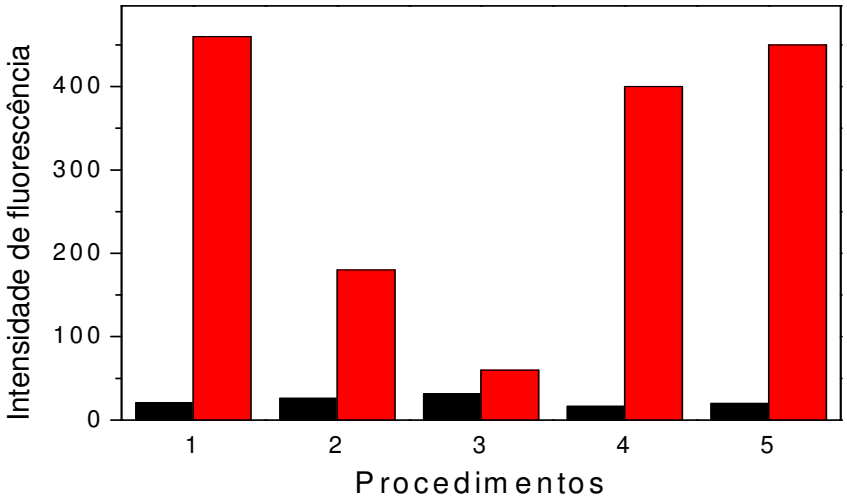


Figura 14 - Efeito da temperatura e tempo de extração de AS com aquecimento assistido por micro-ondas: (■) Intensidade da banda de AS e (■) Intensidade da banda de possíveis interferentes (t_R = 3 min, Figura 12). Procedimentos 1 a 5 conforme Tabela 3

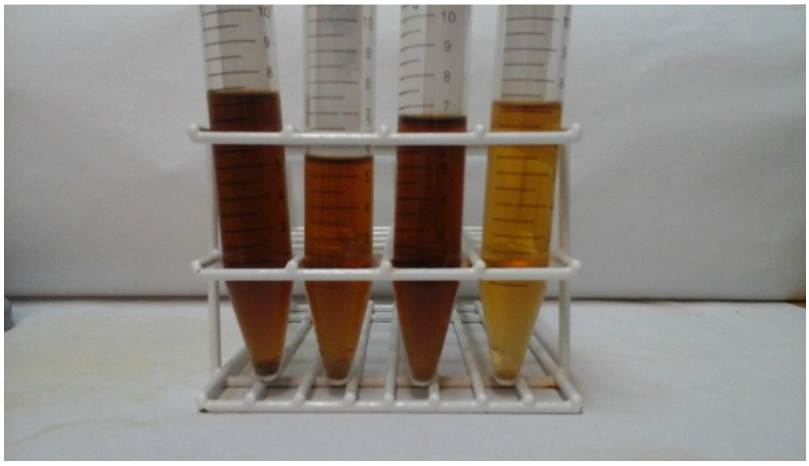


Figura 15 - Fotografia dos extratos aquosos de materiais vegetais. Da esquerda para a direita: amostras de 1 a 4

4.4. Características analíticas

As características analíticas foram avaliadas após otimização do procedimento. Uma curva analítica foi preparada empregando soluções de referência de AS em água. Resposta linear foi observada entre 0,5 e 8,0 mg L^{-1} segundo a equação F = 53,41C + 53,33 com r = 0,996, em que F corresponde à intensidade de fluorescência medida em altura de pico e C à concentração de AS em mg L^{-1} (Figura 16). Limites de detecção (99,7% de confiança) e quantificação foram estimados em 80 e 240 µg L^{-1}, respectivamente. Estes limites correspodem a 4,8 e 14,4 mg kg^{-1} nas amostras de materiais vegetais (valores correspondentes à matéria seca). Em estudo com extratos de plantas utilizando técnicas hifenadas, cromatografia líquida de alta eficiência, arranjo de diodos, ionização por eletrospray, espectrometria de massa (HPLC-DAD-ESI-MS) foram estimados limites de detecção e quantificação entre 1,2 e 4,0 µg L^{-1} [27]. Entretanto, o limite de quantificação é adequado à aplicação a análise de materiais vegetais, sendo uma alternativa vantajosa pela economia de reagentes, baixa produção de efluentes, menor custo de equipamentos e portabilidade [43].

