

Cristine Durante de Souza Silveira

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA BASEADA EM
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM
E SEM REFRIGERAÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E
PESTICIDAS EM COURO**

Tese de doutorado desenvolvida no Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito para a obtenção do título de Doutora em Química Analítica.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek
Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Soldi

**Florianópolis
2012**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Silveira, Cristine Durante de Souza

Desenvolvimento de metodologia analítica baseada em microextração em fase sólida com e sem refrigeração para determinação de fenóis e pesticidas em couro [tese] / Cristine Durante de Souza Silveira ; orientador, Eduardo Carasek ; co-orientador, Valdir Soldi. - Florianópolis, SC, 2012.

121 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas. Programa de Pós-Graduação em Química.

Inclui referências

1. Química. 2. Preparo de amostra. 3. Couro. 4. Pesticidas. 5. Clorofenóis. I. Carasek, Eduardo. II. Soldi, Valdir. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Cristine Durante de Souza Silveira

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA
ANALÍTICA BASEADA EM
MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM
E SEM REFRIGERAÇÃO PARA
DETERMINAÇÃO DE FENÓIS E
PESTICIDAS EM COURO**

Esta tese foi julgada e aprovada para obtenção do título de **Doutora em Química** no **Programa de Pós-Graduação em Química** da Universidade Federal de Santa Catarina

Florianópolis, 05 de dezembro de 2012.

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Carasek
Orientador

Prof. Dr. Valdir Soldi
Co-orientador

Prof. Dr. Renato Zanella
(DQ-UFSM)

Prof.^a Dr.^a Janaína Bortoluzzi
(IQB-UFAL)

Prof. Dr. Augusto Madureira

Prof.^a Dr.^a Cristiane Jost

Prof.^a Dr.^a Marilda Fernandes

Ao meu marido Jair,
e aos meus pais Celso e Analíria

AGRADECIMENTOS

Ao professor Eduardo Carasek, pela orientação, incentivo e suas valiosas contribuições e sugestões.

Ao professor Valdir Soldi, pela co-orientação, e por me oportunizar o trabalho com a matriz couro.

À minha mãe Analíria e meu pai Celso, pelos ensinamentos, incentivos, amizade, respeito, amor e por ver em mim o sonho que almejavam como grandiosos educadores que são.

Às minhas irmãs Clarisse e Heloísa, por sempre me incentivarem e pelos seus conselhos grandiosos.

Ao meu marido Jair, pela paciência, apoio, carinho, amizade e, sobretudo pela dedicação e força de vontade de retornar a Florianópolis para que eu pudesse cursar o doutorado.

As minhas amigas, Roberta, Ana Cristina e Franciani pelo incentivo de quando tudo parecia dar errado e pela valiosa amizade.

Ao amigo Edmar, pelos ensinamentos repassados e pela parceria neste trabalho.

Aos colegas do Laboratório 209 (Silvane, Renata, Ivan, Adriana, Yasmin, Jeferson, Gabriela, Giuliana, Josias e Vanessa) pelo companheirismo, troca de conhecimentos e pela hora do cafezinho.

As amigas da E.B.M. Osmar Cunha (Raquel, Suzana, Marivete, Rosane e Lidiany) pela amizade e conselhos.

Aos colegas do grupo do laboratório de ciências da Prefeitura Municipal de Florianópolis pela convivência e apoio.

Aos colegas da Vigilância Sanitária de Santa Catarina, em especial a Gerência em Saúde Ambiental, pela convivência diária.

A todos os professores do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina pelos ensinamentos repassados.

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pela bolsa de doutorado concedida.

"Existe uma coisa que uma longa existência me ensinou: toda a nossa ciência, comparada à realidade, é primitiva e inocente; e, portanto, é o que temos de mais valioso."

Albert Einstein

RESUMO

Os métodos de microextração em fase sólida (SPME) e de microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (CF-SPME) foram utilizados neste trabalho para o desenvolvimento de metodologias analíticas para a determinação de fenóis e pesticidas na matriz couro. Estratégias de otimização foram utilizadas para estabelecer as condições ótimas de extração e derivatização. A primeira metodologia desenvolvida se refere à utilização da técnica de SPME para determinação de 16 fenóis em couro utilizando uma fibra comercial de poliacrilato (PA) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS). Para a metodologia desenvolvida, obteve-se um limite de detecção (LOD) na faixa de 0,03 a 0,20 ng g⁻¹ com desvio padrão relativo (RSD) ≤ 10,3% (n=6), com recuperação entre de 90,0 e 107,2%. A segunda metodologia utiliza a CF-SPME para determinação de 8 fenóis em couro associada com a derivatização *on fiber* com bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) e detecção por GC/MS. A fase extratora utilizada foi uma membrana oca de PDMS. Neste estudo obteve-se faixa linear entre 8,92 e 80 µg g⁻¹ para os fenóis e LOD variando de 1,03 a 2,68 µg g⁻¹ com RSD ≤ 15,5% (n=5), com recuperação na faixa de 64,6 a 92,3%. A terceira e última metodologia desenvolvida foi para quantificação de 11 pesticidas organoclorados em couro utilizando a técnica de SPME (fibra comercial de PDMS/DVB) e GC/MS. Para a metodologia desenvolvida, obteve-se um LOD na faixa de 3,28 a 10,98 ng g⁻¹ com RSD ≤ 14,3% (n=5), com recuperação entre 93,7 e 107,3%. Todas as metodologias mostraram-se adequadas para análise de fenóis e pesticidas em couro.

Palavras Chave: SPME, CF-SPME, preparo de amostras, fenóis e pesticidas.

ABSTRACT

Solid phase microextraction (SPME) and cold fiber solid phase microextraction (CF-SPME) methods were used in this work for the development of analytical methods for the detection of phenols and pesticides in leather matrices. Optimization strategies were used to establish the derivatization and extraction optimal conditions. The first developed method refers to the use of SPME technique for the determination of 16 phenols in leather using a commercial PA fiber and gas chromatography mass spectrometry (GC/MS). For the developed method, a detection limit in the range 0.03 to 0.2 ng g⁻¹ was obtained, with a relative standard deviation (RSD) ≤ 10.23% (n=6), with recovery between 90.0 and 107.2%. The second method uses CF-SPME for the determination of 8 phenols in leather associated with on fiber derivatization, using trimethylsilyltrifluoroacetamide (BSTFA) and detection by GC/MS. The extraction phase was a PDMS hollow membrane. In this study a linear range between 8.92 and 80.00 µg g⁻¹ was obtained for phenols with a detection limit ranging from 1.03 to 2.68 µg g⁻¹ with RSD ≤ 15.48% (n=5), with recovery into the range 64.6 to 92.3%. The third and last method developed was the quantitation of 11 organochlorinated pesticides in leather using the SPME technique (commercial PDMS/DVB fiber) and GC/MS. For the developed method, a detection limit in the range of 3.28 to 10.98 ng g⁻¹ was obtained, with RSD ≤ 14.25% (n=5), with recovery between 93.7 and 107.3%. All the methods proved adequate for analysis of phenols and pesticides in leather.

Key words: SPME, CF-SPME, sample preparation, phenols and pesticides.

LISTA DE ABREVIATURAS

- BHC – hexaclorobenzeno
BSTFA – bis(trimetilsilil)trifluoracetamida
CAR – carboxen
CF-SPME – Microextração em Fase Sólida com Recobrimento Internamente Refrigerado (*cold fiber - solid Phase microextraction*)
CICB – Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil
DBO – demanda bioquímica de oxigênio
DDD – diclorodifenildicloroetano
DDE – diclorodifenildicloroetileno
DDT – diclorodifeniltricloroetano
DQO – demanda química de oxigênio
DVB – divinilbenzeno
EF – ésteres de ftalatos
GC – Cromatografia Gasosa (*gas chromatography*)
GC/MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas (*gas chromatography mass spectrometry*)
HCH – hexaclorocicloexanos
HPA – hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (*high performance liquid chromatography*)
HS – *headspace*
LOD – limite de detecção
LOQ – limite de quantificação
LLE – Extração Líquido-Líquido (*liquid-liquid extraction*)
LPME – Microextração em Fase Líquida (*liquid phase microextraction*)
MEPS – Microextração por Sorvente Empacotado (*microextraction phase sorbent*)
PA – poliacrilato
PDMS – polidimetilsiloxano
PLE - Extração Líquida Pressurizada (*pressurized liquid extraction*)
rpm – rotação por minuto
RSD – desvio padrão relativo (*relative standard deviation*)
SIM – monitoramento de íons selecionados (*selected ion monitoring*)
SAX – trocador de ânions forte
SBSE – Extração Sortiva em Barras de Agitação (*stir bar sorptive extraction*)
SFE – Extração com Fluido Supercrítico (*supercritical fluid extraction*)

SCX - trocador de cátions forte

SPME – Microextração em Fase Sólida (*solid phase microextraction*)

SPE – Extração em Fase Sólida (*solid phase extraction*)

t – tempo

t_R - tempo de retenção

W – Watt

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema de destilação assistida por microondas com enriquecimento *on-line* SPE, adaptado de Ganeshjeevan *et al.*¹⁷27
- Figura 2.** Representação esquemática da barra de agitação de SBSE.....34
- Figura 3.** Representação esquemática do sistema de extração LPME.....35
- Figura 4.** Microserringa MEPS e na ampliação microcoluna com sorvente empacotado.....36
- Figura 5.** Dispositivo de SPME internamente refrigerado, adaptado de Chen e Pawliszyn.⁶¹48
- Figura 6.** Sistema de SPME internamente refrigerado, adaptado de Chen e Pawliszyn.⁶¹50
- Figura 7.** Sistema de CF-SPME com resfriamento termoelétrico, adaptado de Haddadi *et al.*⁷³61
- Figura 8.** Sistema de refrigeração do *headspace*, adaptado de Chia *et al.*⁷⁴62
- Figura 9.** Dispositivo de CF-SPME, adaptado de Menezes e Cardeal.⁷⁵63
- Figura 10.** Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} na otimização das variáveis e suas interações na determinação dos fenóis em couro. (1) Co-solvente, (2) Força iônica, (3) Tempo de extração, (4) Temperatura de extração, (5) Agente derivatizador.....74
- Figura 11.** Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central para três variáveis (temperatura de extração, tempo de extração e força iônica) na determinação dos fenóis em couro.....75

Figura 12. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo 2^3 na otimização das variáveis e suas interações na determinação dos fenóis em couro. (1) Temperatura da fibra, (2) Tempo de extração, (3) Temperatura da amostra.....89

Figura 13. Gráfico do estudo univariado da temperatura da fibra, de 10 a 50 °C.....90

Figura 14. Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento Doehlert para otimização da derivatização dos fenóis, variáveis (volume de BSTFA, tempo de exposição ao BSTFA).....91

Figura 15. Cromatogramas obtidos com três diferentes fibras para os onze pesticidas organoclorados estudados (1 = α -BHC, t_R = 15,7 min; 2 = β -BHC, t_R = 16,9 min; 3 = heptacloro, t_R = 19,6 min; 4 = andrin, t_R = 20,8 min; 5 = heptacloro epoxide, t_R = 22,3 min; 6 = endossulfan I, t_R = 23,7 min; 7 = DDE, t_R = 24,7 min; 8 = dieldrin, t_R = 24,8 min; 9 = DDD, t_R = 26,5 min; 10 = DDT, t_R = 28,1 min; 11 = metoxocloro, t_R = 30,7 min) t_R = tempo de retenção.....99

Figura 16. Estudo da força iônica na presença de NaCl e na ausência de NaCl (1 = α -BHC, 2 = β -BHC, 3 = heptacloro, 4 = andrin, 5 = heptacloro epoxide, 6 = endossulfan I, 7 = DDE, 8 = dieldrin, 9 = DDD, 10 = DDT, 11 = metoxocloro).....100

Figura 17. Superfície de resposta obtida por um planejamento Doehlert para duas variáveis na análise de pesticidas em couro.....101

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Principais produtos químicos utilizados na indústria do couro, adaptado de Pacheco.⁵23
- Tabela 2.** Limite de detecção e recuperação para os 11 pesticidas estudados, adaptada de Font e Marsal.¹⁹28
- Tabela 3.** Propriedades físico-químicas dos clorofenóis.....30
- Tabela 4.** Valores de mínimo, máximo e ponto central dos parâmetros avaliados.....70
- Tabela 5.** Experimentos requeridos em um planejamento fatorial fracionário em dois níveis (2^{5-1}) com cinco variáveis.....71
- Tabela 6.** Planejamento composto central (2^3) para as variáveis: temperatura de extração, tempo e força iônicos, com seus respectivos valores usados.....72
- Tabela 7.** Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação e limites de detecção para otimização dos fenóis em amostra de couro...78
- Tabela 8.** Estudo da repetibilidade dos clorofenóis 800 ng g^{-1} e do 2-fenilfenol 1325 ng g^{-1} em *splitless* e com a razão de *split* 1/60 para os clorofenóis $80 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e para o 2-fenilfenol $85 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de couro.....79
- Tabela 9.** Estudo da recuperação para os fenóis em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.....80
- Tabela 10.** Valores de mínimo, máximo e ponto central dos parâmetros avaliados.....85
- Tabela 11.** Experimentos requeridos em um planejamento fatorial completo em dois níveis (2^3) com três variáveis.....86

Tabela 12. Ensaios realizados no planejamento Doehlert para duas variáveis, volume de BSTFA estudada em quatro níveis e tempo de exposição estudada em cinco níveis.....	87
Tabela 13. Extrações sucessivas dos fenóis em couro.....	92
Tabela 14. Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação, repetibilidade e limites de detecção para otimização dos fenóis em amostra de couro.....	93
Tabela 15. Estudo da recuperação para os fenóis em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.....	94
Tabela 16. Ensaios realizados no planejamento Doehlert para duas variáveis, temperatura e tempo de extração, ambas estudadas em cinco níveis.....	98
Tabela 17. Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação, repetibilidade e limites de detecção para otimização dos pesticidas em amostra de couro.....	102
Tabela 18. Estudo da recuperação para os pesticidas em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.....	103

SUMÁRIO

JUSTIFICATIVA	25
CAPÍTULO I	27
INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	27
1.1 MATRIZ COURO.....	27
1.2 ASPECTOS GERAIS DA UTILIZAÇÃO DE PRODUTOS QUÍMICOS.....	35
1.2.1 <i>Fenóis e Clorofenóis</i>	35
1.2.2 <i>Pesticidas organoclorados</i>	37
1.3 TÉCNICAS CLÁSSICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS SÓLIDAS.....	38
1.4 TÉCNICAS MODERNAS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	39
1.4.1 <i>Extração Sortiva em barras de agitação (SBSE)</i>	39
1.4.2 <i>Microextração em fase líquida (LPME)</i>	40
1.4.3 <i>Microextração por sorvente empacotado (MEPS)</i>	41
1.4.4 <i>Microextração em fase sólida (SPME)</i>	42
1.4.4.1 Aplicações de SPME.....	48
1.4.5 <i>Microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (CF-SPME)</i>	54
1.4.5.1 Aplicações da CF-SPME.....	59
1.5 DERIVATIZAÇÃO.....	70
CAPÍTULO II	71
OBJETIVOS	71
2.1 OBJETIVO GERAL.....	71
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	71
CAPÍTULO III	73
APLICAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE CLOROFENÓIS EM COURO	73
3.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	73
3.1.1 <i>Reagentes</i>	73
3.1.2 <i>Instrumentação</i>	74
3.1.3 <i>Procedimento SPME</i>	74
3.1.4 <i>Amostras</i>	75
3.1.5 <i>Otimização do método de extração dos fenóis</i>	75
3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	78
3.2.1 <i>Otimização multivariada</i>	78
3.2.1.1 <i>Planejamento Fatorial Fracionário (2^{5-1})</i>	78
3.2.1.2 <i>Planejamento Composto Central</i>	81

3.2.2 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	83
3.2.2.1 <i>Faixa linear e limite de detecção</i>	83
3.2.2.2 <i>Repetibilidade</i>	84
3.2.2.3 <i>Análises das amostras de couro e Recuperação</i>	85
3.1 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	86
CAPÍTULO IV.....	89
EXTRAÇÃO E DERIVATIZAÇÃO ON-FIBER DE CLOROFENÓIS EM COURO POR MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA COM RECOBRIMENTO INTERNAMENTE REFRIGERADO.....	89
4.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	89
4.1.1 <i>Reagentes</i>	89
4.1.2 <i>Instrumentação</i>	89
4.1.3 <i>Amostras</i>	90
4.1.4 <i>Preparo da amostra</i>	90
4.1.5 <i>Estratégias de otimização</i>	91
4.1.6 <i>Extração quantitativa dos fenóis em couro</i>	93
4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	93
4.2.1 <i>Otimização do procedimento de CF-SPME</i>	94
4.2.1.1 <i>Planejamento Fatorial Completo</i>	94
4.2.1.2 <i>Planejamento Univariado</i>	95
4.2.2 <i>Otimização do procedimento de derivatização</i>	96
4.2.3 <i>Extração quantitativa dos fenóis em couro</i>	97
4.2.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA.....	98
4.2.4.1 <i>Faixa linear, limite de detecção e repetibilidade</i>	98
4.2.4.2 <i>Análise das amostras e recuperação</i>	99
4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	100
CAPÍTULO V.....	101
APLICAÇÃO DE MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA À ESPECTROMETRIA DE MASSAS PARA DETERMINAÇÃO DE PESTICIDAS EM COURO.....	101
5.1 PARTE EXPERIMENTAL.....	101
5.1.1 <i>Reagentes</i>	101
5.1.2 <i>Instrumentação</i>	101
5.1.3 <i>Procedimento SPME</i>	102
5.1.4 <i>Amostras</i>	102
5.1.5 <i>Preparo das amostras</i>	102
5.1.6 <i>Seleção da fibra de extração</i>	103

<i>5.1.7 Estudo da influência da força iônica</i>	103
<i>5.1.8 Otimização das condições de extração</i>	103
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	104
<i>5.2.1 Seleção da fibra de extração</i>	104
<i>5.2.2 Estudo da influência da força iônica</i>	105
<i>5.2.3 Planejamento Doehlert</i>	106
5.2.4 VALIDAÇÃO DA METODOLOGIA	107
<i>5.2.4.1 Faixa linear, limite de detecção e repetibilidade</i>	107
<i>5.2.4.2 Amostras analisadas e Recuperação</i>	108
5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS	109
CAPÍTULO VI	111
CONCLUSÃO FINAL	111
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	113

JUSTIFICATIVA

Uma das características da indústria mundial de couro é o deslocamento de sua produção de países desenvolvidos, tradicionais produtores, para países em desenvolvimento, principalmente aqueles localizados na Ásia e na América do Sul, com destaque para China, Índia, Coréia do Sul, Brasil e Argentina. O deslocamento da produção de couro para países em desenvolvimento tem sido estimulado pela maior disponibilidade de matéria-prima, pela procura de mão-de-obra mais barata, pela existência de restrições mais severas das políticas ambientais dos países desenvolvidos, bem como pelo próprio movimento de transferência da produção de calçados, importante fonte de demanda.¹

Poucos setores da economia brasileira têm a capacidade e o potencial apresentados pela indústria de couro e peles. O fato de o Brasil ser dono do maior rebanho bovino comercial do planeta, o que gera abundante oferta de matéria-prima, é um dos fatores que explica o bom desempenho da indústria nacional. Além é claro dos avanços tecnológicos registrados. Na última década, o setor aumentou em 293% a parcela da receita obtida com a produção de couros acabados, o produto mais valorizado do mercado. Para se ter uma ideia da representatividade do agronegócio na economia, o total de exportados de US\$ 1,74 bilhão, no ano de 2010 e US\$ 2,05 bilhões em 2011, confirma a posição do País como segundo maior produtor e quarto maior exportador de couros do mundo, dados obtidos do Centro das Indústrias de Curtumes do Brasil (CICB).²

Nas últimas quatro décadas, o Brasil tem ocupado um importante espaço na produção e comercialização de calçados. A indústria nacional de calçados é formada por 8.200 estabelecimentos, responsável pelo emprego formal de 348.700 pessoas, dados obtidos da *World Shoe Review*³ para o ano de 2010. A produção brasileira de calçados atingiu 819,1 milhões de pares produzidos em 2011, dos quais 113 milhões foram exportados.

Devido à agilidade em obter informações sobre as tendências mundiais de moda, somada à facilidade para a obtenção de matéria prima necessária para desenvolver a modelagem adequada ao mercado comprador e posterior fabricação em série, os calçadistas brasileiros têm amplas condições de atender à demanda de importadores dos mais

diversos perfis. Alguns exemplos são os calçados fabricados para importantes grifes e lojas norte-americanas e europeias, que já reconhecem o “Made in Brazil” impresso nos seus calçados.⁴ Entretanto, para a exportação de calçados, tem sido importante nos últimos anos estar atento e de acordo com a legislação do país importador. A União Europeia tem criado inúmeras restrições tanto em relação ao uso como ao controle de algumas substâncias químicas perigosas que possam eventualmente causar danos à saúde dos consumidores e ao meio ambiente. Entre estas substâncias destacam-se duas classes: clorofenóis e pesticidas.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Matriz Couro

A quantificação precisa dos analitos de interesse em matrizes sólidas representa um desafio muito importante para a comunidade analítica, tendo em vista a dificuldade de se extrair os analitos dessas matrizes que, em muitos casos, interagem fortemente com a mesma. Dentre as matrizes sólidas, uma que vem despertando grande interesse, não só da área acadêmica, mas também de investidores e principalmente pela indústria de calçados e artefatos, é a matriz couro.

Materiais naturais, como o couro, passam por processos de limpeza, estabilização (dado pelo curtimento) e de acabamento para adquirirem as características desejadas, para a confecção de calçados, peças de vestuário, revestimentos de mobília e de estofamentos de automóveis, bem como de outros artigos.

A qualidade dos couros depende de uma série de fatores, que se iniciam com cuidados já durante a criação dos rebanhos, como o controle de parasitas e formas adequadas de identificação, condução, confinamento e transporte dos animais. A partir do seu abate, deve-se evitar que suas peles degradem-se por ação de micro-organismos, para que seu processamento seja eficiente e se obtenha couros de boa qualidade. Isto se obtém por meio de manuseio, conservação e armazenamento adequados das peles. Quando o tempo entre o abate e o processamento das peles para curtimento é curto - menor do que 6 a 12 horas, dependendo da temperatura - estas podem aguardar sem nenhum pré-tratamento. Quando as peles necessitam serem estocadas e/ou transportadas por um tempo maior, principalmente em temperaturas mais altas, elas devem passar por um pré-tratamento chamado “cura”, para serem conservadas. Em geral, esta conservação é realizada empilhando-se as peles, intercalando-se camadas de sal entre elas. Pode-se ter uma imersão das peles em salmoura, antes do seu empilhamento em camadas. Este processo pode ser feito no frigorífico e/ou por intermediários (salgadores de peles) e/ou pelos próprios curtumes. Nestas condições, as peles podem ser armazenadas por meses até seu processamento. A conservação das peles também pode ser realizada por resfriamento ou secagem, práticas utilizadas em pequena escala. As

peles salgadas apresentam boa resistência aos micro-organismos, porém o sal provoca a desidratação das peles, eliminando água e parte das proteínas solúveis. Além do sal, alguns fornecedores de couros usam inseticidas para afastar insetos e/ou biocidas como auxiliares de conservação durante estoque e transporte.^{5,6}

O processo de transformação do couro no curtume pode ser dividido em três principais etapas, conhecidas como ribeira, curtimento e acabamento.^{5,6}

A etapa de ribeira tem por finalidades a limpeza e a eliminação das diferentes partes e substâncias das peles que não irão constituir os produtos finais, bem como preparar sua matriz de fibras colagênicas (estrutura proteica a ser mantida), para reagir adequadamente com os produtos químicos das etapas seguintes, o curtimento e o acabamento.^{5,6}

O curtimento é um processo que consiste na transformação das peles, pré-tratadas na ribeira, em materiais estáveis e imputrescíveis, ou seja, a transformação das peles em couros.^{5,6}

Por fim, a etapa de acabamento tem por finalidade de complementar o curtimento principal anterior, bem como conferir a base de algumas propriedades físicas e mecânicas desejáveis aos couros, como cor básica, resistência à tração, impermeabilidade, maciez, flexibilidade, toque e elasticidade.^{5,6}

Nas três etapas de tratamento do couro citadas, faz-se necessário à utilização de produtos químicos, bem como, antes do processo de transformação do couro, nas etapas de conservação e armazenamento das peles. Na Tabela 1, estão listados os principais produtos químicos utilizados em cada etapa do processo dos curtumes.

