

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
CENTRO DE ENERGIA NUCLEAR NA AGRICULTURA

KETHLIN FLORA CURIEL

Desenvolvimento de um analisador em fluxo para extração e
quantificação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas

Piracicaba

2022

KETHLIN FLORA CURIEL

Desenvolvimento de um analisador em fluxo para extração e
quantificação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas

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

Orientadora: Profa. Dra. Wanessa Melchert
Mattos

Piracicaba

2022

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)

Técnica de Biblioteca - CENA/USP

Curiel, Kethlin Flora

Desenvolvimento de um analisador em fluxo para extração e quantificação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas / Kethlin Flora Curiel; Wanessa Melchert Mattos. - - Versão revisada de acordo com a Resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2022.

68 p.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-Graduação em Ciências. Área de Concentração: Química na Agricultura e no Ambiente) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, 2022.

1. Amostras sólidas 2. Análise em fluxo 3 Compostos fenólicos 4. Extração e quantificação 5. Multicomutação 6. Química analítica instrumental I. Título.

CDU 543.068.3 : 547.56

Elaborada por:

Rubenildo Oliveira da Costa

CRB-8/79468

Resolução CFB Nº 184 de 29 de setembro de 2017

*Aos meus pais, **Djalma e Elzeli**,
os dois maiores incentivadores das
realizações dos meus sonhos, que
sempre estiveram comigo e acreditaram
que tudo isso fosse possível.*

*À minha irmã, **Thainá**, pela parceria e companheirismo de todos esses anos, por sempre me apoiar e me incentivar a nunca desistir.*

À minha orientadora,
Wanessa, por toda orientação,
paciência, compreensão e dedicação.
Por ser uma constante fonte de
motivação e incentivo ao longo de
todo o projeto.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, e por me permitir ultrapassar todos os obstáculos encontrados ao longo da realização deste trabalho.

À minha família que me incentivaram desde o início e compreenderam minha ausência para a realização desse projeto.

Ao Bruno Henrique, pelas vezes que me apoiou e dedicou seu tempo para me acalmar e incentivar a seguir em frente para conquistar todos meus sonhos.

Às minhas amigas Gabriela, Laís e Juliana, pelo apoio, força, amor e assistência inabalável.

Aos meus amigos, que sempre estiveram ao meu lado, pela amizade, companheirismo e apoio em momentos cruciais dessa jornada.

À minha orientadora Profa. Dra. Wanessa M. Mattos, pelas oportunidades, dedicação e amizade bem como a sua paciência e confiança para a realização deste trabalho.

A todos dos GEQAV, pelo companheirismo e pela troca de experiências que me permitiram crescer de forma pessoal e profissionalmente.

Aos professores Fábio R. P. Rocha, Diogo L. da Rocha e Ana Paula Paim pela participação no Exame de Qualificação e pelas sugestões que enriqueceram este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) – Código de Financiamento 001, pela bolsa concedida e pelo apoio financeiro.

Ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura - Universidade de São Paulo e a Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” – Universidade de São Paulo.

Aos membros da banca da defesa de mestrado pela disponibilidade e pelos comentários e sugestões apresentados.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram de alguma forma para o alcance do meu objetivo. A gratidão permanecerá para todo sempre e levarei cada um de vocês no meu coração. Muito obrigada!

*Ser feliz não é ter uma vida perfeita.
Mas usar as lágrimas para irrigar a
tolerância. Usar as perdas para refinar a
paciência. Usar as falhas para esculpir a
serenidade. Usar a dor para lapidar o prazer.
Usar os obstáculos para abrir as janelas da
inteligência.*

Augusto Cury

RESUMO

CURIEL, K. F. **Desenvolvimento de um analisador em fluxo para extração e quantificação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas.** 2022. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

A multicomutação é um processo baseado no uso de dispositivos de comutação discretos (como válvulas e/ou microbombas solenoide) que podem aumentar a versatilidade dos sistemas de análises em fluxo. Permitem a inserção de amostras e reagentes na quantidade necessária para a realização do procedimento analítico, consumindo poucos microlitros. O sistema de fluxo desenvolvido foi projetado com quatro microbombas solenoide para inserção de amostras e reagentes analíticos, uma válvula solenoide para direcionamento das soluções e uma placa microcontroladora Arduino para o controle dos dispositivos. A extração e quantificação dos compostos fenólicos totais foram empregadas como exemplo de aplicação do analisador em fluxo. A medida espectrofotométrica foi baseada na metodologia de Folin-Ciocalteu, que consiste na reação de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. O módulo de extração foi construído com ponteira descartável de micropipeta para condicionamento das amostras sólidas, frit como suporte do sólido e algodão como filtro que ficou sob agitação constante. A extração dos compostos fenólicos totais foi iniciada percolando a solução extratora (etanol 5%, v/v) através da amostra sólida (P_1 , 3795 μL) direcionada ao descarte. No percurso analítico, houve introdução sequencial dos compostos fenólicos extraídos (P_1 , 101 μL) e simultaneamente os reagentes Folin-Ciocalteu 20% (v/v) (P_3 , 24 μL) e carbonato de sódio 2% (m/v) (P_4 , 24 μL). A sequência foi repetida duas vezes e a zona de amostra direcionada ao detector (740 nm) pela solução carregadora, H_2O (P_2 , 3060 μL), passando por um reator helicoidal. O sinal analítico foi baseado na altura do pico de absorvância, e as medidas foram feitas em triplicata. Em condições experimentais otimizadas empregando soluções de padrões analíticos, resposta linear foi estimada entre 1 e 20 mg L^{-1} de ácido gálico, descrita pela equação da reta: $\text{Absorbância} = 0,023 + 0,028 C (\text{mg L}^{-1})$ ($R^2 = 0,997$). O limite de detecção (nível de confiança de 99,7%), limite de quantificação, o coeficiente de variação ($n=11$; 10 mg L^{-1}) e a frequência analítica foram estimados em 188 $\mu\text{g L}^{-1}$; 627 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0,11% e 100 determinações h^{-1} , respectivamente. O consumo de reagentes por determinação foi estimado em 9,6 μL de Folin-Ciocalteu e 0,95 mg de carbonato de sódio, gerando 3,4 mL de resíduo. Para quantificação dos compostos fenólicos em amostras sólidas, curva de calibração entre 300 e 2500 mg de compostos fenólicos por 100 g^{-1} de amostra seca foi construída com farinhas processadas de alimentos, descrita pela equação da reta: $\text{Absorbância} = 0,007 + 0,0004 C (\text{mg de compostos fenólicos por } 100 \text{ g}^{-1} \text{ de amostra seca})$ ($R^2 = 0,999$). Os compostos fenólicos totais de farinhas de diferentes matérias primas foram analisados pelo procedimento proposto e de referência e não apresentaram diferenças significativas a nível de confiança de 95%. Características intrínsecas de sistemas que utilizam microbombas solenoide, como portabilidade, baixo custo e baixo consumo de energia, melhor mistura e reprodutibilidade de microvolumes de soluções foram alcançadas. Além disso, a extração online de compostos de amostras sólidas demonstra a versatilidade e

praticidade dos sistemas empregando multicomutação que atendem aos preceitos da química verde configurando em metodologia ambientalmente amigável.

Palavras-chaves: Multicomutação. Extração e quantificação. Compostos fenólicos totais. Amostras sólidas.

ABSTRACT

CURIEL, K. F. **Development of a flow-based procedure for extraction and determination of total phenolic compounds in solid samples.** 2022. 68 p. Dissertação (Mestrado) – Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2022.

Multicommutation is a process based on the use of discrete switching devices (such as solenoid valves and/or micropumps) that can increase the versatility of flow analysis systems. They allow the insertion of samples and reagents in the amount necessary to carry out the analytical procedure, consuming few microliters. The flow system developed was designed with four solenoid micropumps for the insertion of samples and analytical reagents; a solenoid valve to direct the solutions and an Arduino microcontroller board to control the devices. The extraction and quantification of total phenolic compounds were used as an example of application of the flow analyzer. The spectrophotometric measurement was based on the Folin-Ciocalteu methodology, which consists of the redox reaction between phenolic compounds and metal ions. The extraction module was built with a disposable micropipette tip for conditioning the solid samples, frit as a support for the solid and cotton as a filter and was kept under constant agitation. The extraction of total phenolic compounds was started by percolating the extracting solution (ethanol 5%, v/v) through the solid sample (P_1 , 3795 μL) directed to disposal. In the analytical process, there was a sequential introduction of the extracted phenolic compounds (P_1 , 101 μL) and simultaneous reagents Folin-Ciocalteu 20% (v/v) (P_3 , 24 μL) and sodium carbonate 2% (m/v) (P_4 , 24 μL). The sequence was repeated twice, and the sampling zone directed to the detector (740 nm) through the carrier solution, H_2O (P_2 , 3060 μL), passing through a helical reactor. The analytical signal was based on the height of the absorbance peak, and measurements were made in triplicate. Under optimized experimental conditions using solutions of analytical standards, linear response was estimated between 1 and 20 mg L^{-1} of gallic acid, described by the equation of the straight line: $\text{Absorbance} = 0.023 + 0.028 C$ (mg L^{-1}) ($R^2 = 0.997$). The detection limit (99.7% confidence level), limit of quantification, coefficient of variation ($n=11$; 10 mg L^{-1}) and sampling rate were estimated at 188 $\mu\text{g L}^{-1}$; 627 $\mu\text{g L}^{-1}$; 0.11% and 100 determinations h^{-1} , respectively. The consumption of reagents by determination was estimated at 9.6 μL of Folin-Ciocalteu and 0.95 mg of sodium carbonate, generating 3.4 mL of residue. For quantification of phenolic compounds in solid samples, a calibration curve between 300 and 2500 mg of phenolic compounds per 100 g^{-1} of dry sample was constructed with processed food flours, described by the equation of the straight line: $\text{Absorbance} = 0.007 + 0.0004 C$ (mg of phenolic compounds per 100 g^{-1} of dry sample) ($R^2 = 0.999$). The total phenolic compounds of flours from different raw materials were analyzed by the proposed and reference procedure and did not show significant differences at the 95% confidence level. Intrinsic characteristics of systems using solenoid micropumps, such as portability, low cost and low energy consumption, better mixing and reproducibility of microvolumes of solutions were achieved. In addition, the online extraction of compounds from solid samples demonstrates the versatility and practicality of systems employing multicommutation that meet the precepts of green chemistry configuring an environmentally friendly methodology.

Keywords: Multicommutation. Extraction and quantification. Total phenolic compounds. Solid samples.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Modelo do espectrofotômetro modular empregado para medidas em fluxo. (a) espectrômetro multicanal; (b) fonte de radiação; (c) cabos de fibras ópticas e (d) suporte para cela de fluxo de 1 cm.36
- Figura 2. Diagrama de fluxos do módulo de extração (A) e quantificação (B). P₁-P₄: microbombas solenoide; VB: agitador vibratório; Col: coluna; SE: solução extratora; Ca: carregador; R₁-R₂: reagentes; D: cela de fluxo (1 cm); V: válvula solenoide de 3 vias; W: descartes; x: ponto de confluência; R: Reator helicoidal de 170 cm e GD: célula de difusão de gás.39
- Figura 3. Reação envolvida na determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Fonte: Martins (2016).41
- Figura 4. Espectro de absorção (a) e cinética da reação (b) do produto formado da determinação dos compostos fenólicos totais.42
- Figura 5. Efeito do número de pulsos de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L⁻¹ (3 pulsos); Na₂CO₃ 4% (m/v) (4 pulsos); água como transportador; 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.43
- Figura 6. Efeito do número de pulsos de carbonato de sódio 4% (m/v) sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L⁻¹ (3 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (2 pulsos); água como transportador; 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.43
- Figura 7. Efeito do número de pulsos de ácido gálico 10 mg L⁻¹ sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (2 pulsos); carbonato de sódio 4% (m/v) (2 pulsos), água como transportador, 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.44
- Figura 8. Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L⁻¹ (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); água como transportador e reator de 200 cm.45
- Figura 9. Efeito da parada de fluxo sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L⁻¹ (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); 7 ciclos de amostragem e água como transportador.46
- Figura 10. Efeito do comprimento do reator helicoidal sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L⁻¹ (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); 7 ciclos de amostragem e água como transportador.47

- Figura 11 Efeito da concentração de Folin-Ciocalteu sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu (1 pulso); carbonato de sódio (1 pulso); 7 ciclos de amostragem, água como transportador e reator helicoidal de 170 cm. 48
- Figura 12 Efeito da concentração de carbonato de sódio sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu (1 pulso); carbonato de sódio (1 pulso); 7 ciclos de amostragem, água como transportador e reator helicoidal de 170 cm. 49
- Figura 13. Sinais transientes para determinação de CFT empregando ácido gálico como analito. A figura inserida mostra a relação linear entre absorbância e concentração e os números indicam as concentrações de ácido gálico em mg L^{-1} . 50
- Figura 14. Efeito da massa de amostra sobre o sinal analítico do produto formado da reação com os compostos fenólicos totais extraídos. 52
- Figura 15. Efeito da concentração de Folin-Ciocalteu sobre a massa de amostra para extração dos compostos fenólicos totais. 53
- Figura 16. Efeito da massa de amostra sobre o sinal analítico do produto formado da reação com os compostos fenólicos totais extraídos com Folin-Ciocalteu 20% (v/v). 54
- Figura 17. Extrações com diferentes vazões da microbomba do solvente extrator. . 55
- Figura 18. Sinais transientes obtidos da solução de Triton X-114 sem (a) e com (b) presença da amostra sólida. 56
- Figura 20. Sinais transientes para determinação de CFT empregando ácido gálico como analito. A figura inserida mostra a relação linear entre absorbância e concentração e os números indicam as concentrações de ácido gálico em mg L^{-1} . 58
- Figura 21. Curvas de calibração com amostras sólidas para a determinação de compostos fenólicos totais com o sistema proposto. 59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Sequência de acionamento dos dispositivos para determinação de compostos fenólicos totais utilizando microbombas solenoide	39
Tabela 2. Parâmetros otimizados para o sistema com microbombas solenoide para determinação de compostos fenólicos totais.	50
Tabela 3. Limite de tolerância de íons concomitantes na determinação de compostos fenólicos totais.	51
Tabela 4. Determinação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas de alimentos pelo procedimento proposto e de referência (n=3).	60
Tabela 5. Características analíticas de alguns procedimentos de preparo de amostras sólidas online.	61

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- MAE – Extração Assistida por Micro-ondas (do inglês *Microwave Assisted Extraction*)
- PLE – Extração com Líquido Pressurizado (do inglês *Pressurized Liquid Extraction*)
- SFE – Extração por fluido supercrítico (do inglês *Supercritical Fluid Extraction*)
- UAE – Extração assistida por ultrassom (do inglês *Ultrasound Assisted Extraction*)
- GAE – Equivalentes de ácido gálico
- HPLC-UV – Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (do inglês *High Performance Liquid Chromatography- Ultraviolet/Visible radiation*)
- FIA – Análise por Injeção em Fluxo (do inglês *Flow Injection Analysis*)
- EDTA – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético (do inglês *Ethylenediamine tetraacetic acid*)
- CL – Quimiluminescência (do inglês *Chemiluminescence*)
- PTFE – Politetrafluoretileno
- HPLC-FLD - Cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por fluorescência (do inglês *High Performance Liquid Chromatography – Fluorescence*)
- DG – Célula de Difusão de Gás
- UV-Vis – Radiação ultravioleta/visível
- CFT – Compostos Fenólicos Totais (do inglês *Total Phenolic Compounds*)
- ICP OES – Espectroscopia de Emissão Óptica por Plasma Acoplado Indutivamente (do inglês *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*)
- HPLC-MS/MS – Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas em Tandem (do inglês *High Performance Liquid Chromatography tandem mass spectrometry*)
- R² – Coeficiente de correlação linear
- d.i. – Diâmetro interno
- P – Microbomba solenoide
- V – Válvula solenoide
- R – Reagente
- C – Carregador
- D – Detector
- W – Descarte
- USB – Porta serial universal (do inglês *Universal Serial Bus*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 Procedimentos analíticos para extração de compostos fenólicos totais	26
1.2 Sistemas de análises em fluxo	28
1.3 Extrações de amostras sólidas em fluxo	31
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
2.1. Reagentes e Soluções.....	35
2.2. Equipamentos e acessórios	35
2.2.1. Sistema de análises em fluxo	35
2.2.2. Módulo de análises com microbomba e válvula solenoide de 3 vias.....	36
2.2.3. Avaliação das condições reacionais	36
2.3. Procedimento experimental.....	37
2.3.1. Preparo de amostras	37
2.3.2. Estudos preliminares	37
2.3.3. Extração e determinação de compostos fenólicos empregando sistema em fluxo com multicomutação.....	37
2.3.4. Módulo de extração e quantificação de compostos fenólicos totais	38
2.3.5. Procedimento de referência.....	40
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
3.1. Avaliação das condições reacionais.....	41
3.1.1. Procedimento de referência.....	41
3.2. Extração e determinação de compostos fenólicos totais empregando análises em fluxo com multicomutação.....	42
3.2.1. Módulo de quantificação de compostos fenólicos totais.....	42
3.2.1.1. Avaliação das características analíticas.....	50
3.2.1.2. Efeitos de espécies concomitantes	51
3.2.2. Módulo de extração de compostos fenólicos totais.....	52

3.3. Avaliação das características analíticas	57
3.4. Análises de amostras de alimentos sólidos	58
4. CONCLUSÕES.....	64
REFERÊNCIAS.....	65

1. INTRODUÇÃO

Os compostos fenólicos são considerados os maiores representantes da classe dos compostos bioativos. São substâncias que possuem um ou mais núcleos aromáticos, com substituintes hidroxilados e/ou derivados funcionais (glicosídeos, ésteres, éteres, entre outros). Também são conhecidos como fitoquímicos por influenciarem em vários processos fisiológicos e metabólitos, contribuindo para a prevenção e tratamento de doenças crônicas (SHASHIREKHA; MALLIKARJUNA; RAJARATHNAM, 2015).