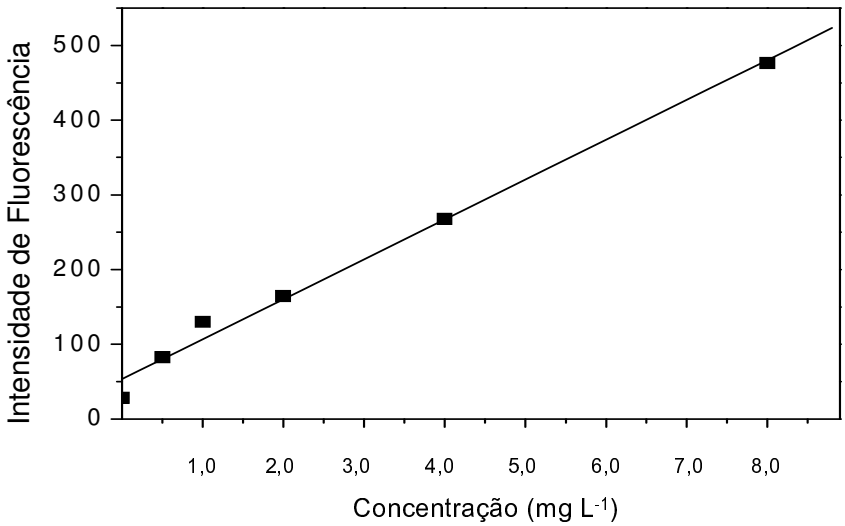


Figura 16 - Curva de calibração de AS. Soluções de referência de AS em água preparadas sob procedimento 3 (Tabela 3) de extração assistida por micro-ondas

Curvas de calilbração obtidas com soluções de referência de AS em água e em meio do extrato da amostra, na faixa de concentração entre 0,5 e 2,0 mg L^{-1}, resultaram em coeficientes angulares bastante distintos (Figura 17): F = 66,46C + 42,84 com r = 0,960 e F = 233,07C + 214,45 com r = 0,998, respectivamente (Figura 17). Isso evidencia a ocorrência de efeitos de matriz, mesmo após *clean-up* da amostra por EFS em linha e separação cromatográfica. Estes efeitos foram comprovados pelas altas recuperações obtidas para AS adicionado aos 4 extratos de folhas de soja (Tabela 6).

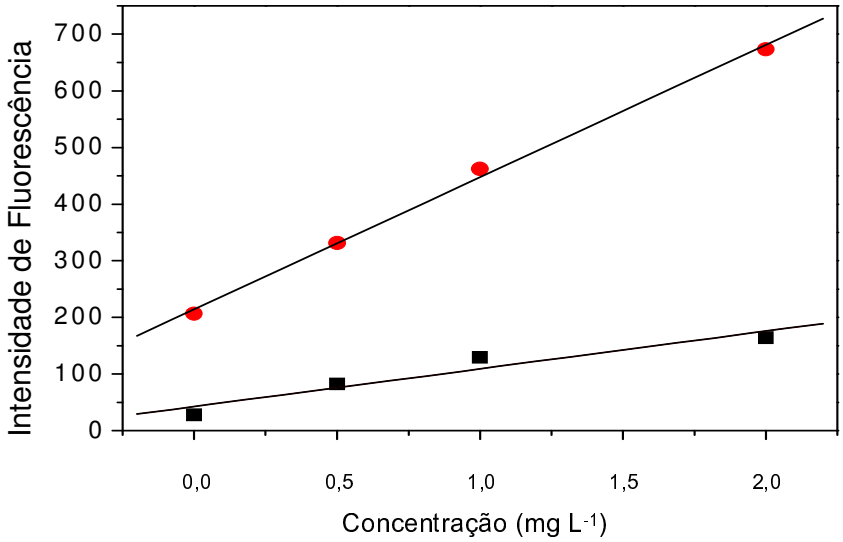


Figura 17 - Curvas de calibração de AS em água (■) e em meio de amostra (●)