Tabela 1. Principais produtos químicos utilizados na indústria do couro, adaptado de Pacheco.⁵

Etapa do Processo		Produtos Utilizados
Conservação/Armazenamento das peles		cloreto de sódio, piretrum, permetrin, <i>p</i> -diclorobenzeno, sílico-fluoreto de sódio, bórax, DDT, BHC, diendrin, inseticidas a base de arsênio e mercúrio
Ribeira	Pré-remolho	Água
	Remolho	Água, soda cáustica, bicarbonato de sódio, hipoclorito de sódio, tensoativos (detergentes que podem ser fenólicos, nonilfenoletoxilato, álcoois graxos sulfonados, organo-fosfatados), enzimas e/ou produtos enzimáticos
	Depilação/ Calreiro	Sulfidrato de sódio, soda cáustica, aminas (p. Ex. sulfato de dietilamina), ácido mercaptoacético, glicolato de sódio, sulfeto de bário e enzimas
	Descalcinação/ Desencalagem	Ácidos (sulfúrico, clorídrico, láctico, fórmico, acético, glioxílico, cítrico, oxálico, bórico) sais ácidos, cloreto e/ou sulfeto de amônio, bissulfico de sódio, peróxido de hidrógeno, CO ₂
	Purga	Cloreto de amônio e enzimas proteolíticas, normalmente pancreáticas
	Píquel	Cloreto de sódio, sulfato de sódio, ácidos (sulfúrico, clorídrico, acético, fórmico, sulfônico aromático), alguns fungicidas podem ser utilizados: tiobenzotiazol, <i>p</i> -clorometacresol, <i>p</i> -nitrofenol, tri-clorofenol, pentaclorofenol, β-naftol e fungicidas a base de mercúrio
	Desengraxe (peles não bovinas)	Água rás, querosene, monoclorobenzeno, percloroetileno, carbonato de sódio

Curtimento	Mineral	Cromo, alumínio, titânio, magnésio, zircônio, cloreto de sódio, óxido de magnésio, carbonato ou bicarbonato de sódio, fungicidas, ácido fórmico, formiato, diftalato de sódio, ácido oxálico, sulfito de sódio, engraxantes, resinas
	Vegetal	Taninos (compostos polifenólicos), branqueadores, sequestrantes, engraxantes, ácido fórmico, resinas
	Sintético	Sintanas, produtos sulfonados de fenol, cresol, naftaleno, resinas de poliuretanos ou acrílicas, adeídos midificados, branqueadores, sequestrantes, engraxantes
Acabamento Geral	Neutralização	Sais de ácidos fracos (formiato de sódio, bicarbonato de sódio) sais de taninos sintéticos, de amônio ou de sódio, agentes complexantes (EDTA, NTA, polifosfatos)
	Recurtimento	Sais de cromo, alumínio, zircônio, taninos, sitanas, glutaraldeído, adeídos midificados, resinas
	Tingimento	Aminas aromáticas, azocorantes, complexos metálicos, ácidos, enxofre
	Engraxe	Óleos sulfonados de peixes, outros óleos animais, óleos vegetais, óleos minerais (parafinas cloradas), óleos sintéticos (siliconados), lecitina de soja
	Impregnação	Polímeros termoplásticos
	Acabamento	Tintas, misturas a base de ligantes e pigmentos, solventes (acetona, outras cetonas, n-butanol, acetato de etila, butila e isobutila, ácido fórmico, monoclorobenzeno, ciclohexano, etilenoglicol, butilenoglicol, etilbenzeno, percloroetileno, tricloroetilenotolueno, tolueno, xileno

Os resíduos de curtumes contêm grande quantidade de material putrescível (proteínas, sangue, fibras musculares) e de substâncias tóxicas ou potencialmente tóxicas tais como: cromo, sulfetos orgânicos e inorgânicos, cal livre, compostos arsenicais, corantes, fenóis e pesticidas. Geram com facilidade sulfeto de hidrogênio, que pode tornar as águas receptoras impróprias para fins de abastecimento público, usos industriais, agrícolas e para recreação. Os efluentes líquidos são caracterizados pela alta salinidade, alto conteúdo de matéria orgânica (demanda química de oxigênio - DQO e demanda bioquímica de oxigênio - DBO), nitrogênio orgânico e amônia. A elevada quantidade de DBO e DQO pode exaurir todo o oxigênio dissolvido nos cursos d'água receptores. A alcalinidade elevada também pode causar mortandade aos peixes. Colóides e sabões contidos nos efluentes dão origem à formação de grande quantidade de espuma. O ácido tânico contido neste efluente combina-se com os compostos de ferro do leito do rio ou dissolvidos na água, formando tanato férrico, de cor negra e também reage com sulfato de sódio produzindo sulfato ferroso que se mantém em suspensão coloidal. Os sólidos sedimentáveis formam bancos de lodo de aspecto desagradável e de cheiro repugnante. As carcaças, pelos, restos de peles e de fibras depositadas nas margens dos córregos atraem ratos e moscas.⁷

Atualmente, há uma grande preocupação no controle de processos de curtumes, manejo e tratamento de resíduos.⁸⁻¹³ Além disso, vem crescendo, também, a preocupação quando à utilização de substâncias tóxicas que fiquem aderidas ao couro, durante seu tratamento, e podem ser lixiviadas para o ser humano por meio do contato, ocasionando danos a saúde.

Neste sentido, Muralidharan e Rao, no ano de 1994,¹⁴ desenvolveram um método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) apenas para a identificação de nove preservativos utilizados no couro, incluindo 4-clorofenol (4CP), 2-fenilfenol (2PP), 2,4,6-triclorofenol (2,3,6tCP) e pentaclorofenol (PCP). Aplicaram o método para a identificação e confirmação dos ingredientes ativos presentes em formulações comerciais. No entanto não realizaram a identificação em nenhuma amostra de couro.

Meyer e Kleiböhmer, em 1995,¹⁵ realizaram a determinação de PCP em couro por extração com fluído supercrítico (SFE) com derivatização *in situ* e quantificação por GC. O PCP foi extraído do couro com dióxido de carbono supercrítico e derivatização *in situ* com anidrido acético na

presença de base. A influência das condições de extração e os parâmetros de derivatização (pressão, temperatura, tempo de extração durante o modo de extração dinâmica e estática, volume de base e derivatizante) foram investigados com o intuito de se obter uma extração eficiente. Foram realizadas análises em amostras de couro certificadas contendo PCP. Os resultados obtidos foram comparados com a extração por Soxhlet com metanol, e os valores obtidos através dos dois métodos foram similares. No entanto, os autores reforçam que a extração por SFE é mais rápida (3 horas) e utiliza menos solvente em comparação com Soxhlet (2 dias).

Ganeshjeevan *et al.*, em 2005,¹⁶ realizaram a extração aquosa em microondas de clorofenóis em matrizes sólidas (solo, madeira e couro) e analisaram as mesmas por técnicas cromatográficas. Após a extração aquosa por microondas foi realizada uma extração em fase sólida (SPE) com C18 e os analitos foram determinados por cromatografia líquida com detector ultravioleta (HPLC-UV), ou como seus derivados acetil por cromatografia gasosa com detector por captura de elétrons (GC/ECD). O estudo de fortificação nas diferentes matrizes, incluindo couro, foi realizado com apenas cinco isômeros selecionados de forma aleatória dos dezoito clorofenóis estudados no trabalho. Os isômeros selecionados foram 3-metil-clorofenol (3mCP), 2,4-diclorofenol (2,4dCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4tCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6teCP) e PCP. Para o 3mCP e 2,4dCP foram fortificados níveis de concentração de 0,5 e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$, já para 2,3,4tCP, 2,3,4,6teCP e PCP foram fortificados níveis de concentração de 0,2, 0,5 e 1,0 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os níveis de recuperação para a matriz couro variaram de 84 a 102% para os compostos citados acima. O LOD variou de 0,1 a 0,9 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os compostos avaliados por quantificação por GC/ECD. Os autores enfatizam que a extração aquosa por microondas e extração por Soxhlet produziram resultados similares para as amostras reais analisadas, confirmando a validade do método.

Ganeshjeevan *et al.*, em 2007,¹⁷ utilizaram a técnica de preparo de amostra por destilação a vapor assistida por microondas para estudar a extração de clorofenóis em amostras sólidas. O esquema do sistema utilizado está apresentado na Figura 1. GC/ECD foi utilizada nas análises. O estudo envolve a otimização dos parâmetros da técnica e os de enriquecimento *on-line* através da fortificação das amostras sólidas. Algumas amostras reais foram analisadas incluindo solo, madeira, couro, tecidos, corantes, amostras certificadas de solo e madeira e os

resultados estão em concordância com a técnica de extração por Soxhlet. No entanto, a recuperação e o LOD foram feitos somente em amostras de solo, sendo que os analitos avaliados foram 2-metil-clorofenol (2mCP), 2,4-dCP, 2,4,6-tCP, 2,3,5,6-tetraclorofenol (2,3,5,6tCP) e PCP. O LOD variou de 12 a 190 ng g⁻¹ com recuperação de 98,3 a 101,2% para as amostras certificadas.

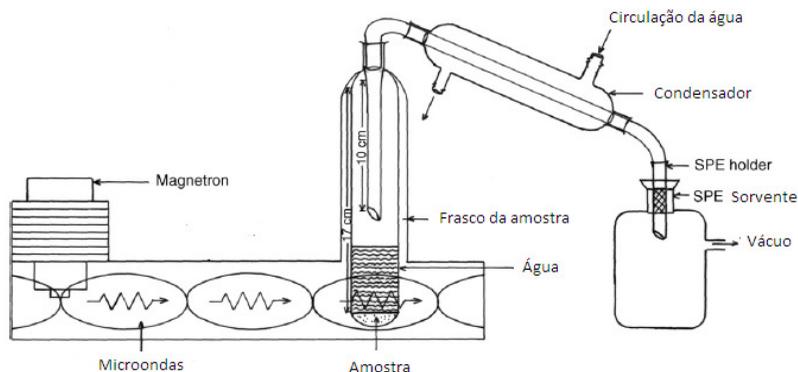


Figura 1. Sistema de destilação assistida por microondas com enriquecimento *on-line* SPE, adaptado de Ganeshjeevan *et al.*¹⁷

Favaro *et al*, em 2008,¹⁸ realizaram a determinação quantitativa de sete clorofenóis em couro com extração líquida pressurizada (PLE) utilizando como solvente acetonitrila por HPLC. Após um único ciclo de PLE, as soluções foram submetidas à pré-concentração por evaporação do solvente sob vácuo e tratamento de limpeza com cartuchos de extração de fase sólida, depois submetidas às análises quantitativas por HPLC com gradiente de eluição e detecção espectrofotométrica no UV. Os LOD para os sete analitos (4-cloro-3-metilfenol (4C3mP), 4-cloro-2-metilfenol (4C2mP), 2,4-dCP, 2PP, 2,4,6-tCP, 2,3,4,6-teCP e PCP) variaram de 10 a 70 µg kg⁻¹, com valores de R² entre 0,995 e 1,000. A repetibilidade para cinco extrações variou de 2 a 5% para a concentração de 1x10⁻⁶ mol L⁻¹, e recuperação de 88 a 97%. O método foi utilizado para análises de amostras reais de couro.

Font e Marsal, em 1998,¹⁹ realizaram a determinação de pesticidas organoclorados em peles e couro por GC/ECD. A GC/MS foi utilizada para identificação e confirmação dos analitos. As amostras foram extraídas com hexano por Soxhlet, o extrato foi concentrado e limpo

com coluna Florisil. Dibromooctafluorobifenil foi adicionado como padrão interno. O LOD e a recuperação para os onze compostos estudados estão apresentados na Tabela 2. Os compostos organoclorados foram analisados em 57 amostras de países da América, Europa e África entre o ano de 1996 e 1997. Os analitos não foram detectados nas amostras da América e Europa. Resíduos de lindano foram encontrados em 56% das amostras oriundas da África.

Tabela 2. Limite de detecção e recuperação para os 11 pesticidas estudados, adaptada de Font e Marsal.¹⁹

Pesticidas	LOD (ng g⁻¹)	RSD % (n=4)	Adicionado (µg g⁻¹)	Recuperado (%)	RSD % (n=4)
α - HCH	5	6	0,5	95	3
			5,0	96	1
β - HCH	12	6	0,5	94	3
			5,0	94	3
Lindane	5	6	0,5	98	4
			5,0	96	2
δ- HCH	8	6	0,5	78	9
			5,0	74	4
Andrin	5	13	0,5	87	5
			5,0	96	2
Heptacloro	10	6	0,5	88	4
			5,0	97	4
Heptacloro- Epoxide	7	5	0,5	88	3
			5,0	92	2
Diendrin	7	3	0,5	86	3
			5,0	85	5
4'4-DDT	19	18	0,5	76	5
			5,0	74	9
4'4-DDD	9	4	0,5	92	8
			5,0	94	8
4'4-DDE	6	6	0,5	84	5
			5,0	94	3

1.2 Aspectos gerais da utilização de produtos químicos

Desde a revolução industrial no século XVIII, os processos produtivos são considerados os motores do capitalismo. E são os responsáveis pelo desenvolvimento econômico como conhecido na atualidade, bem como pela maioria esmagadora de impactos ambientais gerados e já reconhecidos. O processo de beneficiamento do couro, que ocorre dentro de uma fábrica denominada curtume, é um dos processos produtivos mais antigos que se tem conhecimento. De maneira semelhante a outros processos fabris, ele é causador de impactos ambientais relevantes.

O risco potencial que os produtos químicos utilizados nos processos produtivos causam ao meio ambiente afetando diretamente o homem a flora e a fauna tem despertado preocupações da sociedade em geral, estando isso relacionado à qualidade de vida e um planeta mais sustentável. A preocupação com a qualidade de vida e preservação do ambiente tornou-se, nas últimas décadas, uma necessidade social. Os efeitos nocivos do homem para com o meio ambiente são tão evidentes quanto à necessidade das normas e leis para regulamentá-lo e buscar minimizar seus efeitos. A utilização de produtos químicos pelo homem está atrelada ao rápido aumento populacional, em conjunto com o intenso desenvolvimento industrial, comercial e residencial.

1.2.1 Fenóis e Clorofenóis

Entre as classes dos fenóis mais amplamente utilizados na indústria do couro encontram-se os clorofenóis e o 2-fenilfenol.

O grupo principal dos clorofenóis é constituído por 19 compostos que diferem entre si por sua estrutura molecular e, conseqüentemente, por suas propriedades físico-químicas, os quais estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Propriedades físico-químicas dos clorofenóis.

Composto	Fórmula	M (g mol ⁻¹)	PF (°C)	PE (°C)	Solubilidade (g L ⁻¹ , 20°C)	pKa
2-clorofenol	C ₆ H ₅ ClO	128,56	9,3	174,9	28	2,12-2,17
3-clorofenol	C ₆ H ₅ ClO	128,56	33-34	214	2,6	2,48-2,50
4-clorofenol	C ₆ H ₅ ClO	128,56	42-44	217-219	2,7	2,35-2,44
2,3-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	57-58	206	nd	3,15-3,19
2,4-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	45	210	4,5	2,75-3,30
2,5-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	58-59	211	nd	3,20-3,24
2,6-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	68	219	nd	2,57-2,86
3,4-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	65-68	253-254	nd	3,13-3,44
3,5-diclorofenol	C ₆ H ₄ Cl ₂ O	163,00	68	233	nd	2,57-3,56
2,3,4-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	77-84	Sublima	0,22	3,49-4,07
2,3,5-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	57-62	248-255	0,22	3,84-4,56
2,3,6-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	58	246	nd	3,88
2,4,5-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	67-70	Sublima	0,948	3,72-4,10
2,4,6-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	69	243-249	0,434	3,60-4,05
3,4,5-triclorofenol	C ₆ H ₃ Cl ₃ O	197,45	101	271-277	nd	4,01-4,39
2,3,4,5-tetraclorofenol	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	116-117	Sublima	0,166	4,21-5,16
2,3,4,6-tetraclorofenol	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	70	150	0,183	4,10-4,81
2,3,5,6-tetraclorofenol	C ₆ H ₂ Cl ₄ O	231,89	114-116	188	0,100	3,88-4,92
pentaclorofenol	C ₆ Cl ₅ OH	266,34	190	300	0,014	5,01-5,86

nd = não determinado

A toxicidade dos clorofenóis depende do grau de cloração e da posição do átomo de cloro em relação ao grupo hidroxila. Desta forma, a toxicidade desses compostos aumenta com o número de átomos de cloro substituintes e em virtude da posição do substituinte. Posições como 3-, 4- e 5- conferem maior toxicidade à molécula. Embora dentro dessa família existam 19 clorofenóis com toxicidades variáveis, todos são descritos como possuindo elevada toxicidade, potencialidades mutagênicas e carcinogênicas, difícil degradação, tendência à bioacumulação nos seres vivos e persistência no ambiente. Os clorofenóis são amplamente utilizados como fungicidas, biocidas e herbicidas.²⁰⁻²³

O 2-fenilfenol é conhecido por sua potente ação fungicida e antibactericida, comumente empregado como aditivo agrícola, desinfetante veterinário e hospitalar. Sua toxicidade tem se correlacionado com a indução de tumores na bexiga, bem como com danos hepáticos e renais em ratos, aberrações cromossômicas e mutagenicidade em células humanas.²⁴⁻²⁷

1.2.2 Pesticidas organoclorados

Outra classe de produtos químicos usados na indústria do couro são os pesticidas organoclorados, classificados como poluentes orgânicos persistentes (POPs) pela *United Nations Environment Programme*.

Diclorodifeniltricloroetano (DDT) e lindano tiveram seu uso reportado em 1954, sendo empregados para evitar danos causados pelo ataque de insetos durante o processo de secagem ao ar do couro. Outro pesticida organoclorado, dieldrin, foi introduzido para fornecer proteção contra ectoparasitas. Lindano foi um dos inseticidas mais comumente empregados para proteção de couro e peles pelo menos até os anos de 1990.¹⁹ Contudo, a maioria dos usos registrados para DDT e outros pesticidas organoclorados foram proibidos em diversos países desde a década de 1970, sobretudo devido a sua persistência no ambiente, bioacumulação e alta toxicidade.²⁸ A persistência no ambiente desses compostos ocorre em função de sua baixa degradação por processos bióticos e abióticos, acarretando em elevada meia-vida no ambiente, que pode chegar a anos ou décadas.²⁹ Devido a sua lipofilicidade os pesticidas organoclorados são absorvidos pelos organismos através da alimentação, respiração e pele. Após a absorção, esses compostos são

rapidamente distribuídos para vários tecidos e o sangue.³⁰ A toxicidade desses contaminantes é altamente complexa e específica para cada composto. Assim, pode haver múltiplas respostas tóxicas dependendo da espécie, sexo e órgãos atingidos.³¹

1.3 Técnicas clássicas de preparo de amostras sólidas

O preparo da amostra é uma das etapas mais críticas da análise química e consiste na extração, que visa à remoção dos analitos da matriz, e no isolamento dos analitos de interesse com consequente eliminação dos interferentes.³²

As técnicas de preparo de amostras têm como objetivo a retirada dos analitos de interesse da matriz, para uma forma que seja adequada para a introdução no equipamento cromatográfico. Em se tratando de matriz sólida, a etapa de preparo de amostra é imprescindível. Esse procedimento pode-se adequar tanto à transferência do analito para um meio físico compatível com o cromatógrafo, como já citado anteriormente, quanto adequar à concentração dos analitos para que fiquem dentro da faixa linear do equipamento de trabalho, ou ainda ambos.

Os principais métodos de preparo de amostras sólidas usados para separação/detecção por cromatografia a gás são: extração por Soxhlet, extração em fase sólida, extração com fluído supercrítico, extração acelerada com solvente, extração com ultrassom ou microondas, e extração com líquido pressurizado.³³⁻⁴⁰ Normalmente, quando se empregam as técnicas citadas acima após o procedimento de extração, é necessário acrescentar uma etapa de limpeza da amostra, e dependendo dos analitos, a derivatização.

Entre as técnicas citadas acima, as mais difundidas e empregadas para preparo de amostras sólidas são as extrações com solventes, que incluem extração por Soxhlet, extração acelerada com solvente, extração com ultrassom ou microondas, extração com líquido pressurizado, sendo que todas elas baseiam-se na partição dos analitos entre a matriz da amostra e o solvente orgânico. Alguns fatores podem influenciar a extração, tais como massa da amostra, pH, volume e tipo do solvente extrator, tempo de extração, etc. Com o ajuste adequado dessas condições, as técnicas que empregam solventes podem remover quantitativamente os analitos da matriz e em alguns casos, com baixos limites de detecção. Porém, estas técnicas, em geral, são tediosas, demoradas, apresentam múltiplos

estágios de operação e de difícil automação e de pequena reprodutibilidade e repetibilidade em decorrência das várias etapas de manipulação da amostra. Aliado a isso, o volume de solvente orgânico necessário nessas técnicas é um aspecto preocupante, devido ao custo e problemas de poluição ambiental.

Considerando-se que a preparação de amostras é normalmente a etapa que consome mais tempo e gera maior erro na análise instrumental, estudos estão sendo realizados com o intuito de se desenvolver métodos de preparação de amostras que forneçam resultados mais reprodutíveis, exijam menores habilidades técnicas, que não utilizam ou utilizam microvolumes de solventes orgânicos, menor custo, menor tempo e forneçam extratos mais limpos. Destaca-se nesse contexto as técnicas modernas de preparo de amostra: extração sortiva em barras de agitação (SBSE), microextração em fase líquida (LPME), microextração por sorvente empacotado (MEPS), microextração em fase sólida (SPME) e microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (CF-SPME). São técnicas, que além de reduzirem a manipulação analítica, proporcionam significativa sensibilidade na recuperação de analitos, elevada repetibilidade, rapidez, baixo custo e facilidade de automatização.

1.4 Técnicas modernas de preparo de amostra

A seguir serão descritas algumas técnicas modernas de preparo de amostras, com maior ênfase para a técnica de SPME e a técnica de CF-SPME, cujo estado da arte se encontra em fase de desenvolvimento, as quais foram as técnicas utilizadas neste trabalho.

1.4.1 Extração Sortiva em barras de agitação (SBSE)

A técnica de SBSE foi introduzida por Baltussen⁴¹ et al no final dos anos noventa, e a mesma baseia-se no equilíbrio de partição do analito nas distintas fases presentes no sistema analítico. No processo de SBSE é utilizada uma barra de agitação magnética (magneto encapsulado com vidro, 10 a 20 mm de comprimento) revestida com 25 a 125 μL de filme de polimérico, por exemplo, polidimetilsiloxano (PDMS), única fase extratora disponível comercialmente (Gerstel GmbH Müllheim Ruhr, Alemanha). As extremidades da barra não são revestidas com o

polímero. A representação esquemática do sistema está apresentada na Figura 2.

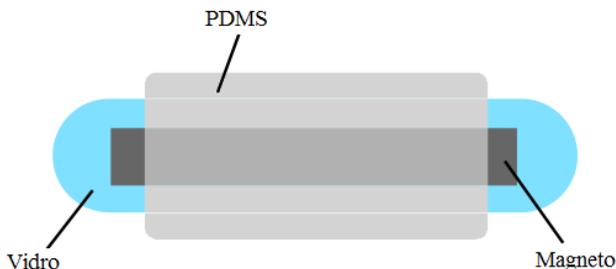


Figura 2. Representação esquemática da barra de agitação de SBSE.

O mecanismo de extração dos analitos é baseado na absorção (processo de partição), ou seja, os analitos são solubilizados na fase polimérica. A técnica de SBSE pode ser utilizada de duas maneiras. No modo direto, onde a barra de agitação é inserida diretamente na amostra, ou no *headspace*, situado no espaço confinante acima da amostra.

1.4.2 Microextração em fase líquida (LPME)

A LPME foi inicialmente introduzida como uma miniaturização da técnica clássica de extração líquido-líquido (LLE), no ano de 1996.⁴² Representada por uma gotícula de solvente orgânico suspensa na extremidade da agulha de uma microsseringa, a qual pode ser exposta a uma amostra aquosa, permite a migração dos analitos, com maior afinidade com o solvente orgânicos, para a gota, ocasionando uma microextração. Esta técnica apresenta bons fatores de enriquecimento para analitos com altos coeficientes de partição. No entanto, não possui robustez, já que a gota pode desprender facilmente da ponta da agulha, além de problemas eventuais que possam ocorrer com a agitação vigorosa.

Pedersen-Bjergaard e Rasmussen⁴³ introduziram um conceito alternativo para a LPME, baseado no uso de membrana oca feita de polipropileno,

agindo como suporte para o solvente orgânico. Nesta técnica, a amostra aquosa de interesse normalmente é transferida para um pequeno recipiente com capacidade para 1 a 4 mL e uma fibra oca de 1,5 a 10 cm é mergulhada nesse recipiente (Figura 3). Antes da extração, a membrana é imersa no solvente orgânico para imobilizá-lo nos seus poros e o excesso é removido por imersão em água. A seguir, o lúmen da membrana oca é preenchido com microlitros da solução receptora que pode ser o próprio solvente usado na etapa anterior (sistema de duas fases) ou uma solução aquosa de pH contrário ao da solução doadora (sistema de três fases).

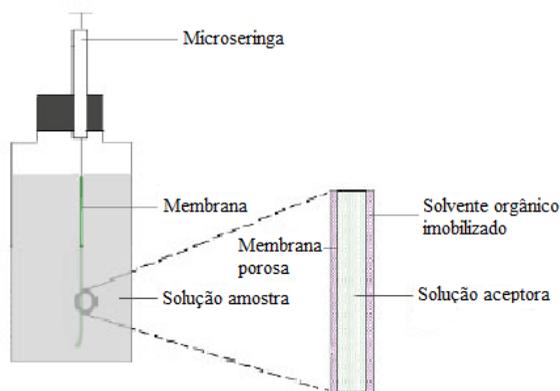


Figura 3. Representação esquemática do sistema de extração LPME.

O princípio fundamental de extração da LPME baseia-se na partição entre os analitos e o solvente orgânico impregnado nos poros da membrana, sendo o processo de transferência dos analitos controlado pela difusão dos mesmos em solução.

1.4.3 Microextração por sorvente empacotado (MEPS)

A técnica de preparo de amostra MEPS baseia-se na miniaturização da técnica convencional da SPE, onde os volumes das amostras e dos solventes utilizados na etapa de eluição foram reduzidos de mililitros para microlitros (10 a 1000 μL).^{44,45} Aproximadamente 1

mg do material sorvente seletivo é empacotado e conectado à agulha de uma microseringa (100 – 250 μL), ou seja, integrado a microseringa, como uma microcoluna, com aproximadamente 1 cm de comprimento por 0,2 mm de diâmetro interno (D.I.) (Figura 4). A MEPS pode ser acoplada (em linha) às técnicas de separação, cromatografia líquida (LC), GC ou à eletroforese capilar (CE), desta forma, os analitos sorvidos na microcoluna poderão ser eluídos (dessorvidos), durante a etapa de introdução (injeção) da amostra no equipamento. Diferentes fases seletivas MEPS, com diferentes mecanismos de extração, estão comercialmente disponíveis, tais como: sílica (fase normal), C2, C8, C18 (fase reversa), trocador de cátions forte (SCX), trocador de ânions forte (SAX), e fase mista (C8 + SCX).

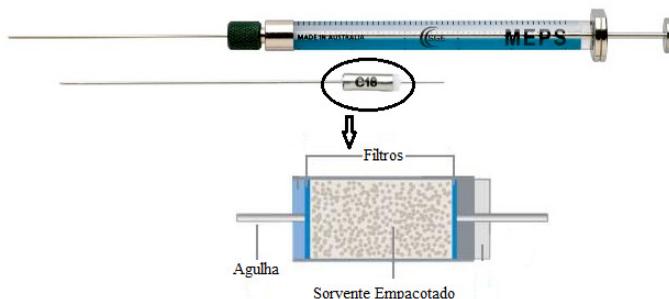


Figura 4. Microseringa MEPS e na ampliação microcoluna com sorvente empacotado.