São produzidos pelas plantas como metabólitos secundários, provocando efeitos farmacológicos ou toxicológicos em humanos e animais. Nas plantas, a síntese pode ter objetivos distintos como: proteger contra a ação dos radicais livres gerados na fotossíntese, atrair polinizadores ou dispersores de sementes e repelir ataques de insetos ou animais. Podem ser classificados pela estrutura química e vias bioquímicas como glicosídeos, flavonoides, proantocianidinas, taninos, mono- e sesqui-terpenoides, fenilpropanoides, diterpenoides, resinas, ligninas e alcaloides (HANSEN; WOLD, 2010).

Os compostos fenólicos são amplamente utilizados como antioxidantes naturais e agentes antimicrobianos (TANASE; BUJOR; POPA, 2019) devido à propriedade de proporcionar benefícios à saúde humana, prevenindo o organismo contra os danos oxidativos causados pelos radicais livres. Além de apresentar atividades antialérgicas, antiaterogênicas e anti-inflamatórias exploradas pelas indústrias alimentícias e farmacêuticas (OSORIO-TOBÓN, 2020).

Levantamento bibliográfico realizado em bases de dados científicos como Web of Science sobre compostos fenólicos totais, demonstrou o crescente avanço no desenvolvimento de trabalhos em diferentes matrizes para a determinação dos compostos fenólicos totais. Mais de 33.500 trabalhos foram encontrados entre os anos de 2013 e 2022, com a palavra-chave “compostos fenólicos totais”, sendo 10.639 referentes aos últimos três anos, dos quais 2.600 foram publicados somente neste ano.

O método Folin-Ciocalteu proposto por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), tem sido amplamente utilizado para quantificar o teor de compostos fenólicos totais de produtos alimentícios. Quando realizado em batelada,

apresenta algumas desvantagens, como análise morosa devido ao tempo de reação e à fotossensibilidade (MAGALHÃES et al., 2007).

A análise com sistema em fluxo com multicomutação é atraente alternativa para contornar tais desvantagens. Baseia-se na utilização de dispositivos discretos para inserções ou direcionamentos de soluções, como microbombas e válvulas solenoide, aumentando a versatilidade do sistema, com menor consumo de amostra e reagente, menor geração de resíduos e volumes de solução definido pela vazão e tempo de amostragem controlado por *software* (LARA-ORTEGA et al., 2016; MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012).

A literatura reporta estudos que utilizaram a análise de injeção em fluxo para avaliar a capacidade antioxidante de produtos alimentícios e medicamentosos (CELESTE et al., 1992; MAGALHÃES et al., 2006; PERIS; MÜLLER; MAQUIEIRA, 1991; ŠATÍNSKÝ; KARLÍČEK; SVOBODA, 2002). No entanto, a etapa de preparo de amostra, especificamente a etapa de extração de compostos fenólicos, foi realizada offline.

1.1 Procedimentos analíticos para extração de compostos fenólicos totais

A fim de melhorar a eficiência da extração, procedimentos analíticos mais limpos e econômicos vêm sendo desenvolvidos para extração de compostos fenólicos em diversos tipos de amostras. Visto que atualmente não há procedimento padrão para a extração de compostos fenólicos em materiais vegetais, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos analíticos alternativos. Tais procedimentos consideram o tipo de amostra e compostos fenólicos alvo, objeto da análise que está sendo utilizado e a disponibilidade técnica (ALARA; ABDURAHMAN; UKAEGBU, 2021).

Os métodos de extração de compostos fenólicos podem ser divididos em convencionais e não convencionais. Os métodos convencionais mais utilizados empregam maceração e a extração exaustiva por Soxhlet que emprega grandes volumes de solventes e maiores tempos de extração, podendo acarretar em perdas dos analitos por degradação (OSORIO-TOBÓN, 2020). A fim de diminuir as desvantagens dos métodos convencionais, os métodos de extração assistida por micro-ondas (MAE), extração por líquido pressurizado (PLE), extração por fluido

supercrítico (SFE) e extração assistida por ultrassom (UAE) são os não convencionais comumente empregados.

Sutivisedsak et al. (2010) empregaram a extração assistida por micro-ondas em oito tipos de grãos de feijão encontrando 70,6 mg equivalentes de ácido gálico (GAE) g^{-1} de amostra. A maior eficiência de extração foi obtida com etanol 50% (v/v) como solvente extrator e temperatura de 150 °C. Em temperaturas superiores há melhor permeabilidade do solvente na matriz e maior solubilidade dos compostos no solvente. O consumo de solvente extrator para cada amostra foi estimado em 49 mL, geração de 150 mL de resíduos e tempo de 15 minutos para extração dos compostos fenólicos totais, além do tempo de espera para o resfriamento do extrato, ocasionando desvantagem no tempo de análise. A extração assistida por micro-ondas também foi empregada em amostras de uvas moídas (0,3 g) a partir de 10 mL de solvente extrator (50% (v/v) de etanol acidificado) a 70°C sob agitação magnética. O tempo de extração foi de 5 minutos, obtendo-se 200 a 1200 mg de compostos fenólicos totais kg^{-1} de amostra seca. Foram consumidos grandes volumes de solução, gerando aproximadamente 35 mL de resíduo por determinação, considerando apenas a etapa de preparo do extrato da amostra. A determinação foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta (HPLC-UV) empregando elevado volume de solvente (44 mL por injeção) para eluição dos analitos (PIÑEIRO et al., 2022).

Na PLE são empregados solventes orgânicos em alta pressão e temperatura acima do ponto de ebulição. No trabalho de Tripodo et al. (2018) foi utilizado 1,0 g de frutas secas, 10 MPa de pressão por 20 minutos e etanol 100% (v/v) para extração dos compostos fenólicos totais, obtendo ca. 66 mg GAE g^{-1} de amostra, demonstrando ser alternativa viável em comparação com a extração sólido-líquido convencional. Entretanto, neste procedimento foram requeridos 11 mL de solução extratora por determinação, acarretando em grandes volumes de resíduos gerados. A fim de aumentar a seletividade e diminuir a degradação dos compostos extraídos, o método de PLE foi acoplado com a extração em fase sólida em linha. Embora o procedimento tenha apresentado 81% de recuperação, com alta eficiência de extração, foram consumidos 14 mL de metanol, gerando 42 mL de resíduos por extração (PALMA; PIÑEIRO; BARROSO, 2002).

Com objetivo de extrair compostos fenólicos de amostras de cascas de manga, a UAE foi empregada com solução de etanol 50% (v/v) como solvente

extrator, razão sólido-líquido de 1:30 a 45 °C, amplitude de ultrassom de 30% com 10 minutos de operação. Quantidade de compostos fenólicos totais foi estimada em 35,5 mg GAE g⁻¹ de amostra, consumindo 30 mL de solvente extrator (KAUR; PANESAR, ANAL, 2022). A UAE também foi empregada em amostras de cebola, utilizando metanol 53% (v/v) como solvente extrator, pH 2,6, temperatura de 60 °C, amplitude de 30,1% por 10 minutos e razão de 0,2 g de amostra a cada 11 mL de solvente, obtendo-se 7,23 mg g⁻¹ de compostos fenólicos totais. No total foram gerados aproximadamente 25 mL de resíduo por determinação, gastando-se 20 minutos para extração dos analitos (GONZÁLEZ-DE-PEREDO et al., 2021).

Nos procedimentos em batelada apresentados, há maior consumo de reagentes, geração de resíduos e tempos de extração elevados. Em vista disso, pesquisas atuais buscam o desenvolvimento de procedimentos mais simples, econômicos, rápidos e com menor consumo de amostras e reagentes e, conseqüentemente, menor geração de resíduos, visando o aumento da frequência analítica em menor tempo.

1.2 Sistemas de análises em fluxo

A análise por injeção em fluxo (FIA) tem sido alternativa para procedimentos mais rápidos, baratos e simples, visando à mecanização de procedimentos analíticos. Baseia-se na injeção da amostra líquida em solução carregadora, sendo direcionada para o sistema de detecção. Neste processo, a zona de amostra pode receber reagentes, passar por etapas de separação, pré-concentração, diluição, filtração, entre outras, possibilitando a detecção de diferentes analitos (BEZERRA et al., 2020; REIS; GINÉ; KRONKA, 1989).

A FIA possibilita a automação de procedimentos analíticos apresentando características que englobam alguns dos princípios da Química Verde, como a minimização do consumo de reagentes e geração de resíduos; rapidez e simplicidade no tratamento da amostra, evitando desperdícios e reduzindo os riscos aos analistas devido o processamento da amostra ocorrer em sistema fechado (MELCHERT; REIS; ROCHA, 2012).

A inserção da amostra e/ou reagentes, controle da vazão, controle do detector, aquisição, armazenamento e processamento de dados, são algumas das

etapas de um sistema em fluxo que podem ser mecanizadas e/ou automatizadas (BEZERRA et al., 2020).

A determinação de polifenóis totais em amostras de vinhos baseada na reação de Folin-Ciocalteu em meio básico foi avaliada por Celeste et al. (1992). Uma bomba peristáltica e um amostrador automático foram empregados no sistema a fim de diminuir os erros associados e aumentar frequência analítica. Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e NaOH 0,5 mol L⁻¹ foram empregados como reagentes na vazão de 1,0 mL min⁻¹ e o produto da reação foi monitorado em 760 nm. Embora a precisão e frequência analítica tenham sido estimadas em 0,2 mg L⁻¹ e 60 determinações h⁻¹, respectivamente, foram necessárias diferentes diluições das amostras de vinho para aplicação efetiva do procedimento.

Peris, Müller e Maquieira (1991) propuseram sistema em fluxo para análise de polifenóis em amostras de cerveja pelo método do reagente Folin-Ciocalteu (medidas espectrofotométricas em 750 nm). As condições otimizadas foram: 19,7 µL de volume de injeção; 0,8 mL min⁻¹ de vazão; reatores helicoidais de 30 e 200 cm e soluções de 1% (m/v) e 1% (v/v) de Na₂CO₃ e Folin-Ciocalteu, respectivamente. Parâmetros analíticos como precisão e frequência analítica foram estimados em 1,58% (n=11) e 42 determinações h⁻¹, respectivamente. No entanto, o sistema FIA empregando injetor comutador manual, empregava fluxo contínuo de ambas as soluções de reagente, acarretando alto consumo de reagentes e geração de resíduos.

A multicomutação é um processo baseado no uso de dispositivos de comutação discretos (como válvulas e/ou microbombas solenoide) que podem aumentar a versatilidade dos sistemas de análises em fluxo. Tais dispositivos são controlados por microcomputador e permitem a inserção de amostras e reagentes na quantidade necessária para a realização do procedimento analítico, consumindo poucos microlitros de soluções e reagentes (REIS; MORALES-RUBIO; LA GUARDIA, 1999; ROCHA et al., 2002).

Em sistemas com multicomutação, a amostragem binária pode ser explorada, o que inclui a inserção intercalada entre alíquotas de amostra e reagentes, aumentando o número de interfaces entre as soluções. A sequência de etapas para inserção da solução é chamada de ciclo de amostragem. Esta estratégia e o fluxo pulsado característico gerado pela microbomba solenoide

promovem a melhoria das condições de mistura entre a amostra e o reagente (REIS et al., 1994).

A microbomba solenoide é constituída de câmara interna, diafragma e êmbolo envolto por um solenoide, sendo encarregado de movimentá-lo por meio de mola fixada na extremidade. Ao acionar a corrente elétrica, o diafragma expande e a solução (amostra, reagentes ou carregador) preenche a câmara interna. Assim que a tensão é desligada, a mola e o diafragma retornam ao posicionamento original, provocando o bombeamento do líquido para fora da câmara, direcionando-o para o sistema de detecção. As válvulas solenoide, quando acionadas permitem a passagem do fluido em um sentido e, quando desligadas, o conduzem para outra via. Podem ser encontradas válvulas de duas ou três vias e o fluxo pode ser comutado na posição aberta ou fechada (BEZERRA et al., 2020).

Neste contexto, um estudo propôs a determinação da capacidade redutora do reagente Folin-Ciocalteu em amostra de vinhos, cervejas, chás, refrigerantes e sucos de frutas (MAGALHÃES et al., 2006). A fim de melhorar a mistura entre a amostra e o reagente, fluxo contínuo de reagentes, zonas coalescentes e amostragem binária foram avaliadas, empregando sistema com multi-seringa. O limite de detecção foi estimado em $0,6 \text{ mg L}^{-1}$ e frequência analítica de 12 determinações h^{-1} com repetibilidade de $\text{RSD} < 1,3\%$ ($n=10$). Comparando-se o procedimento com o convencional em batelada, reduziu-se em 22 vezes o tempo de análise.

Pulgarín, Bermejo e Durán (2012) propuseram o procedimento em fluxo baseado na inibição dos antioxidantes naturais das amostras (vinhos, infusões de chás e sementes de uva) sobre o luminol-perborato induzido por Co(II)/EDTA com detecção quimiluminescente. Os resultados foram expressos em IC_{50} , que é a massa de amostra necessária para reduzir em 50% a quimioluminescência na ausência do antioxidante. Na repetibilidade e reprodutibilidade com $17,1 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido gálico, desvios padrão relativo foram estimados em 3,5 ($n=5$) e 6,4% (5 dias consecutivos), respectivamente. O emprego da FIA, possibilitou a redução de 24 vezes no tempo de análise em comparação com o procedimento em batelada. Contudo, para o pré-tratamento da amostra foi necessário o preparo das infusões de chás com 100 mL de água fervente e agitação constante por 5 minutos, seguido de repouso até atingir a temperatura ambiente. Para as sementes de uva foi empregado 25 mL de solução etanol:água (1:1) com agitação constante (2 horas) e posterior

filtração para balão de 100 mL, ocasionando aumento no tempo total de análise para ambas as amostras.

O método de análise por injeção em fluxo com multicomutação com detecção por quimioluminescência (CL) foi proposto como alternativa ao método de Folin-Ciocalteu em batelada. Amostras de azeite foram analisadas a fim de determinar a concentração de compostos fenólicos totais e valor de peróxido (LARA-ORTEGA et al., 2018). O procedimento foi baseado na emissão de CL de permanganato ($3,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) em meio ácido (H_2SO_4 $1,0 \text{ mol L}^{-1}$), a partir de extratos aquosos de azeite, empregando tiosulfato ($1,0 \times 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$) para aumentar o sinal analítico. Embora a frequência analítica tenha sido estimada em 180 determinações h^{-1} , o procedimento avaliado não atingiu bons coeficientes de correlação ($R^2 = 0,944$) e extensa faixa linear nas calibrações. Portanto, foi estimado como método semiquantitativo, podendo ser utilizado como triagem para determinação de compostos fenólicos em amostras de azeite. Dois métodos de extração foram empregados para o tratamento das amostras: extração em fase sólida, que requereu grandes volumes de solventes tóxicos, como hexano e acetato de etila e a extração líquido-líquido também utilizando hexano como solvente extrator, acarretando elevados volumes de solventes e conseqüentemente maior geração de resíduos.