Tabela 6 - Recuperação de AS adicionado em 4 extratos de folhas de soja. Adições de 0,5 e 1,0 mg L^{-1}

Amostra	Recuperação (%)
1	128
2	292
3	132
4	216

O método das adições de analito, frequentemente utilizado para compensar efeitos de matriz, foi então adotado. Esta estratégia de calibração foi aplicada aos extratos após diferentes diluições: amostras 1 e 3 foram diluídas 1:3 v/v e as amostras 2 e 4 foram diluídas 1:2 e 1:5 v/v, respectivamente. A Figura 18 mostra fotografias dos extratos antes e após diluição.

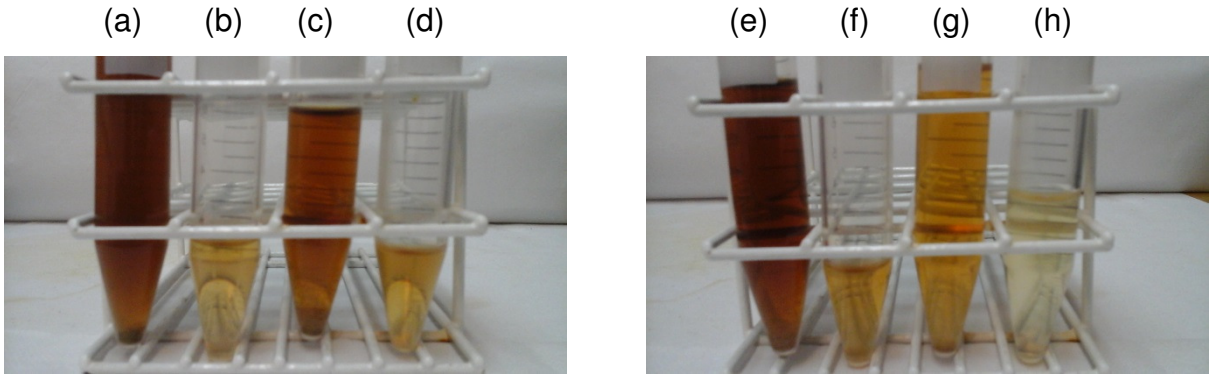


Figura 18 - Fotografia dos extratos de materiais vegetais antes e após diluição. (a) amostra 1, (b) amostra 1 diluída 1:3 v/v, (c) amostra 2, (d) amostra 2 diluída 1:2 v/v, (e) amostra 3, (f) amostra 3 diluída 1:3 v/v, (g) amostra 4, (h) amostra 4 diluída 1:5 v/v

Respostas lineares (r entre 0,985 e 0,999) foram obtidas nas calibrações em meio dos extratos (adições de AS entre 0,5 e 1,5 mg L^{-1}) e boas recuperações foram estimadas (Tabela 7). A amostra 2, que resultou em menor recuperação, é de idade incerta e sua moagem foi a 6 anos. Isto pode ter originado as baixas recuperações e estudos adicionais seriam necessários.

Tabela 7 - Recuperações obtidas pelo método de adições de analito nos extratos de materiais vegetais. Adições de 0,5, 1,0 e 1,5 mg L^{-1} de AS

Amostra	r	Recuperação (%)
1	0,999	96,4
2	0,990	74,2
3	0,985	92,0
4	0,991	90,4

A precisão do procedimento foi estimada pela repetibilidade (intradia) e precisão intermediária (interdia) [61]. Foram realizadas 4 séries (n = 10) por 3 dias para a estimativa da precisão intradia (0,99%) e interdia (3,6%). Características analíticas de diferentes procedimentos cromatográficos para a determinação de AS em materiais vegetais são apresentadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Características analíticas de procedimentos cromatográficos para a determinação de AS em materiais vegetais