1.4.4 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME é uma técnica de extração e pré-concentração rápida, simples e que dispensa o uso de solventes extratores e manipulação excessiva de amostra. Esta técnica foi descrita por Arthur e Pawliszyn,⁴⁶ no início da década de 1990, e tem sido extensivamente estudada e aplicada em diversas matrizes como alternativa às metodologias tradicionais. O princípio da técnica é a partição do analito entre a amostra matriz e um microcomponente extrator, o qual consiste de uma fase polimérica líquida ou sólida que recobre uma fibra de sílica fundida ou suporte metálico. As espessuras dos recobrimentos das fibras comerciais variam de 7 a 100 μm e seus volumes de 0,03 a 0,7 μL . A extração por SPME ocorre através de duas etapas: a sorção e dessorção

dos analitos. Na etapa de sorção, os analitos de interesse são extraídos da amostra matriz pela exposição do recobrimento da fibra de sílica fundida/suporte metálico à amostra por um intervalo de tempo pré-determinado. Após a etapa de sorção, a fibra é removida da amostra e os analitos retidos são, em seguida, desorvidos em um instrumento analítico apropriado (CE, GC, HPLC, etc.) para serem separados e quantificados. Vários fatores podem influenciar a velocidade e/ou quantidade do analito extraído pela SPME, tais como, tipo de recobrimento da fibra, espessura da fibra, modo de extração (*headspace* ou direto), temperatura de extração, tempo de extração, velocidade de agitação, influência do pH, força iônica da amostra e massa ou volume da amostra.^{47,48}

A seleção do recobrimento é baseada primariamente nas características de polaridade e volatilidade dos analitos. A escolha do revestimento apropriado é muito importante para alcançar uma boa seletividade dos analitos alvo. A espessura do filme da fibra determina a capacidade da fibra (quantidade de analito que pode ser extraído) e o tempo de extração. Os filmes de maior espessura apresentam maior capacidade/sensibilidade, porém requerem maior tempo de extração.^{47,48}

O modo de extração pode ser por imersão direta ou por *headspace*, também chamado de espaço confinante. No modo de imersão direta, a fibra é colocada em contato direto com a amostra líquida ou gasosa, podendo ser aplicada para análise de gases e de amostras líquidas relativamente limpas. Na amostragem por *headspace*, a fibra é suspensa na região confinada sobre a matriz da amostra. Esse tipo de amostragem é aplicada às amostras de sólidos e líquidos com um número maior de impurezas, desde que os analitos de interesse sejam voláteis ou semi-voláteis. No caso de amostras sólidas, o modo *headspace* é o mais utilizado, a fim de se evitar que partículas sólidas colidam com a fibra e a danifiquem reduzindo sua vida útil.^{47,48}

A agitação da amostra diminui o tempo necessário para atingir o equilíbrio, porque a difusão dos analitos aumenta. Na extração no modo *headspace*, a agitação facilita ainda a transferência de massa entre a fase aquosa e o *headspace*.^{47,48}

O pH apresenta forte influência na sensibilidade da extração. Em meio aquoso, o pH afeta o equilíbrio de dissociação. Uma diminuição do pH provoca aumento na concentração de espécies neutras de compostos ácidos, aumentando a quantidade extraída. No caso de compostos ácidos, uma melhora na extração é obtida ajustando-se o

valor do pH para duas unidades abaixo do valor do pKa do analito; para compostos básicos, o pH deve ser ajustado duas unidades acima do valor de pKa do analito. Em geral, para compostos de caráter ácido ou básico, é imprescindível um ajuste de pH da amostra para que se obtenha melhor desempenho na extração. No entanto, deve-se tomar cuidado no caso da extração direta, pois valores extremos de pH, tanto altos como baixos, podem danificar a fibra.^{47,48}

A adição de um sal à solução da amostra geralmente melhora a extração dos analitos, principalmente para os analitos mais polares. Concentrações de sal entre 1 e 30% têm sido empregadas na análise de amostras aquosas. O aumento da força iônica provoca redução na solubilidade do analito na matriz, facilitando a sua extração pela fibra. No entanto, esse efeito não é geral e depende da polaridade do analito, da concentração do sal e da matriz da amostra. Em alguns casos que englobam analitos altamente polares ou passíveis de sofrer dissociação iônica em meio aquoso, este aumento da força iônica pode provocar efeito contrário e provocar uma diminuição da eficiência da extração.^{47,48}

A relação massa-volume da amostra é um parâmetro importante, uma vez que a massa dos compostos extraídos pela fibra é função da razão massa-volume e da concentração inicial na amostra. A razão massa/volume da amostra está diretamente relacionada à sensibilidade do método.^{47,48}

A SPME no modo direto envolve o equilíbrio do analito em duas fases distintas, e no modo *headspace*, entre três fases – a amostra líquida, a fase de vapor sobre a amostra líquida (*headspace*) e a fase extrativa (líquido polimérico ou sólido adsorvente). Idealmente, a matriz deve ser completamente homogênea e os analitos estáveis nas fases envolvidas. O tratamento termodinâmico representado pelas equações abaixo se refere ao processo de partição, característico dos recobrimentos da fibra com filme de líquido polimérico. Nos casos em que se utiliza como fase extrativa um sólido adsorvente, como sílica fundida, as equações são similares na análise ao nível de traços, salvo algumas restrições. A quantidade total do analito nas três fases pode ser dada pelo balanço de massa:

$$C_0V_S = C_fV_f + C_HV_H + C_SV_S \quad \text{Equação 1}$$

onde, C_0 é a concentração inicial do analito na amostra; C_f , C_H , C_S são as concentrações no equilíbrio, na fibra extrativa, no *headspace* e na amostra, respectivamente, e V_f , V_H e V_S são, nessa ordem, os volumes do recobrimento da fibra, do *headspace* e da amostra. A constante de partição do analito entre as fases fibra/*headspace*, K_{fH} , e *headspace*/amostra, K_{HS} , são definidas como:

$$K_{fH} = \frac{C_f}{C_H} \quad \text{Equação 2}$$

e

$$K_{HS} = \frac{C_H}{C_S} \quad \text{Equação 3}$$

A quantidade do analito extraído na fibra extrativa, n , é calculada pela expressão:

$$n = C_f V_f \quad \text{Equação 4}$$

$$n = \frac{K_{fH} K_{HS} V_f C_0 V_S}{K_{fH} K_{HS} V_f + K_{HS} V_H + V_S} \quad \text{Equação 5}$$

Como a constante de partição do analito nas fases fibra/amostra, K_{fS} , é igual ao produto $K_{fH} K_{HS}$, temos que:

$$n = \frac{K_{fS} V_f C_0 V_S}{K_{fS} V_f + K_{HS} V_H + V_S} \quad \text{Equação 6}$$

Considerando a extração da amostra no modo direto, a parcela $K_{HS} V_H$ pode ser desprezada. Deste modo, a equação (6) assume a forma:

$$n = \frac{K_{fS} V_f C_0 V_S}{K_{fS} V_f + V_S} \quad \text{Equação 7}$$

Como K_{fS} apresenta, geralmente, uma ordem de grandeza muito pequena, aliada ao fato de que, normalmente, o volume da amostra, V_S , é muito superior ao volume do recobrimento da fibra, V_f , podemos aplicar a aproximação de que $K_{fS}V_f \ll V_S$. Logo, pode ser abreviada para:

$$n = K_{fS} V_f C_0 \text{ Equação 8}$$

Podemos perceber uma relação linear entre a quantidade de analito extraído da amostra e a concentração inicial deste na matriz, ou seja:

$$n = KC_0 \text{ Equação 9}$$

No modo *headspace*, partindo-se da equação (7), podemos inicialmente considerar que as fases amostral *headspace* apresentam o mesmo volume ($V_S = V_H$)

$$n = \frac{K_{fS} V_f C_0 V_S}{K_{fS} V_f + (1 + K_{HS}) V_S} \text{ Equação 10}$$

Usando o mesmo raciocínio empregado para o modo direto, temos:

$$K_{fS} V_f \ll (1 + K_{HS}) V_S ,$$

$$\text{logo: } n = \frac{K_{fS} V_f}{(1 + K_{HS})} C_0 \text{ Equação 11}$$

Conclui-se então que a quantidade do analito coletada pela fibra, no modo *headspace*, segue também uma dependência linear com a concentração inicial do analito na amostra:

$$n = k' C_0 \text{ Equação 12}$$

A SPME é uma técnica de equilíbrio, mas sob certas condições uma extração quantitativa dos analitos pode ser alcançada. Isso é

aplicável para compostos com grande coeficiente de partição em condições normais, no entanto não são todos os compostos que apresentam elevados valores do coeficiente de partição. A fim de alcançar a extração total, pode-se usar um menor volume de amostra (V_s), mas isso significa, em SPME, usar um tamanho de amostra que não é desejável para análise precisa. Aumentar o volume do revestimento da fibra é outra opção, mas é pouco prático uma vez que uma das vantagens da SPME é a pequena dimensão do recobrimento da fibra, por não haver a necessidade de modificações na porta de injeção do GC. Outra alternativa seria utilizar um recobrimento da fibra que tenha alta afinidade pelos analitos tendo, assim, um alto valor para o coeficiente de partição. Infelizmente o desenvolvimento desses recobrimentos não é tarefa fácil.^{47,48}

Um método muito mais facilmente aplicável é o de aumentar o coeficiente de partição do revestimento/*headspace* criando um diferencial de temperatura entre o revestimento da fibra e o *headspace*. Talvez por isso, dentro os parâmetros relacionados acima que podem afetar o processo de extração da SPME, pode-se destacar a temperatura como um dos mais importantes. Geralmente, a temperatura da amostra tem uma influência dupla. Em geral, um aumento na temperatura da extração provoca aumento na velocidade de extração e diminuição na constante de distribuição, reduzindo o tempo necessário para atingir o equilíbrio de extração. Porém, elevadas temperaturas diminuem o coeficiente de partição entre o recobrimento da fibra e o *headspace*, isso porque, a etapa de sorção dos analitos na fibra é um processo exotérmico. O aquecimento da amostra a uma temperatura elevada fornece energia para as moléculas de analito superarem as barreiras de energia que as “amarram” com a matriz, melhora o processo de transferência de massa e aumenta a pressão de vapor dos analitos. Na amostragem por *headspace*, o aumento da temperatura ajuda a transferência dos analitos da amostra para o *headspace*, assim, em direção à fibra. Sabendo-se que o modo de extração por *headspace* é o mais adequado para amostras sólidas, quanto maior a temperatura de extração teoricamente maior a concentração dos analitos no *headspace* e conseqüentemente maior sensibilidade. Assim, o ideal seria trabalhar com temperaturas elevadas, porém como já descrito, o equilíbrio de sorção dos analitos pela fibra é um processo exotérmico. Isto significa que, enquanto a alta temperatura melhora a liberação dos analitos a partir de sua matriz, por outro lado pode prejudicar a absorção dos

analitos pelo revestimento devido à diminuição dos coeficientes de partição. Devido ao aumento nas concentrações dos analitos no *headspace*, aquecer a amostra pode inicialmente melhorar a sensibilidade de amostragem da SPME por *headspace*. Conforme a temperatura aumenta ainda mais, no entanto, a diminuição nos coeficientes de partição não pode ser compensada pelo aumento na concentração do *headspace*. Como resultado, há geralmente uma temperatura ótima para SPME por *headspace*. O problema é que a temperatura ótima muitas vezes não é o bastante e oferece pouca ajuda para superar adsorção dos analitos pela matriz ou melhorar a volatilidade dos analitos semivoláteis. Como alternativa de contornar o problema relacionado a altas temperaturas de extração, Pawliszyn propôs, no ano de 1995,⁶⁰ um sistema para resfriamento do recobrimento da fibra, o qual denominou de microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (*internally cooled solid-phase microextraction*) ou simplesmente *cold fiber* (CF) e descrito com mais detalhes no item 1.4.5.

1.4.4.1 Aplicações de SPME

A SPME tem uma gama muito ampla de aplicações, implicando em um grande volume de publicações. Desta forma, a seguir serão descritos trabalhos mais recentes, dos três últimos anos (2010, 2011 e 2012), como forma de ilustrar as aplicações da SPME nos mais variados tipos de matrizes e analitos.

Tranchida *et al.*,⁴⁹ analisaram o óleo essencial de bergamota por SPME e detecção por GC. Além disso, investigaram as vantagens da utilização de uma coluna *narrow-bore* juntamente com a técnica de SPME por *headspace*, em amostras complexas, como o óleo de bergamota. Foi empregada uma fibra de PDMS com uma capacidade de extração baixa (7 µm), permitindo um tempo de equilíbrio curto (15 min). Os compostos voláteis absorvidos foram separados em 12,5 min, em um uma coluna capilar de 10 m × 0,1 mm de D.I. O método rápido de GC foi caracterizado por meio de parâmetros relativamente moderados (pressão da cabeça: 173 kPa; taxa de aquecimento: 12 °C/min). A utilização da fibra com baixa capacidade, juntamente com a quantidade reduzida de amostra evitou a sobregarregamento da coluna empregada. A repetibilidade analítica foi determinada em termos de tempos de retenção (no máximo RSD 0,32%) e as áreas de pico (RSD máxima

9,80%). Os resultados obtidos foram comparados com aqueles obtidos por HS-SPME-GC convencional (com uma fibra 30 μm de PDMS e 0,25 mm D.I. de uma coluna capilar) na aplicação sobre a mesma amostra. A SPME com fibra e coluna reduzida levou a uma grande redução do tempo de análise, em comparação com o tempo de equilíbrio de SPME e tempo de corrida no GC, que foram de 50 min para ambos na comparação de SPME e coluna convencional. A resolução do pico foi totalmente comparável em ambas as aplicações. Embora uma ligeira perda em termos de sensibilidade foi observada na abordagem mais rápida (geralmente dentro da gama de 25-50%), entretanto, não prejudicou a detecção de todos os picos de interesse. A seletividade para fibra de SPME de 7 e 30 μm foi avaliada e está em boa concordância.

Delgado *et al*⁵⁰ estudaram o perfil aromático de voláteis do queijo espanhol de leite de cabra cru da denominação de origem protegida (DOP) "Queso Ibore" em quatro estágios de maturação (dia 1, 30, 60, e 90) pelo método de SPME E GC/MS para determinar os compostos voláteis característicos deste queijo e saber quais as alterações ocorrem no perfil dos voláteis do queijo durante a maturação. De acordo com o DOP, o aroma do queijo "Ibore" varia entre doce e suave e tem um sabor forte, ligeiramente azedo. Um total de 64 compostos foram identificados: 14 ácidos, 18 álcoois, 13 ésteres, 6 cetonas e 13 compostos que não podem ser classificados nestes grupos. Os ácidos carboxílicos são os compostos voláteis mais abundantes na *headspace* de queijo "Ibore". O teor de compostos voláteis foi significativamente alterado ($P < 0,05$) durante o amadurecimento. As quantidades relativas totais de ácidos, ésteres e cetonas aumentaram durante os primeiros 60 dias de maturação. Os compostos mais características de aroma do queijo Ibore foram ácido butanóico, hexanóico e octanóico e alguns álcoois (2-butanol e 2-heptanol), etil-ésteres dos ácidos hexanóico e butanóico, algumas metil-cetonas (2-butanona, 2-pentanona e 2 - heptanona) e δ -decalactona.

Menezes Filho *et al*⁵¹ desenvolveram um método baseado na técnica de SPME com detecção por GC/MS para determinação simultânea de 16 pesticidas de sete grupos químicos diferentes (seis organofosforados, dois imidazólicos, dois estrobilurinas, um carbamato, uma tetrazina e um triazol em água). A extração dos pesticidas foi feita com o modo de imersão direta com fibra poliacrilato (PA) 85 μm . A temperatura de extração de trabalho foi de 50 $^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, enquanto se agitava a amostra a 250 rpm. Após a extração, a fibra foi introduzida no injector

GC para a dessorção térmica durante 5 min a 280 °C. O método foi validado por amostras de água ultra pura fortificada com os pesticidas em níveis de concentração diferentes e apresentou boa linearidade nas concentrações entre 0,05 e 250,00 ng mL⁻¹. O LOD e LOQ variaram, 0,02 a 0,30 ng mL⁻¹ e 0,05 a 1,00 ng mL⁻¹, respectivamente. Precisoões intra-dia e inter-dia foram determinadas em dois níveis de concentração (5,00 e 50,00 ng mL⁻¹). O RSD intra-dia variou entre 3,6 e 13,6%, e inter-dia entre 6,3 e 18,5%. Testes de recuperação foram realizados em relação às amostras de água ultra pura em três níveis diferentes de concentração de 0,20; 5,00 e 50,00 ng mL⁻¹. A recuperação do nível 0,20 ng mL⁻¹ variou de 86,4 ± 9,4% a 108,5 ± 10,5%, para o nível de 5,00 ng mL⁻¹ variou de 77,5 ± 10,8% a 104,6 ± 9,6% e para o nível de 50,00 ng mL⁻¹ variou de 70,2 ± 4,6% a 98,4 ± 8,5%. O método de SPME proposto foi aplicado em 26 amostras de água coletadas no "Platô de Neópolis", Estado de Sergipe, Brasil. Metilparatin foi detectado em cinco amostras com uma concentração média de 0,17 ng mL⁻¹ e bifentrina, piraclostrobina e azoxistrobina foram encontrados em três amostras com concentrações médias de 2,28; 3,12 e 0,15 ng mL⁻¹, respectivamente.

Watkins *et al*⁵² realizaram a comparação da técnica de extração por SPME com a de destilação simultânea para a extração de compostos voláteis em carne cozida e gordura de ovelhas com a separação e detecção por GC/MS. Cerca de 100 compostos (em abundância relativamente elevada) foram caracterizados nos perfis voláteis da carne cozida e na gordura de ovelha utilizando ambas as técnicas. Foram observadas diferenças nos perfis dos voláteis obtidos a partir de cada técnica, independente da classe de compostos. Ao invés de uma técnica apresentar quantidades de compostos voláteis superiores a outra, desta forma, as técnicas podem ser consideradas como um complemento uma da outra.

Jia *et al*⁵³ utilizaram a SPME para estudar a biodisponibilidade de éteres difenólicos polibromados (PBDE) em sedimentos. Os PBDE fazem parte da classe dos retardantes de chama bromados. Neste estudo, utilizaram uma fibra de PDMS para determinar a concentração de PBDE livremente dissolvidos (Clivre) em sedimento como uma medida de biodisponibilidade. Em sedimentos, PBDE foram predominantemente sorvidos na fase sedimentar, com Clivre < 0,012% da massa química total, verificando que o Clivre de PBDE diminui quando sua bromação ou a quantidade de carbono orgânico sedimentar aumenta. A forte

associação com a matéria orgânica dissolvida implica em um potencial para facilitar o transporte e a dispersão no meio ambiente que depende estreitamente da estabilidade dos agregados dos sedimentos.

Zhang *et al*⁵⁴ utilizaram a técnica de SPME para estudar a bioconcentração de medicamentos em tecidos específicos de peixes vivos. O desenho segmentado das fibras de SPME permitiu a determinação simultânea de resíduos de produtos farmacêuticos em músculo dorsal do peixe-epaxial e tecido adiposo com uma única fibra de SPME. A miniaturização da fibra dotada com técnica de elevada resolução espacial, permitiu a quantificação de analitos dentro dos tecidos adjacentes, relativamente pequenos de trutas arco-íris jovens. O pré-equilíbrio das amostras e a cinética de calibração produziram a quantificação eficiente e precisa dos produtos farmacêuticos nos tecidos dos peixes. A capacidade do método de SPME para monitoramento do mesmo peixe contorna problemas resultantes da variação interanimal, melhorando assim a precisão dos perfis cinéticos de bioconcentração gerados. A validação da SPME *in vivo* foi feita com extração líquida das amostras de tecidos com metanol. Dos nove compostos avaliados, cinco (atrazina, genfibrozil, ibuprofeno, carbamazepina e fluoxetina) foram bioacumulados no tecido adiposo e muscular ao longo dos oito dias de exposição. Embora a acumulação dos analitos em ambos os tecidos foi correlacionada positivamente, cada composto particiona com afinidades diferentes, tais como, por sua hidrofobicidade e estrutura molecular única. As amostras de água analisadas utilizando a técnica de SPME obtiveram resultados semelhantes aos determinados por SPE, no entanto, a SPME foi mais rápida e operacionalmente muito mais simples. Este estudo ilustra as condições de aplicação *in situ* da SPME e ao mesmo tempo demonstrando o potencial destas fibras de SPME miniaturizadas para repetir a amostragem *in vivo* em diferentes tecidos animais.

Kataoka *et al*⁵⁵ realizaram uma revisão dos trabalhos que utilizam a técnica de SPME para o estudo de drogas em matrizes biológicas complexas. Análises biomédicas de drogas, metabólitos, venenos, poluentes ambientais e ocupacionais, biomarcadores de doenças e substâncias endógenas em fluidos e tecidos corporais são importantes no desenvolvimento de novos medicamentos, acompanhamento terapêutico, toxicologia forense, no diagnóstico do paciente e de biomonitorização da exposição humana a produtos químicos perigosos. A SPME é uma técnica eficaz na preparação de amostra que permitiu a

automatização, a miniaturização, e alto rendimento e desempenho. O uso da SPME reduziu tempos de ensaio, bem como os custos da eliminação de solventes. Este trabalho incide na avaliação dos recentes avanços nas novas técnicas de SPME, na análise biomédica. Os autores também resumiram as aplicações dessas técnicas para farmacoterapêuticos, forense, e estudos de diagnóstico, e às determinações da exposição ambiental e ocupacional.

Sakhvidi *et al*⁵⁶ examinaram a aplicabilidade da SPME para a amostragem e quantificação de três anestésicos inalatórios, incluindo: halotano, isoflurano, sevoflurano e em ar de ambiente operacional. A fibra de CAR-PDMS no modo recolhido (sem exposição da fibra, ou seja, a fibra não foi retirada da agulha) foi utilizada e foram estudados os efeitos dos parâmetros ambientais, incluindo temperatura, umidade e velocidade do ar. Não houve diferenças significativas entre a amostragem determinada com diferentes temperaturas e velocidades do ar. Porém a umidade tem um efeito significativo oposto em relação às quantidades amostradas. A comparação dos resultados entre o método de SPME desenvolvido e o método 103 OSHA em atmosfera de ensaio padrão e de campo mostrou uma concordância satisfatória.

Abdulra'uf *et al*⁵⁷ realizaram uma revisão das fibras de SPME utilizadas para análise de resíduos de pesticidas em frutas e vegetais. Amostras de alimentos são normalmente analisadas com um passo preliminar de preparação da amostra, porque normalmente os resíduos de pesticidas estão presentes em baixas concentrações e incorporados em matrizes complexas. A SPME utiliza fibras revestidas com uma fase estacionária polimérica que pode ser líquida ou sólida, ou uma combinação de ambos. O revestimento da fibra extrai os analitos alvo a partir de matrizes alimentares complexas por absorção no caso de revestimentos líquidos ou adsorção, no caso de revestimentos de sólidos. A fibra SPME é então transferida para o instrumento analítico para a dessorção e análise dos analitos alvo. A utilização da tecnologia de sol-gel na produção de fibras de SPME tem ajudado a aumentar a gama de resíduos de pesticidas que podem ser extraídos com a técnica de SPME.

Spietelun *et al*⁵⁸ fizeram uma revisão crítica das informações sobre as abordagens conhecidas e inovadoras para a fabricação de revestimentos de fibra utilizados na SPME. São discutidos em detalhes as propriedades, as vantagens e as desvantagens dos diferentes tipos de revestimentos de fibra de SPME disponíveis comercialmente, além dos novos tipos de revestimentos e as metodologias para a sua preparação.

Analísaram as aplicações dos revestimentos da fibra na SPME para um amplo espectro de analitos, com ênfase para a amostragem de analitos polares a partir de matrizes polares (174 referências).

Bianchin *et al*⁵⁹ propõem uma nova abordagem para otimização e determinação simultânea de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA) e benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno (BTEX) em amostras de água utilizando a SPME com detecção por GC/MS. O objetivo do estudo foi encontrar um compromisso entre as condições de extração, adequado para todos os compostos voláteis e semi-voláteis, em que a quantidade extraída é maximizada para todos os analitos. Isto foi alcançado através da otimização cuidadosa do revestimento da fibra, efeito *salting-out*, do tempo de extração, temperatura e o do modo de extração (*headspace* ou imersão direta). Com o revestimento de fibra otimizada - PDMS/DVB 65 µm - os outros fatores selecionados foram otimizados usando uma metodologia de superfície de resposta através do delineamento composto central. Como esperado, os resultados otimizados para cada classe de analitos variou significativamente, provavelmente devido às diferenças na sua volatilidade e as constantes de equilíbrio para o revestimento de analito/fibra. A fim de superar este problema, a otimização de uma nova abordagem foi proposta com base em uma combinação de modos de extração e temperaturas de extração. O procedimento final foi otimizado: 48 min de extração no modo imersão direta com a amostra mantida a 80 °C seguido de um adicional de 32 min de extração no *headspace* com a temperatura da amostra mantida a 10 °C. O procedimento proposto foi comparado com os métodos convencionais baseados na utilização de um único modo de extração e temperatura (80 min de extração no *headspace* a 60 °C ou 80 min de extração em imersão direta a 50 °C). O novo método proposto mostrou ser mais atraente, uma vez que maiores quantidades foram extraídas dos compostos semi-voláteis e voláteis em um único procedimento de extração em comparação com os métodos convencionais.

Os trabalhos citados acima ilustram o grande campo de aplicações da técnica de extração de SPME, como podemos constatar a mesma vem sendo utilizada para estudos de cinética, quantificação, qualificação, monitoramento de ambientes, até mesmo para análises *in vivo*. Além de apresentar trabalhos nas mais diversas áreas, tais como farmacêutica, ambiental, médica, forense, alimentar, petróleo, entre outras. Apesar de a SPME ser uma técnica já consolidada, estudos são desenvolvidos a

fim de melhorar ainda mais sua eficiência e sensibilidade, como pode ser observado pela busca de novos revestimentos, novas estratégias de otimização das condições de extração e variações da mesma.

