



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA - *CAMPUS I*
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

CAROLINE CAMILA SANTOS SALES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-
CONCENTRAÇÃO USANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-
VIS EM AMOSTRAS DE CHÁ VERDE**

SALVADOR - BA

2023

CAROLINE CAMILA SANTOS SALES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-
CONCENTRAÇÃO USANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA
DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-
VIS EM AMOSTRAS DE CHÁ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia como requisito para a obtenção do título de mestre em química.

Área de concentração: Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos

**SALVADOR - BA
2023**

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura** - UNEB – Campus I
Bibliotecária: Célia Maria da Costa – CRB5/918

S163d Sales, Caroline Camila Santos

Desenvolvimento de um sistema de extração e pré-concentração usando nanopartículas magnéticas para determinação de fenólicos totais por espectrofotometria uv-vis em amostras de chá verde / Caroline Camila Santos Sales. – Salvador, 2023.

59 f. : il.

Orientador: Dr. Walter Nei Lopes dos Santos.

Dissertação (Mestrado Acadêmico). Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada – PGQA. Campus I. 2023.

Contém referências.

1. Chá verde – Teor de fenol. 2. Nanopartículas de ferro magnético. 3. Chá verde – Compostos fenólicos. 4. Espectrofotometria. I. Santos, Walter Nei Lopes dos. II. Santos, Walter Nei Lopes dos. III. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

CDD: 615.321

CAROLINE CAMILA SANTOS SALES

**DESENVOLVIMENTO DE UM SISTEMA DE EXTRAÇÃO E PRÉ-CONCENTRAÇÃO
USANDO NANOPARTÍCULAS MAGNÉTICAS PARA DETERMINAÇÃO DE
FENÓLICOS TOTAIS POR ESPECTROFOTOMETRIA UV-VIS EM AMOSTRAS DE
CHÁ VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação e Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica.

Aprovada em: ____/____/____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
(Orientador)

Prof. Dra. Débora de Andrade Santana
Universidade do Estado da Bahia (UNEB)
(Avaliador)

Prof. Dra. Elane Santos da Boa Morte
Instituto Federal de Ciência e Tecnologia da Bahia (IFBA)
(Avaliador)

*Dedico este trabalho aos meus pais, Sônia e Jorge,
pelo amor, proteção e por ser a razão maior para a
realização desse sonho.*

*E à minha irmã Lorena e ao meu afilhado Gael pelo
afeto, companherismo e alegria.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por se fazer presente na minha vida! Obrigada Deus por me guiar, iluminar, abençoar, proteger e por ser a base e combustível desta conquista!

Agradeço às minhas avós Sebastiana e Adalgisa pelas orações, pela confiança depositada em mim e pelas palavras de incentivo!

Agradeço aos meus pais, Sônia e Jorge, pelo amor incondicional, pelo apoio, pelos ensinamentos e por serem a minha maior torcida!

Agradeço aos meus irmãos Lorena, Maria Luísa, Jorge e meu afilhado Gael por serem meus fiéis companheiros nesta jornada!

Agradeço à minha digníssima família por todo o apoio, acolhimento, união, pela torcida e pelos abraços calorosos que me fortaleceram nesta jornada! Em especial, às minhas tias Sonilda, Ana e Andréa, aos meus tios Batista e Samuel, aos meus dindos Sonita e Rogério e aos meus primos Rafael, Thiara, Vitor, Glíscia, Matheus e Ana Beatriz pelo constante incentivo e gestos de carinho!

Agradeço aos meus amigos pela amizade, carinho, cumplicidade, pelas palavras de encorajamento e que mesmo com a distância permanecem presentes em meu coração!

Agradeço aos meus inesquecíveis professores que foram mais do que mestres, foram os verdadeiros guias desta jornada!

Agradeço ao meu grupo de juntas até o fim, Jéssica, Fabrina e Mylena por serem minha força e companheirismo!

Agradeço especial aos meus amigos, Geovani, João e Luciano pelos ensinamentos e acolhimento durante estes dois anos!

Agradeço aos meus amigos do Grupo de Pesquisa, Jéssica, Rafa, Lucas, Ravena, Isaac e Jota pela alegria e companheirismo!

Agradeço à Sérgio, Paulo, Mauricio, Mônica, Hebert, Dimas e Dona Antônia por tornarem a caminhada mais leve e divertida!

Agradeço à meu orientador Prof. Dr. Walter Nei Lopes dos Santos pela paciência, pela atenção fornecida, pelo incentivo e por me guiar a construir este trabalho científico!

Agradeço ao Programa de Pós-graduação em Química Aplicada, a PROGPEAQ e aos funcionários que contribuíram também para a realização desse trabalho.

A todos, meu eterno agradecimento!

"Um cientista no seu laboratório não é apenas um técnico: é, também, uma criança colocada à frente de fenômenos naturais que impressionam como se fossem um conto de fadas"(Marie Curie).

RESUMO

O estudo visa desenvolver um sistema de extração e pré-concentração em fase sólida para a determinação de compostos fenólicos totais em amostras de chá verde. A abordagem adotada utiliza nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro revestidas com sílica ($\text{COFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$), sintetizadas por coprecipitação e caracterizadas por técnicas avançadas, como Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV), Difração de Raios X (DRX) e Espectrômetro de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR). A metodologia empregada inclui o uso da espectrofotometria UV-VIS para aprimorar a detecção dos compostos fenólicos. A síntese e caracterização das nanopartículas são complementadas pela aplicação de métodos estatísticos, como o planejamento fatorial completo de dois níveis e a matriz Box-Behnken, na otimização do processo. As condições otimizadas do sistema foram estabelecidas após rigorosa análise, resultando em um pH de 3,9, uma vazão de $1,19 \text{ mL min}^{-1}$ e um volume do eluente de $1,46 \text{ mL}$ de etanol a $99,5\% (\text{m v}^{-1})$, utilizando uma massa adsorvente de 214 mg . Essas condições demonstraram viabilidade, facilidade de execução e baixo custo na determinação de fenólicos totais em amostras de chá verde. A precisão do método proposto é destacada pela baixa variação, calculada como desvio padrão relativo (RSD) de $1,01\%$ para amostras de chá verde. A recuperação, variando entre $95,61\%$ e $113,91\%$. Além disso, os limites de detecção e quantificação foram estabelecidos em $29,23$ e $43,82 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$, respectivamente.

Palavras-Chave: Nanopartículas magnéticas. Extração em fase sólida. Fenólicos totais. Espectrofotometria UV-VIS. Otimização multivariada.

ABSTRACT

The study aims to develop a solid-phase extraction and pre-concentration system for the determination of total phenolic compounds in green tea samples. The adopted approach involves the use of magnetic nanoparticles of iron oxides coated with silica (COFe₂O₄@SiO₂), synthesized through coprecipitation and characterized using advanced techniques such as Scanning Electron Microscopy (SEM), X-ray Diffraction (XRD), and Fourier Transform Infrared Spectrometer (FTIR). The methodology incorporates UV-VIS spectrophotometry to enhance the detection of phenolic compounds. The synthesis and characterization of nanoparticles are supplemented by the application of statistical methods, including full two-level factorial design and Box-Behnken matrix, in the process optimization. The optimized conditions of the system were established after a rigorous analysis, resulting in a pH of 3.9, a flow rate of 1.19 mL min⁻¹, and an eluent volume of 1.46 mL of 99.5% ethanol (m v⁻¹), using an adsorbent mass of 214 mg. These conditions demonstrated feasibility, ease of execution, and low cost in determining total phenolics in green tea samples. The precision of the proposed method is highlighted by a low variation, calculated as a relative standard deviation (RSD) of 1.01% for green tea samples. The recovery, ranging between 95.61% and 113.91%, emphasizes the effectiveness of the method. Additionally, the detection and quantification limits were established at 29.23 and 43.82 mg 100g⁻¹, respectively.

Keywords: Magnetic nanoparticles. Solid phase extraction. Total phenolics. UV-VIS spectrophotometry. Multivariate optimization.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Folhas e flores da <i>Camellia sinensis</i>	16
Figura 2. Estrutura química do ácido gálico.....	17
Figura 3. Estrutura química das metilxantinas.....	19
Figura 4. Estrutura química de compostos fenólicos.....	19
Figura 5. Esqueleto de um difenilpirano.....	20
Figura 6. Estrutura química dos principais flavonoides.....	20
Figura 7. Estrutura química dos principais ácidos benzóicos.....	21
Figura 8. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.....	21
Figura 9. Reação de substâncias redutoras com reagente Folin-Ciocalteu.....	23
Figura 10. Estrutura da magnetita spinélio invertido.....	25
Figura 11. Ilustração das nanopartículas com e sem revestimento.....	26
Figura 12. Sistema da síntese das nanopartículas: (A) processo de coprecipitação e (B) processo de aquecimento pós-coprecipitação.....	34
Figura 13. Especificações da mini-coluna.....	36
Figura 14. Diagrama esquemático do sistema de pré-concentração em fluxo utilizado para pré-concentração e determinação de fenólicos totais em amostras de chá verde.....	37
Figura 15. Gráficos do FTIR: (a) Espectro FTIR da sílica cromatográfica, (b) Espectro FTIR da NPs revestida com sílica cromatográfica e (c) Espectro FTIR da NPs.....	39
Figura 16. Difrátogramas de Raios-X das nanopartículas: (a) óxido das nanopartículas de CoFe_2O_4 , (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@\text{SiO}_2$ e (c) SiO_2	40
Figura 17. Imagens em MEV: (a) óxido das nanopartículas de CoFe_2O_4 e (b) Revestimento de CoFe_2O_4 com sílica.....	41
Figura 18. Gráfico de pareto para o planejamento fatorial.....	44
Figura 19. Superfícies de resposta para o planejamento Box Behnken.....	46
Figura 20. Curva de calibração de uma solução de $1,43 \text{ mg L}^{-1}$ de chá verde pré-concentrado.....	47
Figura 21. Curva de calibração preparada por uma solução de $1,43 \text{ mg L}^{-1}$ de chá verde sem pré-concentração.....	47
Figura 22. Curva de calibração do padrão de ácido gálico.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação das amostras de chá verde (<i>Camellia sinensis</i>) em sachê analisadas.....	35
Tabela 2. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2^3	38
Tabela 3. Níveis das variáveis do planejamento Box Behnken.....	38
Tabela 4. Resultado do estudo acerca da eficiência de diferentes massas adsorventes e solventes extratores no sistema em fluxo para extração e pré-concentração de chá verde.....	42
Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis e as respectivas respostas.....	43
Tabela 6. Matriz do planejamento Box Behnken com valores codificados e, reais e as respectivas respostas.....	44
Tabela 7. Resultados obtidos do teste de recuperação com adição de ácido gálico à amostra com concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pela metodologia de Espectrofotometria.....	49
Tabela 8. Resultados obtidos de fenólicos totais em amostras de chá verde, para $n=3$ com nível de confiança de (95%).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABS	Absorvância
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AOAC	Association of Official Analytical Chemists
CG	Cromatografia gasosa
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
DRX	Difração de raios X
EC	Eficiência de concentração
FE	Fator de enriquecimento
IC	Índice de consumo
ICSD	Inorganic Crystal Structure Database
IUPAC	União de Química Pura e Aplicada
LD	Limite de detecção
LLE	Liquid Liquid Extraction
LL	Limite de linearidade
LQ	Limite de quantificação
MET	Microscópio Eletrônico de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
NPMs	Nanopartículas magnéticas
NPs	Nanopartículas
P	Fator de transferência de fase
RSD	Desvio padrão relativo
SPE	Solid Phase Extraction

TPC	Teor de fenólicos totais
VA	Vazão de amostragem
VE	Volume de eluente
VIS	Visível
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos gerais sobre o chá verde	16
2.2 Compostos bioativos.....	19
2.3 Extração em fase sólida (SPE).....	23
2.4 Breve resumo sobre nanopartículas magnéticas	24
2.5 Técnicas de caracterização de nanopartículas.....	27
2.5.1 Difração de Raios X (DRX).....	27
2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	27
2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	27
2.6 A espectrofotometria UV-VIS	28
2.7 Quimiometria	29
2.7.1 Planejamento de experimentos.....	29
2.7.2 Planejamento fatorial completo de três fatores (2^3)	29
2.7.3 Modelo Box-Behnken	30
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos específicos	30
4. PARTE EXPERIMENTAL	31
4.1 Amostra e reagentes	31
4.2 Preparo das soluções	31
4.3 Determinação de fenólicos totais	32
4.4 Instrumentação	33
4.5 Síntese das nanopartículas de cobalto (CoFe_2O_4).....	34
4.6 Revestimento das nanopartículas	35
4.7 Coleta e preparo das amostras.....	35
4.8 Especificações técnicas da minicoluna e da bomba	36
4.9 Sistema de extração e pré-concentração em fluxo	37
5.0 Estudo preliminar- massa adsorvente e do solvente extrator para a extração e pré-concentração em sistema em fluxo	37
5.1 Otimização do processo de extração e pré-concentração	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES	39
6.1 Caracterização do adsorvente	39
6.1.1 Análise de infravermelho (FTIR).....	39
6.1.2 Análise de difração de raio X (DRX).....	39

6.1.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	41
6.2 Estudo preliminar da massa adsorvente e do solvente extrator	41
6.2 Otimização da extração e pré concentração de fenólico total.....	42
6.3 Parâmetros analíticos do método de espectrofotométrica.....	46
6.3.1 Linearidade.....	46
6.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ).....	48
6.3.3 Precisão	48
6.3.4 Exatidão.....	49
6.3.5 Fator de enriquecimento (FE)	50
6.3.6 Eficiência de concentração (EC).....	50
6.3.7 Índice de consumo (IC).....	51
6.3.8 Fator de transferência de fase (P).....	51
6.3.9 Aplicação.....	51
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	52
REFERÊNCIAS	53

1. INTRODUÇÃO

O consumo de chá verde (*Camellia sinensis*), no mundo, vem aumentando progressivamente, devido a sua representatividade, na dieta alimentar, por ser fonte de proteína ricas em vitaminas, aminoácidos, minerais e gerar compostos bioativos, como antioxidantes. Fatores, os quais fazem com que o chá seja denominado como um elemento saudável (FAO, 2018; HALLIWEL, 2008; WANG et al., 2010).

A ingestão de bebidas, como o chá verde, apresentam substâncias bioativas, que favorecem na prevenção de certas doenças crônicas, como câncer, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, devido à atividade antioxidante, que estas substâncias englobam (FUJIKI, OKUDA, & HARA, 1992; LIN et al., 2014).

Os antioxidantes são uma das propriedades mais importante encontrada no chá, devido ao seu papel fundamental na neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres no organismo humano (AZEVEDO et al., 2019; PODSEDEK, 2007).

Os antioxidantes são divididos em diversas classes, dentre elas, têm-se os compostos fenólicos, que são substâncias que apresentam um anel aromático, contendo um ou mais substituintes hidroxílicos, abrangendo também seus grupos funcionais, são comuns no reino vegetal. Essas substâncias estão amplamente distribuídas, englobando, desde moléculas simples até aquelas com elevado grau de polimerização (SOARES et al., 2008).

Em contrapartida, esses compostos bioativos podem estar presentes em níveis de concentrações traços, que dificultam sua quantificação, além de possíveis interferências matriciais, que podem ocorrer durante a análise, devido à complexidade das amostras de alimentos (HUA et al., 2018).

Desta forma, uma etapa de pré-tratamento se faz necessária, antes da análise instrumental, utilizando métodos de separação e pré-concentração, como a extração, em fase sólida (SPE), para que, assim, obtenha uma redução nos problemas relacionados à precisão e sensibilidade (CAMEL, 2003; HUA et al., 2018).