A fim de aumentar a frequência analítica com resultados promissores nas características analíticas dos métodos propostos, os trabalhos apresentados comprovaram a utilização de sistemas em fluxo como alternativas ao método em batelada. Em contrapartida, além de empregar tais procedimentos apenas em amostras líquidas ou preparo de extratos em amostra sólida, a etapa de preparo de amostra tornou os procedimentos morosos e onerosos, utilizando solventes tóxicos e gerando grandes volumes de resíduos. Desse modo, torna-se necessário explorar sistemas em fluxo acoplado às etapas de preparo de amostra em linha, com intuito de diminuir o consumo de reagentes tóxicos e geração de resíduos, a partir de menor quantidade de amostras.

1.3 Extrações de amostras sólidas em fluxo

O preparo de amostra é uma das etapas mais crítica da sequência analítica, na qual a amostra (coletada na etapa de amostragem) é tratada e adequada para

análises em laboratório. Além ser considerada como etapa morosa, é também a mais onerosa, pois é nesta etapa em que são consumidos grandes volumes de reagentes e solventes orgânicos (COSTA, 2014). Nesta etapa, ocorre a separação, pré-concentração do analito com o objetivo de melhorar os limites de detecção e quantificação e remoção de interferentes, sendo mais demorado e com maior fonte de erros, especialmente quando amostras sólidas estão envolvidas (LUQUE DE CASTRO; GARCÍA-AYUSO, 1998).

O uso de automação na etapa de tratamento de amostras melhora a precisão entre as medidas, aumentando a frequência analítica e reduzindo o consumo de reagentes e energia (COSTA, 2014). A fim de mecanizar o método de preparo de amostras e a quantificação de nitrogênio em amostras sólidas, Timofeeva et al. (2015) propuseram sistema de análises em fluxo com extração sólido-líquido online e difusão gasosa. Comparado com o método de Kjeldahl, o volume de solvente de extração empregado foi aproximadamente 15 vezes inferior e redução de 10 vezes do tempo de extração, demonstrando a viabilidade de utilização de sistemas de análises em fluxo para extrações de amostras sólidas (TIMOFEEVA et al., 2015).

Câmara de extração sólido-líquido foi desenvolvida com o objetivo de reduzir o consumo de reagentes e quantidade de amostras, diminuir etapas operacionais no preparo de amostras e aumentar a frequência analítica (GALVIS-SÁNCHEZ; SANTOS; RANGEL, 2016). A extração sólido-líquido em sistema de análises em fluxo foi empregada para determinação de nitrato em diferentes plantas. Comparando os resultados obtidos pelo método proposto, a quantidade de amostra foi reduzida em até 67 vezes, o volume do solvente extrator em 1480 vezes e o tempo de extração foi 30 vezes inferior em comparação com o método em batelada com o emprego de coluna de cádmio.

Procedimento de extração sequencial para fracionamento rápido e automático de arsênio foi proposto com 25 mg de amostra de solo empacotada em microcoluna e detecção por espectrometria de fluorescência atômica de geração de hidretos. Houve redução de 144 vezes no tempo total para extração e detecção do analito. Comparado com o método convencional de extração sequencial em batelada, o método proposto proporcionou maior precisão, menor quantidade de amostra e reagentes e menor risco de contaminação e perda de analito (DONG; YAN, 2005; LARIOS; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ; RUCANDIO, 2012).

As colunas empacotadas com reagentes sólidos são amplamente exploradas para separação e concentração do analito pelo uso de materiais adsorventes, como nas extrações sólido-líquido. Entretanto, apresentam desvantagens físicas e químicas como aumento de pressão e diminuição da interação entre amostra e reagente (CASTRO; TENA, 1993).

O leito fluidizado é alternativa para reduzir ou eliminar as desvantagens no uso de colunas como método de extração e é estabelecido pela passagem de extrator pelo leito de partículas sólidas. Nesse caso, a resistência exercida pelo extrator corresponde ao peso aparente das partículas no leito. Visto que o tamanho e a densidade das partículas no leito afetam a velocidade, quando as partículas estão suspensas, o leito atinge a velocidade mínima, permitindo a fluidização (BEESTON et al., 2007; ROSENDE; MIRÓ; CERDÀ, 2010).

O método de extração em colunas com leito fluidizado é uma maneira dentre vários outros métodos dinâmicos de extração. O movimento da amostra e o refluxo das partículas levam a melhoria nas interações sólido-líquido. A força de arraste da solução através das partículas é suficiente para sustentá-las, proporcionando queda de pressão no leito. Por esta razão, é estabelecida geometria desordenada, mas reproduzível das partículas sólidas em recirculação que caracteriza a fluidização (MACHADO et al., 2017). Além da praticidade, apresentam outras vantagens, como a possibilidade de reduzir a perda e contaminação da amostra, facilitar o manuseio das soluções e reduzir o volume de solvente extrator empregado (MIRÓ et al., 2005).

Shishov et al. (2016) desenvolveram procedimento automatizado para reações nas superfícies de reagentes sólidos em reator fluidizado para amostras de biodiesel. Utilizando análise por injeção cíclica, resina Dowex 50WX4 saturada com Cu^{2+} foi fluidizada por borbulhamento de ar, a fim de promover a interação com o analito (glicerol), formando derivado solúvel com detecção posterior. Resposta linear entre 100 e 1000 mg kg^{-1} de glicerol e limite de detecção de 30 mg kg^{-1} foram obtidos. Evitando a sorção de 3,5-diacetil-1,4-dihidrolutidina nas paredes do tubo de PTFE, como ocorreu em outros estudos com derivatização do glicerol em sistemas em fluxo.

Com objetivo de diminuir a quantidade de reagentes e eliminar solventes orgânicos na extração, Daminato, Kamogawa e Melchert (2017), propuseram sistema de análises por injeção em fluxo com fluidização de amostra sólida para

extração e quantificação de gossipol em torta de algodão. A frequência analítica foi estimada em 30 determinações h^{-1} , sendo 60 vezes superior que o procedimento em batelada. Solventes orgânicos foram substituídos por etanol 55% (v/v) (150 μL), sendo consumidos 1,08 mg de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ e geração de 20 mL de resíduo.

A fim de explorar a automação da extração em fase micro sólida magnética dispersiva com leito fluidizado, foi empregado sistema em fluxo para determinar diferentes fluoroquinolonas em amostras de alimentos infantis à base de carne. Para construção do reator de leito fluidizado foi empregado tubo de PTFE cilíndrico (100 mm de altura x 10 mm de diâmetro interno). Após permeação de solução da amostra com acetonitrila, a separação dos analitos ocorreu empregando nanopartículas magnéticas de Zr-Fe-C, seguindo pela eluição e determinação por cromatografia com detecção por fluorescência (HPLC-FLD). O limite de detecção, quantificação e recuperação foram estimados em 0,3; 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 122%, respectivamente. Foi utilizado 0,15 g de amostra por determinação, reduzindo o consumo de amostra em até 33 vezes. O volume de solvente de eluição (hidróxido de potássio em metanol) foi reduzido em até 12 vezes em comparação com outros métodos empregados em amostras de tecido muscular (suíno e frango) e fórmulas infantis em pó (VAKH et al., 2018).

As vantagens destacadas do emprego do leito fluidizado, como a minimização de perdas de amostras, maior facilidade na manipulação das soluções, redução do consumo de reagente e menor geração de resíduos, demonstram a viabilidade do desenvolvimento de um analisador em fluxo envolvendo as etapas de extração e quantificação em linha.

Neste trabalho, foi desenvolvido um analisador de fluxo para extração e quantificação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas, envolvendo microbombas solenoide. O procedimento proposto foi realizado visando minimizar o consumo de amostras e reagentes, utilizar menos reagentes tóxicos e aumentar a frequência analítica.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Reagentes e Soluções

Todas as soluções foram preparadas com reagentes químicos de grau analítico e água deionizada ($18 \mu\text{S cm}^{-1}$ a $25 \text{ }^\circ\text{C}$) (Merck Millipore, modelo: Synergy® Water Purification System). As soluções de referência foram preparadas na faixa de $1,0$ a $20,0 \text{ mg L}^{-1}$ de ácido gálico (Sigma-Aldrich, 98%) por diluição de solução estoque de 1000 mg L^{-1} .

As soluções de reagente de Folin-Ciocalteu 20% (v/v) (Sigma-Aldrich) e carbonato de sódio 2% (m/v) (Pro Analyti, 97%) foram empregadas no sistema de multicomutação e água deionizada, etanol (Merck) ou surfactante TrintoX-114 (Sigma-Aldrich) como carregador.

O efeito dos íons concomitantes Ca^{2+} , Fe(III) , K^+ , Mg^{2+} , Mn(II) , Na^+ , PO_4^{3-} , Zn^{2+} (Merck) foi avaliado na determinação de compostos fenólicos totais em diferentes concentrações com 10 mg L^{-1} de ácido gálico.

2.2. Equipamentos e acessórios

2.2.1. Sistema de análises em fluxo

Como dispositivos de propulsão e inserção de soluções, foram empregadas microbombas e/ou válvulas solenoide, que dispensaram, com precisão, volumes de $25,3$ (P_1), $43,7$ (P_2) e $23,9$ (P_3 e P_4) μL por pulso. Para a compatibilização da intensidade de corrente e da diferença de potencial necessárias para o acionamento dos dispositivos, foram empregados circuitos integrados do tipo ULN2803. Uma fonte de diferença de potencial constante (12 V) foi construída para alimentação dos solenoides. Para as medidas dos sinais analíticos, foi utilizado espectrofotômetro modular, composto por um espectrômetro multicanal (Ocean Optics, UBS 2000) acoplado à lâmpada de tungstênio-halogênio (Ocean Optics, LS-1) (Figura 1a e 1b). Para o transporte da radiação, foram empregadas fibras ópticas (Figura 1c) e as medidas foram efetuadas com cela de fluxo de 1 cm de caminho óptico com $80 \mu\text{L}$ de volume interno em um suporte para cubeta (Figura 1d).

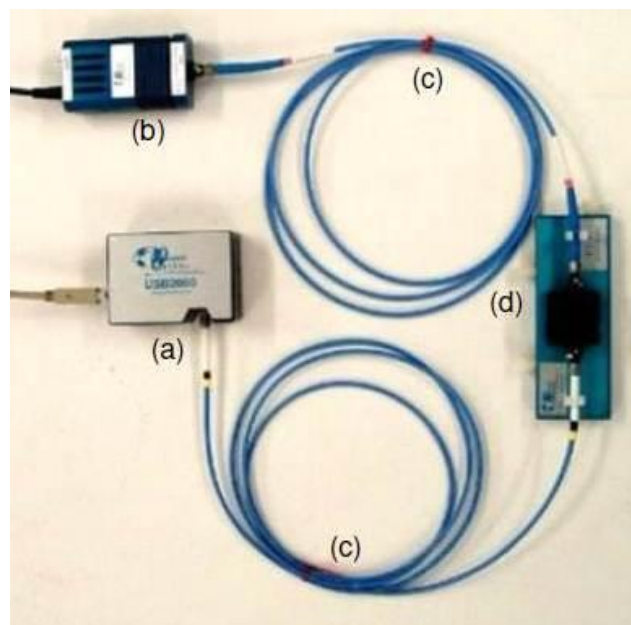


Figura 1. Modelo do espectrofotômetro modular empregado para medidas em fluxo. (a) espectrômetro multicanal; (b) fonte de radiação; (c) cabos de fibras ópticas e (d) suporte para cela de fluxo de 1 cm.

2.2.2. Módulo de análises com microbomba e válvula solenoide de 3 vias

O módulo de análises foi construído com microbombas e válvula solenoide de 3 vias (Bio-Chem), tubos de polietileno (0,8 mm d.i), confluência de acrílico e pontos de articulação Perspex. Célula de difusão de gás (DG) construída com duas placas Perspex (7 cm x 4,5 cm x 0,7 cm), mantidas juntas por três parafusos de aço inoxidável e membrana de politetrafluoretileno (PTFE, $\leq 0,2 \mu\text{m}$) entre as placas foi empregada. Os programas para controle e aquisição de dados foram desenvolvidos no *software* livre Arduino 1.5.5 sendo gravado no microcontrolador via comunicação USB, onde as variáveis que definem a rotina de operação (número de pulsos das microbombas e ciclos de amostragem) foram definidas pelo usuário, e após a gravação, passou a operar de modo independente do computador. O ciclo de acionamento das microbombas e válvulas solenoide tem início com o pressionamento dos botões tipo *Push*.

2.2.3. Avaliação das condições reacionais

Para obtenção dos espectros de absorção molecular e cinética da reação foi empregado espectrofotômetro UV-Vis (Agilent Technologies, Cary 60) equipado com

cubeta de quartzo com 1 cm de caminho óptico. No procedimento de referência, na etapa de extração, foram utilizadas mesa orbital (Quimis, SP, Brasil; Modelo Q225M) e centrífuga (Quimis, SP, Brasil; Modelo Q222TM2).

2.3. Procedimento experimental

2.3.1. Preparo de amostras

As amostras de resíduo da produção de vinho tinto (uvas da espécie borgonha) foram adquiridas no bairro Santa Olímpia do município de Piracicaba-SP. Amostras de café verde especial e tradicional foram adquiridas nos estados de Minas Gerais e São Paulo, sendo os de grãos de café especial (safra 2016/17) obtidos na região da Alta Mogiana. As demais amostras foram provenientes de cafés tradicionais adquiridos no comércio local, armazenados em recipiente plástico hermeticamente vedado e fechado e mantidos resfriados a -8 °C em freezer convencional.

Após secagem em estufa com circulação forçada de ar a 60 °C por 24 horas, o material foi moído (Hamilton Beach), peneirado em 32 mesh e acondicionado em sacos de polipropileno lacrados e armazenados em geladeira (5°C).

2.3.2. Estudos preliminares

Foram avaliadas as condições reacionais do método em batelada e realizado estudo cinético. O espectro de absorção molecular foi obtido entre 300 e 800 nm.

2.3.3. Extração e determinação de compostos fenólicos empregando sistema em fluxo com multicomutação

As medidas no sistema em fluxo foram realizadas em quadruplicata com base na altura do pico, descartando o primeiro pico. A inserção de soluções foi realizada por amostragem binária (REIS et al., 1994), introduzindo quatro vezes a amostra ou solução padrão de ácido gálico e uma vez os reagentes simultaneamente no percurso analítico. Aferições das microbombas solenoides

foram realizadas por pesagem do volume dispensado em 100 pulsos. Nas otimizações do sistema, foi empregado estudo univariado, considerando a magnitude dos sinais analíticos e do branco analítico. O efeito do comprimento do reator foi avaliado variando proporcionalmente o número de ciclos de amostragem.

2.3.4. Módulo de extração e quantificação de compostos fenólicos totais

O módulo de extração e quantificação de compostos fenólicos totais (CFT), (Figura 2), foi construído com 4 microbombas e 1 válvula solenoide de 3 vias, operadas de acordo com a sequência de acionamento descrita na Tabela 1. A coluna de leito fluidizado foi mantida sob agitação constante usando agitador vibratório; 0,05 g de amostra sólida e solução extratora de etanol 5% (v/v). A extração do CFT foi iniciada bombeando a solução de extração através de P_1 (150 pulsos) direcionada para o descarte. Solução contendo CFT e reagentes foram inseridos no percurso analítico através das microbombas P_1 (4 pulsos); P_3 (Folin-Ciocalteu 20% (v/v); 1 pulso) e P_4 (carbonato de sódio 2% (m/v), 1 pulso), respectivamente. A sequência foi repetida 2 vezes e a zona de amostra foi transportada ao detector (medida espectrofotométrica em 740 nm), passando pelo reator helicoidal de 170 cm de comprimento e 0,8 mm d.i. e cela de difusão gasosa (GD). A limpeza do sistema foi realizada acionando simultaneamente a microbomba P_1 e a válvula V, direcionando as soluções para o descarte, evitando a passagem pelo percurso analítico, minimizando os riscos de efeito de memória.