1.4.5 Microextração em fase sólida com revestimento internamente refrigerado (CF-SPME)

A técnica de SPME com revestimento internamente refrigerado foi introduzida por Zhang e Pawliszyn em 1995,⁶⁰ os quais desenvolveram uma nova abordagem para SPME por *headspace*. Ao aquecerem a matriz da amostra enquanto simultaneamente resfriavam o revestimento da fibra, não só para facilitar a transferência de massa e a liberação dos analitos do *headspace*, mas também criar um espaço de temperatura baixa da fibra e alta temperatura do *headspace* aumentaram significativamente o coeficiente de partição dos analitos. Aplicaram o método para extração quantitativa de benzeno, tolueno, etilbenzeno e isômeros de xileno em matrizes de água e solo.

O dispositivo CF-SPME utilizado no trabalho citado acima foi miniaturizado e automatizado em 2006,⁶¹ tornando o trabalho experimental mais viável, e está apresentado na Figura 5.

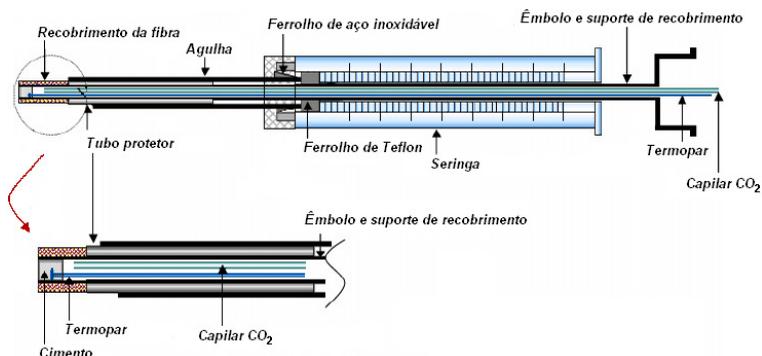


Figura 5. Dispositivo de SPME internamente refrigerado, adaptado de Chen e Pawliszyn.⁶¹

Um tubo de aço inoxidável foi utilizado como suporte da fibra e êmbolo, apresentando diâmetro externo (D.E.) de 0,71 mm D.I. de 0,60 mm. Foram inseridos dentro do mesmo, um tubo com 0,13 e 0,30 mm

de D.I. e D.E., respectivamente, que conduz o CO₂ líquido, e um fio de termopar de aproximadamente 0,08 mm. A extremidade do tubo inoxidável o qual a fibra o recobre foi selada com cimento de alta temperatura. O termopar usado para monitorar a temperatura da fibra foi fixado no cimento a aproximadamente 2 mm da extremidade, como mostrado na parte ampliada da Figura 5. Uma membrana tubular polimérica de PDMS com aproximadamente 1 cm de comprimento e com espessura de 0,18 mm e 0,30 mm de D.I. e D.E., respectivamente, após ser expandida em hexano, foi colocada na extremidade do tubo selado com cimento. Um tubo auxiliar de aço inoxidável (D.I. 0,81 mm e D.E. 1,07 mm), foi colocado a aproximadamente 1 cm da ponta selada, no suporte em que a fibra ficou aderida, com o objetivo de proteger o recobrimento da fibra durante o procedimento de exposição e retração, da mesma. Finalmente, foi introduzido um tubo menor externo de aço inoxidável (D.I. 1,14 mm e D.E. 1,27 mm), com espessura suficiente para acomodar o dispositivo suporte/êmbolo, o qual trabalha como protetor e agulha na perfuração dos septos. O esquema completo do sistema CF-SPME está apresentado na Figura 6. O mesmo contém uma válvula solenoide que permite a entrada de CO₂ líquido, originário do cilindro que contém o gás em direção à fase extratora, acoplado a um controlador de temperatura, o qual envia o comando para a válvula abrir ou fechar, caso a temperatura registrada pelo termopar seja diferente da temperatura de trabalho pré-programada para o recobrimento da fibra.

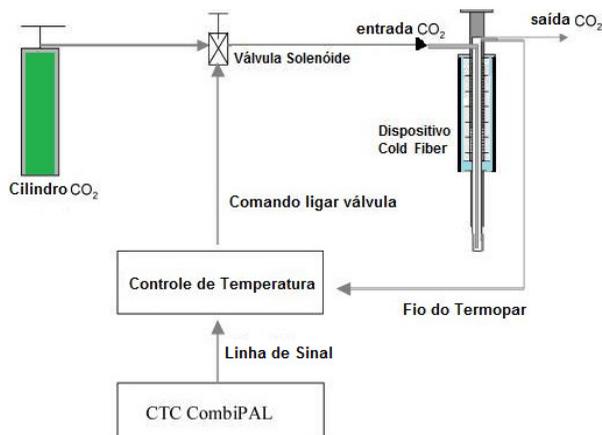


Figura 6. Sistema de SPME internamente refrigerado, adaptado de Chen e Pawliszyn.⁶¹

Com essa estratégia de amostragem, a transferência de massa é acelerada, e um intervalo de temperatura é criado entre a fibra internamente resfriada e o *headspace* altamente aquecido, o que aumenta significativamente o coeficiente de partição. Dessa forma, torna-se possível a utilização de temperaturas elevadas, sendo as mesmas limitadas apenas pela estabilidade dos analitos e da matriz da amostra.⁶¹

Na sequência, serão apresentadas as deduções simplificadas da equação para o cálculo da variação de entropia do processo (a dedução completa pode ser encontrada na referência 60). A simplificação irá considerar a extração de somente um analito e assumir a pressão constante. Na realidade, a transferência dos analitos da fase gasosa para o revestimento irá reduzir a pressão quando o volume do recipiente for mantido constante durante a extração. Porém, quando se trabalha com quantidades muito pequenas do analito a mudança de pressão durante a extração pode ser negligenciada.

A amostragem de HS-SPME da fibra com recobrimento internamente refrigerado pode ser descrito como um processo termodinâmico em sequência. No início, uma amostra de gás com um analito (n_0 mol) e ar está em um recipiente de volume V_s à temperatura T_s e à pressão P_s , e um filme líquido (n_c mol) à uma temperatura T_f e

uma pressão P_s . Os dois sistemas são isolados um do outro. Quando a extração inicia os dois sistemas são conectados. Somente o analito pode transitar da fibra para matriz e vice versa. Durante a extração a temperatura e a pressão da fibra e da fase gasosa são mantidas em seus valores iniciais. Finalmente os dois sistemas atingem um equilíbrio dinâmico (com n_f mol de analito na fibra e n_s mol na fase gasosa; $n_0 = n_f + n_s$), isto é a taxa de desorção do analito da fibra se iguala a de absorção do analito pela fibra. A força motriz da transferência do analito da fase gasosa para o recobrimento da fibra é o aumento da entropia do sistema. O equilíbrio é estabelecido quando é transferida uma quantidade infinitesimal do analito entre a fase gasosa e o recobrimento da fibra, e não resultará em nenhuma mudança de entropia. Como a variação da entropia independe das etapas, mas somente dos estados inicial e final, pode-se estabelecer etapas hipotéticas simples de maneira a tornar mais simples o cálculo da variação de entropia do processo. Pode-se supor inicialmente que o processo ocorra em três etapas. A variação de entropia para primeira etapa representa a mistura de vapor do analito com o ar do *headspace* à temperatura e pressão constantes, sendo expressa por (ΔS_1):

$$\Delta S_1 = -n_s R \ln \frac{n_s}{n_H} + n_0 R \ln \frac{n_0}{n_H} \quad \text{Equação 13}$$

n_s = quantidade do analito no *headspace* quando o equilíbrio é alcançado;

n_0 = quantidade do analito inicialmente presente no *headspace*;

n_H = quantidade de ar no *headspace*;

R = constante dos gases ($8,31 \text{ JK}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)

Na dedução da equação 13, assumiu-se que os gases se comportam idealmente e $n_H \gg n_0$. A segunda etapa envolve o resfriamento do vapor do analito de T_s para T_f nas proximidades do recobrimento resfriado, que pode ser expressa por ΔS_2 :

$$\Delta S_2 = n_f C_p \left(\frac{T_s - T_f}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) = n_f C_p \left(\frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) \quad \text{Equação 14}$$

n_f = quantidade de analito absorvida pelo recobrimento da fibra no equilíbrio;

C_p = capacidade calorífica do analito a pressão constante, onde se assumiu que este valor é constante entre T_s e T_f

A etapa final envolve a absorção do analito pelo recobrimento da fibra com a temperatura constante T_f e pode ser expressa por ΔS_3 :

$$\Delta S_3 = -n_f R \ln \frac{T_f n_f V_s}{T_s V_f K_0 n_H} \quad \text{Equação 15}$$

K_0 = constante de partição de distribuição do analito entre o *headspace* e o recobrimento da fibra, quando ambos se encontram na temperatura da fibra T_f .

A entropia total do sistema é:

$$\Delta S = \Delta S_1 + \Delta S_2 + \Delta S_3 \quad \text{Equação 16}$$

No equilíbrio, como já descrito:

$$\frac{\partial \Delta S}{\partial n_f} = 0 \quad \text{Equação 17}$$

Derivando-se ΔS em relação a n_f e lembrando-se que $n_0 = n_f + n_s$ obtém-se a equação a seguir:

$$C_p \left(\frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) - R \ln \frac{T_f n_f V_s}{T_s V_f n_s K_0} = 0 \quad \text{Equação 18}$$

A constante de distribuição do analito entre o recobrimento da *cold fiber* e o *headspace* aquecido é convenientemente definida por $K_T = C_f / C_{HS} = n_f V_s / n_s V_f$. Substituindo essa relação na equação 19, e isolando o termo K_T , tem-se:

$$K_T = K_0 \frac{T_s}{T_f} \exp \left[\frac{C_p}{R} \left(\frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) \right] \quad \text{Equação 19}$$

K_0 = coeficiente de partição do analito quando tanto o recobrimento da fibra quanto o *headspace* estão na mesma temperatura da fibra T_f ; $\Delta T = T_s - T_f$

Podemos concluir com a equação 19 que quanto maior for a diferença de temperatura entre o *headspace* e a recobrimento da *cold fiber* maior será o coeficiente de partição. Portanto, podemos utilizar altas temperaturas de amostra o que facilitará a dessorção térmica e aumentará a volatilidade do analito enquanto simultaneamente resfria-se o recobrimento da *cold fiber*. Desse modo será possível extrair alguns analitos exaustivamente, que no caso da SPME comercial dificilmente será possível ou sendo possível somente em condições extremas.

1.4.5.1 Aplicações da CF-SPME

A literatura que se refere à aplicação do sistema CF-SPME é muito limitada, provavelmente pelo dispositivo ainda não ser comercializado, a qual será descrita sucintamente abaixo.

Em 2004, Ghiasvand *et al*⁶² utilizaram o sistema de CF-SPME para determinação de naftaleno, acenafileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno e pireno em amostras de areia e sedimento.

Amostras de areia foram fortificadas com os HPA e o efeito de diferentes parâmetros foi estudado, incluindo a temperatura de extração, tempo de extração, teor de umidade, efeito da sonicação e modificador. A temperatura do recobrimento da fibra foi 5 °C, temperatura de extração de 150 °C e tempo de extração de 40 min. Foram obtidos LOD entre 0,3 – 3 $\mu\text{g g}^{-1}$, com 2 g de massa de amostra. Duas amostras de referência foram submetidas à metodologia proposta, sendo obtidos resultados diferentes dos valores de referência para o fluoranteno e pireno, cuja recuperação ficou na faixa de 40 a 60%. Com o intuito de melhorar a recuperação destes compostos, utilizaram-se os modificadores metanol, sulfato de sódio e água. Com o uso da água como modificador foi possível uma melhora significativa na recuperação. No entanto a evaporação da água a 150 °C causa um aumento na pressão interna, o que pode ocasionar vazamentos. Portanto, maiores tempos de extração foram estudados, alcançando-se uma extração exaustiva em concordância com os valores certificados para esses compostos de 180 min.

Carasek e Pawliszyn,⁶³ no ano de 2006, utilizaram o dispositivo CF-SPME para análise de aromas de frutas tropicais, tais como: maracujá, caju, tamarindo, acerola e goiaba. Foi feita uma comparação entre as fibras comercialmente disponíveis de SPME e a CF-SPME. Pode-se concluir que o sistema CF-SPME foi mais atrativo, uma vez que um maior número de compostos pode ser identificado, devido ao maior poder de extração. As condições ótimas de extração foram estudadas para ambas as fibras, sendo que para a SPME utilizando fibra de DVB/CAR/PDMS foram as seguintes: tempo de incubação de 10 min, agitação da amostra de 500 rpm, tempo de extração de 25 min e temperatura de extração de 60 °C. Já para a CF-SPME as condições ótimas foram de 60 °C para a temperatura da amostra e 0 °C para a temperatura da fibra. Os autores concluíram que, exceto para a polpa de maracujá, a metodologia utilizando CF-SPME foi mais eficiente, pois foi possível identificar um maior número de compostos.

Carasek *et al.*,⁶⁴ em 2007, utilizaram novamente o dispositivo de CF-SPME para determinação de 2,4-dicloroanisol, 2,6-dicloroanisol, 2,4,6-tricloroanisol e pentacloroanisol em amostras de rolha de cortiças, utilizadas em garrafas de vinho. Através de um planejamento fatorial completo e matriz Doehlert as melhores condições experimentais foram otimizadas para SPME comercial e CF-SPME. Utilizando-se fibra comercial de DVB/PDMS as melhores condições otimizadas foram:

tempo de incubação de 10 min, tempo de extração de 75 min, temperatura de extração de 85 °C com adição de 8 mL de água sobre 200 mg de amostra e 500 rpm de agitação. Já para o sistema CF-SPME foram: tempo de incubação de 10 min, tempo de extração de 10 min e temperatura da amostra e da fibra de 130 e 10 °C, respectivamente. Os LOD utilizando-se SPME comercial foram cerca de uma ordem de grandeza maiores em comparação ao método que utilizou CF-SPME, 1,2 – 1,8 ng g⁻¹ contra 0,25 – 0,45 ng g⁻¹, mostrando uma melhora no poder de detecção do sistema internamente refrigerado sobre a fibra comercial não refrigerada. Além disso, deve-se destacar a diferença no tempo de extração entre os dois métodos (10 min para CF-SPME e 75 min para SPME comercial).

Ghiasvand *et al*, em 2007,⁶⁵ através do dispositivo CF-SPME analisaram o aroma de nove variedades de arroz iraniano e duas variedades indianas e os resultados foram comparados com aqueles determinados por SPME comercial. Com base em quatro analitos alvos, incluindo hexanal, D-limoneno, tetradecano e 2-acetil-1-pirrolina sendo este último um composto odorante chave, diferentes parâmetros experimentais foram otimizados. O efeito da composição das fibras, umidade presente na matriz, temperatura, tempo de extração e tempo de desorção foram investigados. As melhores condições obtidas foram: fibra CAR/DVB/PDMS, adição de 200 µL de água em 2 g de amostra com tempo de extração de 30 min a 60 °C. Com essas condições, os autores identificaram cerca de 30 compostos em cada amostra analisada. Utilizando o sistema CF-SPME, as seguintes condições foram obtidas: temperatura de amostra de 100 °C e 30 min de extração, sendo que a temperatura de fibra não foi otimizada e fixada em todos os estudos em 5 °C. Com as condições otimizadas para o sistema CF-SPME cerca de 50 compostos foram tentativamente identificados, demonstrando que o sistema internamente refrigerado da fibra é mais eficiente que o sistema de SPME comercial.

Chen *et al*, no ano de 2007,⁶⁶ utilizaram o dispositivo com recobrimento internamente refrigerado para análise do aroma e fragrâncias em xampu. Os resultados obtidos foram comparados aos obtidos utilizando fibra comercial. Os compostos avaliados foram acetato de benzila, geraniol, Cetalex®, e os seguintes componentes modelos de aromas: hexanal, acetato de butila, (E)-2-hexenal, acetato de isoamila, isobutirato de isobutila, acetato de hexila e acetato de heptila. Os componentes modelos de aromas foram extraídos em solução

aquosa, já o restante dos componentes foram extraídos de solução aquosa contendo 1% de xampu. As condições ótimas para extração com o sistema CF-SPME para os componentes modelos de aromas foram: tempo de extração de 20 min a 60 °C com a temperatura de recobrimento fixada em 1 °C, volume de 8 mL de amostra com agitação magnética. Já para o sistema de SPME comercial com fibra de PDMS 100 µL foram: tempo de extração de 45 min a 45 °C, com volume de 8 mL de amostra com agitação magnética. Comparando-se os resultados, o limite de detecção de 2 a 10 vezes menores foram obtidos com o dispositivo CF-SPME. Para análise dos componentes em xampu, as melhores condições otimizadas para o sistema internamente refrigerado foram: volume da amostra de 50 µL com agitação magnética, tempo e temperatura de extração de 45 min a 60 °C, respectivamente, temperatura do recobrimento da fibra fixada em 1 °C. Nessas condições, obteve-se recuperação de 83, 87 e 90% para CetaloX®, acetato de benzila e geraniol, respectivamente, com LOD de 1 a 8 µg g⁻¹. As condições ótimas de extração para SPME comercial foram otimizadas em trabalho anterior (2006)⁶⁷ dos mesmos autores e são as seguintes: tempo de extração de 45 min a 45 °C, 8 mL de amostra, diluída para 0,01% de xampu, saturada com NaCl com agitação magnética. Os LOD ficaram na faixa de 2 a 20 µg g⁻¹. Embora não se tenha um ganho significativo no LOD utilizando o dispositivo CF-SPME em comparação a SPME comercial, temos que levar em conta o volume da amostra e o fator de diluição, muito menores com o dispositivo CF-SPME.

Em 2009, Haddadi *et al*⁶⁸ estudaram a cinética de dessorção de HPA em solo e sedimento através do sistema CF-SPME. A cinética de dessorção de compostos orgânicos hidrofóbicos de partículas de solos e sedimentos é importante tanto do ponto de vista da química ambiental como da química analítica. Utilizando a temperatura da amostra de 150 °C e do recobrimento da fibra de 25 °C, o tempo de extração estudado foi de 2, 5, 15, 30, 45 e 60 min. Os resultados mostram que o tempo para o equilíbrio (< 5 min) muito curto para a maioria dos compostos foi atingido, com isso os analitos foram extraídos quase que exaustivamente, 80% ou mais, da fase gasosa, com apenas 5 min de extração. Esse curto tempo é previsto pela teoria, sabendo-se que a etapa de difusão da matriz gasosa é rápida, sendo a etapa determinante a difusão pelo recobrimento. O coeficiente angular do gráfico entre o logaritmo natural da fração dessorvidano tempo t em função do tempo

de dessorção fornece a constante de dessorção, os valores dessa constante foram obtidos na faixa de temperaturas de 90 a 180 °C, e as energias de ativação aparente de dessorção foram estimadas. Os autores concluíram que a técnica proposta é mais eficiente em tempo, além de mais versátil, quando comparada às técnicas comumente empregadas para o mesmo fim, uma vez que as técnicas convencionais de dessorção são demoradas e na maioria dos estudos um analito por vez e apenas um ou poucos sorventes são empregados.

Sanchez-Prado *et al.*, em 2009,⁶⁹ utilizaram o dispositivo de CF-SPME para o estudo de fotodegradação de moléculas orgânicas voláteis. Como analito usou-se o hexaclorobenzeno, onde o mesmo foi inicialmente absorvido pela fibra a partir de uma solução de 10 mL do padrão $5\mu\text{g L}^{-1}$ num frasco de 22 mL, com agitação magnética de 1000 rpm, temperatura da amostra de 100 °C (5 min de tempo de equilíbrio) e tempo de extração de 45 min, com temperatura do recobrimento da fibra de 50 °C. Após essa etapa, a temperatura da fibra foi ajustada para 0 °C e então retirada do frasco e submetida à radiação UV com comprimento de onda de 254 nm a uma potência de 16 W com tempo que variou de 0 a 20 min. Nas condições experimentais descritas acima e durante o curso da fotoreação do hexaclorobenzeno, os autores relataram, e detectaram a formação de quatro foto produtos: pentaclorobenzeno, dois isômeros tetraclorobenzeno (1,2,3,5 e 1,2,4,5-tetraclorobenzeno) e pequenas quantidades de um isômero do triclorobenzeno (1,3,5-triclorobenzeno). A identificação dos isômeros foi feita por comparação dos tempos de retenção com soluções dos padrões dos analitos. No tempo de 20 min o hexaclorobenzeno foi quase que totalmente fotodegradado. Os resultados obtidos pelos autores estão de acordo com os relatados por outras técnicas em que a fotodegradação foi feita em meio orgânico. O dispositivo CF-SPME, mostrou-se atrativo e eficiente para estudos de fotodegradação, pois utiliza o próprio recobrimento da fibra como meio orgânico para reação e o mesmo é posteriormente utilizado para análise e identificação dos produtos formados.

Martendal e Carasek, em 2011,⁷⁰ descreveram uma nova estratégia de otimização para a CF-SPME baseado numa abordagem multivariada. A temperatura do recobrimento foi variada durante a extração enquanto o tempo de extração foi manipulado com o objetivo de melhorar a extração de compostos de diferentes volatilidades. Os analitos estudados foram HPA, ésteres ácidos de ftalatos (EF) e adipatos. Para ambas as classes estudadas (HPA e EF), a otimização foi

realizada pela transferência de 400 ng de cada composto para o frasco de 15 mL. Em todos os casos, a temperatura das amostras foi controlada por meio de um bloco aquecedor. A incubação e a estabilização da temperatura das amostras foram mantidas constantes por 10 min na temperatura em que esta seria avaliada no momento. A dessorção dos analitos foi realizada na porta do injetor do cromatógrafo a 300 °C por 7 min. Nenhum efeito de memória foi observado. A estratégia de otimização foi feita em duas etapas. Na primeira etapa realizou-se a otimização simultânea do tempo de extração e da temperatura do recobrimento. Já na segunda etapa, o procedimento de extração foi realizado utilizando duas temperaturas na fase extratora, sempre iniciando com o recobrimento na temperatura alta selecionada, e, após um determinado tempo (de acordo com o planejamento experimental), a temperatura da fibra foi mudada para o valor baixo selecionado, no qual ela foi mantida por outro período de tempo também de acordo com o planejamento experimental. Assim, a variável tempo de extração total foi definida como a soma do tempo de extração com a fibra a alta temperatura e o tempo de extração no qual a fibra foi ajustada para a temperatura baixa. A mudança na temperatura da fibra foi realizada manualmente, assim como a operação do dispositivo de *cold fiber* durante todo o trabalho. As condições ótimas de extração para a nova metodologia foram para os HPA selecionou-se 40 min como tempo de extração total, sendo os primeiros 20 min com a fibra a 60 °C, seguido de 20 min com a fibra a 5 °C e para os EF foi de 30 min como tempo total de extração, correspondente à extração de 23 min com o revestimento a 140 °C, seguido por 7 min de resfriamento a 10 °C. Os autores realizaram algumas comparações a fim de visualizar melhor as diferenças entre as novas condições otimizadas e as comumente adotadas, ou seja, com a fibra mantida a uma temperatura mínima e durante todo o tempo de extração. Para EF, as condições comparadas foram: 30 min de extração com a fibra em 140 °C, 30 min com a fibra em 10 °C, 30 min de extração com revestimento em 40 °C. Os resultados das comparações mostraram que para a maioria dos compostos avaliados a nova otimização é mais eficiente, quando não é semelhante. Os autores concluíram ser a nova estratégia de otimização uma excelente alternativa para se trabalhar simultaneamente com analitos de diferentes polaridades/volatilidades.

Martendal e Carasek, também em 2011,⁷¹ descreveram uma nova abordagem para o sistema CF-SPME baseada na combinação de

diferentes modos de extração no mesmo procedimento de extração. Além disso, investigaram a quantidade de água requerida para facilitar a adsorção dos analitos da matriz e seu transporte para o recobrimento da fibra. A temperatura da amostra foi fixada em 90 °C para se evitar vazamentos. Os analitos usados para estudos foram os HPA e os EF em amostras de areia e solo. A estratégia de otimização nesse trabalho foi dividida nas seguintes partes: otimização das variáveis para a extração no modo *headspace*, otimização para o modo de imersão direta e, finalmente, a nova proposta, que consiste em uma combinação dos dois modos de extração no mesmo procedimento. O pH e a força iônica pela adição de NaCl, foi estudada somente para classe dos EF, com o objetivo de avaliar se os EF poderiam ser hidrolisados, uma vez que uma alta temperatura de extração é empregada (90 °C) em todo o estudo. Já o volume de água e a força iônica pela adição de NaCl, foram estudados simultaneamente para os HPA e EF, finalmente foram estudados o efeito do tempo de extração e temperatura do recobrimento da fibra para ambas as classes. As condições otimizadas foram de pH na faixa de 4-7, adição de 12 mL de solução aquosa de NaCl 194 g L⁻¹ e 80 min de extração como tempo total (50 min no modo de extração direto com temperatura do recobrimento de 90 °C seguido de 30 min de extração no modo *headspace* com temperatura de recobrimento de 30 °C). Os resultados foram comparados a CF-SPME convencional, com somente um modo de extração, com e sem a adição de água. Os autores relataram que a abordagem baseada no uso de água e temperatura da amostra intermediária, juntamente com a combinação de dois modos de extração no mesmo procedimento foi muito mais eficiente em comparação com o uso de alta temperatura da amostra, nenhuma adição de água e baixa temperatura do recobrimento. A introdução das inovações metodológicas apresentadas foi capaz de melhorar as abordagens já existentes na utilização da técnica de CF-SPME.