A pré-concentração, em fluxo, geralmente, consiste, por uma fase sólida, que é disposta em uma micro-coluna, através da qual a amostra é impulsionada por uma bomba. Durante sua passagem, pela fase sólida, o elemento de interesse é retido, e, conseqüentemente, pré-concentrado (REMA; MEDINA, 2003).

E, aliadas às etapas de separação e pré-concentração, emprega à espectrofotometria UV-VIS para determinação quantitativa destes compostos. A espectrofotometria UV-VIS é uma técnica analítica amplamente utilizada e reconhecida por sua eficiência na

determinação quantitativa de compostos orgânicos e inorgânicos, com base na absorção de luz nas regiões ultravioleta (UV) e visível (VIS) do espectro eletromagnético (BRASÍLIO et al., 2012; SKOOG et al., 2010). Esta técnica, fornece informações valiosas sobre a concentração de substâncias presentes em uma amostra, sendo aplicada em diversos campos científicos e industriais. E, oferece vantagens notáveis, incluindo simplicidade, custo, rapidez e sensibilidade (SAWYER et al., 1995).

Desta forma, o presente trabalho apresenta o desenvolvimento de um método baseado na separação e pré-concentração em fluxo, empregando uma mini-coluna recheada com nanopartículas de CoFe_2O_4 revestidas de sílica para determinação de compostos bioativos, em amostras de chá verde comercializadas, em Salvador-BA, por espectrofotometria UV-VIS.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos gerais sobre o chá verde

O chá verde é uma bebida milenar originária da China, obtida a partir das folhas da planta *Camellia sinensis*. A planta é caracterizada como arbustiva de pequeno porte, com folhas simples, alternadas, inteiras, apresentando margens serrilhadas e uma textura coriácea. As flores (**Figura 1**) são de tamanho reduzido, de coloração branca, tipicamente com quatro a cinco pétalas e o fruto é uma cápsula com diâmetro de dois a três centímetros (BLANCO, 2020; DUARTE, MENARIM, 2006; LORENZI & MATOS, 2002).

Figura 1. Folhas e flores da *Camellia sinensis*.

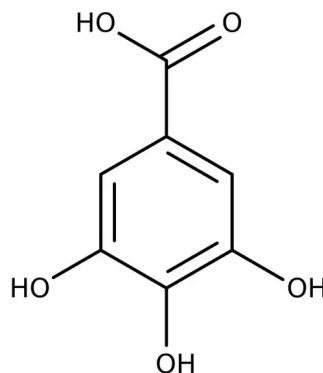


Fonte: <<https://www.abq.org.br/cbq/2013/trabalhos/7/3393-13380.html>>. Acesso em: 14 de dez. 2023.

O chá verde tem sido amplamente consumido em todo o mundo seja por bebida quente ou suplemento. Diferencia-se dos demais tipos de chá, como o chá preto, devido à mínima oxidação das folhas durante seu processamento (GRAHAM, 1992). A sua popularidade crescente está associada a uma série de benefícios para a saúde devido à sua rica composição química, que inclui catequinas, polifenóis, flavonoides e cafeína (HIGDON, 2003).

Dentro de sua rica composição de componentes bioativos, o ácido gálico (ácido 3,4,5-triidroxi-benzóico, conforme a **Figura 2**) merece um destaque especial, dada a sua abundância e importância. O ácido gálico é um composto fenólico, pertencente à categoria dos polifenóis, que são cadeias aromáticas com grupos hidroxilados e carboxila. O ácido gálico é um composto fenólico tri-hidroxilado e pode ser obtido através de taninos hidrolisáveis extraído de plantas e é encontrado em quantidades substanciais no chá verde (ARTS; HOLLMAN, 2005; FECHTAL, 1984; METCHE, 1980). Sua presença em grande quantidade tem implicações significativas nos benefícios para a saúde associados ao consumo dessa bebida ancestral.

Figura 2. Estrutura química do ácido gálico.



Fonte: <<https://www.fishersci.com/us/en/browse/80013719/gallic-acid>>. Acesso em 14 de dez. 2023.

As propriedades antioxidantes do chá verde são notáveis e têm sido objeto de pesquisas extensivas. Os antioxidantes presentes no chá verde, como o ácido gálico, desempenha um papel vital na proteção das células contra os danos provocados pelos radicais livres, contribuindo assim para a prevenção de doenças crônicas, como câncer e problemas cardiovasculares (SAKIHAMA; COHEN; GRACE; YAMASAKI, 2002). Esse efeito antioxidante é de suma importância para a promoção da saúde e bem-estar.

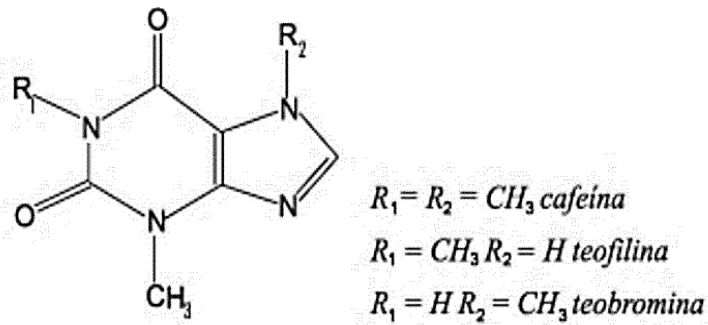
Além disso, estudos científicos têm demonstrado que o ácido gálico possui propriedade anti-inflamatória e potencial neuroprotetor (KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS; NOWAK, 2015; LIN et al., 2014). Essas propriedades podem contribuir para a melhoria das funções cognitivas e proteção contra doenças neurodegenerativas, como o Alzheimer. Enquanto que as catequinas, têm a capacidade de neutralizar os radicais livres através do mecanismo de transferência de elétrons, prevenindo danos celulares e protegendo contra doenças crônicas, como câncer e doenças cardiovasculares (FUJIKI; OKUDA; HARA, 1992; PORTO, 2002).

Outro aspecto notável é a influência do chá verde na perda de peso. A cafeína, presente no chá verde em proporções menores em comparação com o café, tem a capacidade de estimular o metabolismo e promover a queima de gorduras, tornando-o um aliado valioso para indivíduos que buscam perder peso (HURSEL; VIECHTBAUER; WESTERTERP-PLANTENGA, 2009).

Para além das vantagens relacionadas com a sua ação antioxidante, o chá verde também tem evidenciado impactos positivos na saúde cardiovascular. Um estudo conduzido por Chyu et al. (2004) constatou que o consumo frequente de chá verde pode contribuir para a redução do colesterol LDL (conhecido como "mau" colesterol) e para a melhoria da função endotelial, dois fatores que desempenham um papel crucial na prevenção de problemas cardíacos.

Portanto, o chá verde é uma bebida rica em antioxidantes e compostos bioativos que têm sido associados a vários benefícios à saúde. No entanto, é fundamental consumi-lo com moderação, pois contém metilxantinas, como cafeína, teofilina e teobromina, que apresentam em sua estrutura um esqueleto de purina, com diferenciação entre o tipo e posição dos radicais na molécula (MARIA; MOREIRA, 2007) (**Figura 3**). Estes são responsáveis por efeitos adversos e interações medicamentosas. E por atuarem como estimulantes do Sistema Nervoso Central, podem provocar efeitos colaterais, como insônia e nervosismo (SMITH, 2002; VALENZUELA, 2004).

Figura 3. Estrutura química das metilxantinas.



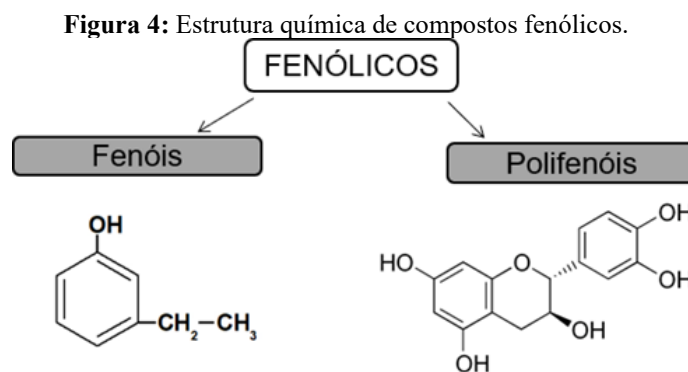
Fonte: (MARIA; MOREIRA, 2007).

As pessoas que são sensíveis às metilxantinas ou com condições médicas específicas devem buscar orientação médica antes de incorporar o chá verde em sua dieta regular, pois, o método de preparo e a dosagem podem afetar à saúde do indivíduo (KHOKHAR; MAGNUSDOTTIR; SAMUELSEN, 2002).

2.2 Compostos bioativos

Uma alimentação rica em frutas, legumes e vegetais pode ajudar o organismo humano na superação das deficiências provocadas pelos radicais livres, bem como ajuda na redução no processo oxidativo. No corpo humano, os efeitos antioxidantes de compostos fenólicos são atribuídos ao poder redutor dos grupos hidroxilas aromáticos, que reduz os radicais livres reativos e é capaz de quelar metais de transição (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

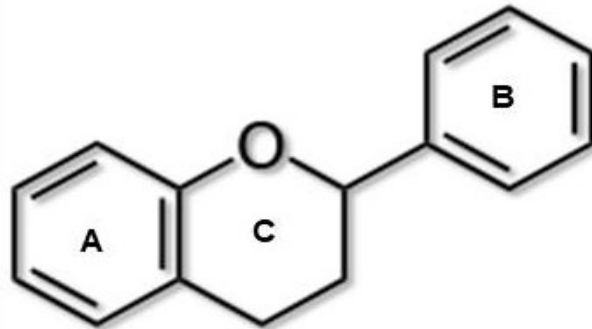
Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos (SOUSA et al., 2007), sendo classificados como fenóis simples ou polifenóis (**Figura 4**), estão presentes nos vegetais na forma livre ou complexadas a açúcares e proteínas (BRAVO, 1998). Destacam-se entre esses compostos, os flavonóides e os ácidos fenólicos, devido à sua presença abundante no chá verde.



Fonte: Adaptada <<https://mundoeducacao.bol.uol.com.br/quimica/fenolis.htm>>. Acesso em 14 de dez. 2023.

Os flavonóides são substâncias produzidas como metabólitos secundários pelas plantas, cujo elemento estrutural comum é a existência de um esqueleto de difenilpirano ($C_6-C_3-C_6$)(MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2015), composto por dois anéis do tipo fenil A e B ligados através de um anel de pirano (C) (**Figura 5**).

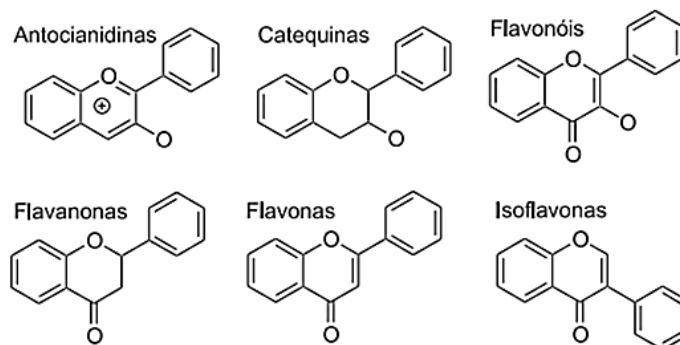
Figura 5. Esqueleto de um difenilpirano.



Fonte: (ANGELO; JORGE, 2007).

Os flavonoides podem ser divididos em diferentes subclasses, incluindo antocianinas, isoflavonas, flavanóis, flavonóis, flavonas e flavanonas (**Figura 6**). A variação entre os flavonoides ocorre conforme o número de anéis benzênicos presentes em sua estrutura, bem como os seus substituintes (HERTOG et al., 1993; TRUZZI et al., 2021; SILVA et al., 2023).

Figura 6. Estrutura química dos principais flavonoides.

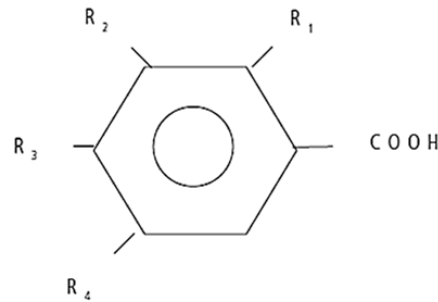


Fonte: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v31n5/a51v31n5.pdf>. Acesso em: 19 dez. de 2023.

Os ácidos fenólicos caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupamentos de hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os vegetais. De acordo com os pesquisadores os ácidos fenólicos podem ser classificados como os ácidos benzóicos, ácidos cinâmicos e seus derivados (SOARES, 2002;ANGELO; JORGE, 2007).

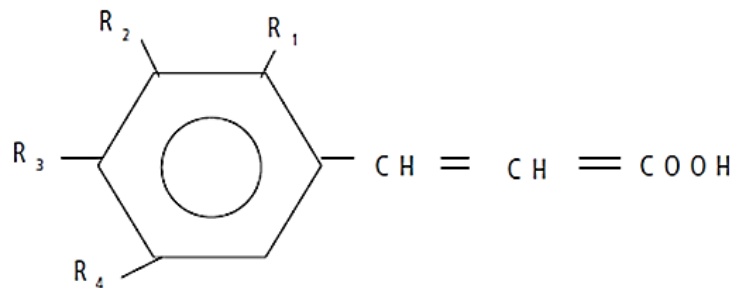
Os ácidos benzóicos possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁) representados na Figura 7 e os ácidos cinâmicos, possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃), sendo este os mais comumente encontrados no reino vegetal, sua estrutura característica é mostrada na Figura 8 (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 7. Estrutura química dos principais ácidos benzóicos.



R₁ = OH → Ácido Salicílico; R₁ = R₄ = OH → Ácido Gentísico; R₃ = OH → Ácido p-hidroxibenzóico; R₂ = R₃ = OH → Ácido Protocatequínico; R₂ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Vanílico; R₂ = R₃ = R₄ = OH → Ácido Gálico; R₂ = R₄ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Siringico

Fonte: <<https://www.scielo.br/img/fbpe/rn/v15n1/a08fig01.gif>>. Acesso em: 19 de dez. 2023.



R₁ = R₂ = R₃ = R₄ = H → Ácido cinâmico; R₁ = OH → Ácido o-cumárico; R₂ = OH → Ácido m-cumárico; R₃ = OH → Ácido p-cumárico; R₂ = R₃ = OH → Ácido Caféico; R₂ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Ferúlico; R₂ = R₄ = OCH₃; R₃ = OH → Ácido Sinápico

Figura 8. Estrutura química dos principais ácidos cinâmicos.

Fonte: <<https://uniiquim.iquimica.unam>>. Acesso em: 19 de dez. 2023.

A composição dos polifenóis nos alimentos pode variar de acordo com o tipo, a época de colheita, fatores ambientais, processamento e armazenamento (MANACH et al., 2004). Esses compostos desempenham um papel crucial no crescimento e na reprodução das plantas, além de contribuírem para a pigmentação. Nos alimentos, os polifenóis são

responsáveis pela coloração, sabor e aroma (PELEG et al., 1998; ANGELO; JORGE, 2007).