Tempo de análise (min)	Consumo de solventes orgânicos (mL)	Consumo de amostra (µL)	Faixa linear (mg L^{-1}) (µg g^{-1})*	CV (%)	r	LOD (µg L^{-1}) (µg g^{-1})*	Ref.
20	2	50	0 – 20,0	3,8	0,972	0,9*	9
60	2	5	0,125 – 5,0	3,6	0,999	0,01*	31
40	25	20	0,5 – 100*	1,9	0,999	0,18*	26
7	2	10	0 – 8,0	2,0	0,999	$0,45x10^{-3}$*	38
60	-	1	0,05 – 50,0	3,1	0,998	$10,0x10^{-3}$*	40
20	7	10	1,93 - 100	1,9	0,999	580	41
47	20	20	$2,5x10^{-3}$ – 5,0	2,7	0,997	1,2	27
27	6	20	5,0 – 20,0	1,7	0,996	$1,5x10^{3}$	62
17	14	20 - 100	$10,0x10^{-5}$ – 10,0*	5,1	0,999	1	63
13	0,3	50	0,25 – 8,0	0,99	0,996	80,0	**

** Este estudo

De maneira geral, os resultados obtidos no procedimento proposto são melhores que aqueles obtidos anteriormente. O curto tempo da análise eleva a frequencia de amostragem, que incluindo o *clean-up* da amostra e a limpeza do módulo de análises, foi de apenas 17 min. Tem-se baixa produção de resíduos por determinação, que associado ao baixo consumo de solventes orgânicos, *ca.* 300 µL de acetonitrila por determinação enquadra este procedimento como ambientalmente amigável. A alta sensibilidade da técnica de fluorescência é diretamente responsável pelo baixo limite de detecção. A repetibilidade do procedimento é confirmada pelos baixos coeficientes de variação. Outras vantagens incluem equipamento de baixo custo (comparado ao HPLC), simplicidade de operação e eluição isocrática.

4.5 Quantificação de AS nas amostras

Com o procedimento otimizado, foram estimadas as quantidades de AS nas amostras (Tabela 9).

Tabela 9 - Concentração de AS nas amostras de folhas de soja

Amostra	Concentração (µg g^{-1})
1	37,1 ± 0,5
2	17 ± 5
3	76 ± 5
4	95 ± 2

A idade e o tempo de armazenamento da amostra influenciam na biodisponibilidade do analito [21]. Assim, a amostra 2 apresentou resultados inferiores às demais amostras, devido à idade de no mínimo de 6 anos.

Dentre as amostras colhidas na safra 2014, a amostra 1 apresentou menores níveis de AS que amostras 3 e 4, sendo que essa era de folhas verdes cultivadas em casa de vegetação, local com menor estresse sobre a planta. As amostras 3 e 4 foram colhidas no campo com 17 semanas, sendo que a amostra 4 estava em avançado estágio de maturação, concordando com a descrição desta condição para maior de produção de AS em vegetais [4].

Uma provável explicação para a maior concentração de AS encontrada neste estudo em relação aos resultados da Tabela 10 foi a seca que ocorreu no verão de 2014, época do desenvolvimento e colheita destas amostras. Esta situação concorda com um aumento de 10 vezes de AS em cana soca 60 dias após a colheita, provavelmente pela falta de chuva, já que os índices das amostras colhidas com 30, 90, 120 e 150 dias estiveram entre 2,7 e 7,7 μg g^{-1} [36].

Tabela 10 - Quantidades de AS em diferentes amostras vegetais

Folhas	Idade (semanas)[a]	Quantidade (μg g^{-1})	Referência
Arabidopsis	5	0,1	9
Arabidopsis		0,9	35
Arroz	2-4	37,19	19
Batata	1	0,1	20
	9-10	1,0	20
Café		0,042–1,67	31
Cana de açúcar	4	3,3	36
	8	36,7	36
	12	2,7	36
	17	6,0	36
	21	7,7	36
Choupo		31	37
Milho	1	0,7	34
Prímula		30	27
Soja	2-4	1	19
Soja	17	76-94	este estudo

[a]A idade da amostra não foi apresentada em todos os estudos.