Jiang *et al*, no ano de 2012,⁷² aplicaram um dispositivo de CF-SPME totalmente automatizado através do acoplamento com o amostrador automático da GERSTEL (MPS 2) para a análise de compostos voláteis e semi-voláteis em matrizes aquosas e sólidas. O dispositivo proposto foi cuidadosamente avaliado quanto ao seu desempenho de extração, reprodutibilidade, robustez e confiabilidade por GC/MS. Com o uso de uma cabeça de injetor sem septo (*septumless*), toda a configuração automatizada foi capaz de analisar mais de 200 amostras sem vazamento no injetor do GC. A avaliação do

dispositivo automatizado de *cold fiber* foi realizada, usando um grupo de compostos caracterizados por diferentes volatilidades e polaridades, pela determinação da eficiência de extração bem como a comparação de parâmetros analíticos de mérito com os de fibras comerciais de SPME. O dispositivo automatizado de CF-SPME mostrou melhor eficiência de extração e melhorou significativamente em comparação com a fibra comercial de PDMS para na análise de amostras em padrão aquoso devido à baixa temperatura do revestimento. A faixa linear dinâmica da CF-SPME foi de $0,5 \text{ ng mL}^{-1}$ a 100 ng mL^{-1} , com um coeficiente de correlação $\geq 0,9963$ para todos os compostos. O LOD para os analitos avaliados variou de $1,0 \text{ ng mL}^{-1}$ a $9,4 \text{ ng mL}^{-1}$. O recém automatizado dispositivo de CF-SPME apresenta uma excelente alternativa para análise por *headspace* de compostos voláteis e semi-voláteis com grande número de amostras analisadas e com um melhor rendimento e sensibilidade.

Todos os trabalhos citados acima utilizam o dispositivo de CF-SPME, descrito do item 1.4.5 deste trabalho, diferentemente dos trabalhos relatados abaixo que fazem uso de um dispositivo de CF-SPME desenvolvidos pelos autores.

Em 2009, Haddadi *et al*⁷³ desenvolveram um novo dispositivo de *cold fiber* baseado em resfriamento termoeletrico (Figura 7). Um resfriador termoeletrico de três estágios (TEC) foi usado para resfriar um fio de cobre revestido com uma membrana oca da PDMS. O fio de cobre foi montado num sistema comercial de SPME e exposto à superfície resfriada do TEC, o qual fica dentro de uma pequena caixa de alumínio. Para medir indiretamente a temperatura do recobrimento da fibra um termopar foi colocado na parte resfriada do dispositivo. O novo dispositivo foi aplicado na análise quantitativa de aromas que causam mau cheiro em arroz (hexanal, nonanal e undecanal). Perfis da quantidade extraída (ng) *versus* a temperatura de extração que variou de 50 a 110 °C foram obtidos para a fibra comercial de SPME (DVB/CAR/PDMS) e para o sistema proposto, com 20 min de extração para ambos os casos. Como temperatura ótima para a fibra comercial obteve-se 70 °C para o hexanal e nonanal e 90 °C para o undecanal e para o sistema proposto obteve-se como temperatura ótima 110 °C para todos os três compostos. O sistema proposto apresentou melhores resultados nas quantidades extraídas do que o sistema comercial, cerca de 12, 5 e 2 vezes maiores, respectivamente, para o hexanal, nonanal e undecanal. Neste caso a temperatura da fibra ficou aproximadamente 20

°C e a da amostra, 100 °C. O tempo de equilíbrio para temperatura de 70 °C foi de 30 min, já para a temperatura de 100 °C foi alcançado em apenas 5 min, indicando que na temperatura maior os analitos são mais facilmente liberados pela matriz. Os aldeídos foram quantificados numa amostra de arroz através do método proposto e pelo método padrão de extração com solventes, estatisticamente os resultados não foram diferentes, no entanto o método proposto mostrou-se mais preciso, rápido e simples e sem utilização de solventes.

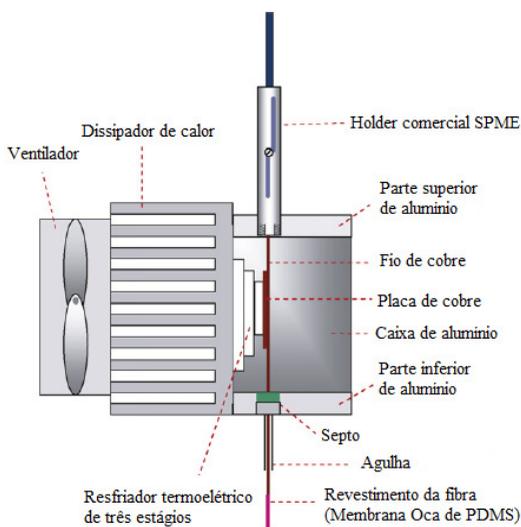


Figura 7. Sistema de CF-SPME com resfriamento termoelétrico, adaptado de Haddadi *et al.*⁷³

Chia *et al.*, no ano de 2004,⁷⁴ desenvolveram um sistema para refrigerar o recobrimento da fibra, enquanto a amostra era aquecida. O sistema refrigerado (Figura 8) foi utilizado para determinação de policlorodibenzeno-*p*-dioxinas e policlorodibenzofuranos em amostras de solo. Consistindo basicamente em refrigerar a parte superior externa através de um fluxo de etanol refrigerado. Para monitoramento da temperatura um termopar foi colocado juntamente com a fibra no *headspace*. A extração foi feita com a fibra PDMS 100 µm, 500 mg da amostra fortificada com os analitos foi adicionada num frasco de 8 mL,

com 1 mL de água, a temperatura da amostra foi de 85 °C, com tempo de extração de 60 min, com agitação ultrassônica e a temperatura do *headspace* medida de 4 °C. Para comparação dos resultados o sistema foi operado com e sem refrigeração, no entanto, os autores obtiveram uma melhora de 2 a 22 vezes, operando com o sistema refrigerado, dependendo do analito.

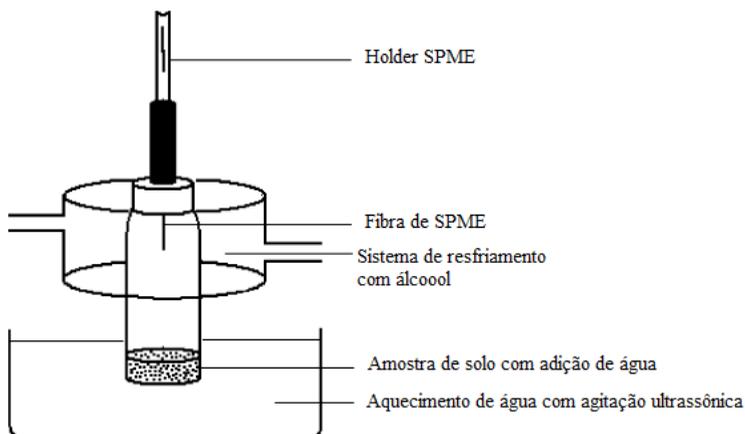


Figura 8. Sistema de refrigeração do *headspace*, adaptado de Chia *et al.*⁷⁴

Menezes e Cardeal, no ano de 2011,⁷⁵ aplicaram o dispositivo de CF-SPME, desenvolvido pelos autores, para determinação de HPA em material particulado de ar ambiente. O dispositivo desenvolvido pelos autores está apresentado na Figura 9. O mesmo consiste de um fio de cobre de 70 cm (D.E. de 2,4 mm e D.I. de 1,6 mm), que foi usado para transferir o nitrogênio líquido do frasco de Dewar para o dispositivo de SPME. Uma das extremidades do tubo foi inserida dentro do frasco de Dewar através de uma rolha de borracha e a outra a um tubo em espiral de 3 cm de comprimento (D.I. de 2 mm), sustentado à agulha do *holder* manual, contendo uma fibra de PDMS de 100 μm . O estudo foi conduzido através de um planejamento fatorial 2^3 , as variáveis investigadas foram: temperatura de extração, tempo de equilíbrio no banho de ultrassom e o tempo de extração. O modo de extração utilizado no trabalho foi o modo direto e a temperatura da fibra não foi controlada. Os autores compararam o resultado com e sem

resfriamento da fibra e o ganho foi de apenas 2 vezes para o composto que apresentou maior eficiência.

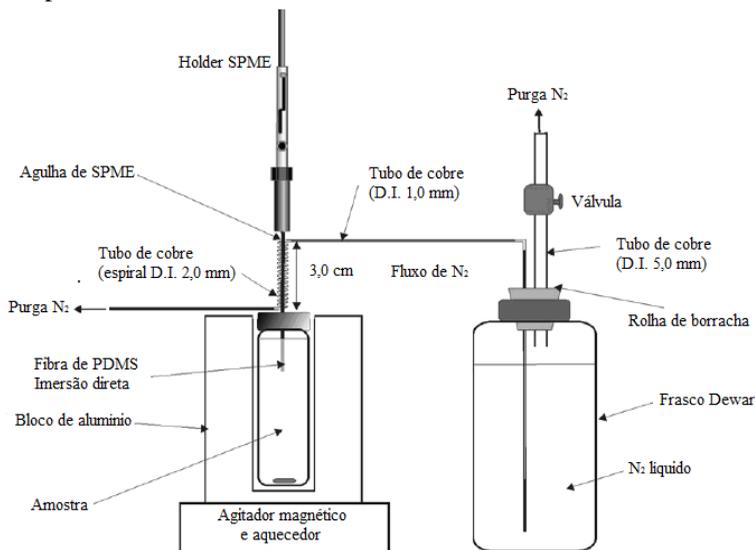


Figura 9. Dispositivo de CF-SPME, adaptado de Menezes e Cardeal.⁷⁵

Menezes *et al*, em 2012,⁷⁶ desenvolveram um método para determinação de naftaleno em ar ambiente usando CF-SPME com detecção por GC/MS. O método utiliza uma fibra de 100 μm de PDMS, o esquema do sistema de CF-SPME é semelhante ao apresentado da Figura 9, porém a fibra fica exposta num tubo de permeação por onde o ar passa. O método apresenta bons resultados para os parâmetros de validação, o intra-ensaio de precisão mostra um RSD variando 1,04-8,11%, o LOD foi de $0,33 \pm 0,01 \text{ g m}^{-3}$, e o LOQ foi de $0,55 \pm 0,01 \text{ g m}^{-3}$. O método foi aplicado para a determinação de naftaleno de amostras reais coletadas de ar interior e exterior. Os resultados demonstraram a capacidade do método em medir os níveis baixos de naftaleno no ar em diferentes ambientes.

Com os resultados dos trabalhos desenvolvidos utilizando o sistema de *cold fiber*, é possível verificar que há sempre um ganho significativo na quantidade de analitos extraídos da matriz, no entanto isso foi observado com menos intensidade nos três últimos trabalhos, provavelmente por esses serem menos aprimorados que os demais dispositivos. Contudo,

ficou clara a eficiência do dispositivo CF-SPME para matrizes complexas.

1.5 Derivatização

Alguns compostos que possuem elevada polaridade como os fenóis, apresentam baixos coeficientes de partição recobrimento/água ou recobrimento/gás e baixa volatilidade (resultando em uma baixa resolução cromatográfica). Uma das maneiras de reverter esse problema é realizar a derivatização dos mesmos, ou seja, convertê-los em seus análogos menos polares, aumentando assim os coeficientes de partição com fibras pouco polares como PDMS. Como resultado, geralmente observa-se uma melhora na eficiência de extração e da sensibilidade do método de detecção. No entanto, a derivatização introduz também uma nova etapa trabalhosa e longa na análise, além de poder introduzir erros devido às reações paralelas que podem ocorrer durante a derivatização, por isso suas condições devem ser otimizadas.⁴⁷

A derivatização combinada com SPME poder ser feita de quatro modos: antes da extração (o reagente derivatizante é adicionado à matriz antes da extração, e aguardado um tempo suficiente para que a reação ocorra), durante a extração (reagente é pré-carregado no sorvente da SPME, ocorrendo simultaneamente a derivatização e extração), no recobrimento da fibra após extração (fibra com os analitos extraídos é exposta ao reagente derivatizante após ser retirada do frasco de extração) ou derivatização após dessorção (a derivatização ocorre no injetor ou na coluna).⁴⁷

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Desenvolver, através das técnicas de SPME e CF-SPME, metodologias analíticas para a determinação de contaminantes orgânicos em amostras de couro utilizando como método de identificação/quantificação a cromatografia gasosa.

2.2 Objetivos Específicos

Otimizar as variáveis que afetam a eficiência de extração da SPME convencional para determinação de fenóis em couro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

Otimizar as variáveis que afetam a eficiência de extração da SPME comercial para determinação de pesticidas em couro por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas;

Determinar o compromisso entre a temperatura da fibra, temperatura da amostra e tempo de extração para a extração dos fenóis, em couro, no dispositivo de SPME internamente refrigerado;

Estudar meios para derivatização dos fenóis no dispositivo SPME internamente refrigerado, durante e após a extração dos analitos, com o seguinte derivatizante: bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA);

Obter os parâmetros analíticos de mérito para validar as metodologias propostas como faixa linear de trabalho, limites de detecção e quantificação, repetibilidade e recuperação.

CAPÍTULO III

Aplicação de microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para determinação de clorofenóis em couro

Este trabalho propõe um método para análise simultânea de 16 fenóis em couro utilizando SPME E GC/MS com derivatização anterior à extração. A fibra de poliacrilato foi utilizada devido a sua eficiência comprovada frente à extração dos analitos de interesse.⁷⁷⁻⁸¹ Os analitos avaliados nos referidos trabalhos incluem, 2 e 4-clorofenol, 2,4 e 2,6-diclorofenol, 2,4,5 e 2,4,6-triclorofenol, 2,3,4,6-tetraclorofenol, pentaclorofenol e 4-cloro-3-metilfenol. A otimização da extração dos fenóis foi realizada seguindo dois planejamentos experimentais, o planejamento fatorial fracionário e o delineamento de composto central, os quais indicaram as condições ótimas de extração. O procedimento otimizado foi aplicado na análise dos fenóis em couro.

3.1 PARTE EXPERIMENTAL

3.1.1 Reagentes

Uma mistura de fenóis [2,3-diclorofenol (2,3dCP), 2,4-diclorofenol (2,4dCP), 2,5-diclorofenol (2,5dCP), 2,6-diclorofenol (2,6dCP), 3,5-diclorofenol (3,5dCP), 2,3,4-triclorofenol (2,3,4tCP), 2,3,5-triclorofenol (2,3,5tCP), 2,3,6-triclorofenol (2,3,6tCP), 2,4,5-triclorofenol (2,4,5tCP), 2,4,6-triclorofenol (2,4,6tCP), 3,4,5- triclorofenol (3,4,5tCP), 2,3,4,5-tetraclorofenol (2,3,4,5teCP), 2,3,4,6-tetraclorofenol (2,3,4,6teCP), 2,3,5,6-tetraclorofenol (2,3,5,6teCP), e pentaclorofenol (PCP)] foi obtida na concentração de 2000 mg L⁻¹ em metanol (Supelco, Bellefonte, EUA). O 2-fenilfenol foi obtido sólido (Sigma Aldrich, Steinheim, Germany). A solução estoque de 2-fenilfenol foi obtida pesando-se quantidade apropriada do mesmo e dissolvendo-se em metanol (Sigma Aldrich, Steinheim, Alemanha). Água destilada e deionizada foi utilizada nos experimentos.

Fosfato de sódio (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) e anidrido acético (Merk, Darmstadt, Alemanha) foram usados na etapa de derivatização. Cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para o estudo da força iônica. Acetona (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemanha) foi usada para o estudo do efeito da adição de co-solvente.

3.1.2 Instrumentação

Análises cromatográficas foram feitas usando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, com ionização por impacto de elétrons, 70 eV (GCMS-QP 2010 Plus-Shimadzu), equipado com injetor *split/splitless*. Hélio (99,999%) foi empregado como gás de arraste, com pressão constante de 100 kPa. A coluna capilar usada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm - Restec, Bellefonte, EUA). O programa de temperatura usado iniciou-se em 50 °C e foi até 200 °C com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. A temperatura do injetor foi de 290 °C e o tempo de dessorção da fibra no injetor foi de 5 min, este tempo foi suficiente para que nenhum efeito de memória fosse observado. A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C e na interface foi de 210 °C. O modo de monitoramento usado foi o modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), devido à sobreposição de picos da matriz com os dos analitos. Os íons usados para quantificação (razão massa/carga) foram os seguintes: 162-164-204 (2,3-dCP; 2,4-dCP; 2,5-dCP; 2,6-dCP; 3,5-dCP), 196-198-200 (2,3,4-tCP; 2,3,5-tCP; 2,3,6-tCP; 2,4,5-tCP; 2,4,6-tCP; 3,4,5-tCP), 230-232-234 (2,3,4,5-teCP; 2,3,4,6-teCP; 2,3,5,6-teCP), 264-266-268 (PCP) e 115-170-171 (2-PP). Os íons selecionados para análise foram os dos analitos após derivatização com anidrido acético. Todas as análises foram feitas no modo *splitless*, exceto a repetibilidade que também foi feita com divisor de fluxo.

Outros equipamentos utilizados incluem pHmetro (Metter Toledo 320), agitador magnético (MQAMA 301) e banho termostatizado (NT 269).

3.1.3 Procedimento SPME

Amostras de couro de 250 mg (cortadas em cubos de aproximadamente 2 mm²), livres dos analitos de interesse, foram pesadas, adicionadas dentro de um frasco próprio para SPME de 40 mL, fortificadas com o padrão de clorofenóis e o padrão do 2-fenilfenol e deixadas em repouso por 24 horas (-18 °C) para interação dos analitos com a matriz. Para a extração foi adicionado um volume de 20 mL de solução de fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ com pH ajustado para 12, e a extração realizada com agitação constante. As extrações foram realizadas no modo *headspace* e a separação/detecção realizada no GC/MS sendo que as respostas utilizadas na otimização do procedimento foram as áreas de pico de cada composto. A SPME foi

aplicada utilizando-se uma fibra comercial com *holder* manual (Supelco, Bellefonte, EUA). Todas as extrações foram feitas usando fibra de PA 85 μm (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Antes da primeira utilização, a fibra foi condicionada no injetor do GC/MS, com a temperatura ajustada para 300 °C durante uma hora.

3.1.4 Amostras

As amostras de couro (*wet blue*) foram obtidas do Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro e Artefatos (Novo Hamburgo, RS, Brasil).

3.1.5 Otimização do método de extração dos fenóis

Para a etapa de otimização, foram fortificadas com 10 μL do padrão de clorofenóis (10 mg L^{-1}) e 10 μL do padrão do 2-fenilfenol (16,56 mg L^{-1}) e deixadas em repouso. Para a extração, foi adicionado um volume de 20 mL de solução de fosfato de sódio 0,05 mol L^{-1} com pH ajustado para 12, e a extração realizada com agitação constante.

A otimização multivariada^{82,83} das condições de extração dos fenóis em couro foi realizada em duas etapas. Na primeira etapa utilizou-se um planejamento fatorial fracionário (2^{5-1}), a fim de avaliar as possíveis variáveis que afetam a extração dos fenóis. As variáveis avaliadas foram temperatura de extração (40 – 80 °C), tempo de extração (10 - 30 min), quantidade do agente derivatizador (100 - 300 μL), força iônica pela adição de cloreto de sódio (0 - 6 g) e influência do co-solvente (0 - 1000 μL). Juntamente, foram realizados pontos centrais com quatro replicatas, para temperatura de extração (60 °C), tempo de extração (20 min), quantidade do agente derivatizador (200 μL), força iônica pela adição de cloreto de sódio (3 g) e influência do co-solvente (500 μL). Cada variável foi estudada em um nível máximo (+1) e um nível mínimo (-1), além do ponto central (0), realizado em quatro replicatas, sendo que a resposta empregada foi a média geométrica das áreas dos picos referentes aos fenóis avaliados, os valores de máximo, mínimo e ponto central avaliados estão apresentados na Tabela 4. O número de experimentos requerido é dado por $N = 2^{k-p} + C$, sendo k o número de fatores, C as replicatas do ponto central e $p = 1$. Um modelo da combinação de experimentos entre as cinco variáveis em um planejamento fatorial fracionário com quatro replicatas no ponto central é dado por $N = 2^{5-1} + 4$, ou seja, $N = 16 + 4$ totalizando 20 experimentos, como está exemplificado na Tabela 5. Este tipo de experimento é indicado quando se tem muitos fatores, com o propósito de identificar

aqueles com efeito significativo. Geralmente são realizados numa etapa anterior ao experimento definitivo. Os fatores identificados com efeito significativo são estudados num experimento mais completo, como realizado neste trabalho.^{82,83}

Tabela 4. Valores de mínimo, máximo e ponto central dos parâmetros avaliados.

Variável	Ponto mínimo (-)	Ponto central (0)	Ponto máximo (+)
Co-solvente Acetona (µL)	0	500	1000
Força iônica NaCl (g)	0	3	6
Tempo (min)	10	20	30
Temperatura (°C)	40	60	80
Agente Deriv. Andr. acético (µL)	100	200	300

Tabela 5. Experimentos requeridos em um planejamento fatorial fracionário em dois níveis (2^{5-1}) com cinco variáveis.

Ensaio	Acetona (μL)	NaCl (g)	Tempo (min.)	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Anidrido acético (μL)
1	-1	-1	-1	-1	1
2	1	-1	-1	-1	-1
3	-1	1	-1	-1	-1
4	1	1	-1	-1	1
5	-1	-1	1	-1	-1
6	1	-1	1	-1	1
7	-1	1	1	-1	1
8	1	1	1	-1	-1
9	0	0	0	0	0
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	-1	-1	-1	1	-1
14	1	-1	-1	1	1
15	-1	1	-1	1	1
16	1	1	-1	1	-1
17	-1	-1	1	1	1
18	1	-1	1	1	-1
19	-1	0	1	1	-1
20	1	0	1	1	1

Numa segunda etapa para uma otimização mais apurada, foi realizado um planejamento composto central^{82,83} para fixar os valores das variáveis que afetam a extração, onde se estudaram as variáveis, temperatura de extração (60, 65, 70, 75 e 80 $^{\circ}\text{C}$), tempo de extração (30, 35, 40, 45 e 50 min) e influência da força iônica (3; 3,7; 4,4; 5,2 e 6 g). O delineamento composto central é um delineamento simétrico e de segunda ordem, constituído de duas partes: o fatorial 2^k , com um ou mais pontos centrais, e a parte axial, com o objetivo de avaliar a parte curvilínea existente, de forma a chegar à solução ótima, que maximiza os resultados do sistema. A média geométrica das áreas dos picos foi utilizada como resposta. As variáveis analisadas com seus respectivos

valores no planejamento composto central estão apresentadas na Tabela 6.

Tabela 6. Planejamento composto central (2^3) para as variáveis: temperatura de extração, tempo de extração e força iônica, com os respectivos valores utilizados.

Ensaio	Temperatura (°C)	NaCl (g)	Tempo (min.)
1	60	4,4	40
2	65	3,7	35
3	65	3,7	45
4	65	5,2	35
5	65	5,2	45
6	70	3	40
7	70	6	40
8	70	4,4	40
9	70	4,4	40
10	70	4,4	30
11	70	4,4	50
12	75	3,7	35
13	75	3,7	45
14	75	5,2	35
15	75	5,2	45
16	80	4,4	40

Para os planejamentos experimentais e para o tratamento dos dados dos mesmos foi utilizado o software Statistica 7.0.[®]

3.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.2.1 Otimização multivariada

3.2.1.1 Planejamento Fatorial Fracionário (2^{5-1})

Na primeira etapa da otimização de extração dos fenóis foi realizado um planejamento fatorial fracionário, em dois níveis para otimização das variáveis de extração. As variáveis avaliadas foram temperatura de extração, tempo de extração, quantidade do agente derivatizador (anidrido acético), força iônica pela adição de cloreto de sódio e influência do co-solvente (acetona).

A partir da análise dos resultados obtidos obteve-se o gráfico de Pareto (Figura 10). No gráfico de Pareto, o efeito da variável agente derivatizador e das interações entre as variáveis: força iônica e agente derivatizador, temperatura de extração e agente derivatizador, tempo de extração e temperatura de extração e co-solvente e tempo de extração foram excluídos do gráfico devido ao valor do efeito se confundir ao erro. Logo, no gráfico de Pareto verificou-se que todos os fatores se mostraram significativos para o sistema, com exceção do efeito do agente derivatizador fixado então em 200 μL . Os efeitos das variáveis: temperatura de extração, força iônica e tempo de extração foram significativos com valores positivos, indicando um aumento do sinal analítico ao se trabalhar com estas variáveis no maior nível avaliado, contudo o efeito do co-solvente foi significativo com valor negativo, supondo resultado contrário as outras variáveis, ou seja, ao se trabalhar com o menor nível avaliado obtém-se um maior sinal analítico, por isso o mesmo foi descartado do estudo. Pode-se ainda observar que há um efeito contrário entre o tempo de extração e o agente derivatizador e também entre co-solvente e a força iônica. Considerando os sinais algébricos dos efeitos principais das variáveis individuais, pode-se concluir que o aumento do tempo de extração concomitantemente a um menor volume de agente derivatizador leva a um aumento da resposta analítica. Também, o aumento da força iônica concomitantemente a um menor volume de co-solvente leva a um aumento do sinal analítico.

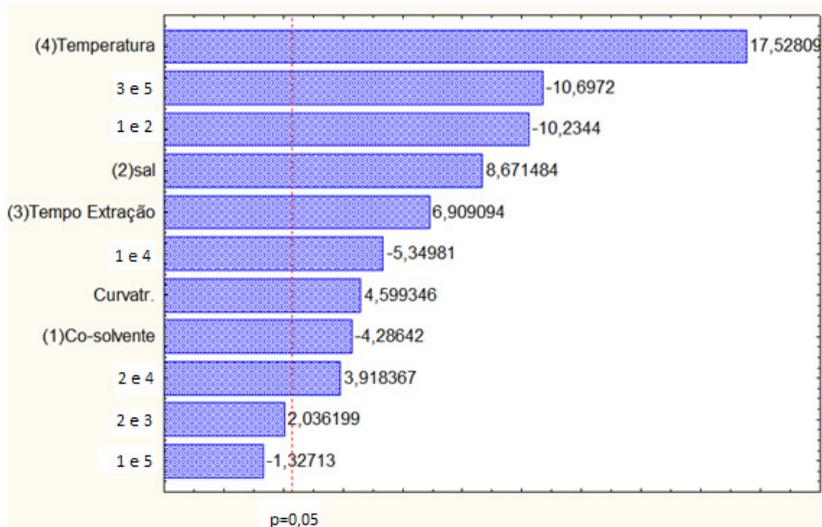


Figura 10. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial fracionário 2^{5-1} na otimização das variáveis e suas interações na determinação dos fenôis em couro. (1) co-solvente, (2) força iônica, (3) tempo de extração, (4) temperatura de extração, (5) agente derivatizador.