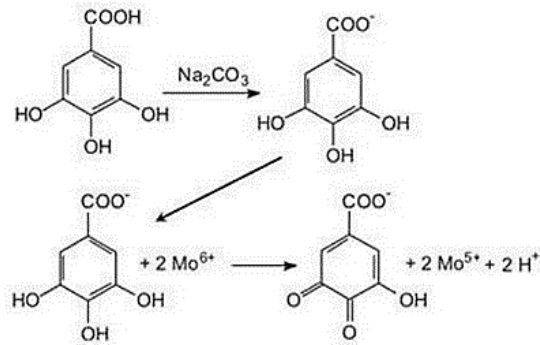
Além de desempenharem um papel essencial na proteção e reprodução de várias plantas, os compostos fenólicos apresentam propriedades fisiológicas como antioxidantes, anti-inflamatórios, antialérgicos, antimicrobianos, vasodilatadores e antitrombóticos. Essas propriedades estão principalmente associadas à presença de grupos funcionais em suas estruturas, caracterizados por uma elevada capacidade redutiva (CHUNG et al., 2011; SILVA et al., 2023).

Desta forma, o interesse tanto científico quanto industrial em substâncias antioxidantes tem crescido e é de suma importância a detecção e quantificação destes analitos, visto que estas substâncias combatem os radicais livres no organismo humano (EDZIRI et al., 2011).

Neste viés, a análise do perfil fenólico do chá verde possibilita a correlação entre a composição fenólica e os benefícios efetivos proporcionados pela bebida. Entretanto, a análise não é tão simples, “nos alimentos e bebidas, geralmente demanda tempo de acurácia, pois esses compostos além de abrangerem uma gama enorme de substâncias, em muitas situações se comportam de maneira inconstante, pela polaridade, sendo muito reativos e susceptíveis à ação de enzimas” (SANTANA, 2014).

Entre as análises laboratoriais mais comuns na determinação destes compostos bioativos está o método espectrofotométrico com o uso do reagente Folin-Ciocalteu, em que a reação redox (**Figura 9**) ocorre em $\text{pH} = 12,44$ e para neutralizar essa mistura é adicionado uma solução de carbonato de sódio (HOFF; SINGLETON; LAFAYETTE, 1977; DAMIANI, 2014). Este reagente possui inicialmente uma coloração amarelo intenso, consistindo na mistura resultante do ácido fosfomolibídico e do ácido fosfotungstúico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação $6+$. No entanto, em presença de certos agentes redutores como os compostos fenólicos presentes em extratos de plantas formam-se o óxido de molibdênio e o óxido de tungstênio, passando a apresentar a coloração azulada na solução, essa coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras no comprimento de onda de 760 nm (MARCUCCI et al., 2021; SOUSA et al., 2007).

Figura 9: Reação de substâncias redutoras com reagente Folin-Ciocalteu.



Fonte: (PIRES et al., 2017).

Na literatura, outras técnicas surgem como alternativa para determinação dos compostos fenólicos, porém pouco difundida. Sua utilização é considerada como abordagem recente, mas tem permitido o estabelecimento de técnicas rápidas, precisas e com instrumentos de baixo custo em sua finalização na análise, desde o desenvolvimento até a aplicação da técnica (DANCHANA et al., 2020). Os pesquisadores responsáveis no estudo garantem que essa novidade, até a sua data de publicação não se tinha existência de outros trabalhos, que envolvessem o uso de imagens digitais para a determinação de compostos fenólicos totais. Todavia, esta técnica foi para os pesquisadores envolvidos como trabalho pioneiro em que o teor de compostos fenólicos totais é determinado por colorimetria de imagem digital.

Outras análises são aplicadas, como o uso de métodos eletroquímicos para determinação de compostos fenólicos em alimentos, observando o potencial redutor, identificar mecanismos de oxidação, determinar os flavonóides através da comparação com um padrão e o potencial redutor de um fenólico desconhecido (MATTILA; ASTOLA; KUMPULAINEN, 2000). Incluindo as técnicas de cromatografia gasosa (CG) e a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) que são usadas tanto na separação quanto na quantificação de compostos fenólicos (SHAIJI; NACZK, 2004).

2.3 Extração em fase sólida (SPE)

As etapas de análises requerem rigor técnico quando se pretende alcançar resultados satisfatórios e confiáveis. Assim como existem inúmeras formas de métodos para determinar os compostos fenólicos, não foge à regra para as diferentes metodologias possíveis utilizadas para a extração dessas substâncias nos vegetais. Santana et al. (2014), consideram essa fase como uma etapa crítica no desenvolvimento de metodologias de análise é a preparação da amostra, cujo objetivo é ajustar o(s) analito(s), adequando para

cada extração o solvente apropriado da pré-concentração seletiva, de modo que minimize as ocorrências de perturbação nas manipulações dos materiais.

A Extração em Fase Sólida ou SPE, do inglês Solid Phase Extraction, representa um dos mais simples modos de preparação de amostras, o princípio fundamental está na divisão dos compostos em duas fases, uma líquida e outra sólida. “Foi introduzido pela primeira vez em 1970 e teve um grande impacto no campo das ciências analíticas”(AZZOUZ et al., 2018, p.11), com a finalidade de substituir a técnica de extração líquido-líquido ou LLE, do inglês Liquid Liquid Extraction, que apresenta desvantagens ao meio ambiente.

O princípio desse método consiste na partição dos compostos entre duas fases, uma líquida e outra sólida. Durante a etapa de retenção ou adsorção, os analitos devem ter uma afinidade superior pela fase sólida em comparação com a matriz da amostra. Os compostos retidos precisam ser subsequentemente removidos na etapa de eluição, utilizando um solvente que tenha maior afinidade pelos analitos, o que ocorre na etapa de eluição ou dessorção.

As características intrínsecas da SPE são: fatores elevados de pré-concentração de analito, simplicidade de operação, baixo custo de instrumentação, alta seletividade, baixo consumo de reagentes, baixa geração de resíduos e automação fácil (CALDERILLA et al., 2018, p.3). Portanto, a SPE representa um método relativamente barato, simples e com o uso de quantidades mínimas de reagentes, além da versatilidade de ser um método automatizado com alta eficiência.

2.4 Breve resumo sobre nanopartículas magnéticas

Segundo Bonniaud (2007) a definição de nanopartículas (NPs) é dada quando uma partícula possui suas dimensões inferiores a 100 nm. As nanopartículas podem ser de origem biológica ou não, natural ou artificial; consistem em moléculas muito variadas, como carbono ou metais (ouro, titânio, etc.) e também possuem formas variadas, dependendo da utilidade e propriedades físico-químicas necessárias. A reatividade das NP's depende principalmente da reatividade de sua superfície atômica. E por fim, as propriedades de materiais finamente magnéticos dependem intimamente do tamanho das partículas e seu estado de dispersão e agregação (BONNIAUD, 2007; BOTTERO et al., 2011; JOLIVET; TRONC; CHANÉAC, 2002).

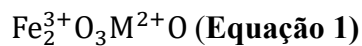
A esse fenômeno Duhan et al. (2017), atribui aos nanomateriais a sua aplicação para revestimento de biofertilizantes, na produção de formulações mais firme a dessecação e na

liberação controlada de fertilizantes, na formulação de nanopesticidas, e seus efeitos na germinação e crescimento das plantas, com o intuito de promover seu uso na agricultura (KHOT et al., 2012) e nanoherbicidas (PÉREZ-DELUQUE; RUBIALES, 2009).

As nanopartículas podem ser produzidas através de várias sínteses para atender as diferentes necessidades de extração seletiva. Entre os tipos de nanopartículas, destacam-se as nanopartículas magnéticas (NPMs) à base de óxido de ferro (Fe_2O_3 e Fe_3O_4), que naturalmente exibem propriedades magnéticas. As NPMs são superparamagnéticas, o que significa que podem ser atraídas por um campo magnético externo, mas não retêm magnetismo após a remoção do campo (XIE et al., 2014). Esse fenômeno explica o por que, após o processo de extração com nanopartículas magnéticas, elas podem ser facilmente retiradas da solução e posteriormente reutilizadas.

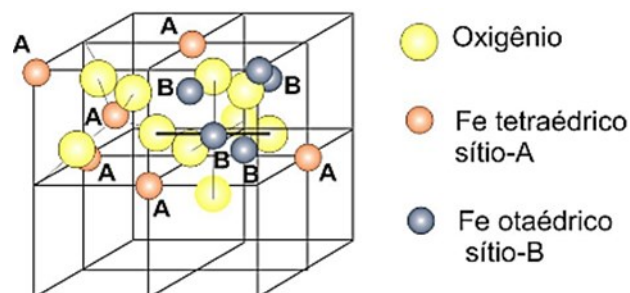
Ao utilizar o óxido de ferro como nanopartículas magnéticas, sabe-se que o elemento ferro pode ser obtido através de três óxidos distintos: FeO , Fe_2O_3 e Fe_3O_4 . E que existem quatro polimorfos de óxidos de ferro, sendo eles wustita(FeO), hematita(Fe_2O_3), magnetita(Fe_3O_4) e maghemita($\gamma\text{Fe}_2\text{O}_3$), e a formação de cada fase depende das condições de temperatura, pressão e pH durante o processo de síntese (JUNIOR, 2009).

A composição química do óxido ferro superparamagnético possui fórmula geral, conforme a Equação 1.



Sendo o M^{2+} representativo de um íon metálico divalente, neste trabalho o metal divalente estudado foi o Co^{2+} , sendo sintetizado as nanopartículas de cobalto CoFe_2O_4 . Os óxidos de ferro apresentam formas cúbicas, no caso da magnetita tem-se uma estrutura de spinélio invertido (**Figura 10**), sendo observadas diferenças apenas na disposição dos íons Fe^{2+} e Fe^{3+} nos interstícios octaédricos ou tetraédricos (MAMANI, 2009).

Figura 10. Estrutura da magnetita spinélio invertido.

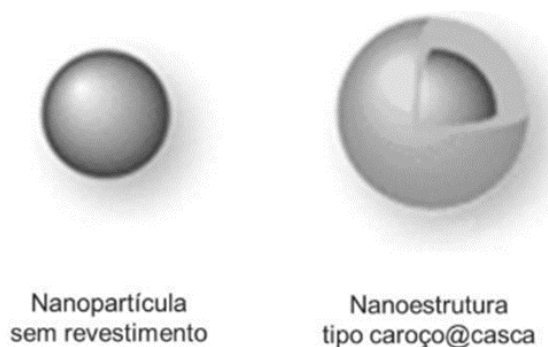


Fonte: < <https://teses.usp.br/teses/disponiveis/75/75134/tde-23042013-105323/Revisado.pdf> >. Acesso em: 20 de dez. 2023.

A síntese pelo método de coprecipitação para obtenção da magnetita pode ser por uma mistura estequiométrica preparada por sais de ferro com dupla e tripla ionização, e posteriormente uma base é adicionada à mistura, para que a mesma fique com pH entre 8 e 14, e para que possibilite a precipitação das partículas de magnetita. Este método demonstra ser altamente eficaz, apresentando facilidade no manuseio e custos reduzidos (FERREIRA, 2013; RÍOS; ZOUGAGH, 2016).

É relevante ressaltar que uma nanopartícula "nua" é altamente ativa quimicamente e facilmente oxidável quando exposta ao ar, resultando na perda de magnetismo e dispersão (XIE et al., 2014). Por esse motivo, é necessário revestir a nanopartícula magnética (NPMs) com um adsorvente para proteger o óxido, estabilizando quimicamente e evitando sua reação com o ambiente externo. Esse revestimento cria uma estrutura semelhante àquela conhecida na literatura como caroço-casca (**Figura 11**).

Figura 11. Ilustração das nanopartículas com e sem revestimento.



Fonte: (BARRETO, 2016).

Os pesquisadores, Shao et al. (2011) e Ziegler-Borowska et al. (2014), concordam como o interesse pelas nanopartículas magnéticas têm sido cada vez mais requisitada em processos de separação, por possuírem uma grande área de superfície, na qual é possível o ancoramento e, o maior carregamento de moléculas como enzimas e proteínas imobilizadas ou ligadas para posterior eluição. Assim, Li et al. (2013) e Ramimoghdam et al. (2014), referem as nanopartículas às infinitas possibilidades ampliam sua utilização, sobretudo os polímeros como revestimento de nanopartículas, não só promove maior estabilidade destas, mas pode contribuir com grupos denominados funcionais, ou até mesmo como intermediários para a biofuncionalização desses suportes com o intuito de alcançar atributos indispensáveis para o estabelecimento da ligação com a molécula de importância.

2.5 Técnicas de caracterização de nanopartículas

2.5.1 Difração de Raios X (DRX)

A difração de raios X é, portanto, uma técnica comum para o estudo de estruturas cristalinas e do espaçamento atômico em diversos materiais, e tem por princípio prático a interferência construtiva entre os raios X monocromáticos e uma amostra cristalina. Os raios X são formados dentro de tubos de raios catódicos (tubos de raios X), filtrados para produzir uma radiação monocromática, colimados e direcionados para a amostra (SILVA, 2020). “O equipamento que realiza a difração de raios X chama-se Difratorômetro de raios X, que no geral, um difratômetro, consiste em 3 elementos básicos: uma fonte ou tubo de raios X, um local para a amostra e um detector de raios X” (SILVA, 2020, p. 73).

2.5.2 Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A utilização da técnica de espectroscopia no infravermelho tem seu sucesso e recomendações quando à confiabilidade nos dados gerados em relação à caracterização, identificação e quantificação da estrutura da amostra analisada. Além do mais, uma das suas propriedades é promover análises com amostras em diferentes estados físicos como sólidos, líquidos e gasosos (SHAI, 2012). Por conseguinte, Skoog et al. (2010), descreve que a espectrofotometria na faixa do infravermelho constitui-se como uma ferramenta imprescindível na identificação de compostos orgânicos e inorgânicos puros, pois tem a capacidade de determinar ligações químicas distintas entre moléculas de átomos deformadas pelas rotações e vibrações, que são absorvidas por meio de energia em determinada frequência de ressonância, conforme as características químicas dos átomos relacionados.

2.5.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A respectiva análise se apropria das funções de um equipamento como referências para a aquisição dos resultados. “O microscópio eletrônico de varredura (MEV) utiliza um feixe de elétrons no lugar de fótons utilizados em um microscópio óptico convencional, o que permite solucionar o problema de resolução relacionado com a fonte de luz branca” (DEDAVID, 2007, p. 09). “O mesmo se trata de um aparelho que pode fornecer rapidamente informações sobre a morfologia e identificação de elementos químicos de uma amostra sólida, informa a mesma autora” (2007, p. 10).

2.6 A espectrofotometria UV-VIS

“Em espectrometria UV-Vis, somente radiações com $\lambda > 200$ nm encontram aplicações práticas, visto que, a radiação com comprimentos de onda menores pode ser absorvida pela água ou por outras espécies presentes no ar” (FILHO et al., 2010, p. 04). A espectrofotometria na região UV-VIS do espectro eletromagnético é uma das técnicas analíticas mais empregadas, em função de robustez, custo relativamente baixo e grande número de aplicações desenvolvidas (LOBINSKI; MARCZENKO, 1992). “Os procedimentos envolvem medidas diretas de espécies que absorvem radiação, medidas após derivação química e acoplamento a diversas técnicas ou processos, como cromatografia, eletroforese e análises em fluxo” (ROCHA; TEIXEIRA, 2004).

Para determinação espectrofotométrica de espécies na região UV-VIS, normalmente é necessário o uso de reagentes para a conversão da espécie de interesse em uma forma que permita a medida de absorção de radiação com maior sensibilidade e/ou seletividade (HOWELL; HARGIS, 1994; PRENESTI; DANIELE; TOSO, 2002). Contextualizando com Rocha; Teixeira, 2004, p. 807:

[...] a espectrofotometria é fundamentada na lei de Lambert-Beer, que é a base matemática para medidas de absorção de radiação por amostras no estado sólido, líquido ou gasoso, nas regiões ultravioleta, visível e infravermelho do espectro eletromagnético. Para medidas de absorção de radiação em determinado comprimento de onda, tem-se: $A = \log(I_0 / I) = \epsilon bc$, onde A é a absorvância, I_0 é a intensidade da radiação monocromática que incide na amostra e I é a intensidade da radiação que emerge da amostra. Apesar da extensa utilização, várias inovações recentes relacionadas às medidas espectrofotométricas ainda são pouco conhecidas. Com respeito ao aspecto instrumental, é notável a evolução desde os procedimentos baseados em comparações visuais e dos fotômetros empregando filtros para a seleção de comprimentos de onda até os equipamentos mais recentes, que empregam arranjos de fotodetectores.