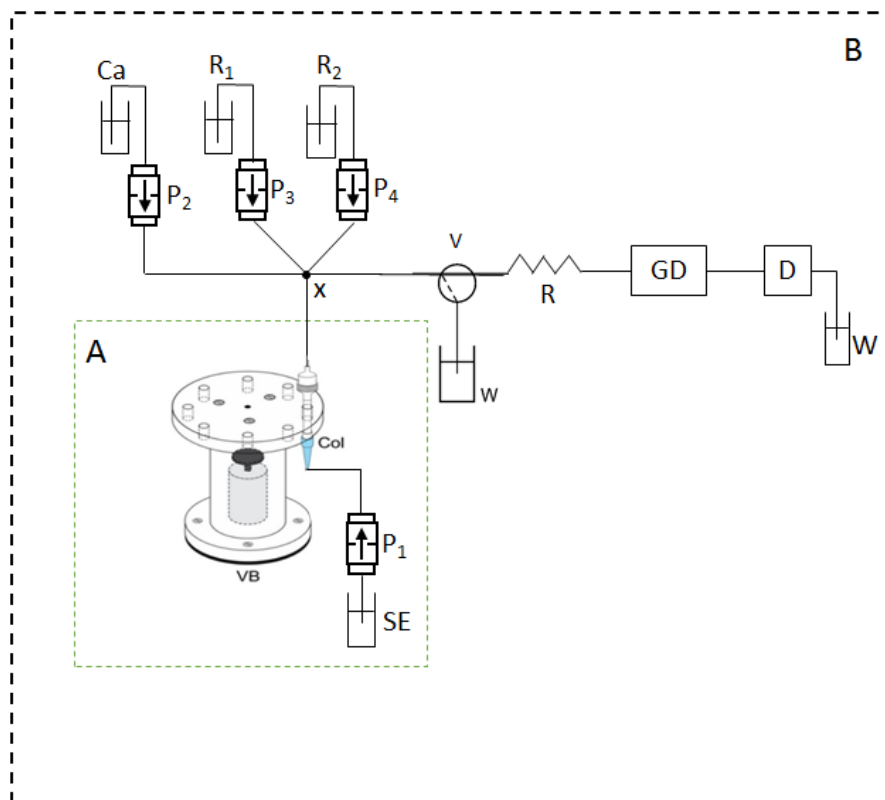


Figura 2. Diagrama de fluxos do módulo de extração (A) e quantificação (B). P₁-P₄: microbombas solenoide; VB: agitador vibratório; Col: coluna; SE: solução extratora; Ca: carregador; R₁-R₂: reagentes; D: cela de fluxo (1 cm); V: válvula solenoide de 3 vias; W: descartes; x: ponto de confluência; R: Reator helicoidal de 170 cm e GD: célula de difusão de gás.

Tabela 1. Sequência de acionamento dos dispositivos para determinação de compostos fenólicos totais utilizando microbombas solenoide

Etapas	Descrição	P1	P2	P3	P4	V	Pulsos	Volume (µL)
1	Extração	1/0	0	0	0	1	150	3795
2	Inserção de amostra	1/0	0	0	0	0	4*	202
3	Inserção de Folin-Ciocalteu e Na ₂ CO ₃	0	0	1/0	1/0	0	1*	48
4	Transporte da zona de amostra e detecção	0	1/0	0	0	0	70	3059
5	Substituição de amostra e limpeza do sistema	1/0	0	0	0	1	15	379
		0	1/0	0	0	1	100	4370

* 2 ciclos de amostragem.

2.3.5. *Procedimento de referência*

Método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu em batelada foi empregado como referência (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999). O extrato alcoólico das farinhas foram obtidos dissolvendo 0,05 g de amostra em 25 mL de etanol absoluto, com posterior agitação em mesa orbital (20 min a 200 rpm) e centrifugação (20 minutos a 4000 rpm) (YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001).

Alíquota do extrato (0,6 mL) foi transferida para tubo tipo Falcon® contendo 3,0 mL de solução reagente de Folin-Ciocalteu 10% (v/v). Após cinco minutos, foi adicionado 2,25 mL de solução de carbonato de potássio 7,5% (m/v). A mistura foi mantida em temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 40 minutos. Posteriormente, a mistura foi centrifugada (20 minutos a 4000 rpm) e submetida à medida espectrofotométrica em 770 nm. A curva de calibração foi obtida com compatibilização do meio de 10 a 50 mg L⁻¹ de ácido gálico.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A determinação dos compostos fenólicos totais foi utilizada como exemplo de aplicação do analisador em fluxo, baseada na medida espectrofotométrica pelo método de Folin-Ciocalteu em 740 nm, que consiste na reação de oxirredução entre os compostos fenólicos e íons metálicos. Em meio alcalino ocorre a redução pelos fenóis do fosfomolibdato-fosfotungstato gerando o azul de molibdênio (Figura 3) (LORDÊLO et al., 2010; SINGLETON, ORTHOFER E LAMUELA-RAVENTÓS, 1999; YILDIRIM; MAVI; KARA, 2001).

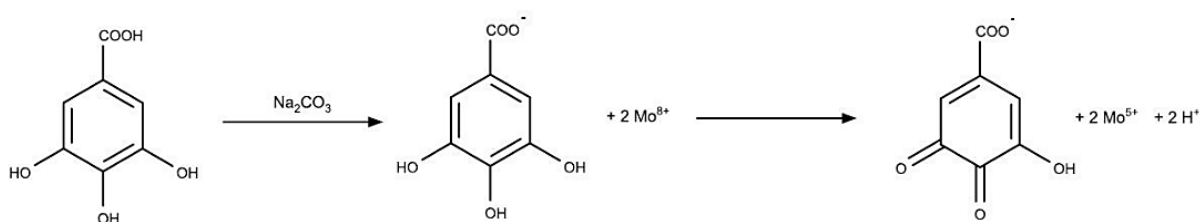


Figura 3. Reação envolvida na determinação dos compostos fenólicos totais pelo método de Folin-Ciocalteu. Fonte: Martins (2016).

3.1. Avaliação das condições reacionais

3.1.1. Procedimento de referência

Estudos iniciais em batelada foram realizados com o intuito de ampliar o conhecimento da reação e avaliar a viabilidade da reação no sistema em fluxo. O espectro de absorção foi obtido para confirmar o comprimento de onda com máxima absorção em 740 nm (Figura 4a). A formação do produto da reação entre os fenóis, em meio alcalino, e o fosfomolibdato-fosfotungstato foi monitorada espectrofotometricamente por 2 horas (Figura 4b). No intervalo de tempo estabelecido foi observado aumento gradativo do sinal analítico até aproximadamente 120 min, demonstrando a relevância do emprego dos sistemas por injeção em fluxo para quantificação de CFT. Curva de calibração entre 10 e 50 mg L^{-1} de ácido gálico foi obtida após 2 horas de reação, descrita pela equação da reta: $A = -0,055 + 0,008 C (\text{mg L}^{-1})$; $R^2 = 0,994$.

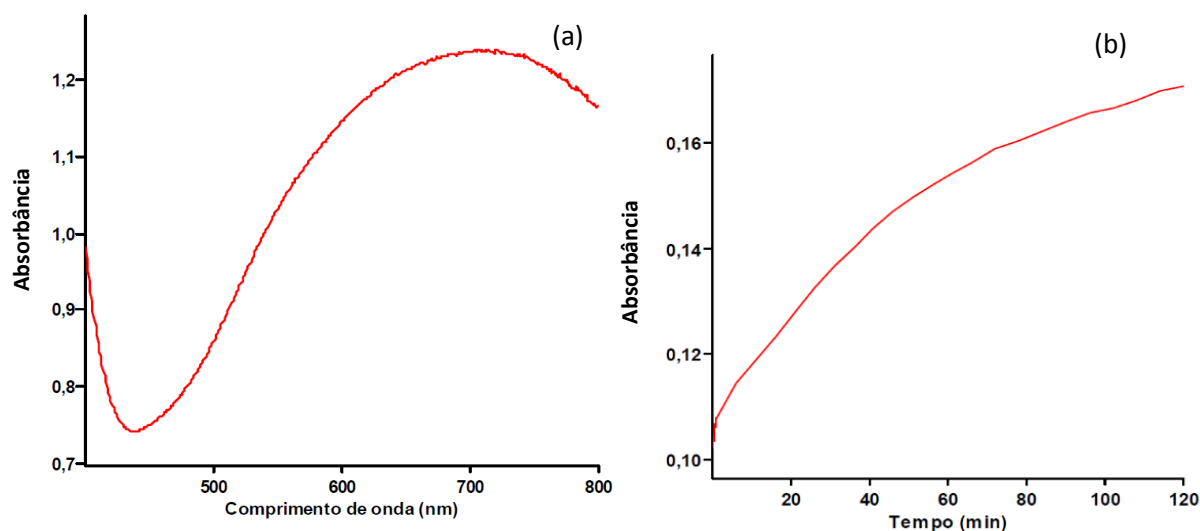


Figura 4. Espectro de absorção (a) e cinética da reação (b) do produto formado da determinação dos compostos fenólicos totais.

3.2. Extração e determinação de compostos fenólicos totais empregando análises em fluxo com multicomutação

3.2.1. Módulo de quantificação de compostos fenólicos totais

Os efeitos dos parâmetros que afetam o desenvolvimento da reação (número de pulsos das microbombas, ciclos de amostragem, parada de fluxo, tamanho do reator, processo de amostragem e concentrações dos reagentes) foram investigados, a fim de maximizar a eficiência da reação com mínima quantidade de tempo e reagentes.

Os efeitos do número de pulsos das microbombas solenoide dos reagentes (Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e Na_2CO_3 4% (m/v)) e da amostra foram avaliados empregando solução padrão de ácido gálico 10 mg L^{-1} (Figuras 5, 6 e 7). A concentração inicial dos reagentes foi estabelecida a partir de trabalhos da literatura, a fim de evitar a formação de gás CO_2 no sistema devido a reação entre os íons carbonato e o ácido do reagente de Folin-Ciocalteu (PERIS, MÜLLER E MAQUIEIRA, 1991). As medidas foram realizadas com 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.

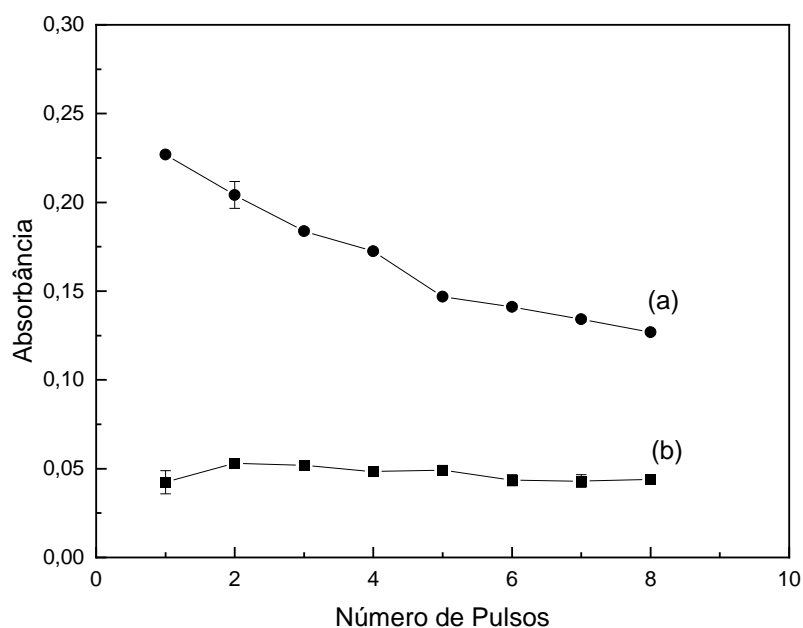


Figura 5. Efeito do número de pulsos de Folin-Ciocalteu 10% (v/v) sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (3 pulsos); Na_2CO_3 4% (m/v) (4 pulsos); água como transportador; 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.

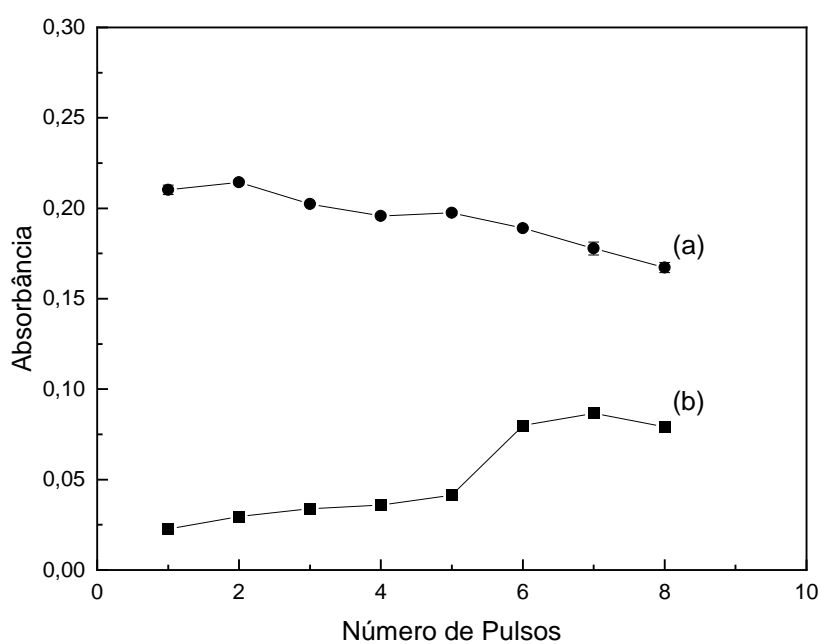


Figura 6. Efeito do número de pulsos de carbonato de sódio 4% (m/v) sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (3 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (2 pulsos); água como transportador; 4 ciclos de amostragem e reator de 200cm.

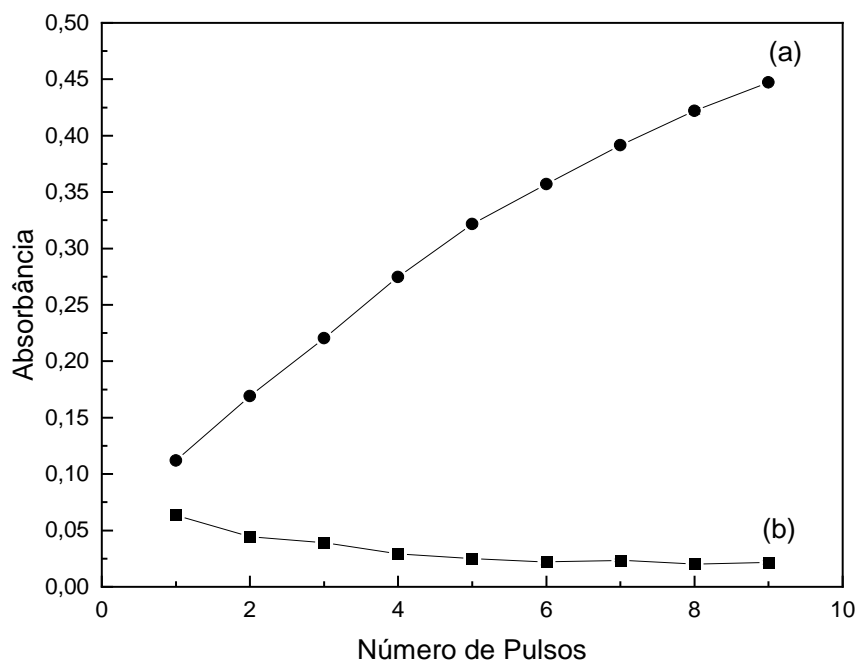


Figura 7. Efeito do número de pulsos de ácido gálico 10 mg L^{-1} sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (2 pulsos); carbonato de sódio 4% (m/v) (2 pulsos); água como transportador; 4 ciclos de amostragem e reator de 200 cm.

Na Figura 5 foi observada maior diferença entre o sinal analítico e branco analítico até 2 pulsos do reagente Folin-Ciocalteu. O sinal analítico foi 30% maior quando comparado com a inserção de 5 pulsos, mantendo o sinal do branco constante. Acima de 2 pulsos, com o aumento da fração volumétrica no percurso analítico, houve decaimento do sinal analítico do produto formado.