Como mostrado na Tabela 10, a quantidade de AS nas amostras vegetais varia pronunciadamente. Ainda não estão estabelecidos os níveis bioquímicos de AS para diferentes matrizes vegetais. A quantidade de AS em plantas é influenciada pelas estações, variável de acordo com sua idade e não há correlação quantitativa entre as espécies [64].

5. CONCLUSÕES

Foi desenvolvido um procedimento alternativo às técnicas analíticas mais utilizadas para determinação de AS em materiais vegetais através de extração assistida por micro-ondas, *clean-up* por EFS em linha e separação com cromatografia por injeção sequencial. O procedimento apresentou recuperações adequadas quando o método das adições de analito foi utilizado para compensar efeitos de matriz.

O procedimento proposto seguiu a tendência de procedimentos ambientalmente amigáveis. Apresentou baixo consumo de solventes orgânicos (apenas *ca.* 300 µL de CH_3CN foram gastos por determinação). Foram evitados solventes orgânicos na etapa de extração do analito das amostras e na EFS em linha utilizou-se tampão fosfato 0,2 mol L^{-1} pH 5,2. O procedimento apresenta baixa geração de resíduos (*ca.* 8 mL por determinação).

O procedimento apresentou uma alta frequencia analítica, pois de forma automatizada e rápida incluiu toda etapa de preparo de amostra em linha, condicionamentos e separação cromatográfica com aproximadamente 4 determinações h^{-1} (*ca.* 17 min por determinação).

A automação do *clean-up* amplia a aplicabilidade da SIC, reduz o tempo do procedimento, evita perdas do analito, bem como minimiza erros inerentes a intervenção do analista e riscos de contaminações. Associou-se a estas vantagens a alta reprodutibilidade, o baixo custo por análise e a reutilização da resina C18 da coluna de EFS. A etapa de *clean-up* em linha na SIC é pioneira na utilização de amostras vegetais, sendo este o segundo estudo de amostras vegetais em SIC. Este estudo confirma a aplicabilidade da SIC a amostras de matriz complexa, em contraponto à aplicação usual à separação de analitos em preparações fármaceuticas.

O procedimento analítico é inédito e adequado à determinação de AS em materiais vegetais com vantagens de ser rápido, suficientemente sensível, seletivo e robusto para a determinação de AS em folhas de soja.

REFERÊNCIAS

1 DAUGHTON, C.G.; TERNES, T.A. Pharmaceuticals and personal care products in the environment: agents of subtle change? **Environmental Health Perspectives**, Research Triangle Park, v. 107, suppl. 6, p. 907–938, 1999.

2 MACKOWIAK, P. A. Brief history of antipyretic therapy. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, n. 5, p. 154–156, 2000.

3 SHALMASHI, A.; ELIASSI, A. Solubility of salicylic acid in water, ethanol, carbon tetrachloride, ethyl acetate, and xylene. **Journal of Chemical & Engineering Data**, Washington, DC, v. 53, n. 1, p. 199–200, 2008.

4 RASKIN, I. Role of salicylic acid in plants. **Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology**, Palo Alto, v. 43, p. 439–463, 1992.

5 LAKOWICZ, J.R. **Principles of fluorescence spectroscopy**. Heidelberg: Springer, 2009. 960 p.

6 RASKIN, I. Salicylate, a new plant hormone. **Plant Physiology**, Rockville, v. 99, p. 799–803, 1992.

7 WILLIAMS, M.E. Introduction to phytohormones. **The Plant Cell**, Baltimore, v. 22, n. 3, p. 1–10, 2012.

8 BALCKE, G.U. et al. An UPLC-MS/MS method for highly sensitive high-throughput analysis of phytohormones in plant tissues. **Plant Methods**, London, v. 8, n. 1, p. 47-57, 2012.

9 FORCAT, S. et al. A rapid and robust method for simultaneously measuring changes in the phytohormones ABA, JA and SA in plants following biotic and abiotic stress. **Plant Methods**, London, v. 4, p. 16-23, 2008.