A compreensão para o perfeito manuseio das técnicas e utilização dos métodos analíticos, é de fundamental importância, pois uma vez mal aplicada, a técnica comprometerá os resultados, inviabilizando a pesquisa e sucesso das investigações em função das respostas que se pretende alcançar. A escolha pragmática dos procedimentos garante a segurança dos métodos utilizados de forma correta, pois para a ciência os dados necessitam de solidez e consistência para a comprovação científica. Para tanto, a construção de uma pesquisa segura se faz necessária aplicar de maneira objetiva e com clareza em todos seus materiais utilizados quanto aos objetos que serão direcionados no estudo, e por ser considerado um procedimento viável, com baixo custo operacional e pela facilidade

para obtenção dos resultados, não se pode dispensar o rigor nas análises (GALO; COLOMBO, 2009).

2.7 Quimiometria

A palavra quimiometria vem sendo empregada desde 1971 para transcrever o crescente uso de modelos matemáticos, princípios estatísticos e outros métodos baseados no campo da química analítica, tais como: 1) Planejamento de experimentos; 2) Análise multivariada; 3) Calibração multivariada (FERREIRA, 2015).

Estas ferramentas trazem uma compreensão dos dados de forma significativa e assim podem ser utilizadas conforme o interesse de estudo, seja para análise quantitativa ou qualitativa (GONÇALVES, 2015).

A quimiometria é um campo interdisciplinar que envolve estatística multivariada, modelagem matemática, ciência da computação e química analítica (GEMPERLINE, 2006).

2.7.1 Planejamento de experimentos

O planejamento experimental vem ganhando espaço nas áreas de ciências, visto que, é uma parte essencial da quimiometria. Este é caracterizado como um conjunto de ferramentas que emprega princípios matemáticos e estatísticos para estabelecer um delimitamento experimental. Desse modo, o planejamento permite otimizar recursos, economizar tempo e reduzir o custo (FERREIRA, 2006).

Desta forma, o planejamento é uma especificação detalhada de todas as operações experimentais que devem ser realizadas, no qual vai depender do objetivo particular que cada pesquisador quiser atingir. Objetivos diferentes precisarão de planejamentos diferentes (NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2001).

2.7.2 Planejamento fatorial completo de dois níveis (2^3)

No planejamento fatorial completo de dois níveis, o primeiro passo consiste definir os três fatores a serem estudados e posteriormente aplicar na expressão $n=2k$, onde n será a quantidade de ensaios a serem feitos e como K representa a quantidade de fatores a serem trabalhados, logo no planejamento $2^3 = 2 \times 2 \times 2$, totalizando assim oito ensaios. E para se obter informações sobre o erro experimental, uma estratégia adotada é a repetição de experimentos no ponto central. (FERREIRA, 2006; FERREIRA, 2015).

O planejamento fatorial auxilia na compreensão dos fatores mais influentes e em como eles interagem (VICENTINI et al., 2011). A análise dos resultados de um planejamento fatorial pode ser conduzida por meio de várias abordagens, incluindo o cálculo e interpretação dos efeitos, gráficos de Pareto e gráfico das médias marginais (FERREIRA, 2015).

2.7.3 Modelo Box-Behnken

A otimização dos processos para análise e quantificação dos componentes bioativos dos vegetais, são cada vez mais eficientes quanto ao avanço da tecnologia para a produção de materiais que garantam a qualidade dos produtos finais. Etapas de planejamentos são fundamentais na sistematização do trabalho e confecção das amostras, são passos indispensáveis para alcançar resultados significativos. Para complementar a pesquisa, a introdução de modelos matemáticos como o Box – Behnken, pode ser utilizado de modo a garantir maior otimização do tempo, redução de gastos com reagentes, bem como, menor geração energética, podendo ser aplicado em distintos processos de extração de compostos químicos (DRANCA; OROIAN, 2019; FILHO; CASTRO, 2020).

O Box-Behnken representa uma categoria específica de planejamento experimental, especialmente valiosa quando há um número moderado de fatores a serem investigados e deseja-se evitar a execução de todos os experimentos possíveis. Esse método utiliza uma combinação de valores em níveis intermediários entre os valores extremos dos fatores para estimar suas respostas (FERREIRA et al., 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo é desenvolver um método de extração e pré-concentração usando nanopartículas magnéticas para quantificar fenólicos totais em amostras de chá verde vendidas em Salvador-BA, através de espectrofotometria UV-VIS.

3.2 Objetivos específicos

- Sintetizar nanopartículas magnéticas de óxidos de ferro e revestir com sílica;
- Caracterizar por meio de técnicas de Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR), Difração de Raio-X (DRX), Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV);

- Avaliar e otimizar os fatores que influenciam na extração e pré-concentração em fase sólida magnética, empregando ferramentas quimiométricas;
- Determinar o teor de fenólicos totais em amostras de chá verde comercializadas na cidade de Salvador – Bahia.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Amostra e reagentes

Os reagentes utilizados em todas as etapas experimentais foram de grau analítico e todas as soluções foram devidamente preparadas com água ultrapura (resistividade $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ a 25°C) obtida através do sistema de purificação Osmoze Reversa OS10LXE (Gehaka, São Paulo-SP, Brasil). De forma a evitar possíveis contaminações, as vidrarias utilizadas foram mantidas em solução de HNO_3 a 10,0% (v/v) durante 24 horas e posteriormente lavadas com água ultrapura antes do uso. Para a síntese dos adsorventes magnéticos, os seguintes reagentes foram utilizados: Cloreto férrico P.A ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [Biotec, Paraná, PR, Brasil], nitrato de cobalto P.A ($\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) [Êxodo Científica, São Paulo, SP, Brasil], hidróxido de sódio (Êxodo Científica, São Paulo, SP, Brasil), Sulfato de cobre (II) Pentahidratado (Synth, São Paulo, SP, Brasil) e Hidróxido de Amônio P.A (Proquimios, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e Silica em gel (Vetec, São Paulo, SP, Brasil).

Para as análises espectrofotométrica foram utilizados tais reagentes: Álcool etílico [99,5% (m/v), Synth, São Paulo, SP, Brasil], Metanol [99,5% (m/v)] e, carbonato de sódio anidro da Êxodo Científica (São Paulo, SP, Brasil), Folin Ciocalteu (Sigma-Aldrich) e o Ácido gálico usado como padrão analítico da Sigma Aldrich (Saint Louis, MO, EUA), .

As amostras de chá verde de três marcas e dois lotes diferentes para cada marca foram obtidas em estabelecimentos de grande e pequeno porte nas cidades de Salvador, BA, Brasil. As mencionadas foram armazenadas em potes escuros.

4.2 Preparo das soluções

As soluções padrões de ácido gálico foram preparadas, diariamente, a partir da solução estoque de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de ácido gálico

Pesou-se 10 mg de ácido gálico e dissolveu-se em um béquer de 10 mL com um pouco de água ultra pura e em seguida transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 10 mL completando seu volume.

Solução Intermediária de ácido gálico (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

Através da solução estoque de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ retirou-se uma alíquota de 1mL e em seguida transferiu-se a solução para um balão volumétrico de 10 mL completando seu volume.

Soluções padrões de ácido gálico (2 a 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$)

As soluções foram preparadas em um tubo falcon de 15 mL a partir da diluição da solução intermediária (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$), em que as alíquotas tomadas foram de 300 μL , 600 μL , 900 μL , 1200 μL e 1500 μL para as respectivas concentrações 2,0; 4,0; 6,0; 8,0 ;10 utilizando como solvente água ultrapura. As referidas ficaram em repouso por duas horas no escuro.

Solução de carbonato de sódio a 20%(m/v)

Pesou-se 20,00g de carbonato de sódio e dissolveu-se em um béquer de 100 mL com um pouco de água ultra pura em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou o seu volume.

Solução de hidróxido de sódio a 20%(m/v)

Pesou-se 10,00g de hidróxido de sódio e dissolveu-se em um béquer de 50 mL com um pouco de água ultra pura em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 50 mL e completou o seu volume.

Solução de ácido clorídrico a 10%(v/v)

Retirou-se uma alíquota de 1mL de ácido clorídrico, em seguida transferiu-se para um balão volumétrico de 10 mL e avolumou com água ultra pura.

4.3 Determinação de fenólicos totais

A determinação do teor de fenólicos totais (TPC) foi realizada através do reagente orgânico principal Folin-Cicateaul de coloração inicial amarela e de comprimento de onda correspondente a 760 nm (HOFF; SINGLETON; LAFAYETTE, 1977) com adaptações. Nesta análise 25 μL do extrato aquoso das amostras, em triplicatas foram transferidos em

tubos falcon de 15 mL, verteu-se em seguida um volume de 14,175 mL de água ultrapura, sendo adicionados 200 µL de Folin-Cicateaul. Após 5 minutos da cinética da reação foram adicionados 600 µL da solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 20% (m/v), a reação total e a leitura em espectrofotômetro UV-Vis é realizada após um período de 2 horas, é possível identificar visualmente se há a presença de algum fenólico através da mudança de coloração do reagente orgânico de amarelo para azul. A curva de calibração (2,0; 4,0; 6,0; 8,0 e 10,0 µg mL⁻¹) foi construída com base no padrão de ácido gálico disponível e cuja concentração é de 100 µg mL⁻¹.

Os resultados foram calculados usando uma curva de calibração de ácido gálico (0-10 µg mL⁻¹); ($y = 0,0774x + 0,0036$; $R = 0,9983$) e expresso em miligramas equivalentes de ácido gálico por 100 gramas (mg 100g⁻¹ GAE).

4.4 Instrumentação

O espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis modelo K37 da Kasvi (São José dos Pinhais, PR, Brasil) foi empregado para realizar a determinação espectrofotométrica convencional dos compostos fenólicos totais e o comprimento de onda fixo em 760 nm.

A massa de todas as amostras e soluções de trabalho foram pesadas numa balança (Mettler Toledo, modelo ME 104/A, Brasil) e para propulsionar estas foi através de uma bomba peristáltica modelo LDP-105-6 (Tecnozon, Piracicaba, SP, Brasil) e equipada com tubos de Tygon (Meinhard, Tube-SOLFSD-40). O pH das amostras foi medido em um pHmetro digital (Metrohm, modelo 913, Suíça).

As características morfológicas dos nanocompósitos, bem como de seus respectivos precursores, foram avaliadas utilizando-se um microscópio eletrônico de varredura (Hitachi S-3400N®) operando após a superfície das amostras serem revestida com uma fina camada de Au (ouro), espectros de difração de raios-X foram adquiridos por meio de um difratômetro de raios-X (Shimadzu XRD 7000) operando com uma fonte de $\text{CuK}\text{-}\alpha$ ($\lambda = 1,5406 \text{ \AA}$) e, ângulo 2θ variando entre 10 e 80° e o espectrômetro de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) (Shimadzu, modelo IRAffinity-1), operando em modo transmissão entre 4000 e 400 cm⁻¹.

No processo de preparo de amostra foi usada uma chapa aquecedora (Quimis, modelo Q313F21) e no processo de extração e pré-concentração dos extratos foi usada uma bomba peristáltica (Tecnozon, modelo LDP 105-6).

4.5 Síntese das nanopartículas de cobalto (CoFe₂O₄)

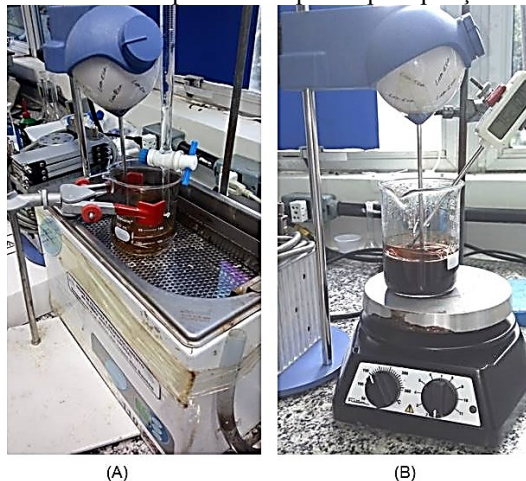
No processo de síntese das nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFe₂O₄), adotou-se o método de coprecipitação com base no descritivo de Minho et al. (2019), com algumas adaptações. Inicialmente, as soluções contendo 0,05 mol L⁻¹ do íon Fe³⁺ e 0,025 mol L⁻¹ do íon de Co²⁺, obedecendo assim a proporção 1:2. Estas foram adicionadas em um balão volumétrico de 100 mL.

Em seguida, a solução resultante foi transferida para um béquer de 250 mL, onde foi adicionado lentamente as gotas de uma solução de NaOH a 10 mol L⁻¹ com auxílio de uma bureta, enquanto agitava-se vigorosamente, a mistura mantinha-se em um banho ultrassônico por 30 minutos. Essa etapa está representada na Figura 12, parte (A).

Após essa fase, a suspensão foi aquecida à 80°C por 3 horas, mantendo agitação constante. As nanopartículas formadas foram separadas da solução final por meio de centrifugação a 3600 rpm, descartando-se a parte líquida. A porção sólida contendo o óxido das nanopartículas foi transferida para um cadinho e colocada em uma estufa a 60°C por 5 horas para remover qualquer excesso de líquido.

Por fim, as nanopartículas foram calcinadas em uma mufla a 450°C por 4 horas para concluir o processo de síntese. A montagem do sistema de aquecimento pode ser visualizada na Figura 12, parte (B).

Figura 12. Sistema da síntese das nanopartículas: (A) processo de coprecipitação e (B) processo de aquecimento pós-coprecipitação.



Fonte: Autoria própria.

4.6 Revestimento das nanopartículas

A preservação da estabilidade das nanopartículas metálicas é de suma importância, visto que elas no âmbito natural são quimicamente ativas. Neste viés, é crucial desenvolver métodos que evitem sua deterioração e, assim, estabeleçam estratégias de proteção eficazes.

O método de Minho et al. (2019) foi utilizado, com adaptações e a seguinte parte experimental foi empregada: inicialmente, foram dissolvidos 2,5 g de sulfato de cobre (CuSO_4) em 25 mL de água ultrapura sob agitação mecânica constante. Em seguida, uma solução aquosa de hidróxido de sódio (NaOH) 10 mol L^{-1} numa proporção de 1:5. Esta foi adicionada lentamente gota à gota até que o precipitado de hidróxido de cobre II (Cu(OH)_2) fosse formado. O precipitado filtrado, coletado e lavado com água ultrapura à temperatura ambiente.

A seguir, 0,5 g do precipitado (ainda húmido) foi suspenso em 25 mL de hidróxido de amônio padrão analítico ($\text{NH}_4(\text{OH})$), formando o complexo de cor azul conhecido como di-hidróxido de tetraaminodiaquacobre [$(\text{Cu(OH)}_2(\text{NH}_4)_4(\text{H}_2\text{O}))$].

