

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Edmar Martendal

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO PARA A TÉCNICA  
DE SPME E SPME COM RECOBRIMENTO INTERNAMENTE  
REFRIGERADO**

**FLORIANÓPOLIS  
2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**

Edmar Martendal

**NOVAS ESTRATÉGIAS DE OTIMIZAÇÃO PARA A TÉCNICA  
DE SPME E SPME COM RECOBRIMENTO INTERNAMENTE  
REFRIGERADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Química, da Universidade Federal de Santa  
Catarina, como pré-requisito parcial para a  
obtenção do título de Doutor em Química.  
Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha

**FLORIANÓPOLIS  
2011**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, fonte de inspiração e perseverança.

À minha esposa Tatiana, pelo carinho, compreensão e apoio.

Aos meus pais, José e Valdete, pelo carinho e apoio incondicionais.

Ao meu orientador e amigo, professor Eduardo Carasek, por suas ideias, amizade e pela perseverança neste trabalho.

A minha grande amiga Dilma Budziak, com a qual aprendi muito com nossos trabalhos em conjunto e nossa convivência.

Aos colegas do laboratório: Jefferson, Silvane, Ivan, Kalya, Cristine, Gizelle, Joyce e Renata pelo clima descontraído, carinho e apoio.

Aos professores e servidores do Departamento de Química da UFSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

E finalmente agradeço ao CNPq pela bolsa de estudo concedida.

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b> .....	i
<b>Abstract</b> .....	ii
<b>Lista de figuras</b> .....	iii
<b>Lista de Tabelas</b> .....	vii
<b>Lista de Abreviaturas e símbolos</b> .....	viii
<b>Lista de equações</b> .....	x
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Objetivos</b> .....	26
<b>3. Capítulo 1- Uma nova abordagem para otimização de SPME internamente refrigerada para amostragem em fase gasosa: uso de diferentes temperaturas do recobrimento durante um único procedimento de extração</b> .....	28
<b>4. Capítulo 2- Determinação de HPA e EF em suspensões de solo em água usando extração direta seguida de amostragem no headspace durante o mesmo procedimento de extração por CF-SPME</b> .....	47
<b>5. Capítulo 3- Uma nova estratégia de otimização para determinação do perfil aromático de matrizes vegetais por HS-SPME: uso de diferentes temperaturas de extração no mesmo procedimento</b> ....	72
<b>6. Considerações finais e perspectivas futuras</b> .....	93

## RESUMO

Esta Tese apresenta três novas estratégias de otimização, sendo duas aplicadas à técnica de microextração em fase sólida (SPME) com recobrimento internamente refrigerado (*cold-fiber* SPME-CF-SPME) e uma aplicada à técnica de SPME comercialmente disponível. Todas as etapas de otimização foram realizadas multivariadamente através de planejamento composto central. A primeira parte do trabalho consistiu em uma nova estratégia de otimização para amostragem em fase gasosa utilizando CF-SPME. Duas classes de compostos, ésteres de ftalato (EF) e hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), com volatilidades distintas foram escolhidos para esse estudo, no qual se propôs um novo método baseado no uso de duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento de extração, objetivando maximizar a quantidade extraída de todos os compostos no menor tempo possível. Comparações foram realizadas entre a nova proposta e o procedimento convencional, sendo obtidos excelentes resultados. A segunda parte do trabalho consistiu na utilização pela primeira vez da técnica de CF-SPME em uma combinação dos modos de extração direto e a partir do *headspace* para extração simultânea de EF e HPA de uma suspensão de solo em água. Força iônica, tempo de extração, pH e temperatura da fibra foram avaliados para cada modo de extração separadamente e posteriormente para a combinação deles. Comparações foram realizadas entre a utilização de cada um dos modos separadamente, a combinação deles e a utilização do procedimento convencional da CF. O procedimento proposto mostrou melhores resultados em todos os casos. O último estudo realizado consistiu na utilização da técnica de SPME comercial para extração da fração volátil de matrizes vegetais. Tempo e temperatura de extração foram avaliados com a fibra DVB/CAR/PDMS. Propôs-se um novo método baseado no uso de duas temperaturas de extração objetivando maximizar a quantidade extraída de compostos com volatilidades/polaridades distintas. Os dois métodos foram comparados pela análise de cinco amostras, sendo o último mais eficiente em todos os casos.