Os pontos centrais foram realizados com o intuito de avaliar a perda de linearidade da resposta analítica entre os níveis de mínimo e máximo estudados. Isso foi possível através da checagem da curvatura, que se mostrou significativa para o sistema e com valor positivo. Sugere-se que o valor significativo da curvatura seja fortemente influenciado pelo valor da variável que se mostrou mais significativa para o estudo, no nosso caso a temperatura de extração. Porém, o que realmente pode-se afirmar em relação ao valor significativo da curvatura é que as variáveis precisam ser reavaliadas por uma metodologia de superfície de resposta.

Como o efeito da temperatura de extração foi significativo com valor positivo, seria uma alternativa coerente fixar essa variável em seu nível máximo. Contudo, levando-se em consideração que a curvatura mostrou-se significativa e positiva, e essa pode estar sendo influenciada pela variável temperatura de extração, como já mencionado anteriormente, nesse caso o valor ótimo pode estar localizado entre o ponto central e o nível máximo estudado (60 a 80 °C). Assim, esta faixa

foi novamente estudada na segunda etapa de otimização. Para o efeito da força iônica a faixa estudada foi de 3 a 6 g devido ao fato de que o valor de máximo avaliado é próximo da saturação da solução e para o efeito do tempo de extração foi aumentado de 30 a 50 min, pois um tempo de 30 min de extração conduz em uma maior resposta em comparação a 10 min. Além do mais, o equilíbrio ainda não foi atingido no valor máximo estudado.

3.2.1.2 Planejamento Composto Central

Para uma otimização mais apurada, um planejamento composto central foi realizado.^{82,83} As variáveis novamente avaliadas foram temperatura de extração (60 a 80 °C), tempo de extração (30 a 50 min) e influência da força iônica (3 a 6 g).

A combinação das variáveis duas a duas gerou três superfícies de resposta (Figura 11). Os valores ótimos obtidos pela superfície de resposta confirmam a tendência observada pelo planejamento fatorial fracionário. Observou-se então que a força iônica, o tempo de extração e a temperatura ótimas confirmam a hipótese sugerida anteriormente pelo planejamento fatorial fracionário. Dessa forma, os valores utilizados para dar continuidade aos estudos foram de 75 °C para a temperatura de extração, 6 g de cloreto de sódio e 50 min de tempo de extração.

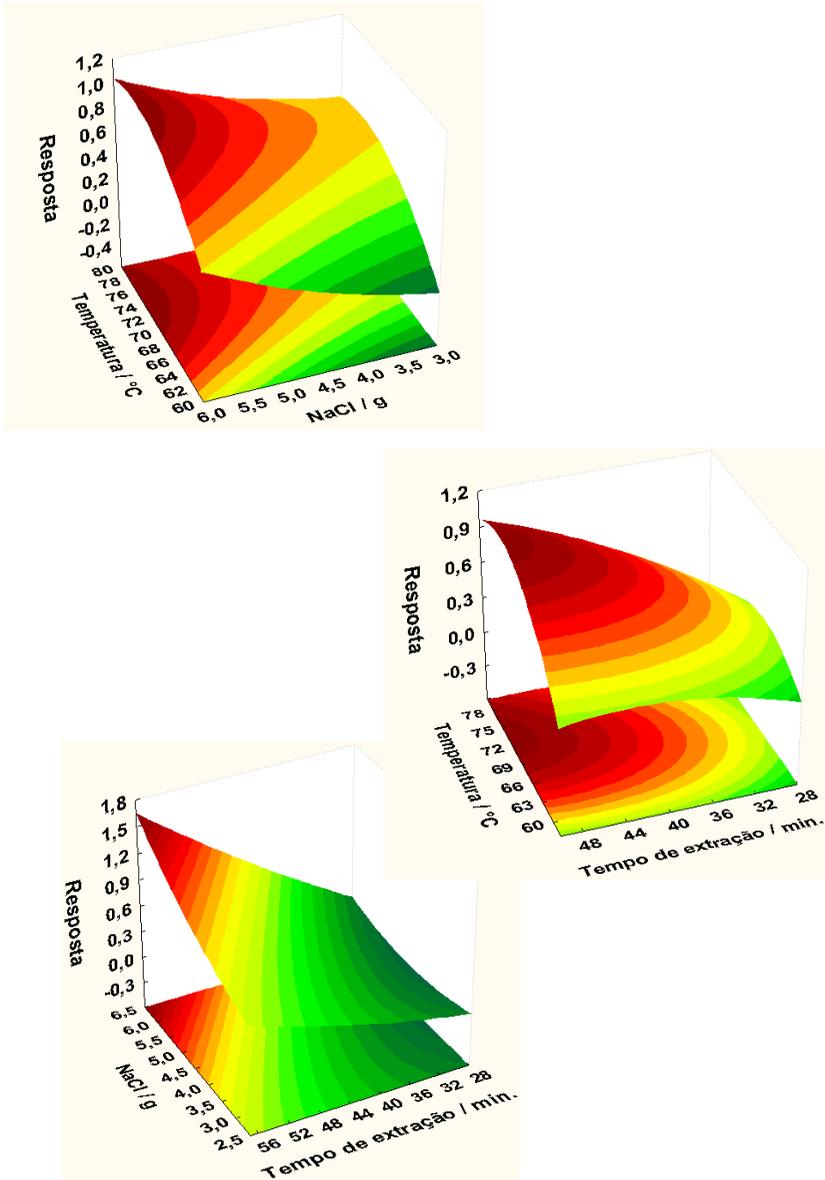


Figura 11. Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central para três variáveis (temperatura de extração, tempo de extração e força iônica) na determinação dos fenóis em couro.

3.2.2 Validação da metodologia

Estabelecidas as melhores condições para extração dos fenóis em couro, tempo de extração 50 min, temperatura de extração 75 °C, volume do derivatizante 200 µL, massa de cloreto de sódio 6 g, a etapa seguinte foi o estudos dos parâmetros analíticos de mérito, tais como: linearidade, faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção, repetibilidade e recuperação.

3.2.2.1 Faixa linear e limite de detecção

A curva analítica foi construída adicionando-se alíquotas de 15, 20, 25, 30, 35, 40 e 45 µL do padrão de clorofenóis (10 mg L⁻¹) e do padrão do 2-fenilfenol (16,56 mg L⁻¹) em 250 mg de couro deixadas em repouso por no mínimo 24 horas (-18 °C). Previamente ao uso adicionaram-se 20 mL da solução de fosfato de sódio 0,05 mol L⁻¹ com pH 12, saturado com cloreto de sódio e 200 µL de anidrido acético. O limite de detecção e quantificação (LOQ) foram calculados utilizando as seguintes fórmulas: $LOD = 3s/B$ e $LOQ = 10s/B$, respectivamente (s = desvio padrão do intercepto da curva analítica, B = coeficiente angular da curva analítica). Dessa forma, foi possível obter uma faixa linear que variou de 0,11 a 1800 ng g⁻¹ para os clorofenóis e de 0,17 a 2981 ng g⁻¹ para o 2-fenilfenol com LOD variando de 0,03 a 0,20 ng g⁻¹ e coeficiente de correlação entre 0,9943 e 0,9996, como observado na Tabela 7.

Tabela 7. Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação e limites de detecção para otimização dos fenóis em amostra de couro.

Analitos	Faixa linear (ng g⁻¹)	R	LOD (ng g⁻¹)
2,4-dCP	0,32 - 1800	0,9981	0,09
2,5-dCP	0,35- 1800	0,9984	0,10
2,3-dCP	0,21- 1800	0,9954	0,06
2,6-dCP	0,33- 1800	0,9981	0,10
3,5-dCP	0,30- 1800	0,9976	0,09
2,3,5-tCP	0,30- 1800	0,9976	0,09
2,4,6-tCP	0,25- 1800	0,9976	0,08
2,4,5-tCP	0,68- 1800	0,9996	0,20
2,3,4-tCP	0,44- 1800	0,9989	0,13
2,3,6-tCP	0,20- 1800	0,9962	0,06
3,4,5-tCP	0,29- 1800	0,9982	0,09
2-PP	0,11- 2981	0,9952	0,03
2,3,5,6-teCP	0,17- 1800	0,9943	0,05
2,3,4,5-teCP	0,22- 1800	0,9967	0,07
2,3,4,6-teCP	0,31- 1800	0,9988	0,09
PCP	0,37- 1800	0,9989	0,11

R = Coeficiente de correlação, LOD = Limite de detecção

3.2.2.2 Repetibilidade

A repetibilidade foi estudada com o intuito de avaliar a precisão da metodologia. A repetibilidade do método foi feita fortificando-se o couro na concentração de 800 ng g⁻¹ para os clorofenóis e 1325 ng g⁻¹ para o 2-fenilfenol, com seis repetições e variou de 3,0 a 10,3% no modo *splitless*. Estudou-se também a repetibilidade com a razão de *split* 60:1 fortificando-se o couro na concentração de 80 µg g⁻¹ para os clorofenóis e 85 µg g⁻¹ para o 2-fenilfenol com seis repetições e as medidas variam de 6,3 a 14,7%, ambas estão apresentadas na Tabela 8. A razão de *split* foi estudada, pois os limites máximos permitidos dos analitos estudados, quando presentes na amostra, por algumas legislações,^{84,85} estão acima da faixa linear estudada neste trabalho, ou seja, estão na ordem de parte por milhão (µg g⁻¹). Com o resultado obtido, podemos concluir que caso se necessite trabalhar nessa ordem de grandeza a metodologia desenvolvida ainda é válida. Os resultados estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8. Estudo da repetibilidade dos clorofenóis 800 ng g^{-1} e do 2-fenilfenol 1325 ng g^{-1} em *splitless* e com a razão de *split* 1/60 para os clorofenóis $80 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ e para o 2-fenilfenol $85 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$ em amostras de couro.

Analitos	RSD % (splitless)^a	RSD % (split 1/60)^b
2,4-dCP	6,7	9,7
2,5-dCP	6,5	12,2
2,3-dCP	6,5	6,3
2,6-dCP	6,3	8,9
3,5-dCP	8,7	12,8
2,3,5-tCP	6,3	8,7
2,4,6-tCP	6,0	8,9
2,4,5-tCP	10,3	8,7
2,3,4-tCP	3,0	9,5
2,3,6-tCP	8,9	9,5
3,4,5-tCP	6,6	11,9
2-PP	3,9*	9,4**
2,3,5,6-teCP	5,7	11,3
2,3,4,5-teCP	6,9	7,8
2,3,4,6-teCP	2,6	14,7
PCP	9,2	13,8

RSD = Desvio padrão relativo, n = 6, a = 800 ng g^{-1} ; * 1325 ng g^{-1} , b = $80 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$; ** $85 \text{ } \mu\text{g g}^{-1}$

3.2.2.3 Análises das amostras de couro e Recuperação

Foram analisadas diferentes amostras de couro. No entanto, nas amostras analisadas não foram encontradas os compostos em estudo, provavelmente por ter sido restringido o uso dos mesmos no pré-tratamento do couro em nosso país desde 2006⁸⁶ ou os analitos podem estar abaixo do limite de detecção do método proposto. Devido a isso, amostras de couro foram fortificadas, para investigar a exatidão da metodologia proposta, em três níveis de concentrações diferentes (600 , 1200 e 1800 ng g^{-1} para os clorofenóis e 994 , 1987 e 2981 ng g^{-1} para o 2-fenilfenol) feitas em triplicata e deixadas em repouso por no mínimo 24 horas ($-18 \text{ } ^\circ\text{C}$). Os valores obtidos para o estudo de recuperação com o método proposto são apresentados na Tabela 9, como pode ser observado encontram-se na faixa de $90,0$ a $107,2\%$, atestando o bom desempenho da metodologia proposta, para a análise rotineira dos clorofenóis avaliados e do 2-fenilfenol em couro.

Tabela 9. Estudo da recuperação para os fenóis em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.

	Nível 1 (600)*	Nível 2 (1200)*	Nível 3 (1800)*
Analitos	Recuperação (%)		
2,4-dCP	95,3 ± 3,2	100,6 ± 4,8	100,4 ± 4,5
2,5-dCP	95,5 ± 3,7	99,1 ± 4,3	99,6 ± 3,9
2,3-dCP	94,5 ± 4,5	95,4 ± 3,8	101,2 ± 3,9
2,6-dCP	95,2 ± 5,1	99,8 ± 3,9	100,5 ± 4,3
3,5-dCP	94,8 ± 3,3	97,3 ± 4,1	98,5 ± 3,5
2,3,5-tCP	95,7 ± 3,0	97,4 ± 3,2	102,3 ± 2,9
2,4,6-tCP	99,8 ± 3,2	97,3 ± 3,7	97,4 ± 3,6
2,4,5-tCP	102,0 ± 6,1	101,9 ± 5,5	99,9 ± 4,9
2,3,4-tCP	101,5 ± 3,5	100,9 ± 3,8	99,2 ± 4,1
2,3,6-tCP	98,7 ± 6,6	98,5 ± 6,1	96,5 ± 5,9
3,4,5-tCP	99,7 ± 2,9	100,3 ± 3,2	96,7 ± 4,2
2,3,5,6-teCP	97,8 ± 4,3	105,4 ± 4,9	94,5 ± 5,0
2,3,4,5-teCP	103,8 ± 4,1	102,3 ± 3,4	95,8 ± 4,5
2,3,4,6-teCP	97,3 ± 3,9	96,3 ± 4,2	101,2 ± 3,2
PCP	102,8 ± 6,2	102,3 ± 5,9	99,7 ± 4,5
	Nível 1 (994)*	Nível 2 (1987)*	Nível 3 (2981)*
	Recuperação (%)		
2-PP	107,2 ± 7,2	90,00 ± 5,2	103,5 ± 4,1

*ng g⁻¹, n = 3

3.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

A utilização do planejamento fatorial fracionário possibilitou definir quais parâmetros, dentro dos selecionados, afetariam de forma mais significativa, a análise simultânea dos fenóis. Além disso, permitiu estudar as interações das variáveis analisadas, conforme observado experimentalmente, que realmente ocorreram interações entre os parâmetros selecionados. O planejamento composto central foi bem sucedido, visto que se obtiveram as condições ideais para a determinação dos 16 fenóis. Constatou-se que a utilização dessas duas metodologias, com eficiência e sensibilidade adequada, possibilitou a redução dos custos com reagentes e equipamentos, levando também a uma rapidez na resposta analítica.

O método analítico desenvolvido nesse estudo, utilizando HS-SPME E GC/MS para a determinação dos fenóis, mostrou-se simples,

rápido e mais sensível que os demais métodos desenvolvidos com o mesmo propósito. Dentre suas principais vantagens, pode-se destacar a utilização direta da amostra sólida sem uma etapa anterior de extração dos compostos de interesse da matriz, o que representa um grande avanço frente à utilização de SPME para este tipo de amostra. Além disso, necessitamos de uma quantidade muito reduzida de amostra, apenas 250 mg.

CAPÍTULO IV

Extração e derivatização *on-fiber* de clorofenóis em couro por microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado

Neste trabalho pela primeira vez, até o presente momento, utilizou-se a CF-SPME associada à derivatização *on-fiber* com o intuito de melhorar a resolução dos picos dos fenóis. O mesmo propõe um método para análise simultânea de fenóis em couro utilizando CF-SPME E GC/MS. A otimização da extração e derivatização dos fenóis foi realizado seguindo dois planejamentos multivariados e um planejamento univariado. O procedimento otimizado foi aplicado na análise dos fenóis em couro.

4.1 PARTE EXPERIMENTAL

4.1.1 Reagentes

Uma mistura de fenóis (fenol (P), 2-metilfenol (2MP), 4-metilfenol (4MP), 3- metilfenol (3MP), 2-clorofenol (2CP), 3-clorofenol (3CP), 4-clorofenol (4CP) 2,4- dimetilfenol (2,4dMP) foram obtidos na concentração de 2000 mg L⁻¹ em metanol (Supelco, Bellefonte, EUA). As soluções de trabalho foram preparadas diluindo-se a solução estoque em metanol (Sigma Aldrich, Alemanha).

Bis(trimetilsilil)trifluoracetamida (BSTFA) (Supelco, Bellefonte, EUA) foi utilizado na etapa de derivatização.

4.1.2 Instrumentação

Análises cromatográficas foram feitas usando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, com ionização por impacto de elétrons, 70 eV (GCMS-QP 2010 Plus-Shimadzu), equipado com injetor *split/splitless*. Hélio (99,999%) foi empregado como gás de arraste, com pressão constante de 100 kPa. A coluna capilar usada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm - Restec, Bellefonte, EUA). O programa de temperatura usado iniciou-se em 50 °C e foi até 200 °C com uma taxa de aquecimento de 5 °C/min. A temperatura do injetor foi de 290 °C e o tempo de dessorção da fibra no injetor foi de 10 min, este tempo foi suficiente para que nenhum efeito de memória fosse observado. A temperatura da fonte de íons foi de 200

°C e na interface foi de 210 °C. O modo de monitoramento usado foi o modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), devido à sobreposição de picos da matriz com os dos analitos. Os íons usados para quantificação (razão massa/carga) foram os seguintes: 91-165-180 (2MP, 4MP, 3MP), 185-200-187 (3CF, 4CP), 93-149-185 (2CP), 151-152-166 (P), 105-179-195 (2,4dMP). Os íons selecionados para análise foram os dos analitos após derivatização com BSTFA. Todas as análises foram feitas no modo *splitless*.

Uma seringa convencional de cromatografia gasosa 10 µL (Hamilton, Reno, NV, EUA) foi utilizada para fortificar as amostras com os padrões dos fenóis.

O dispositivo de *cold-fiber*, controlador de temperatura e válvula solenoide utilizados nesse trabalho são os mesmos utilizados nos artigos previamente publicados.^{62-65,68,69} Membrana oca de PDMS com 178 µm de espessura e 1 cm de comprimento foi utilizada como fase extratora. Dióxido de carbono líquido foi utilizado para resfriar o recobrimento.

A temperatura da amostra foi controlada por meio de um bloco aquecedor (faixa operacional a partir da temperatura ambiente até 200°C) especialmente desenvolvido para a realização dos trabalhos de CF-SPME (Dist, Florianópolis, Brasil). Incubação e estabilização da temperatura das amostras foram mantidas constantes em 10 min na temperatura a qual seria avaliada no momento. A mudança na temperatura da fibra foi realizada manualmente, assim como a operação do dispositivo de *cold fiber* durante todo o trabalho.

Para a etapa de derivatização foi utilizado um agitador magnético (MQAMA 301).

4.1.3 Amostras

As amostras de couro (*wet blue*) foram obtidas do Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro e Artefatos (Novo Hamburgo, RS, Brasil).

4.1.4 Preparo da amostra

Todas as etapas foram feitas no modo *headspace*. Amostras de couro de 100 mg (cortadas em cubos de aproximadamente 2 mm²), isentas dos analitos de interesse, foram pesadas e adicionadas dentro de um frasco próprio para SPME de 15 mL, fortificadas com 4 µL do padrão de fenóis (400 mg L⁻¹) e deixadas em repouso por no mínimo 24 horas (-18 °C) para interação dos analitos com a matriz. Após a

incubação dos analitos na matriz, o frasco de 15 mL que continha a mesma foi inserido no bloco aquecedor com a temperatura ajustada de trabalho, o dispositivo de *cold fiber* foi então inserido dentro do frasco e a fibra exposta, após o tempo de extração a fibra foi recolhida e o dispositivo retirado do frasco da amostra e inserida em um frasco próprio para SPME de 4 mL que continha o agente derivatizante sob agitação constante. Finalmente, após as duas etapas (extração e derivatização), os analitos foram termicamente desorvidos da fibra na porta de injeção do GC/MS.

4.1.5 Estratégias de otimização

A otimização multivariada^{82,83} das condições de extração dos fenóis em couro foi realizada em três etapas. Na primeira etapa, utilizou-se um planejamento fatorial completo ($N = 2^k + C$, com $k = 3$, onde: N = número de experimentos, k = número de variáveis estudadas no processo, C = número de pontos centrais). Foram avaliadas três variáveis: temperatura de extração (80 –170 °C), tempo de extração (5 - 25 min) e temperatura do recobrimento da fibra (5 – 30 °C). Cada variável foi estudada em um nível máximo (+1) e um nível mínimo (-1), além do ponto central (0), que foi estudado em triplicata, ou seja, as variáveis foram estudadas em seus valores médios (Tabela 10).^{82,83} No total foram realizados onze experimentos, como está demonstrado na Tabela 11. A resposta analítica utilizada foi a média geométrica das áreas dos picos referentes aos fenóis avaliados.

Tabela 10. Valores de mínimo, máximo e ponto central dos parâmetros avaliados.

Variável	Ponto mínimo (-)	Ponto central (0)	Ponto máximo (+)
Temperatura de extração (°C)	80	125	170
Temperatura do recobrimento (°C)	5	17	30
Tempo (min)	5	15	25

Tabela 11. Experimentos requeridos em um planejamento fatorial completo em dois níveis (2^3) com três variáveis.

Ensaio	Temperatura do recobrimento (°C)	Temperatura de extração (°C)	Tempo (min)
1	-1	-1	-1
2	-1	1	-1
3	1	1	-1
4	1	-1	-1
5	1	1	1
6	1	-1	1
7	-1	1	1
8	-1	-1	1
9	0	0	0
10	0	0	0
11	0	0	0

Numa segunda etapa estudou-se de forma univariada a temperatura da fibra (10 – 50 °C). Em ambas as etapas fixaram-se as condições de derivatização em volume de BSTFA 50 μ L e tempo de exposição de 15 min. Numa terceira etapa avaliaram-se as condições ótimas para a derivatização dos fenóis utilizando um planejamento Doehlert,^{82,83} onde o volume do agente derivatizante avaliado foi de 25 a 100 μ L e o tempo de exposição entre 5 e 30 min. O modelo para o planejamento Doehlert com a variável volume de BSTFA, estudada em quatro níveis (25, 50, 75 e 100 μ L) e variável tempo de exposição, estudada em cinco níveis (5, 11, 17, 23 e 30 min) está representado na Tabela 12. Novamente, a média geométrica das áreas dos picos dos fenóis foi utilizada como resposta.

Tabela 12. Ensaios realizados no planejamento Doehlert para duas variáveis, volume de BSTFA estudada em quatro níveis e tempo de exposição estudada em cinco níveis.

Ensaio	Volume de BSTFA (μL)	Tempo de exposição (min)
1	25	11
2	25	23
3	50	5
4	50	17
5	50	30
6	75	11
7	75	23
8	100	17

Para os planejamentos experimentais e para o tratamento dos dados dos mesmos foi utilizado o software Statistica 7.0.[®]

4.1.6 Extração quantitativa dos fenóis em couro

Para obterem-se informações da quantidade extraída no procedimento otimizado para os fenóis, extrações sucessivas foram feitas (100 mg a $20 \mu\text{g g}^{-1}$). Depois de realizada a primeira extração, a fibra foi recolhida e o frasco colocado num banho de gelo, até a temperatura de $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ser atingida, somente depois o dispositivo de *cold-fiber* foi retirado do frasco e inserido dentro do frasco do agente derivatizante. Após a dessorção dos analitos o dispositivo de *cold-fiber* foi inserido dentro do frasco da amostra, o qual permanecia em banho de gelo, e reintroduzido dentro do bloco de aquecimento, esperado a temperatura de estudo de a amostra ser atingida e então a fibra exposta e mesmo procedimento descrito acima foi repetido.

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A sequência seguida neste trabalho para otimizar o método proposto consistiu-se em duas etapas: a primeira, centrada em obter as melhores condições experimentais para extrair fenóis do couro usando procedimento de CF-HS-SPME. No segundo passo, o foco foi dado ao procedimento de derivatização usando o agente derivatizante BSTFA. Em ambos os casos, desenhos experimentais foram utilizados.

Finalmente, os parâmetros analíticos de mérito para todos os compostos estudados, foram determinados utilizando a metodologia desenvolvida.

4.2.1 Otimização do procedimento de CF-SPME

4.2.1.1 Planejamento Fatorial Completo

A primeira etapa da otimização das condições de extração dos fenóis foi realizado um planejamento fatorial completo (2^3). As variáveis avaliadas foram temperatura da amostra (80 – 170 °C), tempo de extração (5 - 25 min) e temperatura da fibra (5 – 30 °C). Juntamente, foram realizados pontos centrais em triplicatas, para temperatura da amostra (125 °C), tempo de extração (15 min) e temperatura da fibra (17 °C).

A partir da análise dos resultados obtidos obteve-se o gráfico de Pareto (Figura 12). A Figura 12 mostra os principais efeitos e as suas interações para o planejamento fatorial, a temperatura da fibra e a temperatura da amostra foram altamente significativas, bem como a interação entre elas. Por outro lado, considerando as condições estabelecidas no domínio experimental o tempo de extração não foi significativo e, portanto, foi fixado em 5 min para todos os experimentos. No entanto, de acordo com o estudo fatorial através do aumento da temperatura da amostra e da temperatura da fibra a eficiência de extração poderá melhorar ainda mais. Como a temperatura da amostra estudada já apresentava um valor relativamente alto optou-se por fixar esta variável no seu valor máximo estudado (170 °C). O estudo de temperaturas ainda maiores poderia acarretar em perdas e vazamentos dos analitos do frasco de amostragem. À medida que a interação entre a temperatura da amostra e a temperatura da fibra foi significativa e uma curvatura indicando que a resposta não é linear no intervalo avaliado, uma otimização final para a temperatura de fibra foi realizada através de um procedimento univariado.