Nesta suspensão preparada previamente, 0,3 g do óxido das nanopartículas sintetizadas foram adicionados, e estas foram inicialmente revestidas com adição de 0,5 g de sílica cromatográfica (SiO_2). Após a adição do adsorvente, a mistura foi submetida a uma agitação vigorosa por 4 horas. Em seguida, 25 mL de uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 10% (v/v) foram introduzidos para desfazer o complexo formado anteriormente. Dessa forma, o precipitado foi filtrado e lavado repetidamente com água ultrapura até atingir um pH neutro e, finalmente, lavado cinco vezes com metanol. As nanopartículas revestidas foram então colocadas em uma estufa a 60°C por 5 horas para secagem. O material seco foi triturado e peneirado através de uma malha de 120 mesh (0,125 mm).

4.7 Coleta e preparo das amostras

As amostras de chá verde foram compradas na cidade de Salvador-BA em estabelecimentos de pequeno e grande porte, obtendo assim três marcas e dois lotes diferentes para cada marca.

Na tabela 1 contém a relação das amostras analisadas com o respectivo ponto de coleta, lote e o indicador de cada uma delas.

Tabela 1. Relação das amostras de chá verde (*Camellia sinensis*) em sachê analisadas.

Ponto de coleta	Lote	Indicador
-----------------	------	-----------

Brotas	211010722M	CVOBB2
Itapuã	211010722B	CVOBB3
Costa Azul	290	CVMCA3
Brotas	157	CVMCA5
Itapuã	23076	CVLIC3
Costa Azul	2203	CVLIC2

Fonte: Autoria própria.

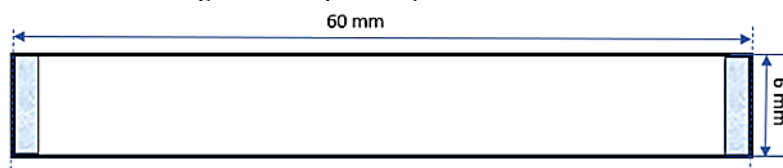
As amostras de chá verde foram preparadas conforme o método de infusão de Santos e Magalhães (2020), no qual a amostra (2,0g) foi diretamente pesada em um béquer de 25 mL, posteriormente transferida para um enlarmeyer de 250 mL e reservado. Em seguida, adicionou-se 140 mL de água em ebulição em um recipiente fechado. Após 17 min em repouso, foi filtrado e congelada a -20°C para posterior análise.

No dia em que as análises foram realizadas, preparou-se soluções da amostra original ajustada em um pH apropriado, no qual uma alíquota de 1 mL da amostra com pH ajustado foi transferida para um balão volumétrico com capacidade de 10 mL, resultando em uma concentração final de $1,43 \text{ mg mL}^{-1}$ da solução original do chá verde. Essas soluções das amostras foram submetidas no sistema de pré-concentração em fluxo. E para averiguar a exatidão do método proposto foram feitos testes de adição e recuperação com concentrações de ácido galico de 2, 4 e $6 \mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.8 Especificações técnicas da minicoluna e da bomba

A minicoluna foi confeccionada através do corpo de uma seringa de acrílico em que foi cortada as suas extremidades, tendo como dimensões (**Figura 13**): o diâmetro de 0,6 cm e comprimento de 6 cm, obtendo um volume final de $3,39 \text{ cm}^3$, preenchida com $0,214\text{g}$ de CoFe_2O_4 revestidas com sílica e nas extremidades contém seção de uma ponteira de micropipeta com um pouco de espuma de poliuretano.

Figura 13. Especificações da mini-coluna.



Fonte: Autoria própria.

A bomba peristáltica (Tecnoyon, modelo LDP 105-6) foi utilizada para passagem do fluxo através de um tubo tygon com diâmetro de 0,191 mm e 152 mm de comprimento que conecta-se a minicoluna e assim pré-concentra o analito.

4.9 Sistema de extração e pré-concentração em fluxo

Na etapa de extração e pré-concentração foi usado um sistema, conforme Figura 13, envolvendo uma bomba peristáltica, um tubo de tygon, uma válvula conectada a minicoluna descrita no item acima.

O procedimento foi desenvolvido através de uma válvula na posição de amostragem, a amostra ajustada em pH 4,0 (A), contendo uma solução de 10mL numa concentração final de $1,43 \text{ mg mL}^{-1}$ de chá verde, foi bombeada por uma vazão de $1,19 \text{ mL min}^{-1}$ através da minicoluna que reteve as substâncias fenólicas por sorção química. A solução restante foi para o descarte (D). Comutando a válvula para a posição de eluição, passava-se através da coluna no sentido unidirecional ao de amostragem, $1,46 \text{ mL}$ de uma solução de etanol à 99,5% m/v (E), a uma vazão de $1,19 \text{ mL min}^{-1}$ para extrair os fenólicos totais. Após a extração do analito foi feita a leitura no espectrofotômetro de absorção molecular UV/Vis na faixa de 760nm (**Figura 14**).

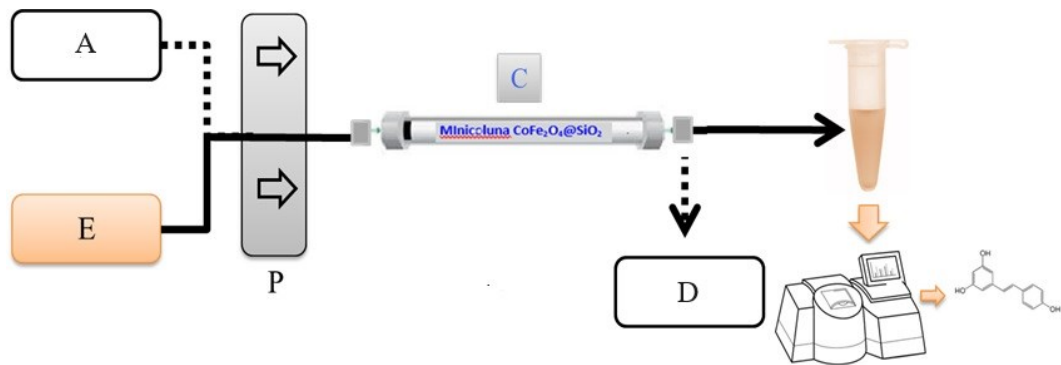


Figura 14. Diagrama esquemático do sistema de pré-concentração em fluxo utilizado para pré-concentração e determinação de fenólicos totais em amostras de chá verde. A, amostra; E, eluente, P, bomba peristáltica; C, minicoluna; UV-VIS, espectrofotômetro de absorção UV-VIS e D, descarte.

Fonte: Autoria própria.

5.0 Estudo preliminar - massa adsorvente e do solvente extrator para a extração e pré-concentração em fluxo

O estudo preliminar foi feito com base em ensaios envolvendo as seguintes massas adsorventes: 0,214g e 0,500g e os solventes extatores foi água, metanol e etanol à 99,5% (m/v). Para este estudo, cada solução da amostra continha uma concentração de chá verde

1,43 mg mL⁻¹. As condições empregadas foram: vazão de amostragem 11 mL min⁻¹, pH 6 e os eluentes mencionados à um volume de 3,5 mL.

5.1 Otimização do processo de extração e pré-concentração

O processo de otimização foi realizado através de um estudo multivariado para obter as condições eficientes de extração e pré-concentração de substâncias fenólicas nas amostras de chá verde.

Desta forma, primeiramente foi realizado um planejamento fatorial 2³ e com ponto central, totalizando 11 experimentos (**Tabela 2**) e a partir dos resultados obtidos aplicou-se o planejamento Box Behnken (**Tabela 3**) para determinação das melhores condições de extração. Durante este processo o sistema de extração e pré-concentração em fluxo foi operado no modo de amostragem baseado no volume, usando-se 10,0 mL de uma solução da amostra original contendo 1,43 mg mL⁻¹. Foram estudadas as seguintes variáveis: vazão de amostragem (VA), volume do eluente (VE) e pH. Os valores dos níveis máximo, central e mínimo de cada variável são apresentados na Tabela.

Todos os experimentos foram realizados em triplicata e, os dados experimentais foram processados no software STATISTICA 7.0 e o teor de fenólicos totais foi usado como resposta analítica com nível de confiança de 95%.

Tabela 2. Níveis das variáveis do planejamento fatorial 2³

Símbolo	Variável	Nível baixo (-)	Nível central (0)	Nível alto (+)
VA	Vazão de amostragem (mL min ⁻¹)	3,0	7,0	11,0
VE	Volume do eluente (mL)	2,5	3,0	3,5
pH	pH	5,0	5,5	6,0

Fonte: Autoria própria.

Tabela 3. Níveis das variáveis do planejamento Box Behnken

Símbolo	Variável	Nível baixo (-)	Nível central (0)	Nível alto (+)
VA	Vazão de amostragem	2,0	3,0	4,0

		(mL min ⁻¹)		
VE	Volume do eluente	1,0	1,5	2,0
		(mL)		
pH	pH	2,0	4,0	6,0

Fonte: Aatoria própria.

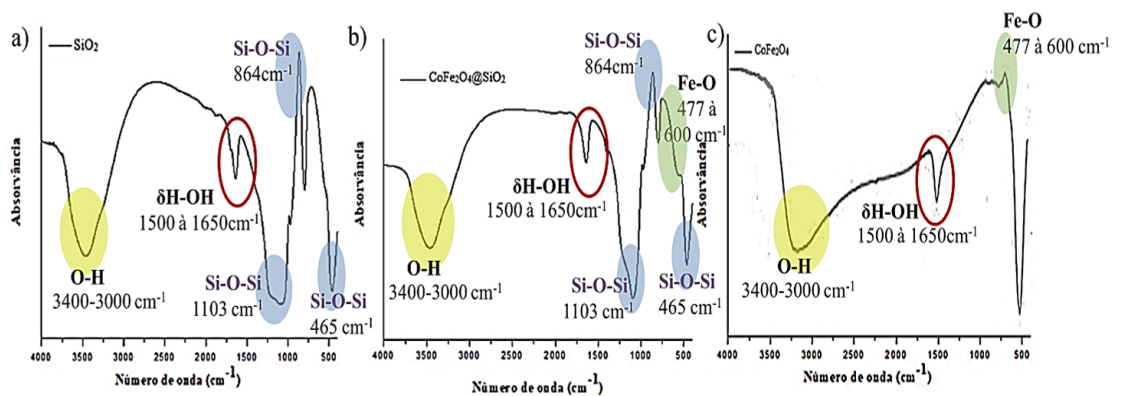
6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Caracterização do adsorvente

6.1.1 Análise de infravermelho (FTIR)

As análises pelo espectrômetro de infravermelho consistem em determinar as posições e intensidades das absorções ou picos de grupos funcionais em estruturas orgânicas numa faixa de 4000 a 400 cm⁻¹, conforme a Figura 15.

Figura 15. Gráficos do FTIR: (a) Espectro FTIR da sílica cromatográfica, (b) Espectro FTIR da NPs revestida com sílica cromatográfica e (c) Espectro FTIR da NPs



Fonte: Aatoria própria.

Na Figura 15, a presença de uma banda larga na faixa de 3400-3000 cm⁻¹, observada em todos os materiais, pode ser atribuída à vibração do grupo OH provenientes de moléculas de água adsorvidas no material.

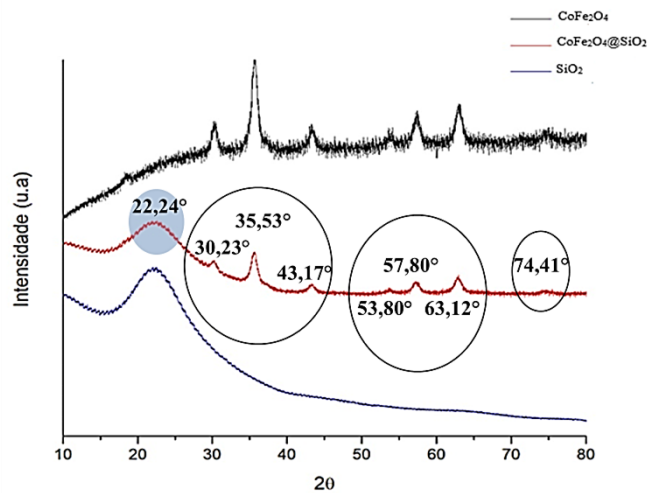
Enquanto nos espectros de absorção IR das nanopartículas com e sem revestimento na faixa de 600-477 cm⁻¹ há uma banda de absorção característica de espinélio e ferritas em particular, no qual é atribuída às vibrações de estiramento intrínsecas da ligação oxigênio-metal no sítio tetraédrico (Mtetra↔O) [RUAN et al, 2002]. Assim como uma banda entre 1650 e 1500 cm⁻¹ corresponde à deformação angular das ligações δH-OH, indicando a presença de água no meio.

O espectro C mostrou-se similar ao espectro B, exceto pela presença de uma banda em 1103 cm^{-1} , 864 cm^{-1} e 465 cm^{-1} a qual pode ser atribuída às vibrações das ligações dos grupos Si-O-Si, comprovando o recobrimento de sílica de acordo ao espectro A.

6.1.2 Análise de difração de raios X (DRX)

A análise do difratograma obtido por análises de difração de Raios X é fundamental para a caracterização do adsorvente, visto que os materiais podem exibir diversas fases com propriedades notavelmente diversas entre si. Os resultados obtidos dos difratogramas das amostras de óxido das nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFe_2O_4), das ferritas de cobalto revestida com a sílica e sílica cromatográfica (SiO_2) estão na Figura 16.

Figura 16. Difratogramas de Raios-X das nanopartículas: (a) óxido das nanopartículas de CoFe_2O_4 , (b) $\text{CoFe}_2\text{O}_4@/\text{SiO}_2$ e (c) SiO_2 .



Fonte: Autoria própria.

Como ilustrado na Figura 16a, observa-se picos de difração distintos associados às reflexões do óxido das nanopartículas, os quais estão em conformidade com o padrão fornecido pela Inorganic Crystal Structure Database (ICSD). Os ângulos de difração característicos do óxido, conforme evidenciados no difratograma, são: $2\theta = 30,23^\circ$; $35,53^\circ$; $43,17^\circ$; $53,80^\circ$; $57,80^\circ$; $63,12^\circ$ e $74,41^\circ$, com seus correspondentes índices de difração de: $d(220)$, $d(311)$, $d(400)$, $d(422)$, $d(511)$, $d(440)$ e $d(622)$.