**Palavras-chave:** cold-fiber, SPME, planejamento composto central, preparação de amostras, ésteres de ftalato, HPA, aromas.

## ABSTRACT

This study presents three new optimization approaches, two of which were applied to internally-cooled solid-phase microextraction technique (or cold-fiber SPME - CF-SPME) and one to a commercially available SPME. All optimization steps were carried out by means of central composite designs. The first part of the study consisted of a new optimization strategy for gaseous phase sampling using CF-SPME. Phthalate esters (PEs) and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were the model compounds employed in this study. A new method based on the use of two coating temperatures in the same extraction procedure was proposed aiming at maximizing the amount extracted in a minimum extraction time. Comparisons between the proposed and conventional methods were carried out and excellent results were obtained. The second part of the study consisted of the utilization of CF-SPME in a combination of extraction modes, direct and headspace, for the simultaneous extraction of PEs and PAHs from a suspension of soil in water. Ionic strength, extraction time, sample pH and fiber temperature were evaluated for each extraction mode separately and then for a combination of the two. Comparisons were made between the use of each mode separately, a combination of the two and the conventional procedure of CF-SPME. The proposed procedure was better in all cases. Finally, a commercially available SPME fiber was used to extract the volatile fraction of plant matrices. Extraction time and temperature were evaluated using DVB/CAR/PDMS fiber. In view of the different optimum extraction temperatures obtained for each group of compounds, a new method based on two extraction temperatures in the same procedure was proposed. The conventional method based on a single extraction temperature was compared to the proposed method by analyzing five samples. The proposed method was shown to be more efficient in all cases.

**Keywords:** cold-fiber SPME, sample preparation, aromatic profile, phthalate esters, polycyclic aromatic hydrocarbons, central composite design.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Dispositivo de SPME resfriado internamente.....	13
Figura 2. Esquema completo do dispositivo de CF-SPME utilizado nesta tese, mostrando cilindro de CO <sub>2</sub> (l), válvula solenóide e controlador de temperatura.....	14
Figura 3. Foto do sistema de CF-SPME utilizado nesta tese, mostrando cilindro de CO <sub>2</sub> (l), válvula solenóide, controlador de temperatura e frasco com amostra inserido no bloco aquecedor.....	15
Figura 4. Superfícies de resposta de compostos representativos para cada classe obtidas pela otimização do tempo de extração e temperatura da fibra.....	33
Figura 5. Superfícies de resposta compromisso para todos os compostos obtidas pela otimização do tempo total de extração e fração deste tempo em que o recobrimento foi resfriado a 10 °C para EF e a 5 °C para HPA.....	37
Figura 6. Comparação da eficiência de extração entre os procedimentos utilizando SPME convencional (sem refrigeração do recobrimento), abordagem convencional univariada (temperatura do recobrimento fixada em 10 °C durante todo tempo de extração) e o procedimento proposto neste trabalho baseado em duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento.....	39
Figura 7. Comparação da eficiência de extração entre os procedimentos utilizando abordagem convencional univariada e o procedimento proposto neste trabalho baseado em duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento.....	40
Figura 8. Superfícies de resposta obtida por meio da otimização da adição de NaCl e pH da suspensão no modo headspace. 8A: superfície de resposta para os três mais leves EF. 8B: superfície de resposta para os três mais pesados EF.....	52
Figura 9. Superfície de resposta obtida para a otimização da adição de NaCl e volume de água para o modo headspace.....	54
Figura 10. Superfícies de resposta para avaliação do tempo de extração e temperatura da fibra no modo headspace. 10A: resposta combinada para	