10 GUTIÉRREZ-CORONADO, M.A.; TREJO-LÓPEZ, C.; LARQUÉ-SAAVEDRA, A. Effects of salicylic acid on the growth of roots and shoots in soybean. **Plant Physiology and Biochemistry** , Amsterdam, v. 36, n. 8, p. 563–565, 1998.

11 SRIVASTAVA, M.; DWIVEDI, U. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. **Plant Science**, Amsterdam, v. 158, n. 1-2, p. 87–96, 2000.

12 KHAN, W.; PRITHIVIRAJ, B.; SMITH, D.L. Photosynthetic responses of corn and soybean to foliar application of salicylates. **Journal of Plant Physiology**, Jena, v. 160, n. 5, p. 485–492, 2003.

13 FRÍAS, M.; BRITO, N.; GONZÁLEZ, C. The Botrytis cinerea cerato-platanin BcSpl1 is a potent inducer of systemic acquired resistance (SAR) in tobacco and generates a wave of salicylic acid expanding from the site of application. **Molecular Plant Pathology**, Oxford, v. 14, n. 2, p. 191–196, 2013.

14 KANG, G.; LI, G.; GUO, T. Molecular mechanism of salicylic acid-induced abiotic stress tolerance in higher plants. **Acta Physiologiae Plantarum**, Krakow, v. 36, n. 9, p. 2287–2297, 2014.

15 KALACHOVA, T. et al. Involvement of phospholipase D and NADPH-oxidase in salicylic acid signaling cascade. **Plant Physiology and Biochemistry** , Amsterdam, v. 66, p. 127–133, 2013.

16 VERNOOIJ, B. et al. Salicylic acid as a signal molecule in plant-pathogen interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, London, v. 6, n. 2, p. 275–279, 1994.

17 GRANT, M.; LAMB, C. Systemic immunity. **Current Opinion in Plant Biology**, London, v. 9, n. 4, p. 414–420, 2006.

18 HAYAT, Q. et al. Effect of exogenous salicylic acid under changing environment: A review. **Environmental and Experimental Botany**, Oxford, v. 68, n. 1, p. 14–25, 2010.

19 RASKIN, I. et al. Salicylic acid levels in thermogenic and non-thermogenic plants. **Annals of Botany**, Oxford, v. 66, p. 369–373, 1990.

20 NAVARRE, D. A.; MAYO, D. Differential characteristics of salicylic acid-mediated signaling in potato. **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 64, n. 4, p. 179–188, 2004.

21 NACZK, M.; SHAHIDI, F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: occurrence, extraction and analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 1523–42, 2006.

22 NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1-2, p. 95–111, 2004.

23 LEE, H.I.; LEÓN, J.; RASKIN, I. Biosynthesis and metabolism of salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 92, n. 10, p. 4076–4079, 1995.

24 VLOT, A C.; DEMPSEY, D.A.; KLESSIG, D.F. Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. **Annual Review of Phytopathology**, Palo Alto, v. 47, p. 177–206, 2009.

25 PHAN-THIEN, K.-Y.; WRIGHT, G.C.; LEE, N.A. Peanut antioxidants: Part 2. Quantitation of free and matrix-bound phytochemicals in five selected genotypes with diverse antioxidant capacity by high performance liquid chromatography (HPLC). **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 57, n. 1, p. 312–319, 2014.

26 IRAKLI, M.N. et al. Development and validation of an HPLC-method for determination of free and bound phenolic acids in cereals after solid-phase extraction. **Food Chemistry**, Barking, v. 134, n. 3, p. 1624–1632, 2012.

27 UDDIN, N. et al. Quantitative analysis of salicylic acid and its derivatives in Primulae radix by high performance liquid chromatography-diode array detec- tion-electrospray ionization mass spectrometry (HPLC-DAD-ESI-MS) and simultaneous determination of total polyphenols. **Current Analytical Chemistry**, Beijing, v. 10, p. 271–279, 2014.