No efeito da solução de carbonato de sódio sobre o sinal analítico (Figura 6), maior diferença entre o sinal e branco analítico foi observada com 2 pulsos do reagente. Com a introdução de maior quantidade de carbonato de sódio acima de 5 pulsos, o sinal do branco analítico foi afetado significativamente. Isto pode ter sido ocasionado por espalhamento da radiação devido ao efeito Schlieren (ROCHA; NÓBREGA, 1996).

Como observado na Figura 7, o sinal analítico aumentou gradativamente, conforme o número de pulsos da solução padrão de ácido gálico, sem aumento do sinal do branco analítico. No entanto, com 9 pulsos, o volume da fração volumétrica no percurso analítico ultrapassou a capacidade do reator de 200 cm (1 mL). Portanto, a melhor resposta analítica foi obtida com 2 pulsos de Folin-Ciocalteu 10%

(v/v), 2 pulsos de Na_2CO_3 4% (m/v) e 8 pulsos de amostra, correspondendo ao volume de 191,2 μL para os reagentes e 809,6 μL para amostra, menores que o volume de reator.

O efeito de ciclos de amostragem foi avaliado visando obter a melhor condição de mistura entre amostra e reagentes juntamente com o fluxo pulsado característico das microbombas solenoide. Visto que os valores selecionados dos números de pulsos são pares e para ampliar a extensão do estudo, reduziu-se pela metade o número de pulsos das soluções (1 pulso de Folin-Ciocalteu; 1 pulso de Na_2CO_3 e 4 pulsos de amostra). O efeito do número de ciclos de amostragem foi avaliado entre 1 e 9, utilizando ácido gálico 10 mg L^{-1} , Folin-Ciocalteu 10% (v/v) e carbonato de sódio 4% (m/v), Figura 8.

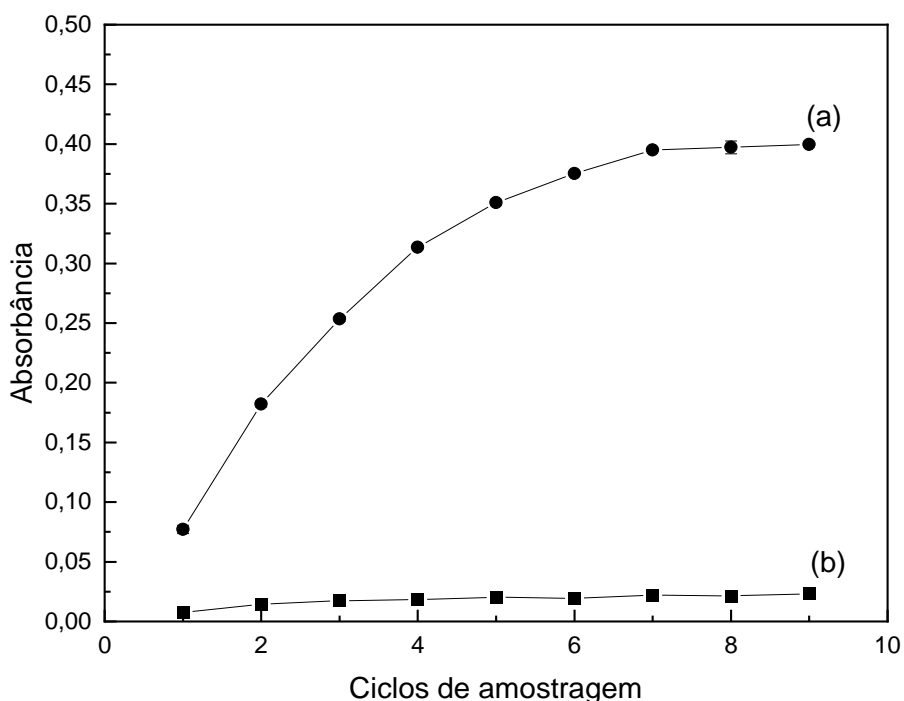


Figura 8. Efeito do número de ciclos de amostragem sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10 mg L^{-1} (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); água como transportador e reator de 200 cm.

Conforme demonstrado na Figura 8, o aumento significativo do sinal analítico ocorreu até 7 ciclos de amostragem, sem alterações significativas no sinal do branco analítico. Após 8 ciclos de amostragem, o volume inserido no percurso analítico ultrapassou a capacidade do reator de 200 cm, não apresentando

diferenças significativas nos sinais. Portanto, foram selecionados 7 ciclos de amostragem para o procedimento proposto nas etapas subsequentes.

O efeito do tempo de parada de fluxo, antes da detecção espectrofotométrica, foi estudado (Figura 9) devido a cinética da reação ser relativamente lenta, conforme observado na Figura 4b.

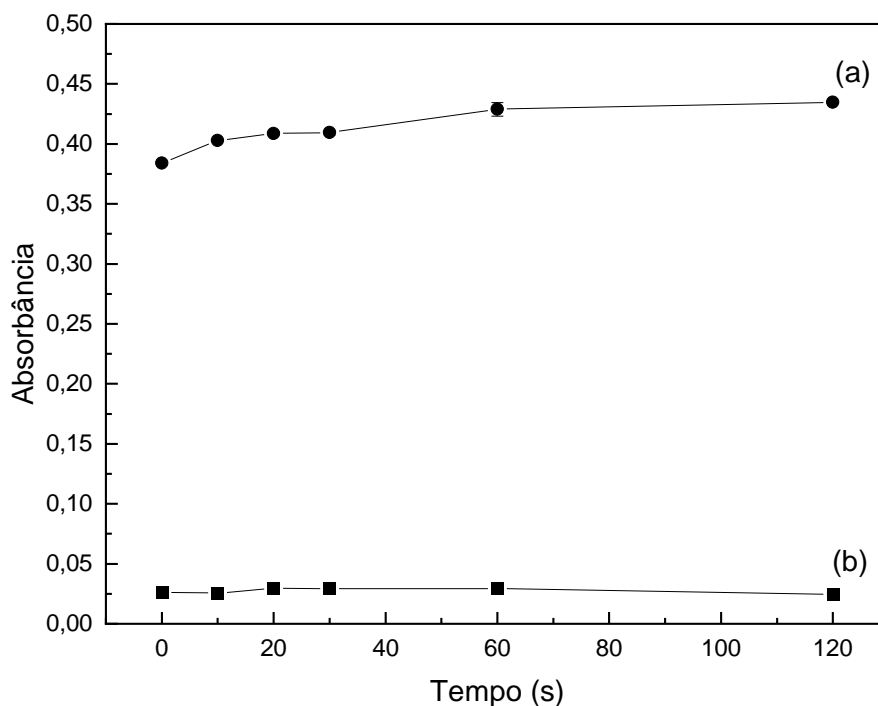


Figura 9. Efeito da parada de fluxo sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); 7 ciclos de amostragem e água como transportador.

O estudo da parada de fluxo foi realizado entre os tempos de 0 a 120 segundos e aumento de 8% foi observado com 60 segundos de parada. Como o aumento no sinal analítico foi relativamente baixo e que a sensibilidade analítica para quantificação de CFT não é problemática, os estudos subsequentes foram realizados sem parada de fluxo, antes da medida espectrofotométrica.

O efeito do comprimento do reator helicoidal foi avaliado entre 70 (350 μL) a 300 cm (1500 μL) (Figura 10). O tamanho do reator helicoidal foi variado proporcionalmente com os ciclos de amostragem, a fim de minimizar o efeito da dispersão.

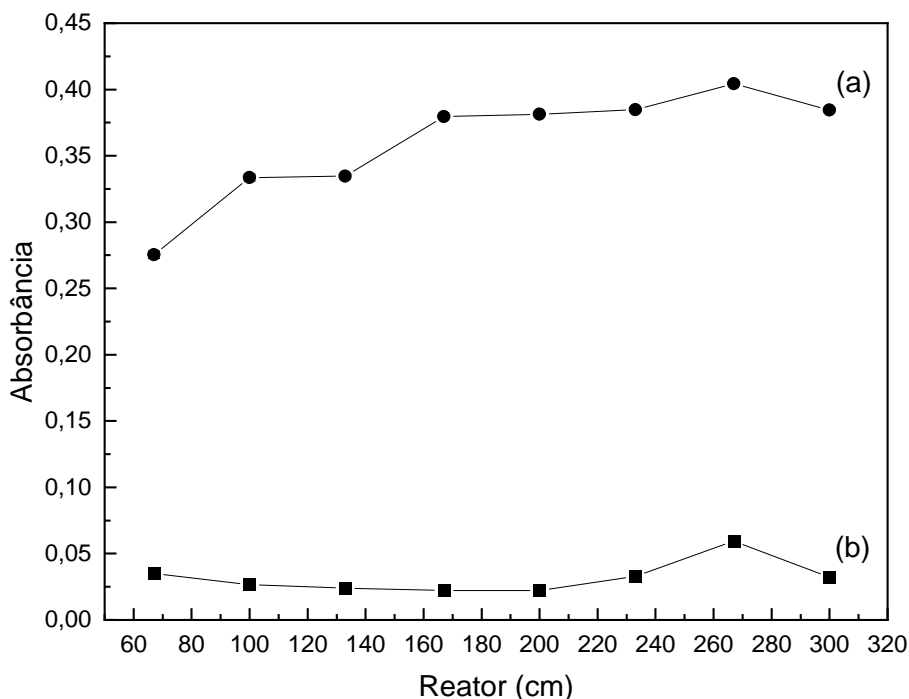


Figura 10. Efeito do comprimento do reator helicoidal sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu 10% (v/v) (1 pulso); carbonato de sódio 4% (m/v) (1 pulso); 7 ciclos de amostragem e água como transportador.

Na Figura 10 foi observado o aumento gradativo do sinal analítico até reator helicoidal de 170 cm, elucidando que o efeito do tempo de residência sobre a formação do azul de molibdênio superou o efeito da dispersão da amostra. Considerando o volume da fração volumétrica ($840 \mu\text{L}$) inserida no sistema, a maior resposta analítica e que não houve diferença significativa acima de 170 cm ($850 \mu\text{L}$), este reator foi selecionado para os estudos subsequentes.

O efeito da ordem de acionamento das microbombas solenoide foi avaliado em diferentes sequências, buscando a melhor resposta analítica. Como não houve diferenças significativas nos sinais obtidos, o acionamento das microbombas ficou definido como amostra com subsequente introdução simultânea dos reagentes.

As concentrações dos reagentes Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio foram avaliadas a fim de garantir a estequiometria da reação química envolvida (Figura 3). As concentrações de Folin-Ciocalteu foram avaliadas de 1 a 15% (v/v), mantendo constante a concentração de carbonato de sódio (4%, m/v) e ácido gálico em 10 mg L^{-1} (Figura 11).

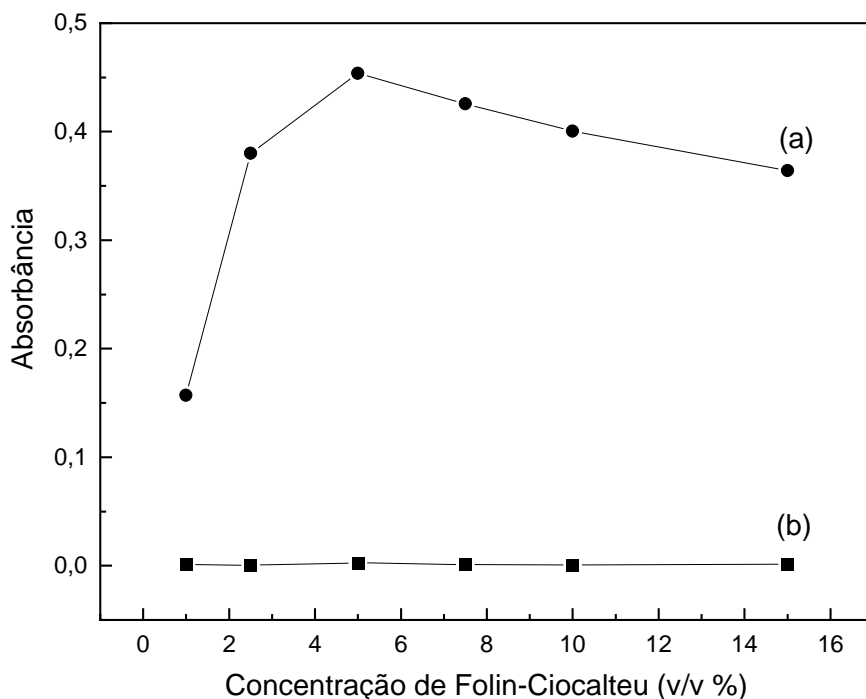


Figura 11 Efeito da concentração de Folin-Ciocalteu sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu (1 pulso); carbonato de sódio (1 pulso); 7 ciclos de amostragem, água como transportador e reator helicoidal de 170 cm.

Como pode ser observado na Figura 11, o sinal analítico aumentou linearmente até 5% (v/v) de Folin-Ciocalteu, 3 vezes em relação a concentração inicial (1%). Concentrações maiores do reagente de Folin com carbonato de sódio, formam quantidade maior de gás carbônico, desfavorecendo a reação de oxirredução. Após a otimização da concentração de Folin-Ciocalteu, foram avaliadas diferentes concentrações de carbonato de sódio (1 - 20%, m/v), Figura 12. O estudo foi realizado mantendo o reagente Folin-Ciocalteu 5% (v/v) e concentração de ácido gálico 10 mg L^{-1} constantes.

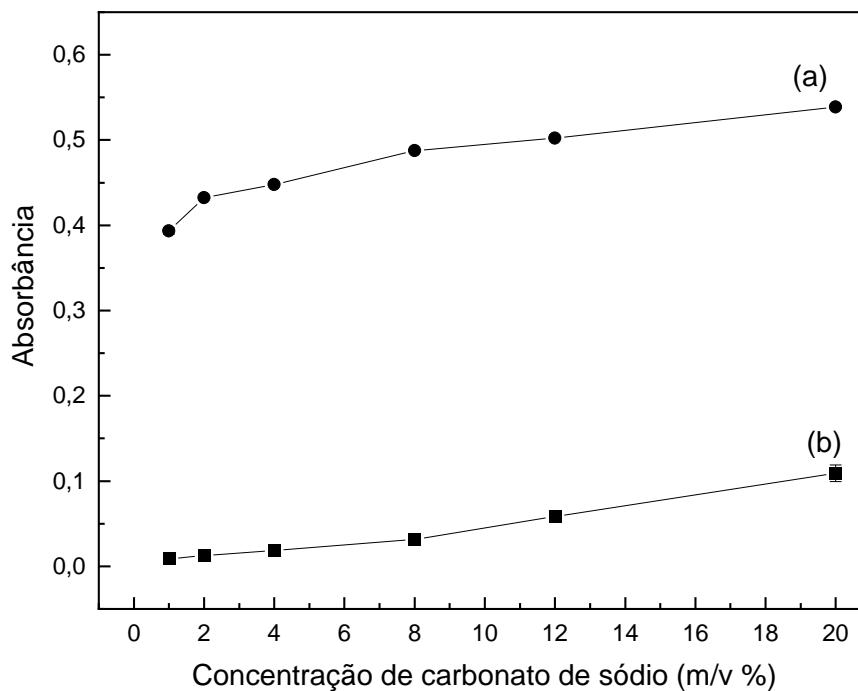


Figura 12 Efeito da concentração de carbonato de sódio sobre o sinal analítico (a) e branco analítico (b). Condições experimentais: ácido gálico 10 mg L^{-1} (4 pulsos); Folin-Ciocalteu (1 pulso); carbonato de sódio (1 pulso); 7 ciclos de amostragem, água como transportador e reator helicoidal de 170 cm.

Como foi observado na Figura 6, o aumento gradativo da quantidade de carbonato de sódio no percurso analítico, aumentou significativamente o sinal do branco analítico (Figura 12). Como explicado anteriormente, isto ocorreu devido ao efeito Schlieren causado por espalhamento de radiação. Como as diferenças entre os sinais do analito e branco não foram diferentes com o aumento da concentração do reagente a partir de 2% (m/v), esta quantidade foi selecionada.