os compostos eluídos antes de 213 °C. 10B: resposta combinada para dois compostos eluídos na faixa de 230 a 238 °C .....	55
Figura 11. Superfície de resposta obtida para a otimização do tempo de extração total com a fibra em diferentes temperaturas: 90 °C (sem refrigeração) e 60 °C para o modo direto. A resposta média foi calculada para os compostos eluídos na faixa de 214-300 °C.....	58
Figura 12. Perfil da variação da resposta dos compostos eluídos antes e depois de 213 °C em relação à concentração de NaCl para o modo direto.....	59
Figura 13. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no headspace da amostra. Temperaturas da fibra: 90 °C (modo direto) e 30 °C (modo HS). Concentração de NaCl: 54% da saturação em água pura. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos.....	61
Figura 14. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no headspace da amostra. % tempo no HS: 40% do tempo de extração total. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos.....	62
Figura 15. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no headspace da amostra. Tempo de extração total: 80 min. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos. ....	63
Figura 16. Comparação entre diferentes condições de extração. Números no eixo x representam os analitos na ordem de eluição. Nova abordagem da CF-SPME no modo HS: 80 min de extração no modo HS com a fibra em 30 °C. Nova abordagem da CF-SPME nos modos direto e HS: 50 min de extração no modo direto sem resfriamento da fibra seguido por 30 min no HS com a fibra a 30 °C. SPME convencional: 80 min de extração com a CF-SPME sem resfriamento da fibra no modo direto.....	65
Figura 17. Comparação entre diferentes métodos de extração usando CF-SPME e 50 mg de sílica adicionada de 10 µg g-1 de cada analito. (A) Condição otimizada proposta neste estudo: temperatura da amostra:	



90 ° C, 12 mL de solução aquosa de NaCl em 194 g L <sup>-1</sup> e pH 5,5 em frasco de 15 ml, 80 min de extração, sendo os primeiros 50 min em modo direto com a fibra a 90 °C, seguida de 30 min de extração no headspace com a fibra a 30 °C. (B) Abordagem usual da CF-SPME: sem adição de água, temperatura da amostra: 160 °C, tempo de incubação: 15 min a 160 ° C, temperatura da fibra: 5 °C, tempo de extração: 80 min.....	67
Figura 18. Superfícies de resposta obtidas pela otimização das variáveis tempo e temperatura para extração da fração volátil de matrizes vegetais através de planejamento composto central.....	75
Figura 19. Superfície de resposta compromisso obtida pela avaliação de tempo e temperatura de extração para todos os grupos.....	77
Figura 20. Superfície de resposta obtida pela otimização do tempo total de extração e fração desse tempo com a temperatura da amostra em 5 °C. Temperatura inicial: 60 °C. Fibra: DVB/CAR/PDMS. Massa de amostra: 100 mg.....	78
Figura 21. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis da banana.....	79
Figura 22. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de maracujá.....	80
Figura 23. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de manga.....	80
Figura 24. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de pitanga.....	81
Figura 25. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de café torrado e moído. ....	81
Figura 26. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta a área total do cromatograma obtido no GC-FID.....	82
Figura 27. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta a somatória da área dos picos identificados por GC-MS.....	83
Figura 28. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta o número de picos identificados por GC-MS (similaridade maior que 85%).....	84

Figura 29: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando banana como amostra. Identificação dos picos na Tabela 7.....	85
Figura 30: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando maracujá como amostra. Identificação dos picos na Tabela 8.....	86
Figura 31: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando manga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 9. ....	86
Figura 32: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando pitanga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 10. A parte do cromatograma indicada é mostrada na Figura 31.....	87
Figura 33. Cromatograma ampliado da parte circulada da Figura 32, obtido pelo método proposto utilizando pitanga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 10.....	87
Figura 34. Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando café torrado e moído como amostra, sem adição de água. Identificação dos picos na Tabela 11.....	88