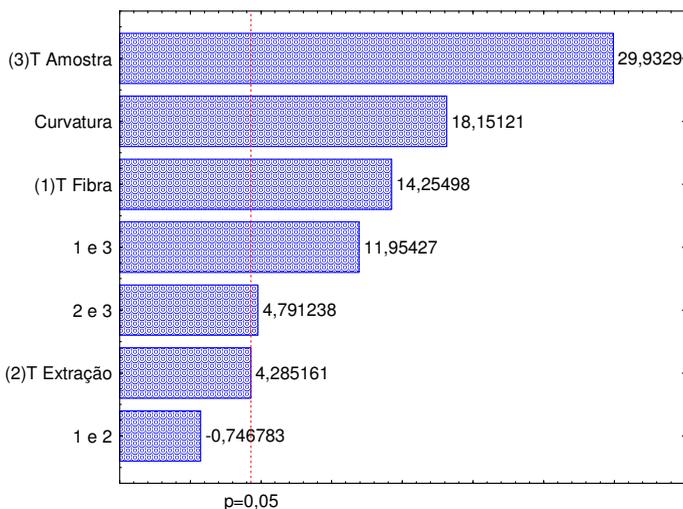


Figura 12. Gráfico de Pareto obtido pelo planejamento fatorial completo 2^3 na otimização das variáveis e suas interações na determinação dos fenóis em couro. (1) Temperatura da fibra, (2) Tempo de extração, (3) Temperatura da amostra.

4.2.1.2 Planejamento Univariado

A temperatura da fibra foi estudada de forma univariada em quatro diferentes temperaturas (10, 20 30 e 50 °C) e o gráfico está apresentado na Figura 13. Como resposta foi utilizada a média geométrica das áreas dos picos referentes aos fenóis avaliados. Desta forma, fica claro que a temperatura de fibra ótima é a de 20 °C a qual foi utilizada para dar continuidade ao estudo.

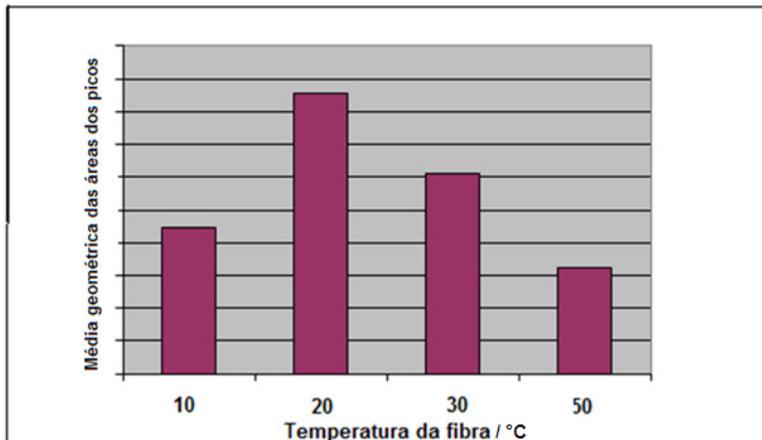


Figura 13. Gráfico do estudo univariado da temperatura da fibra, de 10 a 50 °C.

4.2.2 Otimização do procedimento de derivatização

Finalmente, para estudar as condições ótimas de derivatização um planejamento Doehlert foi realizado. A variável volume do agente derivatizante foi estudado em quatro níveis, enquanto o tempo de exposição ao agente derivatizante (BSTFA) foi estudado em cinco níveis.

Com o resultado do planejamento Doehlert e com a combinação das duas variáveis selecionadas foi possível plotar uma superfície de resposta (Figura 14). Analisando a superfície de resposta foi possível fixar valores ótimos, os quais estão representados dentro de intervalo vermelho mais intenso, região que apresenta melhores respostas. Os valores obtidos para as variáveis tempo de exposição e volume de BSTFA foram 23 min e 70 μ L, respectivamente. Na Figura 14 é claramente possível notar que volumes maiores do agente derivatizante bem como tempos maiores de exposição ao mesmo não levariam a uma melhor resposta analítica, uma vez que a superfície já apresenta um valor máximo. Assim, estes valores não foram utilizados devido à frequência analítica e a redução na utilização de reagentes, além do mais os valores selecionados já apontam para uma condição ótima.

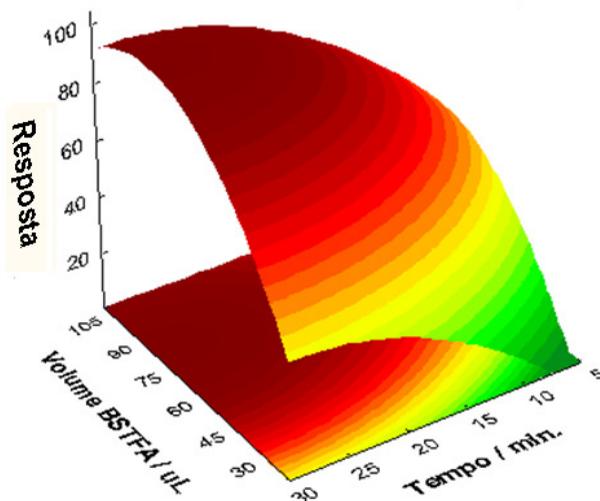


Figura 14. Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento Doehlert para otimização da derivatização dos fenóis, variáveis (volume de BSTFA, tempo de exposição ao BSTFA).

4.2.3 Extração quantitativa dos fenóis em couro

Nesta etapa estudou-se a possibilidade de obter informações sobre extrações exaustivas usando o procedimento de CF-SPME. Neste sentido, foi determinado a quantidade de analito deixado em uma segunda extração da mesma amostra (100 mg do couro, a $20 \mu\text{g g}^{-1}$). O resultado das extrações sucessivas dos fenóis em couro está apresentado na Tabela 13. Observou-se que somente com uma extração foram extraídos de 75 a 85 % da quantidade adicionada dos fenóis, podendo considerar que o processo é exaustivo.

Tabela 13. Extrações sucessivas dos fenóis em couro.

Analitos	% Recuperação da primeira extração	% Recuperação da segunda extração
P	83	14
2MP	80	16
3MP	75	19
4MP	77	18
2CP	79	17
4CP	85	13
2,4 dMP	82	15
3 CP	83	14

4.2.4 Validação da metodologia

Definidas todas as etapas do processo de otimização das condições experimentais, foi realizada a validação do método CF-SPME proposto para os fenóis, com o objetivo de garantir a confiabilidade da resposta analítica obtida das amostras sob análise. Esta avaliação do método analítico consistiu na estimativa de alguns parâmetros analíticos de mérito, indicados a seguir: faixa linear de trabalho, limite de detecção, repetibilidade e recuperação.

4.2.4.1 Faixa linear, limite de detecção e repetibilidade

A curva de calibração foi construída com 50 mg de amostra de couro adicionada dos analitos, com as melhores condições previamente otimizadas. O limite de detecção e quantificação (LOQ) foram calculados utilizando as seguintes fórmulas: $LOD = 3x_s/B$ e $LOQ = 10x_s/B$, respectivamente (s = desvio padrão do intercepto da curva analítica, B = coeficiente angular da curva analítica). Desta forma foi possível obter uma faixa linear que variou de 8,92 a 80 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os fenóis com LOD variando de 1,03 a 2,68 $\mu\text{g g}^{-1}$ e coeficiente de correlação entre 0,9947 a 0,9992 como observado na Tabela 14.

Pode-se observar na Tabela 14 que são satisfatórios os dados analíticos obtidos para todos os fenóis estudados, especialmente se for levado em conta as dificuldades no tratamento de amostras sólidas para a determinação por cromatografia a gás e forte interação dos analitos com a matriz. Além disso, os limites de detecção estão de acordo com outros trabalhos reportados na literatura para a determinação de fenóis em matrizes sólidas, tais como couro e madeira.³⁵ No entanto, os limites

máximos permitidos dos analitos estudados, quando presentes no couro, por algumas legislações,^{84,85} estão na ordem de parte por milhão ($\mu\text{g g}^{-1}$), o que não impede que a metodologia desenvolvida seja aplicada.

O estudo da repetibilidade do método para verificação da precisão foi realizada em cinco amostras de couro fortificadas ($100\text{ mg a }20\ \mu\text{g g}^{-1}$) e variou de 8,3 a 15,5%. Os resultados estão apresentados na Tabela 14.

Tabela 14. Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação, repetibilidade e relativo e limites de detecção para otimização dos fenóis em amostra de couro.

Analitos	Faixa linear ($\mu\text{g g}^{-1}$)	R	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD %
P	7,42 – 80	0,9989	2,23	12,2
2MP	3,83 – 80	0,9958	1,15	15,5
3MP	4,23 – 80	0,9966	1,27	13,6
4MP	3,76 – 80	0,9957	1,13	8,9
2CP	3,42 – 80	0,9947	1,03	12,2
4CP	5,26 – 80	0,9978	1,58	8,3
2,4 dMP	8,92 – 80	0,9992	2,68	10,9
3 CP	6,40 – 80	0,9978	1,92	10,7

R = Coeficiente de correlação, LOD = Limite de detecção, RSD = Desvio padrão relativo, n = 5

4.2.4.2 Análise das amostras e recuperação

Foram analisadas três amostras de couro. No entanto, nas amostras analisadas não foram encontradas os compostos em estudo, provavelmente por ter sido restringido o uso dos mesmos no pré-tratamento do couro em nosso país desde 2006⁸⁶ ou os analitos podem estar abaixo do limite de detecção do método proposto. Devido a isso amostras de couro foram fortificadas em três níveis de concentrações diferentes ($20, 40$ e $80\ \mu\text{g g}^{-1}$) feitas em triplicata e deixadas em repouso por no mínimo 24 horas ($-18\ ^\circ\text{C}$), com o intuito de avaliar a exatidão da metodologia proposta. Os valores obtidos para o estudo de recuperação com o método proposto são apresentados na Tabela 15, como pode ser observado encontram-se na faixa de 64,6 a 92,3%, atestando o bom desempenho da metodologia proposta, para a análise rotineira dos fenóis em couro.

Tabela 15. Estudo da recuperação para os fenóis em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.

Análitos	Nível 1 (20)*	Nível 2 (40)*	Nível 3 (80)*
	Recuperação (%)		
P	81,5 ± 10,3	92,3 ± 12,2	91,1 ± 12,3
2MP	77,7 ± 9,7	83,8 ± 10,5	79,9 ± 11,2
3MP	88,5 ± 13,2	85,0 ± 14,5	86,0 ± 14,6
4MP	78,6 ± 9,2	78,8 ± 8,2	83,8 ± 8,2
2CP	73,3 ± 11,2	67,5 ± 13,2	64,6 ± 11,4
4CP	72,7 ± 9,4	82,5 ± 8,2	78,2 ± 10,4
2,4 dMP	74,5 ± 9,6	88,5 ± 10,8	85,7 ± 9,7
3 CP	81,4 ± 10,5	83,5 ± 11,4	81,0 ± 9,8

* $\mu\text{g g}^{-1}$, n = 3

4.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

A utilização dos planejamentos experimentais possibilitou definir quais as condições ótimas de extração e derivatização para os fenóis em estudo. Além do mais, o estudo permitiu pela primeira vez associar a CF-SPME com a derivatização *on-fiber* e conclui-se que este novo procedimento pode ser utilizado com outros compostos com o mesmo intuito.

O método utilizando CF-SPME com derivatização na fibra mostrou-se ser sensível, preciso e confiável. Além disso, este é um método simples e muito rápido necessitando quantidades muito pequenas de amostra e sem necessidade de pré-tratamento das amostras complexas antes do procedimento de extração.

CAPÍTULO V

Aplicação de microextração em fase sólida e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas para determinação de pesticidas em couro

Este trabalho propõe um método para análise simultânea de 11 pesticidas organoclorados em couro utilizando HS-SPME E GC/MS. O estudo da seleção da fibra foi feito com três tipos de fibras PDMS 100 μm , PDMS 30 μm e PDMS/DVB 65 μm . A otimização da extração dos contaminantes orgânicos foi realizada seguindo um planejamento Doehlert, indicando as condições ótimas de extração. A influência da força iônica foi estudada de forma univariada em dois pontos, na ausência do sal e na saturação. O procedimento otimizado foi aplicado na análise dos pesticidas em couro.

5.1 PARTE EXPERIMENTAL

5.1.1 Reagentes

Uma mistura dos padrões dos (α -BHC, β -BHC, heptacloro, aldrin, heptacloro epoxido, endossulfan I, 4,4' DDE, dieldrin, 4,4' DDD, 4,4' DDT e metoxicloro) foram obtidos na concentração de 250 mg L⁻¹, exceto o metoxicloro que estava na concentração de 1000 mg L⁻¹ todos em tolueno/hexano 50:50, (Supelco, Bellefonte, EUA). As soluções estoques foram obtidas pela diluição em metanol da mistura dos padrões dos pesticidas.

Cloreto de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) foi utilizado para o estudo da força iônica.

5.1.2 Instrumentação

Análises cromatográficas foram feitas usando um cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas do tipo quadrupolo, com ionização por impacto de elétrons, 70 eV (GCMS-QP 2010 Plus-Shimadzu), equipado com injetor *split/splitless*. Hélio (99,999%) foi empregado como gás de arraste, com pressão constante de 100 kPa. A coluna capilar usada foi Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm - Restec, Bellefonte, EUA). O programa de temperatura usado iniciou-se em 100 °C permanecendo por 2 min, sendo elevado até 180 °C com uma taxa de 6 °C/min, seguindo até 220 °C com uma taxa de 5 °C min⁻¹ e

finalizando com a temperatura em 250 °C com uma taxa de 3 °C min⁻¹. A temperatura do injetor foi de 260 °C e o tempo de dessorção da fibra no injetor foi de 5 min, este tempo foi suficiente para que nenhum efeito de memória fosse observado. A temperatura da fonte de íons foi de 210 °C e na interface foi de 220 °C. O modo de monitoramento usado foi o modo SIM (*Selected Ion Monitoring*), devido à sobreposição de picos da matriz com os dos analitos. Os íons usados para quantificação (razão massa/carga) foram os seguintes: 183-181-219 (α -BHC), 219-181-109 (β -BHC), 100-272-274 (heptacloro), 66-263-79 (aldrin), 81-353-355 (heptacloro epoxido), 241-239-195 (endossulfan I), 246-318-248 (4,4' DDE), 79-81-82 (dieldrin), 235-237-165 (4,4' DDD e 4,4' DDT) e 227-228-152 (metoxicloro). Todas as análises foram feitas no modo *splitless*.

Agitador magnético foi utilizado para agitação das amostras (MQAMA 301).

5.1.3 Procedimento SPME

Os pesticidas foram extraídos da matriz pelo modo de extração *no headspace*. A SPME foi feita utilizando-se fibra comercial com manual *holder* (Supelco, Bellefonte, EUA). Fibras PDMS 100 μ m, PDMS 30 μ m e PDMS/DVB 65 μ m (Supelco, Bellefonte, PA, EUA). Antes da primeira utilização as fibras foram condicionadas no injetor do GC/MS de acordo com a temperatura e o tempo fornecido pelo fabricante.

5.1.4 Amostras

As amostras de couro (*wet blue*) foram obtidas do Instituto Brasileiro de Tecnologia do Couro e Artefatos (Novo Hamburgo, RS, Brasil).

5.1.5 Preparo das amostras

Amostras de couro de 100 mg (cortadas em cubos de aproximadamente 2 mm²), livres dos analitos de interesse, foram pesadas e adicionadas à um frasco próprio de SPME de 4 mL, fortificadas com o padrão dos pesticidas e deixadas em repouso por 24 horas (-18 °C) para interação dos analitos com a amostra. Para a extração foi adicionado um volume de 1 mL de água destilada e a barra magnética para posterior agitação. Para todas as etapas de otimizações as amostras foram fortificadas com 30 μ L do padrão dos pesticidas na

concentração de 3 mg L⁻¹ exceto para o metoxicloro na concentração de 12 mg L⁻¹.

5.1.6 Seleção da fibra de extração

Foram avaliadas três fibras comerciais com diferentes recobrimentos: PDMS 100 µm, PMDS 30 µm e PDMS/DVB 65 µm, todas da marca Supelco (Bellefonte, PA, EUA). Antes do uso, as fibras foram condicionadas conforme recomendado pelo fabricante. As extrações dos pesticidas foram efetuadas com 100 mg de amostra preparada como descrito no item preparo de amostra. Os diferentes recobrimentos da fibra foram avaliados em extrações no *headspace* com temperatura de extração de 75 °C e tempo de extração de 35 min com agitação.

5.1.7 Estudo da influência da força iônica

O estudo foi conduzido de duas maneiras diferentes com solução saturada de cloreto de sódio e com água destilada, livre do sal. Para estudo da força iônica novamente fixou-se a temperatura de extração em 75 °C e o tempo de extração em 35 min com agitação.

5.1.8 Otimização das condições de extração

A otimização multivariada^{82,83} das condições de extração dos pesticidas em couro foi realizado seguindo uma matriz Doehlert. As variáveis tempo de extração e temperatura de extração foram estudadas em cinco níveis. A média geométrica foi utilizada como resposta. O modelo para o planejamento Doehlert para variável tempo de extração (10, 17, 25, 32 e 40 min) e variável temperatura da amostra (40, 51, 63, 74 e 85 °C) está representado na Tabela 16.

Tabela 16 Ensaios realizados no planejamento Doehlert para duas variáveis, temperatura e tempo de extração, ambas estudadas em cinco níveis.

Ensaio	Temperatura (°C)	Tempo de exposição (min)
1	40	25
2	51	17
3	51	32
4	63	10
5	63	25
6	63	40
7	74	17
8	74	32
9	85	25

A otimização das condições de extração foi realizada com a fibra de SPME de PMDS/DVB 65 μm , na ausência de cloreto de sódio. Para os planejamentos experimentais e para o tratamento dos dados dos mesmos foi utilizado o software Statistica 7.0.[®]

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2.1 Seleção da fibra de extração

Os resultados estão apresentados na Figura 15. Como pode ser observado pela Figura 16, a fibra de PDMS/DVB apresentou melhores resultados para os compostos (1, 2, 3, 4, 5 e 7), enquanto que para os compostos (6, 8, 9 10 e 11) a fibra de PDMS 100 μm apresentou uma eficiência semelhante à fibra de PDMS/DVB. Isto era esperado pela diminuição da polaridade desses compostos, sendo que a fibra de PDMS apresenta características apolares. No entanto, a fibra que melhor apresenta um compromisso entre todos os compostos é a fibra de PDMS/DVB, a qual foi selecionada para dar continuidade ao estudo.

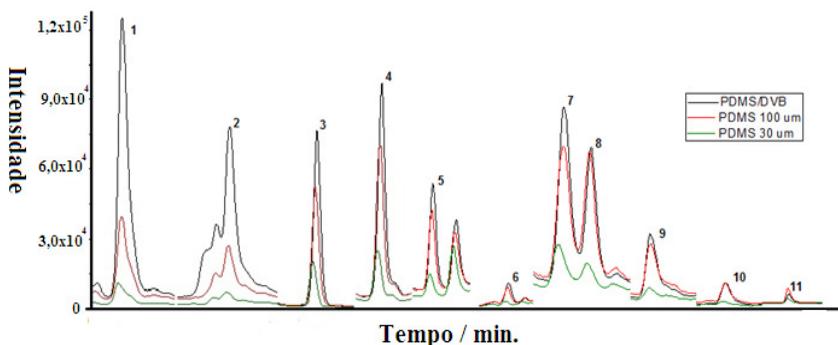


Figura 15. Cromatogramas obtidos com três diferentes fibras para os onze pesticidas organoclorados estudados (1 = α -BHC, t_R = 15,7 min; 2 = β -BHC, t_R = 16,9 min; 3 = heptacloro, t_R = 19,6 min; 4 = andrin, t_R = 20,8 min; 5 = heptacloro epoxide, t_R = 22,3 min; 6 = endossulfan I, t_R = 23,7 min; 7 = DDE, t_R = 24,7 min; 8 = dieldrin, t_R = 24,8 min; 9 = DDD, t_R = 26,5 min; 10 = DDT, t_R = 28,1 min; 11 = metoxocloro, t_R = 30,7 min) t_R = tempo de retenção.

5.2.2 Estudo da influência da força iônica

Optou-se por estudar esta variável de forma isolada, com força iônica zero (ausência do sal) e com força iônica máxima (saturação). Os resultados estão apresentados na Figura 16. Pode-se concluir que a melhor resposta foi obtida quando nenhuma quantidade de sal foi adicionada ao sistema. Portanto, a força iônica não exerce influência na extração, para os pesticidas estudados, além de dificultar ainda mais a passagem dos mesmos para o *headspace*, visto que a área de pico diminuiu na presença do mesmo. Resposta semelhante para o efeito da força iônica foi observada por Dong⁸⁷ e Prates⁸⁸, na análise de pesticidas organoclorados, ou seja, os autores concluíram que o sal não exerce influência na quantidade extraída dos analitos avaliados. Segundo Pawliszyn⁴⁷ o efeito da força iônica pode aumentar ou diminuir a quantidade extraída, dependendo dos compostos avaliados, enfatizando que o efeito do sal deve ser sempre determinado experimentalmente. E conclui que em geral, o efeito da força iônica aumenta com o aumento da polaridade. Para as próximas etapas do trabalho nenhuma quantidade de sal foi adicionada ao sistema e as variáveis temperatura e tempo de

extração foram simultaneamente estudadas através de uma matriz Doehlert.

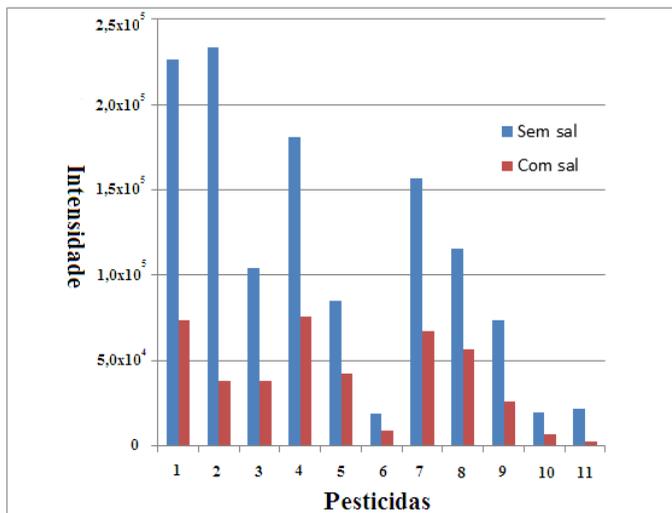


Figura 16. Estudo da força iônica na presença de NaCl e na ausência de NaCl estudados (1 = α -BHC, 2 = β -BHC, 3 = heptacloro, 4 = andrin, 5 = heptacloro epoxide, 6 = endossulfan I, 7 = DDE, 8 = dieldrin, 9 = DDD, 10 = DDT, 11 = metoxocloro).

5.2.3 Planejamento Doehlert

Para o estudo das condições ótimas de extração um planejamento Doehlert foi realizado. As variáveis avaliadas foram temperatura da amostra (40 - 85 °C) e tempo de extração (10 - 40 min).

A combinação das duas variáveis analisadas gerou uma superfície de resposta (Figura 17). Nota-se através da superfície de resposta que temperaturas maiores que as estudadas seriam recomendadas, porém como conhecemos que o processo de SPME na fibra é um processo exotérmico, desta forma não seria interessante estudar valores maiores de temperaturas, uma vez que isso poderia acarretar em perdas no processo. Desta forma, analisando-se a superfície de resposta fixaram-se valores para as seguintes variáveis: temperatura de extração 80 °C e tempo de extração de 35 min.

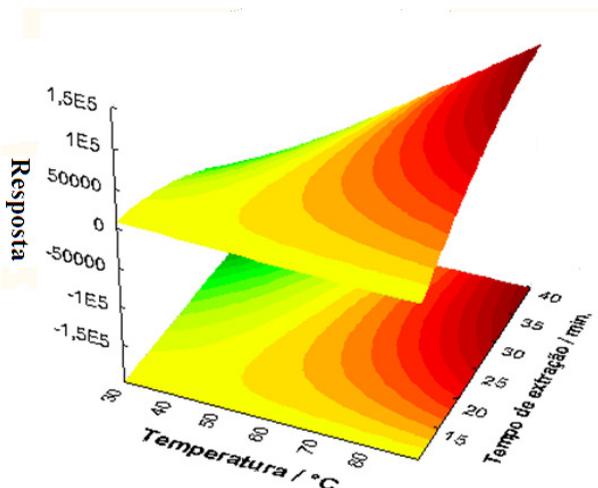


Figura 17. Superfície de resposta obtida por um planejamento Doehlert para duas variáveis na análise de pesticidas em couro.

5.2.4 Validação da metodologia

O desempenho do método analítico em desenvolvimento foi verificado pela obtenção dos parâmetros analíticos de mérito a partir das condições de extração otimizadas, tais como, temperatura e tempo de extração e influência da força iônica. Os parâmetros analíticos de mérito avaliados foram: linearidade, faixa dinâmica de trabalho, limite de detecção, repetibilidade e recuperação.

5.2.4.1 Faixa linear, limite de detecção e repetibilidade

A curva analítica foi construída adicionando alíquotas de 5, 10, 20, 30, 40 e 50 μL do padrão de pesticidas (3 mg L^{-1}) exceto para o metoxicloro (12 mg L^{-1}) em 100 mg de couro deixadas em repouso por no mínimo 24 horas ($-18 \text{ }^\circ\text{C}$). Previamente ao uso adicionou-se 1 mL de água destilada e a barra magnética. O limite de detecção e quantificação (LOQ) foram calculados utilizando as seguintes fórmulas: $\text{LOD} = 3s/B$ e $\text{LOQ} = 10s/B$, respectivamente (s = desvio padrão do intercepto da curva analítica, B = coeficiente angular da curva analítica). Desta forma foi possível obter uma faixa linear que variou de 10,94 a 1500 ng g^{-1} para os pesticidas, exceto para o metoxicloro que variou de 32,27 a 6000

ng g⁻¹ o LOD variou de 3,28 a 10,98 ng g⁻¹ para os demais pesticidas e 107,56 ng g⁻¹ para o metoxicloro e coeficiente de correlação entre 0,9946 a 0,9993 para todos os pesticidas avaliados. A repetibilidade do método foi feita fortificando-se o couro na concentração de 450 ng g⁻¹ para os pesticidas, exceto para metoxicloro 1800 ng g⁻¹, com cinco repetições e variou de 6,1 a 14,3% no modo *splitless*. Os limites de detecção, faixa linear de trabalho, coeficiente de correlação e a repetibilidade, estão apresentados na Tabela 17. Ótimos coeficientes de correlação (maiores que 0,9946) e satisfatórios limites de detecção foram obtidos para todos os compostos estudados.