A Tabela 2 resume os parâmetros que foram otimizados, bem como as faixas estudadas e os valores selecionados.

Tabela 2. Parâmetros otimizados para o sistema com microbombas solenoide para determinação de compostos fenólicos totais.

Parâmetro	Faixa estudada	Valor selecionado
Número de pulsos de Folin-Ciocalteu 10% (v/v)	1 – 8	1
Número de pulsos de carbonato de sódio 2% (m/v)	1 – 8	1
Número de pulsos de amostra	1 – 9	4
Ciclos de amostragem	1 – 9	7
Parada de fluxo (s)	0 – 120	0
Reator helicoidal (cm)	70 – 300	170
Concentração de Folin-Ciocalteu (% v/v)	1 – 15	5
Concentração de carbonato de sódio (% m/v)	1 – 20	2

3.2.1.1. Avaliação das características analíticas

Nas condições otimizadas, sinais transientes obtidos para soluções de ácido gálico entre 1 e 20 mg L⁻¹ são apresentados na Figura 13.

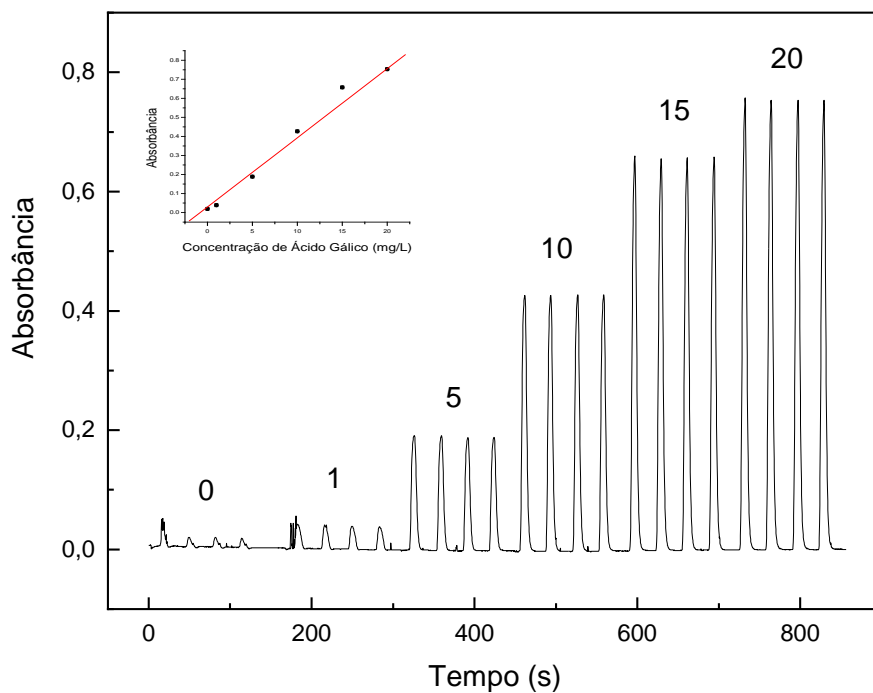


Figura 13. Sinais transientes para determinação de CFT empregando ácido gálico como analito. A figura inserida mostra a relação linear entre absorbância e concentração e os números indicam as concentrações de ácido gálico em mg L⁻¹.

Resposta linear foi observada entre 1 e 20 mg L⁻¹, descrita pela equação da reta: $A = 0,029 + 0,036 C$ (mg L⁻¹); $R^2 = 0,997$. O limite de detecção e quantificação, coeficiente de variação e frequência analítica foram estimados em 33 e 110 µg L⁻¹ a nível de confiança de 99,7%, conforme recomendações da IUPAC considerando o desvio padrão de 11 medidas do branco analítico; 0,41% (n=11) e 120 determinações h⁻¹, respectivamente. Para cada determinação foram consumidos 8,4 µL de Folin-Ciocalteu, 3,4 mg de carbonato de sódio, gerando apenas 4,1 mL de resíduo.

3.2.1.2. Efeitos de espécies concomitantes

Foi avaliado o efeito de algumas espécies possíveis de causar interferência no procedimento proposto para determinação de compostos fenólicos totais. Foram preparadas soluções de Ca²⁺, Fe(III), K⁺, Mg²⁺, Mn(II), Na⁺, PO₄³⁻ e Zn²⁺ enriquecidas com 10 mg L⁻¹ de ácido gálico. Os resultados foram comparados com os sinais analíticos obtidos na ausência dos íons concomitantes (Tabela 3).

Tabela 3. Limite de tolerância de íons concomitantes na determinação de compostos fenólicos totais.

Íon concomitante	Limite de tolerância (mg L ⁻¹)
Ca ²⁺	50
Fe(III)	0,5
K ⁺	1000
Mg ²⁺	100
Mn(II)	2
Na ⁺	100
PO ₄ ³⁻	25
Zn ²⁺	12

As espécies com maior potencial interferente na determinação de compostos fenólicos totais foram os íons Fe(III) e Mn(II). No entanto, conforme a análise utilizando espectrometria de absorção atômica, a concentração encontrada do íon Fe(III) em amostras de resíduo vínico foi de 7,5 mg 100 g⁻¹ é bem menor que o limite de tolerância estudado. Portanto, nenhuma das espécies estudadas causaram interferência significativa (variação do sinal inferior a 5%) no procedimento proposto.

3.2.2. Módulo de extração de compostos fenólicos totais

Para o módulo da etapa de extração, foram realizadas avaliações físicas com diferentes colunas e filtros, a fim de obter maior extração e menor pressão no sistema, evitando vazamentos.

A coluna para acondicionar a amostra sólida foi construída com ponteira descartável de micropipeta automática de 1000 μL , um frit na parte inferior da ponteira para suporte do sólido, evitando contato com a microbomba solenoide e algodão na parte superior (evitando a passagem da amostra sólida até o módulo de quantificação). Microbomba solenoide foi utilizada para propulsão da solução extratora, sendo selecionados 150 pulsos para extração dos compostos fenólicos e preenchimento da tubulação até o ponto de confluência x, mostrada na Figura 2.

O efeito da quantidade de amostra (resíduo vínico) foi avaliado entre 30 e 350 mg em triplicata, conforme Figura 14.

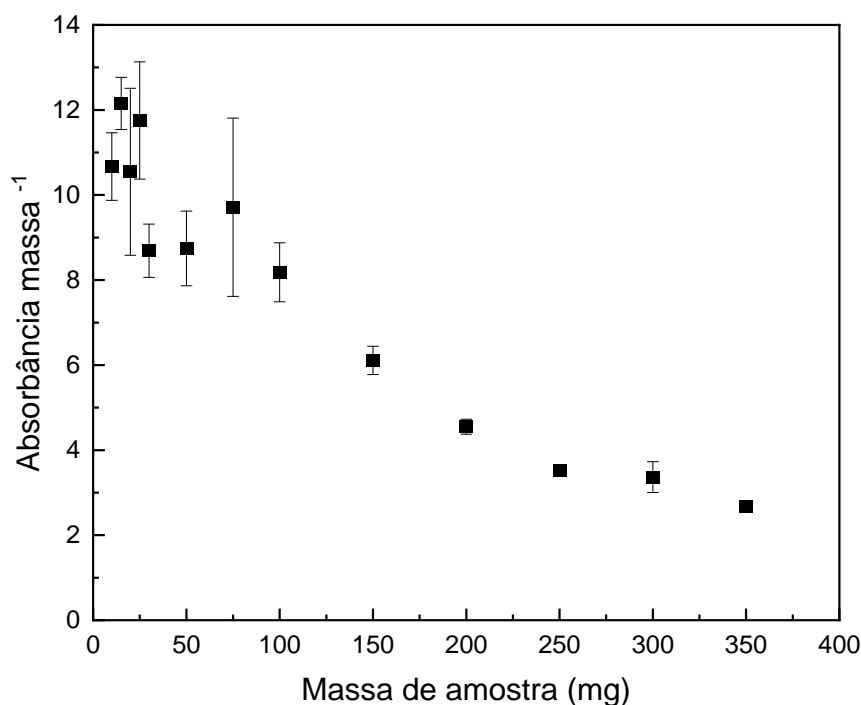


Figura 14. Efeito da massa de amostra sobre o sinal analítico do produto formado da reação com os compostos fenólicos totais extraídos.

Ao aumentar a massa de amostra, a quantidade de CFT aumentou gradativamente e houve diminuição na resposta analítica, conforme Figura 14. Aumento em cinco vezes na massa da amostra causou redução da resposta

analítica em aproximadamente 60%. Diante disso, avaliando a estequiometria da reação envolvida, conforme aumento da quantidade de amostra e, conseqüentemente da CFT, foi percebido que houve falta de reagente de Folin. Novo estudo foi realizado, avaliando concentrações maiores de Folin-Ciocalteu (5 a 40%, v/v), mantendo constante em 500 mg a quantidade de amostra – capacidade máxima da coluna de extração (Figura 15).

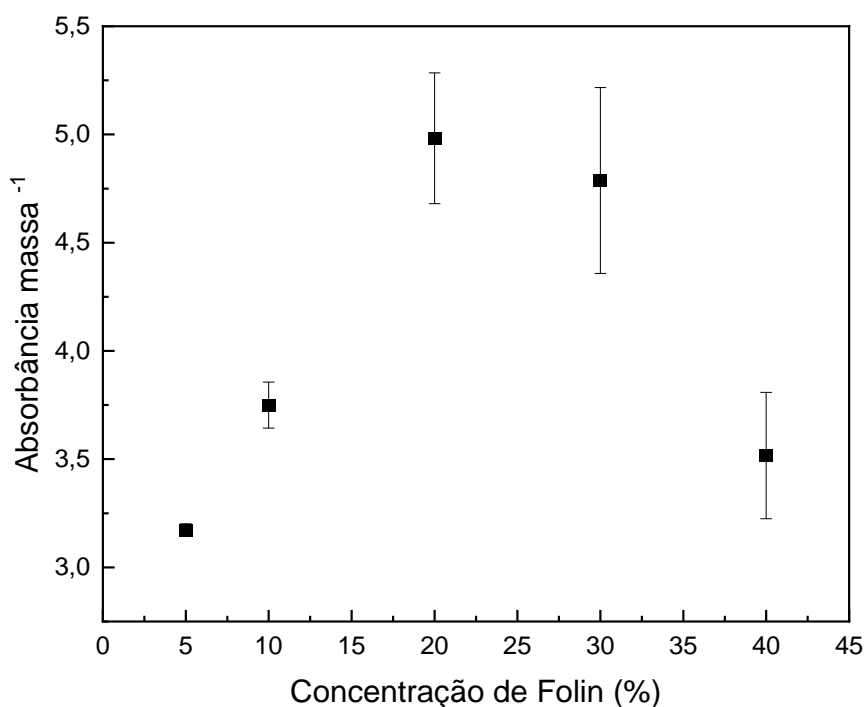


Figura 15. Efeito da concentração de Folin-Ciocalteu sobre a massa de amostra para extração dos compostos fenólicos totais.

Conforme observado na Figura 15, houve aumento linear na resposta analítica até 20% (v/v) de Folin-Ciocalteu. Acima desta concentração de reagente, foi percebido o aumento significativo na produção de bolhas no sistema, afetando diretamente o sinal analítico. Portanto, foi selecionada a concentração de 20% (v/v) de Folin-Ciocalteu para os estudos subsequentes. Assim, a quantidade de amostra sólida foi novamente avaliada entre 25 e 400 mg (Figura 16).

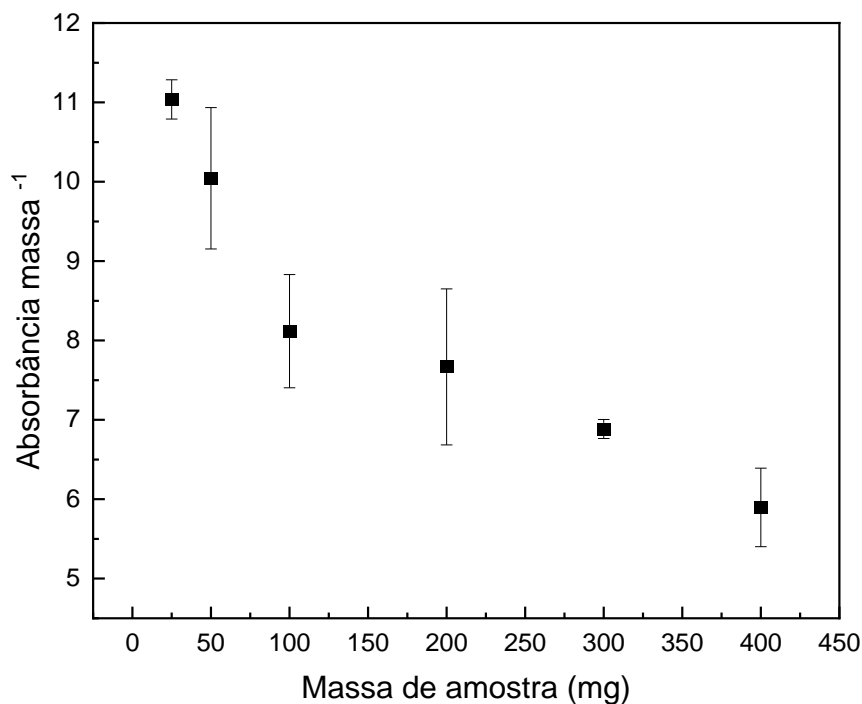


Figura 16. Efeito da massa de amostra sobre o sinal analítico do produto formado da reação com os compostos fenólicos totais extraídos com Folin-Ciocalteu 20% (v/v).

Na Figura 16 são apresentados os resultados obtidos com o aumento da concentração do reagente de Folin, diferentemente do esperado, a eficiência de extração ainda foi diminuindo gradativamente com o aumento da massa de amostra. Então, optou-se em manter constante em 50 mg de amostra sólida na coluna e avaliar o efeito da agitação na fluidização das partículas sólidas. Para tanto, foi empregado um agitador vibratório *home made*, conforme representado na Figura 2A.

Nas extrações realizadas sem agitação, os desvios padrão foram maiores devido aos caminhos preferenciais da solução de extração com a amostra sólida (Dias et al., 2018). Além disso, respostas maiores (25%) foram obtidas com o emprego da agitação constante.

Para avaliar a melhor eficiência de extração, a vazão da microbomba solenoide do solvente extrator (água) foi avaliada entre 0,1 a 4 mL min⁻¹ (Figura 17), mantendo constante a quantidade de amostra em 50 mg e agitação.

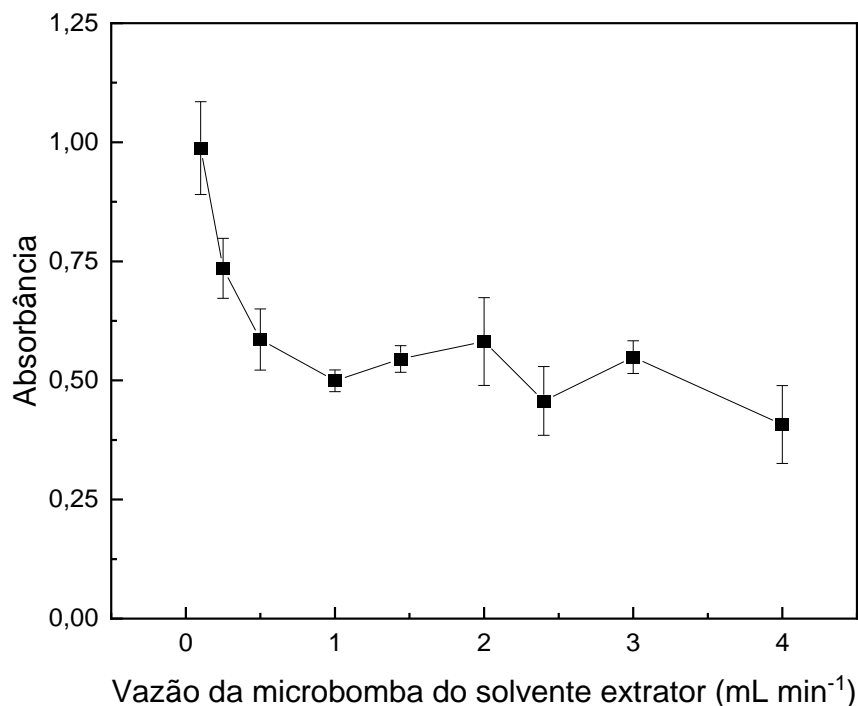


Figura 17. Extrações com diferentes vazões da microbomba do solvente extrator.