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Faixa de temperatura ótima da fibra para cada analito estudado. Temperatura de extração de 140 e 160 °C para EF e HPA, respectivamente.....	34
Tabela 2. Comparação do desempenho do dispositivo de CF-SPME em baixa temperatura com e sem o recobrimento de PDMS.....	35
Tabela 3. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de EF e HPA de amostras gasosas através da nova abordagem proposta nesse trabalho.....	41
Tabela 4. Concentração determinada, estimativas de recuperação da primeira extração e recuperação total e limites de detecção do método desenvolvido calculado usando 0,5 g de massa de amostra para HPA e 2,5 mg para EF.....	44
Tabela 5. Dados analíticos obtidos para a nova proposta de uso da CF-SPME utilizando 50 mg de amostra de sílica.....	69
Tabela 6. Recuperações relativas obtidas para amostras de solos com diferentes teores de argila e matéria orgânica através do método otimizado proposto neste estudo.....	70
Tabela 7. Picos identificados pelo método proposto na banana.....	89
Tabela 8. Picos identificados pelo método proposto no maracujá.....	89
Tabela 9. Picos identificados pelo método proposto na manga.....	90
Tabela 10. Picos identificados pelo método proposto na pitanga.....	91
Tabela 11. Picos identificados pelo método proposto no café torrado e moído.....	92

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

GC	<i>gas chromatography</i> - cromatografia a gás
SHS	<i>Static headspace</i> - headspace estático
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> - extração por fase sólida
SPME	<i>solid-phase microextraction</i> - microextração em fase sólida
PDMS	Polidimetilsiloxano
PA	Poliacrilato
PEG	Polietilenoglicol
CF	<i>cold-fiber</i> - fibra refrigerada
CF-SPME	microextração em fase sólida com fibra internamente refrigerada
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano
K	Constante de partição K entre a fase estacionária e a fase gasosa
$K_{\text{hsm}}$	Constante de partição dos analitos entre a matriz e o headspace
$K_{\text{fhs}}$	Constante de partição dos analitos entre o headspace e o recobrimento da fibra
$K_{\text{fm}}$	Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra
$C_{\text{HS}}$	concentração do analito no headspace no equilíbrio
$C_{\text{f}}$	concentração do analito no revestimento da fibra no equilíbrio
$C_{\text{m}}$	concentração do analito na matriz da amostra no equilíbrio
$n_0$	quantidade de analito inicialmente presente na amostra
$n_{\text{HS}}$	quantidade de analito no headspace no equilíbrio
$n_{\text{m}}$	quantidade de analito restante na matriz da amostra no equilíbrio
$n_{\text{f}}$	quantidade de analito no recobrimento da fibra no equilíbrio
$V_{\text{m}}$	volume ou massa de amostra
$C_0$	concentração inicial do analito na amostra
$V_{\text{f}}$	volume do recobrimento da fibra
$V_{\text{HS}}$	volume de headspace
k	constante de Boltzmann
T	temperatura absoluta
D	coeficiente de difusão
$\Pi$	o número pi
$\mu$	Viscosidade

$r$	raio molecular
$n_t$	quantidade de analito extraída pelo recobrimento no tempo $t$
$n_\infty$	quantidade de analito extraída no equilíbrio (em $t = \infty$ )
$e$	base do logarítmo neperiano
$a$	constante de velocidade do processo de transferência de massa
$\Delta S$	variação de entropia
$R$	constante universal dos gases
$C_p$	capacidade calorífica a pressão constante
$T_s$	temperatura absoluta da amostra
$T_f$	temperatura absoluta da fibra
TEC	thermoelectric cooler - resfriador termoelétrico
EF	ésteres de ftalato
HPA	hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

## LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Constante de partição  $K$  dos compostos entre a fase estacionária e a fase gasosa

Equação 2. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o headspace

Equação 3. Constante de partição dos analitos entre o headspace e o recobrimento da fibra

Equação 4. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra

Equação 5. Balanço de massa dos analitos em um sistema trifásico matriz, heaspase e fibra

Equação 6. Relação entre  $n_f$  e concentração inicial do analito na amostra

Equação 7. Relação Einstein-Stokes demonstrando  $D$  como função de  $r$ ,  $T$  e  $\mu$ .

Equação 8. Quantidade extraída pela fibra  $n_t$  em função do tempo de extração  $t$

Equação 9. Constante de velocidade  $a$  quando a difusão dos analitos pela fibra é a etapa lenta

Equação 10. Constante de velocidade  $a$  quando evaporação dos analitos da fase condensada é a etapa lenta

Equação 11.  $n_f$  como função do tempo de extração quando o parâmetro  $a$  é dado pela eq. 10

Equação 12.  $\sum \Delta S$  em um processo envolvendo CF-SPME a partir do headspace.