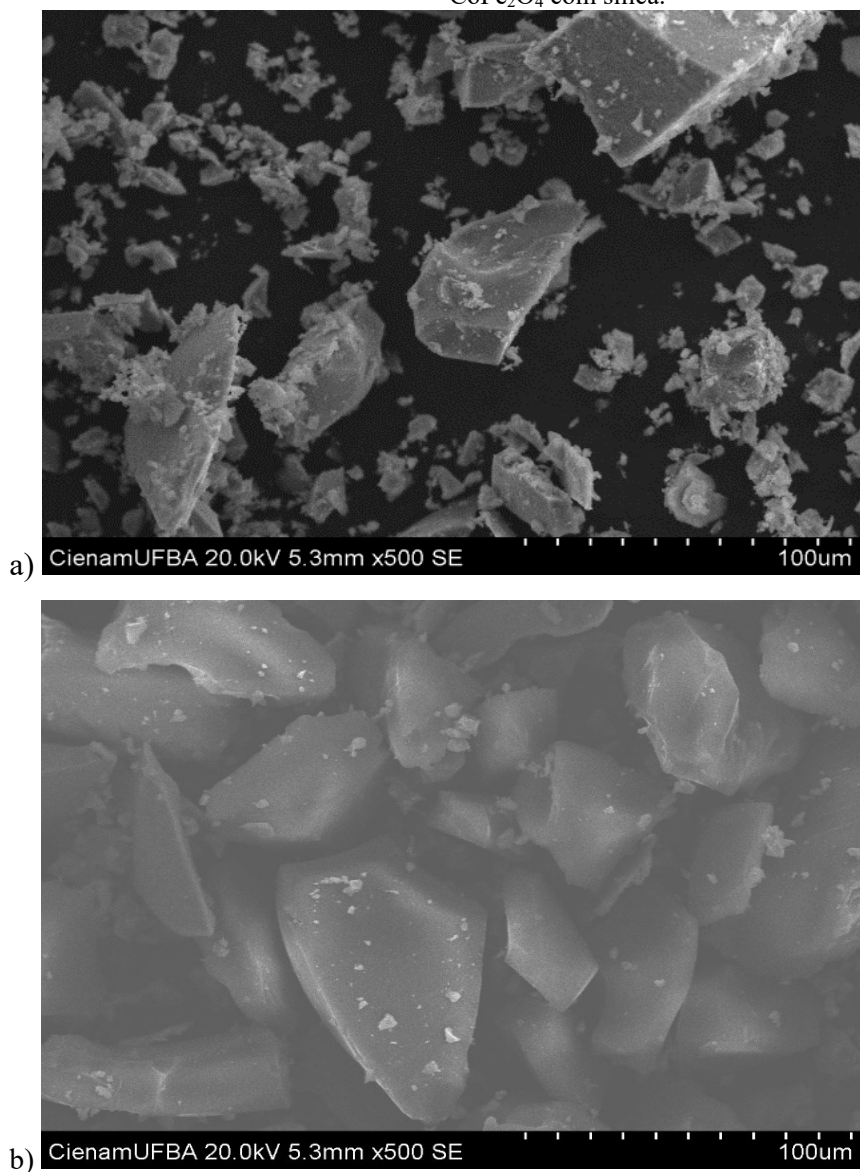
Na Figura 16b, além da semelhança com o difratograma do óxido da nanopartícula de CoFe_2O_4 (Figura 16a), que sugere a síntese das esferas núcleo-casca sem afetar a estrutura

cristalina do núcleo de Fe_3O_4 , identificou-se um pico em $2\theta = 22,24^\circ(200)$, que corresponde à sílica. Nesta cadência, as nanopartículas de CoFe_2O_4 foi revestida com sílica.

6.1.3 Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) tem como objetivo de avaliar a morfologia das amostras. Desta forma, as micrografias analisadas foram das amostras de óxido das nanopartículas de ferritas de cobalto (CoFe_2O) e do revestimento da ferritas de cobalto com a sílica, conforme apresentado na Figura 17.

Figura 17. Imagens em MEV: (a) óxido das nanopartículas de CoFe_2O_4 ; (b) Revestimento de CoFe_2O_4 com sílica.



Fonte: Autoria própria.

De acordo, a Figura 17a) observa-se estruturas bem dispersas. Enquanto na Figura 17b) há uma morfologia mais definida e com maior grau de agregação.

6.2 Estudo preliminar da massa adsorvente e do solvente extrator

De acordo com a Tabela 4, o maior sinal analítico foi obtido ao empregar a massa adsorvente maior e o solvente extrator mais eficiente, foi o etanol devido à sua biocompatibilidade em extração de fenólicos (ILAYARAJA et al., 2015). No entanto, não foi possível continuar com a maior massa adsorvente, devido a um problema de empacotamento na mini-coluna.

Tabela 4. Resultado do estudo acerca da eficiência de diferentes massas adsorventes e solventes extratores no sistema em fluxo para extração e pré-concentração de chá verde.

Solventes	Massa Adsorvente	Absorvância	TPC
Água	0,214g	0,013	3,64
Água	0,500g	0,028	9,46
Etanol	0,214g	0,086	31,94
Etanol	0,500g	0,154	58,29
Metanol	0,214g	0,047	16,82
Metanol	0,500g	0,109	40,85

Fonte: Autoria própria.

Em sistemas de fluxo, o empacotamento adequado de uma mini-coluna é essencial para garantir a passagem uniforme do solvente e a eficácia do processo. O empacotamento refere-se à forma como o adsorvente (fase estacionária) é distribuído uniformemente dentro da mini-coluna. A uniformidade do empacotamento é crucial para garantir que o solvente flua uniformemente através da mini-coluna, permitindo assim o processo adequado (DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Quando se utiliza uma massa adsorvente maior, a densidade da fase estacionária aumenta e, conseqüentemente, a resistência ao fluxo do solvente também aumenta. Isso significa que o sistema de fluxo deve ser capaz de aplicar uma pressão de fluxo adequada para vencer essa resistência e permitir que o solvente flua uniformemente pela mini-coluna. (COLLINS; BRAGA; DONATO, 1995; DEGANI; CASS; VIEIRA, 1998).

Infelizmente, o sistema em fluxo empregado não apresentava uma pressão adequada para vencer essa resistência, resultando assim em um fluxo de solvente não uniforme, o que comprometeu a eficiência do processo e afetando negativamente os resultados analíticos,

justamente pelo fato que no processo de desempacotar a mini-coluna tinha-se percas de nanopartículas.

Como resultado, foi necessário fazer uma escolha e, portanto, a massa adsorvente de 0,214g e o etanol à 99,5% m/v foram admitidos nos demais experimentos.

6.3 Otimização da extração e pré concentração de fenólico total

O planejamento fatorial 2^3 composição central foi escolhido, pois até 3 fatores o planejamento é eficiente, no qual foram inclusos pontos centrais, onde todas as variáveis assumem valores médios, incluídos para evitar o risco da perda da relação não linear no meio do planejamento e para determinar o intervalo de confiança pelas repetições submetidas.

Desta forma, os resultados obtidos encontram-se na Tabela 5, em que contém os valores codificados e reais dos fatores, os sinais analíticos obtidos e o teor de fenólico para cada experimento.

Tabela 5. Matriz do planejamento fatorial completo de dois níveis e as respectivas respostas.

Exp.	pH	Vazão (mL min ⁻¹)	Volume do Eluente (mL)	ABS	TPC
1	- (5)	- (3)	- (2,5)	0,227	86,59
2	+ (6)	- (3)	- (2,5)	0,116	43,57
3	- (5)	+ (11)	- (2,5)	0,194	73,80
4	+ (6)	+ (11)	- (2,5)	0,095	35,43
5	- (5)	- (3)	+ (3,5)	0,201	76,51
6	+ (6)	- (3)	+ (3,5)	0,106	39,69
7	- (5)	+ (11)	+ (3,5)	0,154	58,29
8	+ (6)	+ (11)	+ (3,5)	0,089	33,10
9 (PC)	0 (5,5)	0 (7)	0 (3)	0,156	59,07
10 (PC)	0 (5,5)	0 (7)	0 (3)	0,159	60,23
11 (PC)	0 (5,5)	0 (7)	0 (3)	0,153	57,91

Fonte: Aatoria própria.

Na matriz do planejamento observa-se que os sinais mais elevados foram para o experimento 1. Este experimento utilizou-se o níveis mais baixo de pH, vazão e volume do eluente.

A partir dos resultados obtidos foi possível gerar o gráfico de Pareto pelo programa Statistica 7.0 (**Figura 18**) com probabilidade estatística ($p= 0,05$) para determinar a significância das variáveis e suas interações no sistema.

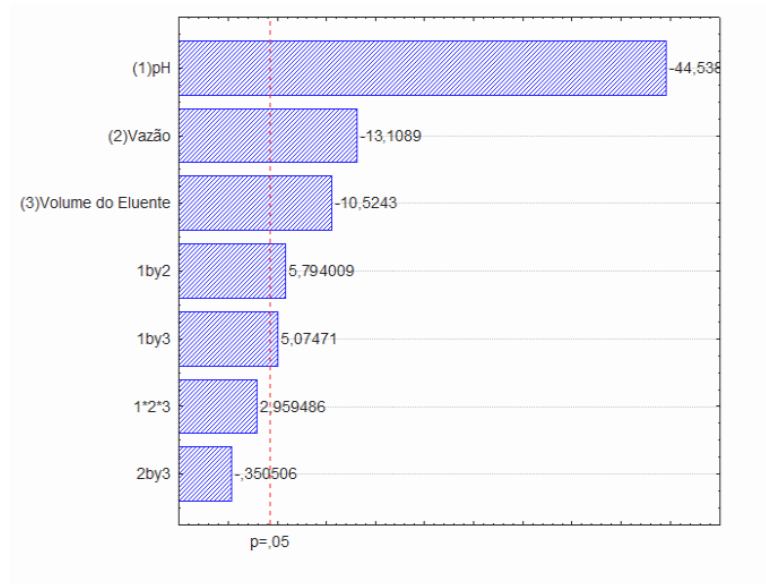


Figura 18. Gráfico de pareto para o planejamento fatorial.
Fonte: Autoria própria.

De acordo com o gráfico de pareto (**Figura 18**) observou-se que a vazão, o pH e volume do eluente foram fatores que tiveram influência significativa no intervalo de estudo e as interações: pH-VE e pH-VA foram significativas.

A variável pH foi de efeito mais significativo, na faixa de pH estudada foi garantida adsorção, entretanto, no nível mais baixo a reação foi mais favorecida.

Enquanto a variável VA (vazão de amostragem) foi a segunda de efeito mais significativo, uma vez que, exerce controle sobre a quantidade de analito que atravessa a coluna por unidade de tempo, bem como sobre o tempo que o analito permanece na coluna, permitindo assim a ocorrência da reação de adsorção e, por conseguinte, a pré-concentração, contudo, no nível mais baixo a reação foi mais favorecida e assim como o volume do eluente.

Com base nestas observações, visto que todas as variáveis estudadas foram significativas com grau de confiança de 95% e para estabelecer as condições ótimas para extração foi aplicado o planejamento Box Behnken e o domínio experimental empregado no planejamento fatorial completo foi modificado.

Tabela 6. Matriz do planejamento Box Behnken com valores codificados e, reais e as respectivas respostas

Exp.	pH	Vazão (mL min ⁻¹)	Volume do Eluente (mL)	ABS	TPC
1	- (2)	- (1)	0 (1,5)	0,346	132,71

2	+ (6)	- (1)	0 (1,5)	0,311	119,15
3	- (2)	+ (3)	0 (1,5)	0,222	84,65
4	+ (6)	+ (3)	0 (1,5)	0,232	88,53
5	- (2)	0 (2)	- (1)	0,241	92,02
6	+ (6)	0 (2)	- (1)	0,272	104,03
7	- (2)	0 (2)	+ (2)	0,253	96,67
8	+ (6)	0 (2)	+ (2)	0,303	116,05
9 (PC)	0 (4)	- (1)	- (1)	0,398	152,87
10 (PC)	0 (4)	+ (3)	- (1)	0,357	136,98
11 (PC)	0 (4)	- (1)	+ (2)	0,305	116,82
12(PC)	0 (4)	+ (3)	+ (2)	0,213	42,40
13(PC)	0 (4)	0 (2)	0 (1,5)	0,360	138,14
14(PC)	0 (4)	0 (2)	0 (1,5)	0,393	150,93
15PC)	0 (4)	0 (2)	0 (1,5)	0,350	134,26

Fonte: Autoria própria.

Os resultados do planejamento Box-Behnken foram analisados com base nos dados reais, resultando no modelo quadrático: Resposta=106,906+2,731(pH)-21,124(VA)-14,244(VE)+11,232(pH)²+6,193(VA)²+8,228(VE)²+4,360(pH)(VA)+1,841(pH)(VE)-14,632(VA)(VE).

De acordo com a análise de variância (ANOVA), ao nível de confiança de 95%, o termo independente, a vazão e volume do eluente linear e pH quadrático foram significativos

O modelo é exemplificado por meio das superfícies de resposta (**Figura 19**), nas quais são observadas condições máximas. Os valores críticos identificados são 3,9, 1,19 mL min⁻¹ e 1,46 mL. A análise de variância (ANOVA) revelou ausência de falta de ajuste, pois o Fcalculado (12,88) foi inferior ao F tabelado (19,16), significância na regressão, baixo erro puro e resíduos. O coeficiente de regressão R²= 0,74871 evidencia uma concordância de 74,87% substancial entre os valores observados e os previstos pelo modelo. Assim, o modelo oferece uma descrição ótima da área de estudo.

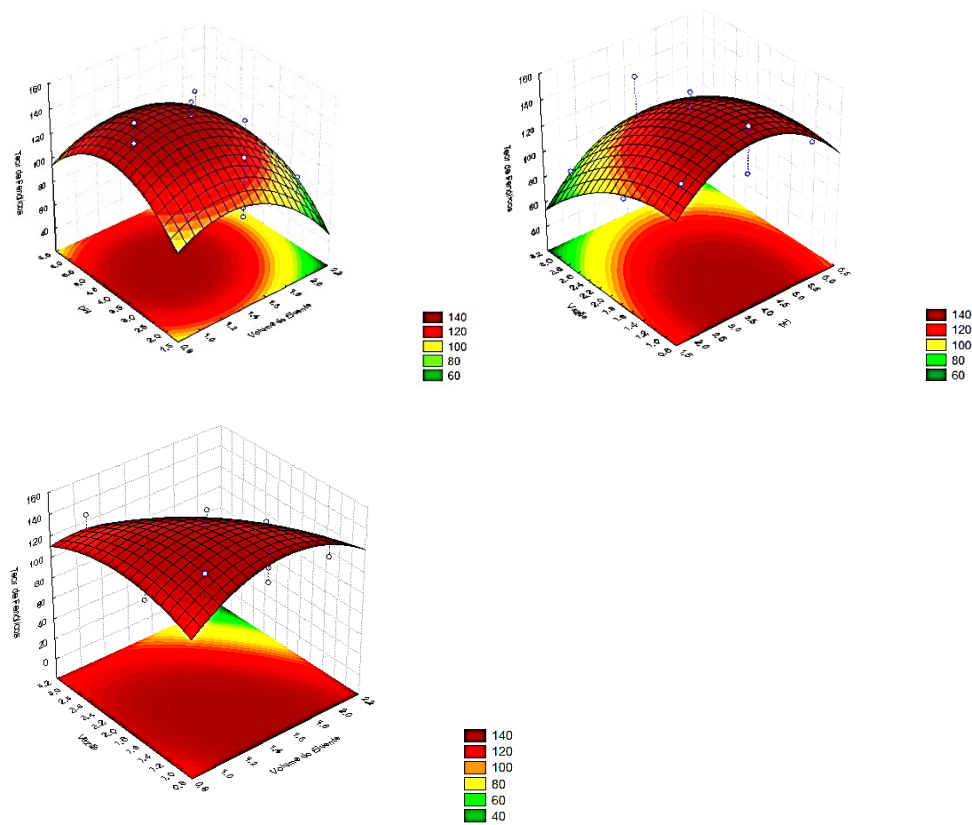


Figura 19. Superfícies de resposta para o planejamento Box Behnken.
Fonte: Autoria própria.

6.4 Parâmetros analíticos do método de espectrofotometria

A validação do método proposto foi realizada através de alguns parâmetros analíticos: linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão e exatidão.

6.4.1 Linearidade

A linearidade de um método é caracterizada pela sua capacidade de produzir resultados que variam diretamente com as concentrações do analito presente nas amostras, abrangendo uma faixa específica de concentração. Neste trabalho, o parâmetro foi realizado através da construção das curvas analíticas (Figura 20, 21 e 22) com cinco soluções padrões de ácido gálico na faixa de 0 a 10,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na curva com pré-concentração da solução de chá verde a seguinte equação foi obtida: $\text{Abs} = 0,1417 \cdot \text{Conc. de ácido gálico } (\mu\text{g mL}^{-1}) + 0,0259$ e $R^2 = 0,999$.