Empregando vazões entre 0,1 e 4,0 mL min⁻¹, a frequência analítica foi estimada entre 5,5 a 46,5 determinações h⁻¹. Conforme, observado na Figura 17, menores vazões melhoram a eficiência de extração, no entanto diminui aproximadamente em dez vezes a frequência analítica. A fim de selecionar a melhor vazão da microbomba com maior sinal analítico e menor tempo de análise, foi selecionada a vazão de 2 mL min⁻¹.

Visando melhorar a eficiência de extração, estudo do solvente extrator foi realizado empregando surfactante Triton X-114 e etanol. Os sinais transientes foram obtidos com o emprego da solução de Triton X-114 sem (Figura 18a) e com a presença da amostra sólida (Figura 18b).

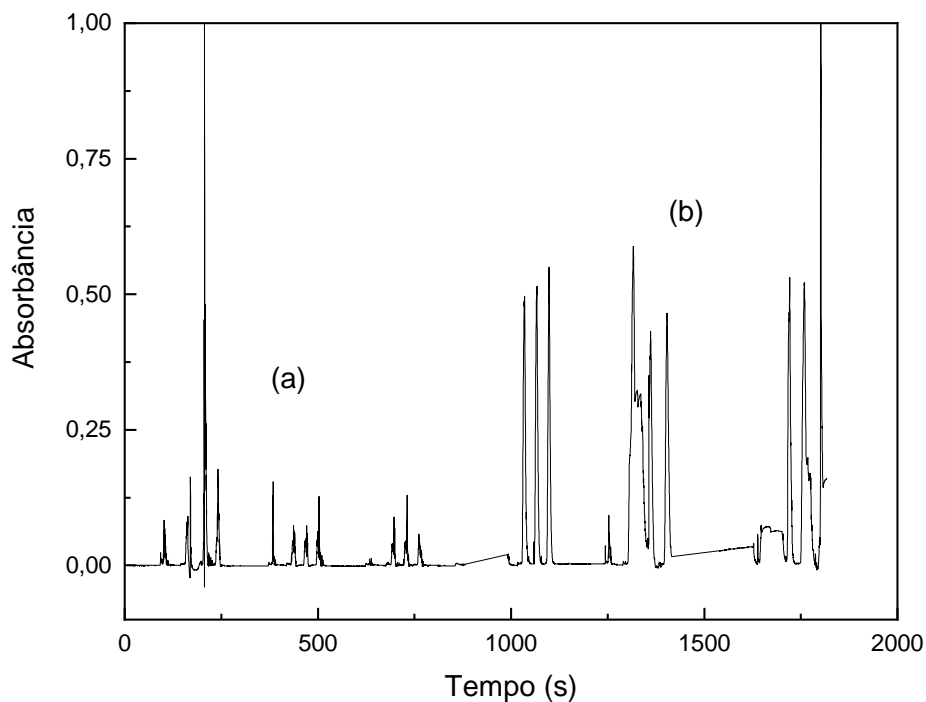


Figura 18. Sinais transientes obtidos da solução de Triton X-114 sem (a) e com (b) presença da amostra sólida.

Quando empregado o Triton X-114 (0,1%, v/v) sem e com a presença da amostra sólida na coluna de extração (Figura 18), foi observado perturbações nos sinais analíticos devido à formação de bolhas no sistema, inviabilizando o emprego do surfactante. No estudo com etanol 20% (v/v), mesmo efeito foi observado, aumento significativo de bolhas, dificultando a obtenção dos sinais transientes.

Solução de etanol 5% (v/v) foi empregada e os resultados foram comparados com a extração realizada em água (Figura 19).

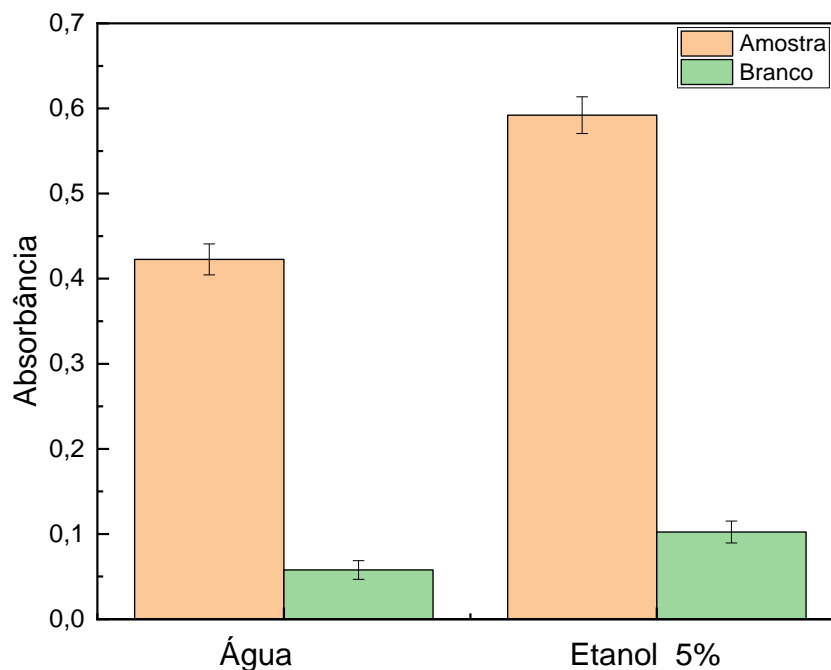


Figura 19. Extrações dos CFTs empregando água e etanol 5% (v/v) como solventes extratores.

Quando a solução de etanol 5% (v/v) foi empregada como solvente extrator não foram observadas perturbações nos sinais transientes. Em comparação com as extrações realizadas em água, houve aumento de 25% no sinal analítico, sem afetar significativamente o branco analítico. Conforme Bunzel e Schendel (2017) os solventes mais empregados para a extração de compostos fenólicos em alimentos são o metanol, etanol e acetona, ou a mistura deles com água, sendo o etanol o menos tóxico dos três solventes descritos. Portanto, o etanol 5% (v/v) foi selecionado como solvente extrator, atendendo os princípios da Química Verde.

3.3. Avaliação das características analíticas

A partir da otimização dos dois módulos, extração e quantificação, as características analíticas foram avaliadas novamente devido as alterações realizadas na concentração de Folin-Ciocalteu e nos ciclos de amostragem, que passou a ser 2 ciclos a fim de abranger todas as amostras com diferentes concentrações de compostos fenólicos totais.

Curva de calibração foi construída entre 1 e 20 mg L⁻¹ de ácido gálico em etanol 5% (v/v), descrita pela equação da reta: $A = 0,023 + 0,028 C$ (mg L⁻¹); $R^2 = 0,997$ (Figura 20). O limite de detecção e quantificação, coeficiente de variação e frequência analítica foram estimados em 188; 627 µg L⁻¹ a nível de confiança de 99,7%, conforme recomendações da IUPAC considerando o desvio padrão de 11 medidas do branco analítico; 0,11% (n=11) e 100 determinações h⁻¹, respectivamente. Para cada determinação foram consumidos 9,6 µL de Folin-Ciocalteu e 0,95 mg de carbonato de sódio, gerando apenas 3,4 mL de resíduo.

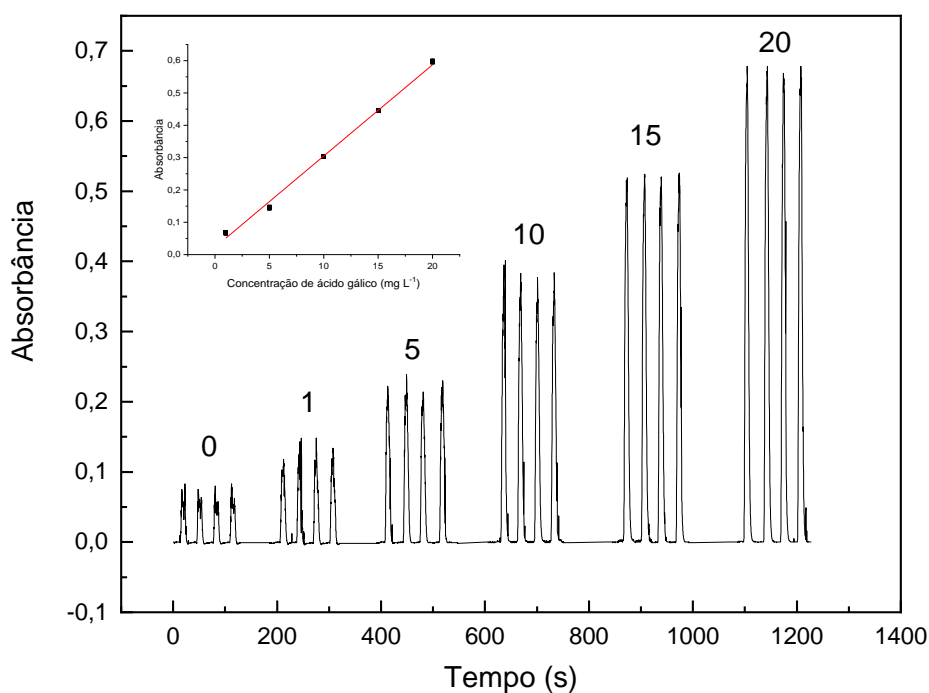


Figura 19. Sinais transientes para determinação de CFT empregando ácido gálico como analito. A figura inserida mostra a relação linear entre absorvância e concentração e os números indicam as concentrações de ácido gálico em mg L⁻¹.

3.4. Análises de amostras de alimentos sólidos

Curva de calibração a partir de amostras sólidas de diferentes alimentos (uva, resíduo de vinho, maçã, café verde especial e tradicional) foi construída em triplicata e em dias distintos entre 300 e 2500 mg de compostos fenólicos 100 g⁻¹ de amostra seca (Figura 21).

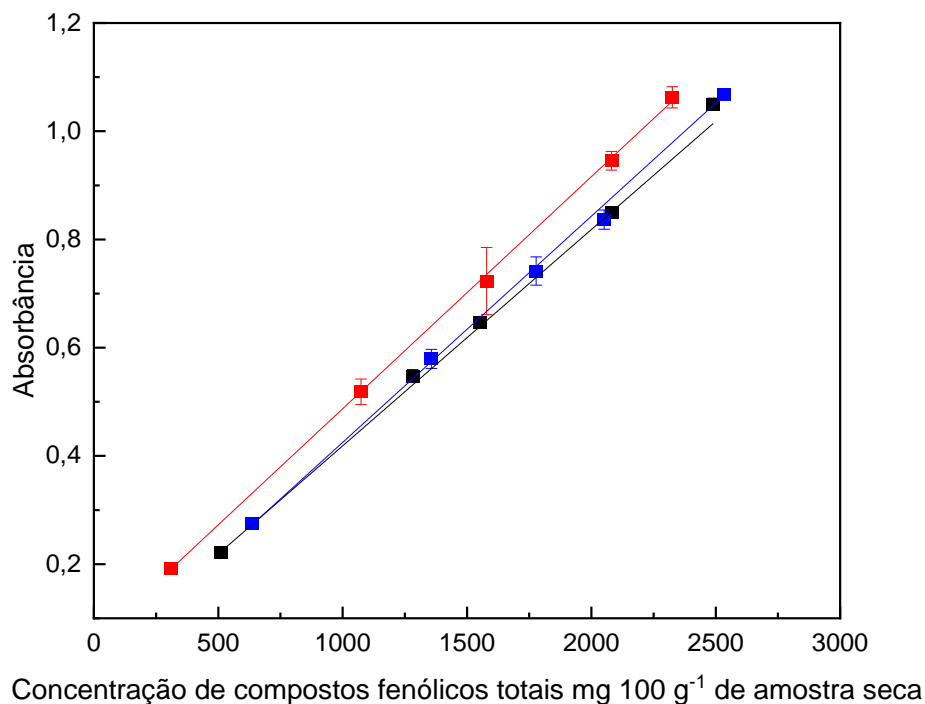


Figura 20. Curvas de calibração com amostras sólidas para a determinação de CFT com o sistema proposto.

As curvas de calibração foram obtidas em três dias distintos com as mesmas amostras sólidas, descritas pelas equações da reta, considerando a eficiência de extração de 20%: $A_1 = 0,058 + 0,0004 C$ (mg 100 g⁻¹) ($R^2 = 0,999$); $A_2 = 0,019 + 0,0004 C$ (mg 100 g⁻¹), ($R^2 = 0,997$) e $A_3 = 0,007 + 0,0004 C$ (mg 100 g⁻¹) ($R^2 = 0,999$). Onde A é a absorbância e C é a concentração de compostos fenólicos totais em mg 100 g⁻¹ de amostra seca.

Amostras de farinha de alimentos foram analisadas em triplicata pelo procedimento proposto e comparadas com o procedimento de referência, os resultados são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Determinação de compostos fenólicos totais em amostras sólidas de alimentos pelo procedimento proposto e de referência (n=3).

Amostra	Compostos fenólicos totais (mg 100 g ⁻¹)	
	Procedimento de referência	Procedimento proposto
1	1406,84 ± 27,48	1524,37 ± 315,92
2	2163,97 ± 70,39	1760,54 ± 122,14
3	1482,36 ± 59,74	1504,99 ± 134,51
4	1326,98 ± 89,60	1425,91 ± 218,83
5	1459,21 ± 50,88	1557,13 ± 119,46
6	2179,18 ± 104,72	1559,92 ± 145,25
7	1072,71 ± 138,65	848,45 ± 49,06
8	954,94 ± 3,21	976,98 ± 96,44
9	972,46 ± 46,21	1084,44 ± 82,80
10	987,13 ± 23,45	1089,15 ± 43,26
11	851,24 ± 18,41	1110,64 ± 54,06
12	906,51 ± 17,14	1231,37 ± 37,05

Conforme a Tabela 4, concentrações entre 850 e 1760 mg de compostos fenólicos por 100 g⁻¹ de amostra seca foram obtidas pelo analisador de fluxo proposto. Os resultados obtidos foram concordantes com aqueles obtidos pelo método de referência em batelada (SINGLETON; ORTHOFER; LAMUELA-RAVENTÓS, 1999), sendo aplicado teste t de Student, a nível de confiança de 95%, não havendo diferença significativa entre as concentrações obtidas.

Em geral, para diferentes aplicações, as características analíticas do procedimento proposto foram superiores aos outros procedimentos baseados em fluxo com extrações de amostras sólidas (Tabela 5).

Tabela 5. Características analíticas de alguns procedimentos de preparo de amostras sólidas online.

Amostra	Analito	Método de extração	Volume e solvente extrator	Massa de amostra (g)	Tempo de extração (min)	Referências
Arroz	Herbicidas de amida	CFMAE–O-DSME	10 mL de metanol 15% (v/v) + 3,0 mL de CCl ₄	1,0	11	(WU; LI, 2021)
Folhas secas de espinafre, laranja e tomate	Macro e micronutrientes	Ácida em fluxo-batelada	10 mL de HCl 8% (v/v)	0,05	4	(MARQUES; NÓBREGA, 2017)
Solo	Pesticidas	Cartucho	105 µL de ACN 82% + 126 µL H ₂ O	0,1	3	(MACIEL; LANÇAS, 2022)
Solo	Mercúrio	Sequencial em fluxo contínuo	40 mL de água deionizada, 0,01 mol L ⁻¹ HNO ₃ e 1 mol L ⁻¹ KOH	0,8	68	(ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018)
Cereais	Capacidade antioxidante	Dispositivo de lixiviação dinâmica em fluxo	10 mL de etanol:água (1:1)	0,04	15	(MAIA et al., 2017)
Torta de algodão	Gossipol	Leito fluidizado	150 µL de etanol 55%	0,025	2	(DAMINATO, KAMOGAWA E MELCHERT, 2017)
Farinha de alimentos	Compostos fenólicos totais	Leito fluidizado	3,75 mL de etanol 5% (v/v)	0,05	1,5	Este trabalho

CFMAE–O-DSME: microextração de gota única online acoplada à extração assistida por micro-ondas de fluxo contínuo; ACN: acetonitrila.