Tabela 17. Faixa dinâmica de trabalho, coeficientes de correlação, repetibilidade e limites de detecção para otimização dos pesticidas em amostra de couro.

Analitos	Faixa linear (ng g ⁻¹)	R	LOD (ng g ⁻¹)	RSD %
α-BHC	10,94 - 1500	0,9993	3,28	7,8
β-BHC	20,3 - 1500	0,9975	6,22	9,8
Heptacloro	25,36 - 1500	0,9963	7,59	10,8
Andrin	25,20 - 1500	0,9963	7,56	9,2
Heptacloro epox.	18,02 - 1500	0,9974	5,41	6,1
Endossulfan I	25,36 - 1500	0,9962	7,61	6,5
4'4 DDE	21,37 - 1500	0,9964	6,41	10,9
Dieldrin	22,14 - 1500	0,9980	6,64	6,8
4'4 DDD	36,60 - 1500	0,9946	10,98	13,9
4'4 DDT	34,65 - 1500	0,9950	10,39	13,1
Metoxicloro	32,27 - 6000	0,9970	107,56	14,3

R = Coeficiente de correlação, LOD = Limite de detecção, RSD = Desvio padrão relativo, n = 5

5.2.4.2 Amostras analisadas e Recuperação

A metodologia proposta foi aplicada em dez amostras de couro oriundas do polo calçadista de Novo Hamburgo, estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Os compostos em estudos não foram encontrados em nenhuma das amostras avaliadas. Os analitos podem estar abaixo do limite de detecção do método proposto. Dessa forma, com o intuito de avaliar a exatidão do método foi realizado o estudo da recuperação. Na qual cada amostra de couro foi fortificada em três níveis de concentração 600, 900 e 1500 ng g⁻¹ exceto para o metoxicloro que a

concentração foi de 2400, 3600 e 6000 ng g⁻¹, feitas em triplicata. Os valores obtidos para o estudo de recuperação, com o método proposto são apresentados na Tabela 18 e foram determinados em três níveis de concentrações diferentes. Como pode ser observado os valores encontram-se na faixa de 93,7 a 107,3% para os onze pesticidas estudados, atestando o bom desempenho da metodologia proposta.

Tabela 18. Estudo da recuperação para os pesticidas em três níveis diferentes de concentração nas amostras de couro.

	Nível 1 (600)*	Nível 2 (900)*	Nível 3 (1500)*
Analitos	Recuperação (%)		
α-BHC	97,1 ± 5,3	99,7 ± 4,7	99,6 ± 3,9
β-BHC	103,0 ± 6,1	97,9 ± 3,5	101,6 ± 2,9
Heptacloro	94,7 ± 6,5	101,8 ± 4,2	98,9 ± 5,2
Andrin	95,7 ± 4,8	98,2 ± 3,6	102,7 ± 4,2
Heptacloro epox.	100,7 ± 7,2	97,7 ± 8,6	100,2 ± 7,3
Endossulfan I	101,7 ± 4,6	100,0 ± 7,1	101,9 ± 6,5
4'4 DDE	93,2 ± 4,9	98,9 ± 2,2	101,0 ± 3,2
Dieldrin	102,5 ± 3,2	99,1 ± 6,2	98,9 ± 5,6
4'4 DDD	95,0 ± 8,1	105,4 ± 7,8	98,8 ± 9,2
4'4 DDT	107,8 ± 7,7	105,4 ± 5,5	106,9 ± 8,1
	Nível 1 (2400)*	Nível 2 (3600)*	Nível 3 (6000)*
	Recuperação (%)		
Metoxicloro	107,3 ± 10,2	96,8 ± 9,9	100,4 ± 7,4

*ng g⁻¹, n = 3

5.3 CONCLUSÕES PARCIAIS

A análise dos pesticidas na matriz couro usando a técnica de extração de SPME associada à GC/MS apresenta grandes vantagens em relação aos métodos tradicionais, tais como, a simplicidade da técnica de pré-concentração e extração, tempo de análise curto e não utilização de solventes. O método utilizado para a determinação dos pesticidas organoclorados estudados apresentou eficiência com níveis de recuperação acima de 93,2% para as amostras de couro. Além disso, o método mostrou-se rápido e sensível para os analitos estudados em couro, o que possibilita seu uso na análise rotineira de pesticidas em couro.

CAPÍTULO VI

CONCLUSÃO FINAL

Com base nos resultados apresentados e discutidos neste trabalho podem-se fazer as seguintes considerações:

As três metodologias desenvolvidas neste trabalho usando as técnicas de SPME E GC/MS e CF-SPME E GC/MS para análise de fenóis, clorofenóis e pesticidas organoclorados, mostraram-se adequadas, rápidas, sensíveis e confiáveis, com excelentes limites de detecção e recuperação. Além disso, os três métodos utilizam quantidades muito reduzidas de amostra e nenhuma quantidade de solvente orgânico. Permitem a análise da amostra sem a necessidade de pré-tratamento e no caso dos fenóis com derivatização *in situ* e *on fiber*. Desta forma, podemos concluir que as novas metodologias enquadram-se perfeitamente para análise rotineira dos analitos estudados na matriz couro. Também podemos destacar a grande contribuição desta pesquisa para o engrandecimento da literatura, uma vez que a mesma é muito escassa sobre o tema (matriz couro). Sem deixar de destacar a grande evolução para a indústria de couro uma vez que a metodologia utilizada para o monitoramento dos analitos alvo é a extração por Soxhlet, técnica esta que despende grande quantidade de tempo e faz uso de grandes volumes de solventes orgânicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.SANTOS, A. M. M. *et. al.* Panorama do Setor de Couro no Brasil. **BNDES Setorial**. Rio de Janeiro, setembro de 2002.
- 2.CENTRO DAS INDÚSTRIAS DE CURTUMES DO BRASIL – CICB. Disponível em <http://www.brazilianleather.com.br/>. Acessado em 16 de agosto de 2012.
- 3.CLEAVER, S. World Shoe Review, 2011 Edition Brasil. Disponível em <http://www.worldshoereview.co.uk/samples/World%20Shoe%20Review%202011%20Edition%20Sample%20-%20Brazil.pdf>. Acessado em 16 agosto de 2012.
- 4.ABICALÇADOS. ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE INDÚSTRIAS DE CALÇADOS. Disponível em <http://www.abicalcados.com.br>. Acessado em 7 de agosto de 2012.
- 5.PACHECO, J. W. F. Curtumes. São Paulo: CETESB, 2005. Disponível em <http://www.cetesb.sp.gov.br>. Acessado em 10 de agosto de 2012.
- 6.CÂMARA, R. P. B.; GONÇALVES FILHO, E. V.; Processamento do couro e a logística reversa. XIII SIMPEP, Bauro, SP, Brasil, 6 a 8 de novembro de 2006.
- 7.BRAILE, P.M.; CAVALCANTI, J.E.W.A. Curtumes. Manual de Tratamento de Águas Residuárias Industriais. São Paulo, CETESB, 1993.
- 8.CHERNICHARO, C.A.L., ARAÚJO, V.L., GONÇALVES, R.F. Estudo sobre Pós-Tratamento de efluentes de reatores UASB através de biofiltros aerados submersos. Belo Horizonte: Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental – DESA/UFMG. V. 5, p. 9, 1998.
- 9.FERRARI JÚNIOR, M. J.; SILVA, P. C.; CHERNICHARO, C. A. L.; von SPERLING, M. Tratamento de Efluentes Líquidos de Curtumes: Uma Concepção Alternativa e Apresentação de Custos. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA SANITÁRIA E AMBIENTAL, Foz do Iguaçu. Trabalhos Técnicos. Rio de Janeiro: ABES, 1997.
- 10.KOETZ, P. R.; FARIA, O. L. V.; NUNES, W. A. Tratamento de efluentes homogeneizados de curtumes por digestão anaeróbica em reatores de fluxo ascendente. *Revista Brasileira de Agrociência*, v. 1, nº 1, p. 23-29, 1995.
- 11.JORDÃO, C. P.; SILVA, A. C.; PEREIRA, J. L.; BRUNE, W.; Contaminação por crômio de águas de rios provenientes de curtumes em Minas Gerais. *Química Nova*, Vol. 22, p. 47-52, 1999.

12. COSSCH, E. S.; Biossaração de cromo (III) pela biomassa da alga marinha *Sargassum SP.* Tese de doutorado, UNICAMP, 2000.
13. SCAPINI, L. Avaliação do desempenho da osmose e da troca iônica para tratamento de efluente de curtume (Aimoré Couros Ltda – Encantado/RS) visando a reutilização da água, Dissertação de Mestrado, Universidade de Santa Cruz do Sul, 2007.
14. MURALIDHARAM, D.; SUNDARA RAO, V. S. Identification of leather preservatives by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v. 675, p. 257-260, 1994.
15. MEYER, A.; KLEIBÖHMER, W. Determination of pentachlorophenol in leather using supercritical fluid extraction with in situ derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 718, p. 131-139, 1995.
16. GANESHJEEVAN, R.; CHANDRASEKAR, R.; SUGUMAR, P.; KADIGACHALAM, P.; RADHAKRISHNAN, G. Focused microwave aqueous extraction of chlorophenol from solid matrices and their analysis by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1069, p. 275-280, 2005.
17. GANESHJEEVAN, R.; CHANDRASEKAR, R.; KADIGACHALAM, P.; RADHAKRISHNAN, G. Rapid, one-pot derivatization and distillation of chlorophenols from solid samples with their on-line enrichment. *Journal of Chromatography A*, v. 1140, p. 168-173, 2007.
18. FAVARO, G.; DE LEO, D.; PASTORE, P.; MAGNO, F.; BALLARDIN, A. Quantitative determination of chlorophenols in leather by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1177, p. 36-42, 2008.
19. FONT, J.; MARSAL, A. Determination of organochlorine pesticides in skins and leather by gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, v. 811, p. 256-260, 1998.
20. CZAPLICKA, M. Sources and transformation of chlorophenols in the natural environment. *Science of the Total Environment*, v. 322, p. 21-39, 2004.
21. SERFONE, N.; TEXIER, I.; EMELINE, A. V.; PICHAT, P.; HIDAKA, H.; ZHAO, J. Post-irradiation effect and reductive dechlorination of chlorophenols at oxygen-free TiO₂/water interfaces in the presence of prominent hole scavengers. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 136, p. 145-155, 2000.
22. BENITEZ, F. J.; BELTRAN-HEREDIA, J.; ACERO, J. L.; RUBIO, F. J. Contribution of free radicals to chlorophenols decomposition by several advanced oxidation processes. *Chemosphere*, v. 41, p. 1271-1277, 2000.

23. ANDRÉASSON, M.; DAVE G. Toxicity of bile from fish exposed to PCP-spiked sediment. *Aquatic Toxicology*, v. 30, p. 171-182, 1994.
24. BALAKRISHNAN, S.; EASTMOND, D. A. Micronuclei and cell proliferation as early biological markers of ortho-phenylphenol-induced changes in the bladder of male F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*, v. 44, p. 1340-1347, 2006.
25. SASAKI, Y. F.; SAGA, A.; AKASAKA, M.; YOSHIDA, K.; NISHIDATE, QUAN SU, E. Y.; MATSUSAKA, N.; TSUDA, S. In vivo genotoxicity of ortho phenylphenol, biphenyl, and thiabendazole detected in multiple mouse organs by the alkaline single cell gel electrophoresis assay. *Mutation Research*, v. 395, p. 189-198, 1997.
26. NAKAGAWA, Y.; TAYAMA, S. Induction of 8-hydroxy-2' deoxyguanosine in CHO-K1 cells exposed to phenyl-hydroquinone, a metabolite of ortho-phenylphenol. *Cancer Letters*, v 101, p. 227-232, 1996.
27. DAVOREN, M.; FOGARTY, A. M. In vitro cytotoxicity assessment of the biocidal agents sodium o-phenylphenol, sodium o benzyl-p-chlorophenol, and sodium p-tertiary amyphenol using established Wsh cell lines. *Toxicology in Vitro*, v. 20, p. 1190-1201, 2006.
28. LEBLANC, G. A. *Basics of environment toxicology*. In: Hodgson, E.; Levi, P. E. (Eds). A textbook of modern toxicology. Appleton & Lange, Stanford, Connecticut, USA, 2ª edição, pp. 389-405, 1997.
29. JONES, K. C.; DE VOOGT, P. Persistents Organic Pollutants (POPs): State of the science. *Environmental Pollution*, v. 100, p. 209-221, 1999.
30. TORDOIR, W. F.; VAN SITTERT, N. J. Organochlorine. *Toxicology*, v. 91, p. 51-57, 1994.
31. SAFE, S. H. Toxicology of persistent organic pollutants. *European Journal of Lipid Science and Technology*, v. 102 (1), p. 52-53, 2000.
32. LANÇAS, F. M. *Validação de métodos cromatográficos de análise*. São Carlos: RiMa, 2004. 46 p.
33. FAVARO, G.; DE LEO, D.; TASTORE, P.; MAGNO, F.; BALLARDIN, A. Quantitative determination of chlorophenols in leathers by pressurized liquid extraction and liquid chromatography with diode-array detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1177, p. 36-42, 2008.
34. GANESHJEEVAN, R.; CHANDRASEKAR, R; KADIGACHALAM, P.; RADHAKRISHNAN, G. Rapid, one-pot derivatization and distillation of chlorophenols from solid samples with their on-line enrichment. *Journal of Chromatography A*, v. 1140, p. 168-173, 2007.

35. GANESHJEEVAN, R.; CHANDRASEKAR, R.; SUGUMAR, P.; KADIGACHALAM, P.; RADHAKRISHNAN, G. Focused microwave aqueous extraction of chlorophenols from solid matrices and their analysis by chromatographic techniques. *Journal of Chromatography A*, v. 1069, p. 275–280, 2005.
36. MEYER, A.; KLEIBÖHMER, W. Determination of pentachlorophenol in leather using supercritical fluid extraction with in situ derivatization. *Journal of Chromatography A*, v. 718, p. 131–139, 1995.
37. COVACI, A.; HURA, C.; SCHEPENS, P. Selected persistent organochlorine pollutants in Romania. *The Science of the Total Environment*, v. 280, p. 143–152, 2001.
38. GRAHAM, M. C.; ALLAN, R.; FALLICK, A. E.; FARMER, J. G. Investigation of extraction and clean-up procedures used in the quantification and stable isotopic characterisation of PAHs in contaminated urban soils. *The Science of the Total Environment*, v. 360, p. 81–89, 2006.
39. MIN, G.; WANG, S.; ZHU, H.; FANG, G.; ZHANG, Y. Multi-walled carbon nanotubes as solid-phase extraction adsorbents for determination of atrazine and its principal metabolites in water and soil samples by gas chromatography-mass spectrometry. *The Science of the Total Environment*, v. 396, p. 79–85, 2008.
40. ANDREU, V.; FERRER, E.; RUBIO, J. L.; FONT, G. PICÓ, Y. Quantitative determination of octylphenol, nonylphenol, alkylphenolethoxylates and alcohol ethoxylates by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-mass spectrometry in soils treated with sewage sludges. *Science of the Total Environment*, v. 378, p. 124–129, 2007.
41. BALTUSSEN, E.; SANDRA, P.; FRANK, D.; CRAMERS, C.; Stir bar sorptive extraction (SBSE), a novel extraction technique for aqueous samples. Theory and principles. *Journal of Microcolumn Separations*, V. 11, p. 737–747, 1999.
42. LIU, H.; DASGUPTA, P. K.; Analytical chemistry in a drop. *Trends in Analytical Chemistry*, v. 15, p. 468–475, 1996.
43. PEDERSEN-BJERGAARD, S.; RASMUSSEN, K. E.; Liquid-liquid-liquid microextraction for sample preparation of biological fluids prior to capillary. *Analytical Chemistry*, V. 71, p. 2650–2656, 1999.
44. ABDEL-REHIM, M. New trend in sample preparation: on-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications: I. Determination of local anaesthetics in human plasma

- samples using gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, V. 801, p. 317-321, 2004.
45. ABDEL-REHIM, M. Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. *Journal of Chromatography A*, V. 1217, p. 2569-2580, 2010.
46. ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry*, v.62, p. 2145-2148, 1990.
47. PAWLISZYN, J. *Handbook of Solid Phase Microextraction*. Canada: Chemical Industry Press, 2009. p. 410.
48. PAWLISZYN, J. *Applications of Solid Phase Microextraction*. Ontario: Royal Society of Chemistry, 1999. p. 655.
49. TRANCHIDA, P. Q.; PRESTI, M. L.; COSTA, R.; DUGO, P.; DUGO, G. MONDELLO, L. High-throughput analysis of bergamot essential oil by fast solid-phase microextraction–capillary gas chromatography–flame ionization detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1103, p. 162-165, 2010.
50. DELGADO, F. J.; GONZÁLEZ-CRESPO, J.; CAVA, R.; RAMÍREZ, R. Formation of the aroma of a raw goat milk cheese during maturation analysed by SPME–GC–MS. *Food Chemistry*, v. 129, p. 1156-1163, 2011.
51. MENEZES FILHO, A.; SANTOS, F. N.; PEREIRA, P. A. P. Development, validation and application of a method based on DI-SPME and GC–MS for determination of pesticides of different chemical groups in surface and groundwater samples. *Microchemical Journal*, v. 96, p. 139-145, 2010.
52. WATKINS, P. J.; ROSE, G.; WARNER, R. D.; DUNSHEA, F. R.; PETHICK, D. W. A comparison of solid-phase microextraction (SPME) with simultaneous distillation–extraction (SDE) for the analysis of volatile compounds in heated beef and sheep fats. *Meat Science*, v. 91, p. 99-107, 2012.
53. JIA, F.; CUI, X.; WANG, W.; DELGADO-MORENO, L.; GAN, J. Using disposable solid-phase microextraction (SPME) to determine the freely dissolved concentration of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in sediments. *Environmental Pollution*, v. 167, p. 34-40, 2012.
54. ZHANG, X.; OAKES, K. D.; CUI, S.; BRAGG, L.; SERVOS, M. R. and PAWLISZYN, J. Tissue-Specific In Vivo Bioconcentration of Pharmaceuticals in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Using

- Space-Resolved Solid-Phase Microextraction. *Environmental Science Technology*, v. 44 (9), p. 3417-3422, 2010.
55. KATAOKA, H.; SAITO, K. Recent advances in SPME techniques in biomedical analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 54, p. 926-950, 2011.
56. SAKHVIDI, M. J. Z. BAHRAMI, A.; ALIREZA GHIASVAND^B, MAHJUB, H.; TUDURI, L. Determination of Inhalational Anesthetics in Field and Laboratory by SPME GC/MS. *Analytical Letters*, v. 45, p. 375-385, 2012.
57. ABDULRA'UF, L. B.; HAMMED' W. A.; & GUAN HUAT TAN, G. H. SPME Fibers for the Analysis of Pesticide Residues in Fruits and Vegetables: A Review. *Analytical Chemistry*, v. 42, p. 152-161, 2012.
58. SPIETELUN, A.; PILARCZYK, M.; KLOSKOWSKI, A.; NAMIEŚNIK, J. Current trends in solid-phase microextraction (SPME) fibre coatings. *Chemical Society Reviews*, v. 39, p. 4524-4537, 2010.
59. BIANCHIN, J. N.; NARDINI, G.; MERIB, J.; DIAS, A. N.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometry procedure. *Journal of Chromatography A*, v. 1233, p. 22-29, 2012.
60. ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. Quantitative Extraction Using an Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device. *Analytical Chemistry*, v. 67, p. 34-43, 1995.
61. CHEN, Y.; PAWLISZYN, J. Miniaturization and Automation of an Internally Cooled Coated Fiber Device. *Analytical Chemistry*, v. 78, p. 5222-5226, 2006.
62. GHIASVAND, A. R.; SHOSSEINZADEH, S.; PAWLISZYN, J. New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment. *Journal of Chromatography A*, v. 1124, p. 35-42, 2006.
63. CARASEK, E.; PAWLISZYN, J. Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 8688-8696, 2006.
64. CARASEK, E.; CUDJOE, E.; PAWLISZYN, J. Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled

- solid-phase microextraction fiber. *Journal of Chromatography A*, v. 1138, p. 10-17, 2007.
65. GHIASVAND, A. R.; SETKOVA, L.; PAWLISZYN, J. Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME–GC–TOF–MS. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 22, p. 377-391, 2007.
66. CHEN, Y.; BEGNAUD, F.; CHAINTREAU, A.; PAWLISZYN, J. Analysis of flavor and perfume using an internally cooled coated fiber device. *Journal of Separation Sciences*, v. 30, p. 1037-1043, 2007.
67. CHEN, Y.; BEGNAUD, F.; CHAINTREAU, A.; PAWLISZYN, J. Quantification of perfume compounds in shampoo using solid-phase microextraction. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 21, p. 822-832, 2006.
68. HADDADI, S. H.; NIRI, V. H.; PAWLISZYN, J. Study of desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from solid matrices using internally cooled coated fiber. *Analytica Chimica Acta*, v. 652, p. 224-230, 2009.
69. SANCHEZ-PRADO, L.; RISTICEVIC, S.; PAWLISZYN, J.; PSILLAKIS, E. Low temperature SPME device: A convenient and effective tool for investigating photodegradation of volatile analytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, v. 206, p. 227-230, 2009.
70. MARTENDAL, E.; CARASEK, E. A new optimization strategy for gaseous phase sampling by an internally cooled solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 367-372, 2011.
71. MARTENDAL, E.; CARASEK, E. A new approach based on a combination of direct and headspace cold-fiber solid-phase microextraction modes in the same procedure for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalate esters in soil samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 1707-1714, 2011.
72. JIANG, R.; CARASEK, E.; RISTICEVIC, S.; CUDJOEA, E.; WARRENA, J.; PAWLISZYN, J. Evaluation of a completely automated cold fiber device using compounds with varying volatility and polarity. *Analytica Chimica Acta*, v. 742, p. 22-29, 2012.
73. HADDADI, S. H.; PAWLISZYN, J. Cold fiber solid-phase microextraction device based on thermoelectric cooling of metal fiber. *Journal of Chromatography A*, v. 1216, p. 2783-2788, 2009.

74. CHIA, K. J.; LEE, T. Y.; HUANG, S. D. Simple device for the solid-phase microextraction screening of polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorodibenzofurans in heavily contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, v. 527, p. 157-162, 2004.
75. MENEZES, H. C.; CARDEAL, Z. L. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons from ambient air particulate matter using a cold fiber solid phase microextraction gas chromatography-mass spectrometry method. *Journal of Chromatography A*, v. 1218, p. 3300-3305, 2011.
76. MENEZES, H. C.; PAULO, B. P.; COSTA, N. T.; CARDEAL, Z. L. New method to determination of naphthalene in ambient air using cold fiber-solid phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Microchemical Journal, In Press*, 2012.
77. SIMÕES, N. G.; CARDOSO, V. V.; FERREIRA, E.; BENOLIEL, M. J.; ALMEIDA, C. M. M. Experimental and statistical validation of SPME-GC-MS analysis of phenol and chlorophenols in raw and treated water. *Chemosphere*, v. 68, p. 501-510, 2007.
78. EBERLIN, M. N.; SILVA, R. C. Faster and simpler determination of chlorophenols in water by fiber introduction mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta*, v. 620, p. 97-102, 2008.
79. HO, H. P.; LEE, R. J.; LEE, M. R. Purge-assisted headspace solid-phase microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry for determination of chlorophenols in aqueous samples. *Journal of Chromatography A*, v. 1213, p. 245-248, 2008.
80. LEE, M. R.; YAO-CHA YEH, Y. C.; HSIANG, W. S.; HWANG, B. H. Solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry for determining chlorophenols from landfill leaches and soil. *Journal of Chromatography A*, v. 806, p. 317-324, 1998.
81. WEI, M. C.; JEN, J. F. Determination of chlorophenols in soil samples by microwave-assisted extraction coupled to headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-electron-capture detection. *Journal of Chromatography A*, v. 1012, p. 111-118, 2003.
82. MONTGOMERY, D. C. *Design and Analysis of Experiments*, New York: Wiley, 2004. p. 660.
83. FERREIRA, L. C. S.; BRUNS, R. E.; SILVA, E. G. P.; SANTOS, W. N. L.; QUINTELLA, C. M.; DAVID, J. M.; ANDRADE, J. B.; BREITKREITZ, M. C.; JARDIM, I. C. S. F.; BARROS NETO, B.; Statistical designs and response surface techniques for the optimization of

- chromatographic systems. *Journal of Chromatography A*, v. 1158, p. 2-14, 2007.
- 84.REGULAMENTO DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO. Relativo ao registo, avaliação, autorização e restrição dos produtos químicos (REACH). CE N° 1907, de 18 de dezembro de 2006.
- 85.REGULAMENTO DO PARLAMENTO EUROPEU E DO CONSELHO.Decisão da comissão que estabelece critérios ecológicos revistos para a atribuição do rótulo ecológico comunitário ao calçado. CE N° 231, de 18de março de 2002.
- 86.AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Proíbe todos os usos do ingrediente ativo pentaclorofenol e seus sais. Resolução RDC ANVISA N° 164, de 18 de agosto de 2006.
- 87.DONG, C.; ZENG, Z.; YANG, M.; Determination of organochlorine pesticides and their derivations in water after HS-SPME using polymethylphenylvinylsiloxane-coated fiber by GC/ECD. *Water Research*, v. 39, p. 4204-4210, 2005.
- 88.PRATES, C. B.; GEBARA, S. S.; RÉ-POPPI, N.; Análise de pesticidas organoclorados em água usando a microextração em fase sólida por headspace com cromatografia gasosa e espectrometria de massas. *Química Nova*, v. 37, p. 1260-1264, 2011.