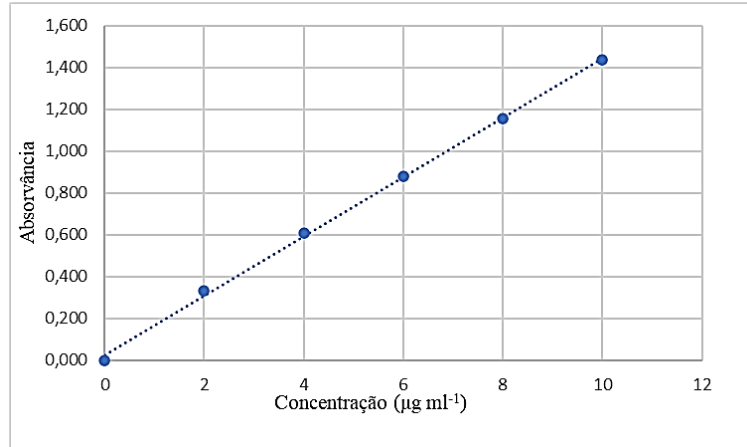


Figura 20: Curva de calibração de uma solução de 1,43 mg L⁻¹ de chá verde pré-concentrado.
Fonte: Autoria própria.

A equação obtida da curva da solução de chá verde sem pré-concentração foi: $Abs = 0,0421 * Conc. \text{ de ácido gálico } (\mu\text{g ml}^{-1}) + 0,0035$, $R^2 = 0,9918$, para soluções padrões de ácido gálico com concentrações entre 0 e 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

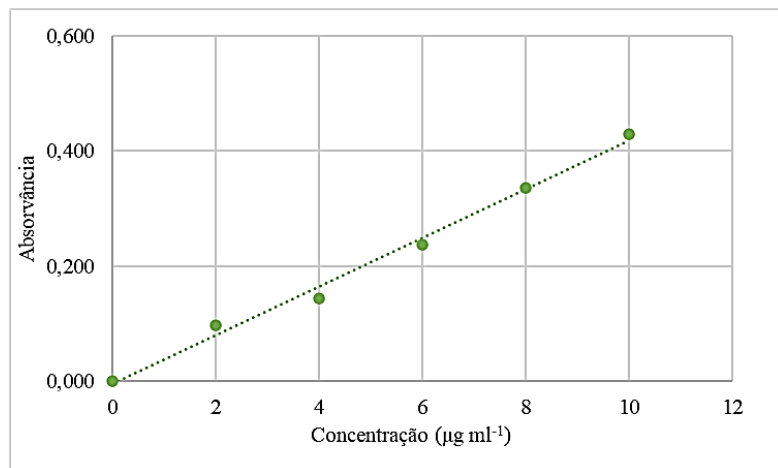


Figura 21: Curva de calibração preparada por uma solução de 1,43 mg L⁻¹ de chá verde sem pré-concentração.
Fonte: Autoria própria.

A equação obtida da curva do padrão de ácido gálico foi: $Abs = 0,0774 * Conc. \text{ de ácido gálico } (\mu\text{g ml}^{-1}) + 0,0036$ e $R^2 = 0,9983$.

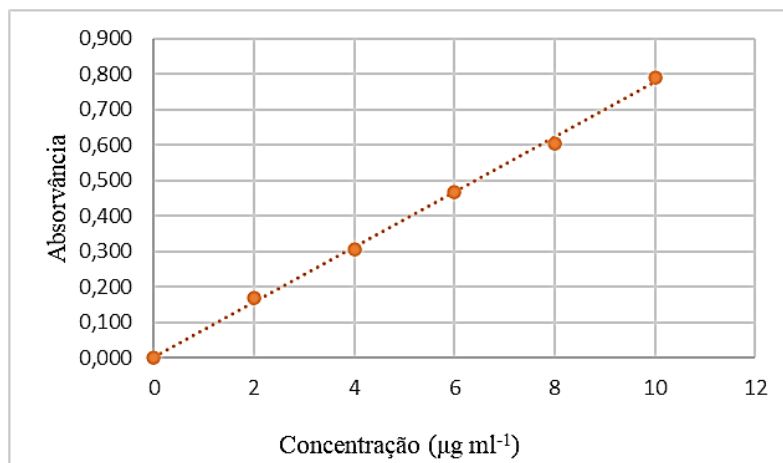


Figura 22: Curva de calibração do padrão de ácido gálico.
Fonte: Autoria própria.

Conforme as Figura 20, 21 e 22, pode-se afirmar que foram obtidos altos valores do coeficiente de correlação de Pearson, visto que, no § 3º do art. 27 da RESOLUÇÃO da ANVISA, o valor mínimo aceito para o coeficiente de determinação R^2 é de 0,990 (BRASIL, 2017). Desta forma, obteve-se um bom comportamento linear dentro da faixa de trabalho estudada.

6.3.2 Limite de detecção (LD) e Limite de quantificação (LQ)

O limite de detecção (LD) é a menor concentração que pode ser distinguida com um certo nível de confiança que se pode determinar (SKOOG, 2007). O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais adotadas.

Os limites de detecção e quantificação foram calculados através dos parâmetros da curva de calibração com nível de confiança de 95%, seguindo as recomendações da IUPAC 2002 (IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada; RIBEIRO et al., 2008).

Neste viés, os limites de detecção e quantificação deste trabalho foram respectivamente 29,23 e 43,82 mg 100g⁻¹.

6.3.3 Precisão

A precisão mede o grau de incerteza de um resultado analítico devido à dispersão das respostas instrumentais e o uso dos valores estimados da equação de calibração. A precisão pode ser expressa pelo desvio padrão relativo (ou coeficiente de variação), o qual é calculado pela divisão do desvio padrão de várias medidas em uma dada concentração, S_c ,

pelo valor médio da concentração determinada, X_c (geralmente expresso em percentagem), conforme a Equação 2.

$$\text{RSD\%} = (\text{Sc} / X_c) \times 100 \text{ (Equação 2)}$$

Desta forma, o desvio padrão relativo (RSD%) foi de 1,01% e foi obtido através de 10 determinações consecutivas de uma amostra de chá verde que continha $124,57 \pm 0,06$ mg 100g^{-1} , empregando a metodologia proposta.

Destaca-se o valor do método proposto é aceitável quando relacionado ao nível de concentração do analito na amostra, de acordo com os critérios sugeridos pela Association of Official Analytical Chemists (AOAC) de até 11% (AOAC, 2005).

6.3.4 Exatidão

A exatidão de um método pode ser definida como a diferença entre o valor obtido experimentalmente e o valor real do analito em uma determinada matriz (SKOOG, 2007).

Desso modo, a avaliação da exatidão neste trabalho foi através do método de adição e recuperação de analito na matriz. Portanto, para averiguar a exatidão foram adicionados três níveis de concentrações diferentes do padrão de ácido gálico e o chá verde como amostra de referência. Os resultados estão mostrados na Tabela 7.

Tabela 7. Resultados obtidos do teste de recuperação com adição de ácido gálico à amostra com concentrações de 2, 4 e 6 $\mu\text{g ml}^{-1}$ pela metodologia de Espectrofotometria.

Concentração adicionada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Concentração encontrada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Recuperação (%)
2,0	6,06 \pm 0,01	95,61
4,0	8,03 \pm 0,01	96,90
6,0	10,99 \pm 0,01	113,91

Fonte: Autoria própria.

Segundo a ANVISA (BRASIL, 2017), no método da adição de padrão, os valores aceitados são entre 80% a 120% de recuperação. Desta forma, os valores obtidos de recuperação da Tabela 7 foram ótimos.

6.3.5 Fator de enriquecimento (FE)

O Fator de Enriquecimento (FE) é um critério amplamente usado para avaliar sistemas de pré-concentração. O FE é definido como a razão entre a concentração do analito concentrado (C_c) e na amostra original (C_a). Mas, o FE não é tão direto para ser estimado em sistemas em linha, devido à complexidade em determinar a concentração real do analito concentrado (C_c) (LEMOS; BEZZERA, 2017).

Desso modo, o valor de FE aceito é calculado através da razão dos coeficientes angulares das curvas de calibração com e sem pré-concentração, conforme a Equação 3.

$$FE = b_p / b_s \text{ (Equação 3)}$$

Neste viés, o valor de FE foi de 3,37. Segundo Freitas (2007) é normal encontrar na literatura valores de fator de enriquecimento que chegam a 4. Mais vale ressaltar que para uma mini-coluna de massa tão pequena o resultado é satisfatório.

6.3.6 Eficiência de concentração (EC)

A Eficiência de Concentração (EC) é um dos parâmetros de avaliação do sistema de pré-concentração em fluxo. Embora o Fator de Enriquecimento (FE) seja fundamental, por si só não fornece informações completas sobre a eficiência. O valor alto de FE nem sempre implica em alta eficiência, podendo ser resultado de um longo período de pré-concentração (LEMOS; BEZZERA, 2017).

Dessa forma, EC é o produto de FE pela frequência f de amostragem por minuto. Conforme a Equação 4, expressa em horas.

$$EC = FE \times (f / 60) \text{ (Equação 4)}$$

O valor de EC foi de $0,11 \text{ min}^{-1}$. Segundo Lemos; Bezzera (2017) é típico encontrar em procedimentos batelada valores de eficiência de Concentração inferiores a 4, já que nesse procedimento, o equipamento para detecção só opera apenas após a etapa de pré-concentração. Desta forma, o valor obtido não foi eficiente, mais está dentro dos valores reportados na literatura diante da metodologia empregada para determinação de fenólicos totais.

6.3.7 Índice de consumo (IC)

O Índice de Consumo (IC) mede a eficiência da quantidade gasta da solução da amostra, relacionando o volume da amostra (V_a , em mL) para atingir FE unitário (LEMOS; BEZZERA, 2017), de acordo com a Equação 5.

$$IC = V_a / FE \text{ (Equação 5)}$$

A relevância dessa eficiência se torna significativa quando temos uma quantidade limitada da amostra. Portanto, o valor de IC foi de 2,97 mL.

6.3.8 Fator de transferência de fase (P)

O Fator de Transferência de Fase (P) quantifica a transferência do analito da fase da amostra para a fase concentrada. Logo, P é a razão entre a massa do analito na solução concentrada (m_c) e na amostra original (m_a) (LEMOS; BEZZERA, 2017), conforme a Equação 6.

$$P = m_c / m_a \text{ (Equação 6)}$$

O valor de P foi de 0,44. Embora tenha sido um valor baixo, a perda do analito não prejudicou a eficiência do sistema e nem implicou a perda da precisão, visto que a perda foi muito reprodutível para as amostras e padrões (LEMOS; BEZZERA, 2017).

6.3.9 Aplicação

O sistema foi aplicado para determinação de fenólicos totais em amostras de chá verde de dois lotes diferentes para três marcas disponíveis no comércio da cidade de Salvador-BA. Os resultados obtidos estão dispostos na Tabela 8, onde é possível observar que os percentuais de recuperações obtidos foram considerados satisfatórios (95 a 111%), o que comprova a eficiência do método.

Tabela 8. Resultados obtidos de fenólicos totais em amostras de chá verde, para n=3 com nível de confiança de (95%).

Amostra	Concentração adicionada ($\mu\text{g ml}^{-1}$)	Teor de de fenólicos totais encontrado ($\text{mg } 100\text{g}^{-1} \text{GAE}$)	Recuperação (%)
CVMCA3*	0	124,57 \pm 0,06	-
CVMCA3*	2	181,94 \pm 0,02	95,61

CVMCA5	0	106,74 ±0,07	-
CVMCA5	2	167,60 ±0,05	101,42
CVOBB2	0	209,84 ±0,03	-
CVOBB2	2	273,02 ±0,04	105,30
CVOBB3	0	174,96 ±0,06	-
CVOBB3	2	237,75 ±0,03	104,65
CVLIC3	0	159,07 ±0,05	-
CVLIC3	2	222,64 ±0,03	105,94
CVLIC2	0	205,19 ±0,02	-
CVLIC2	2	272,25 ±0,04	111,76

Fonte: Autoria própria.

Os teores de fénolicos variaram de 106,74 ±0,07 à 209,84 ±0,03, conforme a Tabela 8. Essas diferenças significativas nos teores analisados entre as marcas avaliadas tanto para os lotes das amostras em sachês estão fundamentada na mudança do perfil fenólico, essa variação se manifesta de acordo com a espécie, podendo estar associada à origem geográfica, às condições ambientais e à fabricação (COSTA et al., 2016; FOTAKIS et al., 2016).

Na literatura, os valores de ácidos fenólicos determinados por Horzic et al. (2009) para infusões de *Camellia sinensis* variaram de 1,07-37,66 mg L⁻¹ de ácido gálico. E Santos et al. (2018) encontraram um valor de 1,29 mg GAE.mL⁻¹. Como observado, os valores de compostos fenólicos totais encontrados na literatura estão dentro da faixa dos valores obtidos das amostras de chás da *Camellia sinensis* no presente trabalho.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS

O método desenvolvido mostrou-se viável, de fácil execução e baixo custo para a determinação de fenólicos totais em amostras comercializadas de chá verde, utilizando os nanocompósitos COFe₂O₄@SiO₂ como fases sólidas. As nanopartículas foram sintetizadas por método de coprecipitação e caracterizados pelas técnicas de Difração de Raios X, FTIR e MEV. O método proposto apresentou-se como uma estratégia eficaz, visto que os parâmetros analíticos teve bons níveis de precisão com desvio padrão relativo (RSD%) de 1,01% (conforme a, AOAC, 2005) e, exatidão (com recuperações de 95,61%, 96,90% e 113,91%), linearidade (de acordo a norma ANVISA; BRASIL, 2017) com os respectivos coeficientes de determinação obtidos na Figura 20, 21 e 22 (R²=0,999, R²=0,9918 e R²=0,9983) e limites de quantificação adequados as baixas concentrações dos analitos

existentes nas amostras (conforme, a IUPAC | União Internacional de Química Pura e Aplicada; RIBEIRO et al., 2008) tendo como valores de $LD=29,23 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$ e $LQ=.43,82 \text{ mg } 100\text{g}^{-1}$.

Na determinação de fenólicos totais, a aplicação das ferramentas quimiométricas, como o planejamento fatorial completo e a metodologia de superfície de resposta (Box-Behnken), além de reduzir significativamente o número de experimentos, foram eficientes no estudo. Através da otimização multivariada, foi viável analisar as variáveis que exerciam influência significativa no sistema, considerando também as interações entre elas, e obter as condições ótimas do sistema.

A aplicação do método foi mediante a teste de adição e recuperação do padrão de ácido gálico (com recuperações de 95 a 111%), o que confirmou a viabilidade e aplicabilidade do sistema em fluxo para extração e pré-concentração de amostras de chá verde para determinação de fenólicos totais. Os teores de fenólicos totais das amostras de chá verde ($106,74 \pm 0,07$ à $209,84 \pm 0,03$) corroboram com os valores reportados na literatura.

As sugestões para futuros trabalhos pode-se realizar a caracterização através do MET (Microscópio Eletrônico de Transmissão) como complemento para assim obter a morfologia intrínseca e o tamanho médio das nanopartículas. Outra sugestão é analisar tanto outras espécies de chás e os tipos, como bebidas fermentadas e a granel. Assim como, determinar os compostos bioativos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

AOAC. Official Methods of Analysis of AOAC International. **Association of Official Analysis Chemists International**, 2005.

ARTS, I. C., & HOLLMAN, P. C. (2005). Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 81(1), 317S-325S.