Na Tabela 5 são apresentados alguns procedimentos em fluxo com extrações online dos analitos. A fim de melhorar a eficiência de extração, Wu e Li (2021) desenvolveram a microextração de gota única online acoplada a extração assistida por micro-ondas de fluxo contínuo (CFMAE–O-DSME) que fornece continuamente solvente de extração, realizando a transferência em linha dos analitos, diminuindo o risco de contaminação e decomposição. Porém, a baixa especificidade, possibilidade de extrair componentes de estruturas e propriedades semelhantes aos do analito foram ressaltadas. A quantidade de amostra, o tempo de extração e o volume total de solvente extrator empregado no analisador em fluxo proposto foi 20, 7 e 3 vezes inferior em relação ao CFMAE–O-DSME (WU; LI, 2021). Quanto às etapas operacionais, diferentemente do trabalho mencionado, o procedimento proposto permitiu a extração e quantificação de modo online.

Um sistema fluxo-batelada foi empregado, a fim de diminuir as desvantagens da utilização de sistemas em fluxo para extração de macro e micronutrientes em tecidos foliares com extração ácida (MARQUES; NÓBREGA, 2017). O reator consistiu em um tubo tipo Falcon® de 50 mL com duas tampas perfuradas para inserir a solução de extração e para filtrar a suspensão e um tecido grosso de algodão preso em um tubo de 100 µL, utilizado como filtro. Os analitos foram extraídos de 50 mg de amostra sólida com 10 mL de HCl 8% (v/v) por 4 minutos sob agitação mecânica constante à temperatura ambiente. O sistema de extração pôde ser acoplado ao ICP OES para determinação de macro e micronutrientes em plantas secas de espinafre, laranja e tomate. Em comparação com o analisador proposto, o tempo de extração e o volume do solvente extrator utilizado foram 2 vezes superiores para a mesma quantidade de amostra sólida empregada.

No procedimento proposto por Maciel e Lanças (2022) foi empregado acetonitrila como solvente extrator que é menos ambientalmente amigável em comparação com etanol 5% (v/v), utilizado no analisador proposto. Além do tempo de extração ter sido 2 vezes superior ao procedimento proposto, o método utilizado para extração e detecção por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas (HPLC-MS/MS) é mais caro, reduzindo a acessibilidade nos laboratórios de rotina.

O procedimento de extração sequencial em fluxo contínuo para a determinação da mobilidade e labilidade de mercúrio em amostras sólidas ambientais, necessitou de maior quantidade de amostra, 4 vezes superior ao

procedimento proposto. O volume de solventes e o tempo de extração requeridos foram, respectivamente, 5 e 11 vezes superiores também (ZHANG; MIRÓ; KOLEV, 2018).

Um dispositivo de extração dinâmica com bombas de seringa foi empregado para extração e avaliação de compostos bioacessíveis em amostras de alimentos sólidos (MAIA et al., 2017). Solução etanólica foi empregada como solvente extrator como no analisador proposto. Porém, o volume do solvente extrator e o tempo de extração foi, respectivamente, 2 e 10 vezes superior.

Daminato, Kamogawa e Melchert (2017), propuseram sistema de análises por injeção em fluxo com leito fluidizado para extração e quantificação de gossipol em torta de algodão. Etanol 55% (v/v) foi utilizado como solvente extrator sendo necessário somente 25 mg de amostra sólida para extração e quantificação, demonstrando a viabilidade do leito fluidizado em análises em fluxo.

Outra vantagem do procedimento proposto é o consumo de reagentes significativamente menor quando comparado com os demais trabalhos da literatura (MACEDO et al., 2018; MARQUES; NÓBREGA, 2017; WU; LI, 2021). Em comparação com o sistema FIA sequencial (MARQUES; NÓBREGA, 2017), a redução foi de aproximadamente 82%.

4. CONCLUSÕES

O presente trabalho visou o desenvolvimento de um analisador em fluxo, a fim de realizar a extração e quantificação em linha de compostos fenólicos totais em amostras sólidas de alimentos. No módulo de quantificação, as características analíticas obtidas foram excelentes, no qual frequência analítica foi estimada em 120 determinações h^{-1} e limites de detecção e quantificação em 33 e 110 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, com coeficiente de variação de 0,41%. Foi alcançado também redução significativa de reagentes e, conseqüentemente, menor geração de resíduos.

Quando acoplado o módulo de extração, as características analíticas foram estimadas em limites de detecção e quantificação de 188 e 627 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente, coeficiente de variação de 0,11% e frequência analítica de 100 determinações h^{-1} . Houve considerável redução de reagentes utilizados para extração dos compostos fenólicos totais, com tempo de extração e volume de solvente extrator de 25 e 7 vezes inferiores ao comparado ao procedimento de extração em batelada.

O analisador em fluxo com microbombas solenoide acoplado ao leito fluidizado com coluna construída com materiais descartáveis de laboratório, além de permitir a minimização drástica do consumo de reagentes e, por conseqüência, a quantidade de efluentes gerados, possibilitou analisar 100 amostras por hora. Características típicas de sistemas com microbombas solenoide como portabilidade, baixo consumo de energia, melhoria das condições de mistura e reprodutibilidade no gerenciamento de microvolumes de soluções, também foram alcançadas. O procedimento proposto é alternativa viável para extração e quantificação de compostos fenólicos totais em diferentes matrizes sólidas.

REFERÊNCIAS

ALARA, O. R.; ABDURAHMAN, N. H.; UKAEGBU, C. I. Extraction of phenolic compounds: A review. **Current Research in Food Science**, v. 4, p. 200–214, 1 jan. 2021.

BEESTON, M. P. *et al.* Assessment of elemental mobility in soil using a fluidised bed approach with on-line ICP-MS analysis. **Analytica Chimica Acta**, v. 599, n. 2, p. 264–270, 19 set. 2007.

BEZERRA, M. A. *et al.* Automation of continuous flow analysis systems – a review. **Microchemical Journal**, v. 155, p. 104731, 1 jun. 2020.

CASTRO, M. D. L.; TENA, M. T. Solid interfaces as analytical problem solvers in flow injection analysis. **Talanta**, v. 40, n. 1, p. 21–36, 1 jan. 1993.

CELESTE, M. *et al.* Enhanced automatic flow-injection determination of the total polyphenol index in wines using Folin-Ciocalteu reagent. **Analytica Chimica Acta**, v. 269, n. 1, p. 21–28, 2 nov. 1992.

COSTA, R. Newly Introduced Sample Preparation Techniques: Towards Miniaturization. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**, v. 44, n. 4, p. 299–310, 2014.

DAMINATO, B.; KAMOGAWA, M. Y.; MELCHERT, W. R. An environmental friendly flow-injection procedure for on line extraction and spectrophotometric determination of gossypol in cottonseed meal. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 11, p. 2094–2099, 1 nov. 2017.

DIAS, T. R. *et al.* Fluidized particles in flow analysis: potentialities, limitations and applications. **Talanta**, v. 184, p. 325–331, 1 jul. 2018.

DONG, L. M.; YAN, X. P. On-line coupling of flow injection sequential extraction to hydride generation atomic fluorescence spectrometry for fractionation of arsenic in soils. **Talanta**, v. 65, n. 3, p. 627–631, 15 fev. 2005.

F. REIS, B.; MORALES-RUBIO, A.; LA GUARDIA, M. DE. Environmentally friendly analytical chemistry through automation: Comparative study of strategies for carbaryl determination with p-aminophenol. **Analytica Chimica Acta**, v. 392, n. 2–3, p. 265–272, 21 jun. 1999.

GALVIS-SÁNCHEZ, A. C.; SANTOS, J. R.; RANGEL, A. O. S. S. A total analytical system featuring a novel solid–liquid extraction chamber for solid sample flow analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 27, p. 7651–7661, 17 nov. 2016.

GONZÁLEZ-DE-PEREDO, A. V. *et al.* Development of optimized ultrasound-assisted extraction methods for the recovery of total phenolic compounds and anthocyanins from onion bulbs. **Antioxidants**, v. 10, n. 11, p. 1755, 1 nov. 2021.

HANSEN, M.; WOLD, A. **Contents of bioactive compounds in food plants as affected by traditional breeding and environmental factors.** Bioactive ed. [s.l: s.n.]. v. 88

KAUR, B.; PANESAR, P. S.; ANAL, A. K. Standardization of ultrasound assisted extraction for the recovery of phenolic compounds from mango peels. **Journal of Food Science and Technology**, v. 59, n. 7, p. 2813–2820, 1 jul. 2022.

LARA-ORTEGA, F. J. *et al.* Multicommuted flow injection method for fast photometric determination of phenolic compounds in commercial virgin olive oil samples. **Talanta**, v. 147, p. 531–536, 15 jan. 2016.

_____. Multicommuted Flow Injection Analysis Using Chemiluminescence Detection (MCFIA-CL) for Olive Oil Analysis. **Food Analytical Methods**, v. 11, n. 6, p. 1804–1814, 1 jun. 2018.

LARIOS, R.; FERNÁNDEZ-MARTÍNEZ, R.; RUCANDIO, I. Comparison of three sequential extraction procedures for fractionation of arsenic from highly polluted mining sediments. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 402, n. 9, p. 2909–2921, 19 mar. 2012.

LORDÊLO, B. *et al.* Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, p. 669–681, 2010.

LUQUE DE CASTRO, M. D.; GARCÍA-AYUSO, L. E. Soxhlet extraction of solid materials: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, v. 369, n. 1–2, p. 1–10, 10 ago. 1998.

MACEDO, C. C. V. *et al.* In-Line Incomplete Solid-Liquid Extraction for Spectrophotometric Determination of Soluble Inorganic Phosphorus in Plants and Foods. **Article J. Braz. Chem. Soc.**, v. 29, n. 11, p. 2334–2341, 2018.

MACHADO, J. M. C. *et al.* A multi-pumping flow system with pulsed fluidization to evaluate soil capacity for phosphate adsorption. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, n. 7, p. 1149–1157, 1 jul. 2017.

MACIEL, E. V. S.; LANÇAS, F. M. A cartridge-based device for automated analyses of solid matrices by online sample prep–capillary LC-MS/MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 414, n. 8, p. 2725–2737, 1 mar. 2022.

MAGALHÃES, L. M. *et al.* Automatic method for the determination of Folin-Ciocalteu reducing capacity in food products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5241–5246, 2006.

_____. Automatic flow system for sequential determination of ABTS+ scavenging capacity and Folin-Ciocalteu index: A comparative study in food products. **Analytica Chimica Acta**, v. 592, n. 2, p. 193–201, 5 jun. 2007.

MAIA, M. A. *et al.* Dynamic flow-through approach to evaluate readily bioaccessible antioxidants in solid food samples. **Talanta**, v. 166, p. 162–168, 1 maio 2017.

MARQUES, T. L.; NÓBREGA, J. A. Fast and simple flow-batch extraction procedure for screening of macro and micronutrients in dried plant leaves by ICP OES. **Microchemical Journal**, v. 134, p. 27–34, 1 set. 2017.

MARTINS, U. E. C. **Determinação da composição de fonólicos e atividade antioxidante de espécies de plantas utilizadas na medicina popular brasileira**. Pato Branco: UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ, 2016.

MELCHERT, W. R.; REIS, B. F.; ROCHA, F. R. P. Green chemistry and the evolution of flow analysis. A review. **Analytica Chimica Acta**, v. 714, p. 8–19, 10 fev. 2012.

MIRÓ, M. *et al.* Dynamic flow-through approaches for metal fractionation in environmentally relevant solid samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n. 8, p. 759–771, 1 set. 2005.

OSORIO-TOBÓN, J. F. Recent advances and comparisons of conventional and alternative extraction techniques of phenolic compounds. **Journal of Food Science and Technology**, v. 57, n. 12, p. 4299–4315, 1 dez. 2020.

PALMA, M.; PIÑEIRO, Z.; BARROSO, C. G. In-line pressurized-fluid extraction–solid-phase extraction for determining phenolic compounds in grapes. **Journal of Chromatography A**, v. 968, n. 1–2, p. 1–6, 30 ago. 2002.

PERIS, M.; MÜLLER, D.; MAQUIEIRA, A. Determination of total polyphenols in beers by flow injection analysis. **Food Chemistry**, v. 40, n. 1, p. 1–8, 1 jan. 1991.

PIÑEIRO, Z. *et al.* Microwave-assisted extraction of non-coloured phenolic compounds from grape cultivars. **European Food Research and Technology**, v. 248, n. 7, p. 1883–1901, 1 jul. 2022.

PULGARÍN, J. A. M.; BERMEJO, L. F. G.; DURÁN, A. C. Use of the Attenuation of Luminol-Perborate Chemiluminescence with Flow Injection Analysis for the Total Antioxidant Activity in Tea Infusions, Wines, and Grape Seeds. **Food Analytical Methods**, v. 5, n. 3, p. 366–372, jun. 2012.

REIS, B. F. *et al.* Multicommutation in flow analysis. Part 1. Binary sampling: concepts, instrumentation and spectrophotometric determination of iron in plant digests. **Analytica Chimica Acta**, v. 293, n. 1–2, p. 129–138, 20 jul. 1994.

REIS, B. F.; GINÉ, M. F.; KRONKA, E. A. M. Análise por injeção de fluxo. **Química Nova**, v. 12, n. 1, p. 82-91, 1989.

ROCHA, F. R. P. *et al.* Multicommutation in flow analysis: Concepts, applications and trends. **Analytica Chimica Acta**, v. 468, n. 1, p. 119–131, 10 set. 2002.

ROSENDE, M.; MIRÓ, M.; CERDÀ, V. Fluidized-bed column method for automatic dynamic extraction and determination of trace element bioaccessibility in highly heterogeneous solid wastes. **Analytica Chimica Acta**, v. 658, n. 1, p. 41–48, 18 jan. 2010.

ŠATÍNSKÝ, D.; KARLÍČEK, R.; SVOBODA, A. Using on-line solid phase extraction for flow-injection spectrophotometric determination of salbutamol. **Analytica Chimica Acta**, v. 455, n. 1, p. 103–109, 18 mar. 2002.

SHASHIREKHA, M. N.; MALLIKARJUNA, S. E.; RAJARATHNAM, S. Status of Bioactive Compounds in Foods, with Focus on Fruits and Vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 10, p. 1324–1339, 24 ago. 2015.

SHISHOV, A. *et al.* Interfacial reaction using particle-immobilized reagents in a fluidized reactor. Determination of glycerol in biodiesel. **Analytica Chimica Acta**, v. 914, p. 75–80, 31 mar. 2016.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p. 152–178, 1999.

SUTIVISEDSEK, N. *et al.* Microwave-assisted extraction of phenolics from bean (*Phaseolus vulgaris* L.). **Food Research International**, v. 43, n. 2, p. 516–519, 1 mar. 2010.

TANASE, C.; BUJOR, O.-C.; POPA, V. I. Phenolic Natural Compounds and Their Influence on Physiological Processes in Plants. *In: Polyphenols in Plants*. [s.l.] Academic Press, 2019. p. 45–58.

TIMOFEEVA, I. I. *et al.* A gas-diffusion flow injection method coupled with online solid–liquid extraction for the determination of ammonium in solid samples. **Talanta**, v. 142, p. 140–144, 1 set. 2015.

TRIPODO, G. *et al.* Optimization of pressurized liquid extraction by response surface methodology of Goji berry (*Lycium barbarum* L.) phenolic bioactive compounds. **ELECTROPHORESIS**, v. 39, n. 13, p. 1673–1682, 1 jul. 2018.

VAKH, C. *et al.* An automated magnetic dispersive micro-solid phase extraction in a fluidized reactor for the determination of fluoroquinolones in baby food samples. **Analytica Chimica Acta**, v. 1001, p. 59–69, 25 fev. 2018.

WU, L.; LI, Z. Continuous-flow microwave-assisted extraction coupled with online single drop microextraction prior to GC-MS for determination of amide herbicides in rice samples. **Journal of Separation Science**, v. 44, n. 4, p. 870–878, 1 fev. 2021.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 4083–4089, 2001.

ZHANG, Y.; MIRÓ, M.; KOLEV, S. D. A novel hybrid flow platform for on-line simultaneous dynamic fractionation and evaluation of mercury lability in environmental solids. **Talanta**, v. 178, p. 622–628, 1 fev. 2018.