28 PROESTOS, C.; KOMAITIS, M. Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds. **LWT - Food Science and Technology**, Amsterdam, v. 41, n. 4, p. 652–659, 2008.

29 IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolics compounds in fruit and vegetables. **Food Chemistry**, Barking, v. 126, n. 4, p. 1821–1835, 2011.

30 RASKIN, I.; TURNER, I.M.; MELANDER, W.R. Regulation of heat production in the inflorescences of an Arum lily by endogenous salicylic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, Washington, DC, v. 86, p. 2214–2218, 1989.

31 SÁ, M. de et al. A liquid chromatography/electrospray ionisation tandem mass spectrometry method for the simultaneous quantification of salicylic, jasmonic and abscisic acids in Coffea arabica leaves. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 94, n. 3, p. 529–36, 2014.

32 ORLANDO, R.M.; CORDEIRO, D.D. Pré-tratamento de amostras. **Vita et Sanitas**, Trindade, v. 3, p. 122–139, 2009.

33 GŁOWNIAK, K.; ZGÓRKA, G.; KOZYRA, M. Solid-phase extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatography of free phenolic acids in some Echinacea species. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 730, n. 1-2, p. 25–29, 1996.

34 ENGELBERTH, J. et al. Simultaneous quantification of jasmonic acid and salicylic acid in plants by vapor-phase extraction and gas chromatography-chemical ionization-mass spectrometry. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 312, n. 2, p. 242–50, 2003.

35 SHAPIRO, A.D.; GUTSCHE, A.T. Capillary electrophoresis-based profiling and quantitation of total salicylic acid and related phenolics for analysis of early signaling in Arabidopsis disease resistance. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 320, n. 2, p. 223–233, 2003.

36 MESCHEDE, D.K. et al. Response of sugarcane metabolism to ripener application. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 30, n. 1, p. 113–119, 2012.

37 WILBERT, S.M.; ERICSSON, L.H.; GORDON, M.P. Quantification of jasmonic acid , methyl jasmonate , and salicylic acid in plants by capillary liquid chromatography. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 257, p. 186–194, 1998.

38 SEGARRA, G. et al. Simultaneous quantitative LC-ESI-MS/MS analyses of salicylic acid and jasmonic acid in crude extracts of Cucumis sativus under biotic stress. **Phytochemistry**, Oxford, v. 67, n. 4, p. 395–401, 2006.

39 HUANG, W.E. et al. Quantitative in situ assay of salicylic acid in tobacco leaves using a genetically modified biosensor strain of Acinetobacter sp. ADP1. **The Plant Journal : for Cell and Molecular Biology**, Oxford, v. 46, n. 6, p. 1073–83, 2006.

40 DENG, C.; WORDS, K. Rapid determination of salicylic acid in plant materials by gas chromatography – mass spectrometry. **Chromatographia**, New York, v. 58, p. 225–229, 2003.

41 WANG, C. et al. Separation, identification, and quantitation of phenolic acids in chinese waxberry (Myrica rubra) juice by HPLC-PDA-ESI-MS. **Journal of Food Science**, Malden, v. 77, n. 2, p. C272–277, 2012.

42 CHOCHOLOUŠ, P. et al. Advantages of core – shell particle columns in Sequential Injection Chromatography for determination of phenolic acids. **Talanta**, London, v. 103, p. 221–227, 2013.

43 IDRIS, A.M. The second five years of sequential injection chromatography: significant developments in the technology and methodologies. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, Philadelphia, v. 44, n. 3, p. 220–32, 2014.

44 BATISTA, A.D. et al. On-line hyphenation of solid-phase extraction to chromatographic separation of sulfonamides with fused-core columns in sequential injection chromatography. **Talanta**, London, v. 133, p. 142–149, 2015.

45 BATISTA, A.D. et al. Expanding the separation capability of sequential injection chromatography: Determination of melamine in milk exploiting micellar medium and on-line sample preparation. **Microchemical Journal**, New York, v. 117, p. 106–110, 2014.