AZEVEDO, R. S. A., TEIXEIRA, B. S., SAUTHIER, M. C. S., SANTANA, M. V. A., DOS SANTOS, W. N. L., & SANTANA, D. A. (2019). Multivariate analysis of the composition of bioactive in tea of the species *Camellia sinensis*. **Food Chemistry**, v. 273, p. 39–44, 2019.

AZZOUZ, A. et al. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 347–369, 2018.

BARRETO, I. S. **Um método automático para extração em fase sólida magnética de Cd e Pb em águas e de Cd em óleo comestível e detecção por GF AAS.** [s.l.] Universidade Federal da Paraíba-UFPB, 2016.

BASÍLIO, I.J.L.D., BHATTACHARYYA, J., MOURA, R.K.P., AGRA, M.F., 2012. Application of UV/VIS spectrophotometry and multivariate analysis to characterization of the species of Solanum sect. Erythrotrichum CHILD. **Chem. Biodivers.** 9, 1114-1124.

BLANCO, A. R.; Os benefícios do chá verde (Camellia sinensis). Disponível em: <<http://jardimdeflores.com.br/sinergia/S08chaverde.htm>> Acesso em 16 de dez. de 2023.

BRASIL. **Guia para tratamento estatístico da validação analítica.** Agência Nacional de Vigilância Sanitária, v. 10, p. 1–19, 2017.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition**, v.56, n.11, p.317-333, 1988.

BONNIAUD, P. Nanoparticules, des méga-inconnues. **Revue des Maladies Respiratoires**, v. 24, n. 3, p. 104–107, 2007.

BOTTERO, J. Y. et al. Nanoparticules de métaux et d'oxydes de métaux manufacturées: propriétés et mécanismes perturbateurs de l'activité biologique dans les écosystèmes. **Comptes Rendus - Geoscience**, v. 343, n. 2–3, p. 168–176, 2011.

CALDERILLA, C. et al. Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 108, p. 370–380, nov. 2018.

CAMEL, V.; Solid phase extraction of trace elements – Review. **Spectrochimica Acta Part B.**, v. 58, p. 1177-1233, 2003.

CHUNG, I.-M. et al. Effect of processing, fermentation, and aging treatment to content and profile of phenolic compounds in soybean seed, soy curd and soy paste. **Food chemistry**, v. 127, n. 3, p. 960–967, 2011.

CHYU, K. Y., BABBIDGE, S. M., ZHAO, X., DANDILLAYA, R., RIETVELD, A. G., YANO, J., ... & SHAH, P. K. (2004). Differential effects of green tea-derived catechin on developing versus established atherosclerosis in apolipoprotein E-null mice. **Circulation**, 109(20), 2448-2453.

COLLINS, Carol H e BRAGA, Gilberto Leite e BONATO, Pierina Sueli. **Introdução a métodos cromatográficos.** Campinas: UNICAMP, 1995.

COSTA G, GRANGEIA H, FIGUEIRINHA A, FIGUEIREDO IV & BATISTA LFC. 2004. **Validação em métodos cromatográficos e material no teor de polifenóis e atividade antioxidante de Cymbopogon citratus infusão.** Ind Crops Prod 83: 738-745.

DANCHANA, KAEWTA ; PHANSI, PIYAWAN ; T. DE SOUZA, CHEILANE et al. Spectrophotometric system based on a device created by 3D printing for the accommodation of a webcam chamber as a detection system. In: **Talanta**. 2020 ; Vol. 206.

DEGANI, A. L. G., CASS, Q. B., VIEIRA, P. C. (1998) “Cromatografia um breve ensaio.” **Química Nova na Escola**, nº 7.

DUARTE, M. R.; MENARIM, D. O. Morfodiagnose da anatomia foliar e caulinar de *Camellia sinensis* (L.) Kuntze, Theaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 4, p. 545-551, 2006.

DUHAN, J. S. *et al.* Nanotechnology: The new perspective in precision agriculture. **Biotechnology Reports**, v. 15, p. 11-23, 2017.

EDZIRI, H. L. *et al.* Antioxidant, antibacterial, and antiviral effects of *Lactuca sativa* extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 1, p. 1182–1185, 2011.

FECHTAL, M. Étude comparative de la teneur en tanin de l'écorce des eucalyptus : *E. Camaldulensis*, *E. Gomphocephala* et *E. Sideroxyylon*. **An. Rech. For. Maroc**. 1404(24) :213-238. 1984.

FERREIRA, R. V. **Síntese e caracterização de magnetolipossomas termossensíveis contendo fármacos antitumorais encapsulados**. 2013. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, Belo Horizonte, 2013.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). Emerging trends in tea consumption: informing a generic promotion process.[S.l: s.n.], 2018. Disponível em: <www.fao.org/3/MW522EN/mw522en.pdf>. Acesso em: 13 de dez. 2023.

FOTAKIS C ET AL. 2016. Perfis metabólicos e antioxidantes de infusões e decocções de ervas. **Food Chem** 211: 963-971.

FREITAS, P.A.M. (2007). Estudos de adsorção de di-2-piridil cetona saliciloilhidrazona (DPKSH) em resinas Amberlite XAD-2 e XAD-7. **Extração de íons cobre em fase sólida envolvendo a XAD-7 modificada com DPKSH**. Tese de Doutorado, 1, 1-164.

FUJIKI, H., OKUDA, T., & HARA, Y. (1992). Anticarcinogenic effects of (-)-epigallocatechin gallate. In **Preventive Medicine** (Vol. 21, No. 4, pp. 503-509). Academic Press.

GRAHAM, H. N. (1992). Green tea composition, consumption, and polyphenol chemistry. **Preventive Medicine**, 21(3), 334-350.

HALLIWELL, B. Are polyphenols antioxidants or pro-oxidants? What do we learn from cell culture and in vivo studies? **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 476, p.107–112, 2008.

HERTOG, G. L. M. *et al.* Dietary antioxidant flavonoids and risk of coronary heart disease : the Zutphen Elderly Study. **The Lancet**, v. 342, p. 1007–1011, 1993

HIGDON JV, FREI B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Crit Rev Food Sci Nutr**. 2003, 43: 89-143.

HOFF, J. E.; SINGLETON, K. I.; LAFAYETTE, W. A METHOD FOR DETERMINATION OF TANNINS IN FOODS BY MEANS OF IMMOBILIZED PROTEIN THE FOLLOWING METHOD distinguishes. **Jornaul of Food Science**, v. 42, n. 6, p. 1566–1569, 1977.

HORZIC, D.; KOMES, DRAZENKA, K.; BELSCAK, A.; GANIC, K. K.; IVEKOVIC, D.; KARLOVIC, D. The composition of polyphenols and methylxanthines in teas and herbal infusions. **Food Chemistry**, v. 115, p. 441-448, 2009.

HUA, K. et al. “Nanopartículas de Fe₃O₄ modificadas com poli(calixareno iônico) como novo sorvente para extração de flavonóides em suco de frutas e chá verde.” **Revista Microquímica** 143 (2018): 39–46.

HURSEL, R., VIECHTBAUER, W., & WESTERTERP-PLANTENGA, M. S. (2009). The effects of green tea on weight loss and weight maintenance: a meta-analysis. **International Journal of Obesity**, 33(9), 956-961.

ILAYARAJA, N., LIKHITH, K. R., BABU, G.R.S., & KHANUM, F. (2015). Optimisation of extraction of bioactive compounds from *Feronia limonia* (wood apple) fruit using response surface methodology (RSM). **Food Chemistry**, 173, 348-354.

IUPAC | **União Internacional de Química Pura e Aplicada**. Disponível em: <<https://iupac.org/project/2002-031-1-500/>>. Acesso em: 19 set. 2023.

JOLIVET, J. P.; TRONC, É.; CHANÉAC, C. Synthesis of iron oxide-based magnetic nanomaterials and composites. **Comptes Rendus Chimie**, v. 5, n. 10, p. 659–664, 2002.

JUNIOR, M. A. S. **Obtenção e caracterização de nanopartículas magnéticas inseridas em materiais carbonosos porosos a partir da decomposição do pentacarbonil ferro**. [s.l.] Universidade Federal do Espírito Santo-UFES, 2009.

KHOKHAR, S., MAGNUSDOTTIR, S. G. M., & SAMUELSEN, A. B. (2002). Catechin contents of foods commonly consumed in the Netherlands. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(17), 5073-5077.

KHOT, L. R. et al. Applications of nanomaterials in agricultural production and crop protection: A Review. **Crop Protection**, v. 35, p. 64-70, 2012.

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS, J., & NOWAK, P. (2015). Protective effects of gallic acid and its combination with lipoic acid against sodium fluoride-induced oxidative stress in murine liver. **Biological Trace Element Research**, 168(2), 452-459.

LEMOS, V. A.; BEZERRA, Marcos Almeida . **Análises químicas por sistemas de injeção em fluxo**. 01. ed. Vitória da Conquista: Edições Uesb, 2017. v. 01. 216p.

LI, C.; FU, R.; YU, C.; LI, Z.; GUAN, H.; HU, D.; ZHAO, D.; LU, L. Silver nanoparticle/chitosan oligosaccharide/poly (vinyl alcohol) nanofibers as wound dressings: a preclinical study. **Int J Nanomedicine**, v. 8, n. 1, p. 4131-45, 2013.

LIN, Y. L., CHANG, Y. C., YANG, D. J., TZANG, B. S., CHEN, Y. C., & LIU, Y. S. (2014). Gallic acid reduces cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human cervical cancer cells. **Oncology Letters**, 7(5), 1749-1755.

LORENZI, H; MATOS, F.J.A.2002. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum.

MAMANI, J. B. **Estrutura e propriedades de nanopartículas preparadas via sol-gel**. [s.l.] Universidade de São Paulo - USP, 2009.

MANACH, C. et al. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, n. 5, p. 727–747, 2004.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos Analíticos Para Identificação De Antocianinas Presentes Em Extratos Naturais. **Ars Pharmaceutica**, v. 56, n. 4, p. 193–200, 2015.

MARCUCCI, M. C. et al. Accessible methodologies for quantification of flavonoids and total phenols in propolis. **Revista Virtual de Química**, v. 13, n. 1, p. 61–73, 2021.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Cafeína: Revisão sobre métodos de análise. **Química Nova**, v. 30, p. 99-105, 2007.

MATTILA P, ASTOLA J, KUMPULAINEN J. Determinação de flavonoides em material vegetal por HPLC com detecções de diodos e eletro-arrays. **J Agric Food Chem**. 2000 Dez; 48(12):5834-41.

METCHE, M. Tanins, nature et propriétés. **Groupe Polyphénols 10**: 11-32. 1980.

NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **J Chromatogr A** 2004; 1054 (1/2): 95-111.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on astringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 371-378, 1998.

PÉREZ-DE-LUQUE, A.; RUBIALES, D. Nanotechnology for parasitic plant control. **Pest Management Science**, v. 65, n. 5, p. 540-545, 2009.

PIRES J., TORRES P.B., SANTOS D.Y.A.C., CHOW F. 2017. **Ensaio em microplaca de substâncias redutoras pelo método do Folin-Ciocalteu para extratos de algas**. Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo. ISBN 978-85-85658-70-0.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT**, v. 40, p. 1–11, 2007.

PORTO, P. A. L. S. **Estudo da atividade antioxidante de catequinas e procianinas oligoméricas**. Dissertação de mestrado. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. Departamento de Química. 2002.

RAMA, M. J. R.; MEDINA, A. R.; DIAZ, A. M. New contributions to the field of bead-injection spectroscopy-flow-injection analysis: determination of cobalt. **Anal. Bioanal. Chem.**, v. 376, n. 4, 527, 2003.

RAMIMOGHADAM, Donya.; BAGHERI, Samira.; HAMID, Sharifah Bee Abd. Biotemplated Synthesis of Anatase Titanium Dioxide Nanoparticles via Lignocellulosic Waste Material. **BioMed Research International**, p. 1-7, 2014.

RIBEIRO, F. A. DE L. et al. **Planilha de validação: uma nova ferramenta para estimar figuras de mérito na validação de métodos analíticos univariados**. *Quimica nova*, v. 31, n.1, p. 164–171, 2008.

RÍOS, Á.; ZOUGAGH, M. Recent advances in magnetic nanomaterials for improving analytical processes. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 84, p. 72–83, 2016.

RUAN, H. D. et al. "Infrared spectroscopy of goethite dehydroxylation. II. Effect of aluminium substitution on the behaviour of hydroxyl units. " **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 58.3 (2002): 479-491.

SAKIHAMA, Y., COHEN, M. F., GRACE, S. C., & YAMASAKI, H. (2002). Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. **Toxicology**, 177(1), 67-80.

SANTANA, Débora de Andrade. **Análise de compostos fenólicos e atividades antioxidante em cachaças baianas**. 2014. 162 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, 2014.

SANTOS JS, DEOLINDO CTP, HOFFMANN JF, CHAVES FC, DO PRADO-SILVA L, SANT'ANA AS, et al. Optimized *Camellia sinensis* var. *sinensis*, *Ilex paraguariensis*, and *Aspalathus linearis* blend presents high antioxidant and antiproliferative activities in a beverage model. **Food Chem.** 2018;254:348-58.

SAWYER, D. T.; SOBKOWIAK, A.; ROBERTS Jr., J. L. **Electrochemistry for Chemists**. 2nd Ed. New York: John Wiley & Sons, 1995. ISBN: 0471594687.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods , beverages and spices : Antioxidant activity and health effects –. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SILVA, A.; SILVA, V.; IGREJAS, G. et al. Phenolic compounds classification and their distribution in winemaking by-products. **European Food Research and Technology**. v. 249. p. 207-239, 2023.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R.; **Fundamentos de Química Analítica**. 8ª ed. São Paulo: Thomson Learning, 2007.

SKOOG, D. A.; WEST, D. M.; HOLLER, F. J.; CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8.ed. São Paulo – SP: Cengage Learning, cap. 24-26, 2010. Disponível

em:https://www.inesul.edu.br/site/documentos/QUIMICA_ANALITICA_SKOOG.pdf. Acesso em: 13 jul. 2023.

SMITH, A. Effects of caffeine on human behaviour. **Food and Chemical Toxicology**, England, v. 40, n. 9, p. 1243-1255, 2002.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-JR., G.M.; AYRES, M.C.C.; COSTA, C.L.S.; ARAÚJO, D.S.; CAVALCANTE, L.C.D.; BARROS, E.D.S.; ARAÚJO, P.B.M.; BRANDÃO, M.S.; CHAVES, M.H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30, n. 2, p.351-355, 2007.

TRUZZI, F.; TIBALDI, C.; ZHANG, Y. et al. An overview on dietary polyphenols and their biopharmaceutical classification system (Bcs). **International Journal of Molecular Sciences**. v. 22, p. 1-23, 2021.

VALENZUELA, A., B. El consumo te y la salud: características y propiedades benéficas de esta bebida milenaria. **Revista Chilena de Nutrición, Santiago**, v. 31, n. 2, p. 72-82, ago. 2004.

WANG, K.; LIU, F.; LIU, Z.; HUANG, J.; XU, Z.; LI, Y.; CHEN, J.; GONG, Y.; YANG, X. Analysis of chemical components in oolong tea in relation to perceived quality. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p.913– 920, 2010.

XIE, L. et al. **Application of functionalized magnetic nanoparticles in sample preparation** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, p. 1–13, 2014.

ZIEGLER-BOROWSKA, M.; CHEŁMINIAK, D.; SIÓDMIĄK, T. *et al.* Synthesis of new chitosan coated magnetic nanoparticles with surface modified with long-distanced amino groups as a support for bioligands binding. **Materials Letters**, v. 132, p. 63–65, 2014.