46 BATISTA, A.D.; ROCHA, F.R.P. On-column preconcentration in sequential injection chromatografy: application to paraben determination. **Analytical Methods**, Cambridge, v. 7, p. 4371-4375, 2015.

47 IDRIS, A.M.; ELGORASHE, R.E.E. Sequential injection chromatography against HPLC and CE: Application to separation and quantification of amoxicillin and clavulanic acid. **Microchemical Journal**, New York, v. 99, n. 2, p. 174–179, 2011.

48 SATÍNSKÝ, D. et al. Determination of ambroxol hydrochloride, methylparaben and benzoic acid in pharmaceutical preparations based on sequential injection technique coupled with monolithic column. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Oxford, v. 40, n. 2, p. 287–293, 2006.

49 HUCLOVÁ, J. Coupling of monolithic columns with sequential injection technique A new separation approach in flow methods. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 494, n. 1-2, p. 133–140, 2003.

50 CHOCHOLOUŠ, P. et al. A novel application of Onyxtrade mark monolithic column for simultaneous determination of salicylic acid and triamcinolone acetonide by sequential injection chromatography. **Talanta**, London, v. 72, n. 2, p. 854–858, 2007.

51 CHOCHOLOUŠ, P.; SOLICH, P.; SATÍNSKÝ D. An overview of sequential injection chromatography. **Analytica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 600, n. 1-2, p. 129–135, 2007.

52 CHOCHOLOUŠ, P. et al. Enhanced capabilities of separation in Sequential Injection Chromatography-fused-core particle column and its comparison with narrow-bore monolithic column. **Talanta**, London, v. 85, n. 2, p. 1129–1134, 2011.

53 ANDREU-NAVARRO, A. et al. Usefulness of terbium-sensitised luminescence detection for chemometric classification of wines by their content in phenolic compounds. **Food Chemistry**, Barking, v. 124, n. 4, p. 1753–1759, 2011.

54 SANTOS JUNIOR, D. et al. Determination of Cd and Pb in food slurries by GFAAS using cryogenic grinding for sample preparation. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 373, n. 3, p. 183–189, 2002.

55 LIAZID, A. et al. Investigation on phenolic compounds stability during microwave-assisted extraction. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1140, n. 1-2, p. 29–34, 2007.

56 AZZOUZ, A.; BALLESTEROS, E. Combined microwave-assisted extraction and continuous solid-phase extraction prior to gas chromatography-mass spectrometry determination of pharmaceuticals, personal care products and hormones in soils, sediments and sludge. **The Science of the Total Environment**, Amsterdam, v. 419, p. 208–215, 2012.

57 MATALLO, M.B. et al. Microwave-assisted solvent extraction and analysis of shikimic acid from plant tissues. **Planta Daninha**, Viçosa, v. 27, p. 987–994, 2009.

58 TABRIZI, A.B. Cloud point extraction of salicylic acid from human urine and its spectrofluorimetric determination. **Chemia Analityzcna**, Warsaw, v. 52, p. 823–833, 2007.

59 SKOOG, D.A. et al. **Fundamentos de química analítica**. 8. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2006.1096 p.

60 SEAVER, C.; PRZYYTEK, J. Solvent selection, part II - physical properties. **LC-GC**, Iselin, NJ v. 13, n. 3, p. 220–227, 1995.

61 TAGLIARI, M.P. et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Química Nova**, São Paulo, v. 35, n. 6, p. 1228–1232, 2012.

62 POBŁOCKA-OLECH, L. et al. Chromatographic analysis of salicylic compounds in different species of the genus Salix. **Journal of Separation Science**, Weinheim, v. 30, n. 17, p. 2958–2966, 2007.

63 ROZHON, W. et al. Quantification of free and total salicylic acid in plants by solid-phase extraction and isocratic high-performance anion-exchange chromatography. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Heidelberg, v. 382, n. 7, p. 1620–16277, 2005.

64 KENSTAVICIENÈ, P. et al. Application of high-performance liquid chromatography for research of salicin in bark of different varieties of Salix. **Medicina,** Kaunas, v. 45, n. 8, p. 644–651, 2009.