Equação 13.  $\Delta S$  do processo de mistura do vapor do analito com o headspace à  $T$  e  $p$  constantes

Equação 14.  $\Delta S$  do processo de resfriamento do vapor do analito de  $T_s$  para  $T_f$ .

Equação 15.  $\Delta S$  do processo de absorção do analito à temperatura constante  $T_f$  pelo recobrimento

Equação 16. Condição de equilíbrio relacionando variação da entropia  $\Delta S$  e  $n_f$ .

Equação 17. Derivada parcial da equação 12 em relação à quantidade absorvida pela fibra  $n_f$

Equação 18. Constante de partição  $K_T$  do analito entre o headspace aquecido e o recobrimento resfriado

Equação 19. Razão da PG estimada pela extração sucessiva da mesma amostra

Equação 20. Estimativa da massa total do analito contido na amostra como função de  $\beta$  e de  $A_1$

Equação 21. Estimativa da massa total do analito contido na amostra como função de  $A_1$  e  $A_2$

Equação 22. Estimativa da recuperação absoluta da primeira extração  $A_1$ .





## 1. INTRODUÇÃO

A Química Analítica é o ramo da Química que trata da determinação da composição da matéria. Uma análise pode ser qualitativa, na qual a identidade de uma ou mais espécies de interesse (analito) na amostra é determinada ou quantitativa, na qual é determinado um valor numérico relacionado à quantidade do analito presente na amostra. Principalmente do ponto de vista da Química Analítica Quantitativa Instrumental, encontra-se na literatura diversos métodos analíticos, baseados em diferentes métodos de detecção, técnicas de introdução e de preparo de amostra, inclusive para o(s) mesmo(s) analito(s) ou grupo de analitos.

Entretanto, o desenvolvimento de novas metodologias analíticas suporta-se apenas na necessidade do aprimoramento dos métodos já existentes, aplicação em amostras de interesse que não tenham sido alvo de aplicação até então ou como um teste para aplicação de novos materiais. Melhoras em um método analítico que justifiquem seu desenvolvimento podem consistir em:

- aumento na relação sinal/ruído (ou seja, aumento na detectabilidade);
- aumento da precisão, reprodutibilidade e seletividade;
- maior adequação da recuperação, exatidão com os limites exigidos;
- ampliação da faixa linear de trabalho;
- melhoras na robustez do método;
- diminuição dos custos com a análise;
- diminuição do número de etapas do método (simplificação);
- minimização do uso de reagentes tóxicos, solventes de alta pureza, aparatos complexos;
- maximização da frequência analítica.

Os últimos quatro itens estão fortemente interligados, ou seja, a simplificação de um método e a minimização do uso de reagentes tóxicos e de solventes geralmente estão associadas à diminuição dos custos com a análise e aumento da frequência analítica.

Estritamente falando dos métodos de determinação simultânea de compostos orgânicos em nível traço (com poder de detecção na faixa de ng a pg), os métodos cromatográficos de análise são os principais,

uma vez que permitem que a mistura injetada seja separada e detectada. Como a cromatografia a gás foi utilizada nesse trabalho, maior ênfase será dada a essa técnica.

### 1.1. Cromatografia a gás

A cromatografia a gás (GC – *gas chromatography*) é um método de separação onde a mistura de compostos injetada é separada seja pela interação diferencial que cada componente tem com uma determinada fase estacionária, seja pela diferença das pressões de vapor de cada componente da mistura.

A fase estacionária em GC pode ser um sólido de alta área superficial (cromatografia sólido-gás) ou um filme de polímero líquido de alta viscosidade aderido sobre um suporte inerte (cromatografia líquido-gás). Já a fase móvel é um gás inerte (geralmente nitrogênio, hidrogênio ou hélio) que percola desde o injetor do instrumento, passando pela fase estacionária (coluna cromatográfica), até o detector. A fase móvel em GC tem o único propósito de arrastar a fração dos analitos que estão na fase gasosa, não interagindo quimicamente com estes. A interação de cada componente da mistura com a fase estacionária pode ser medida através da constante de partição (no caso da GC líquido-gás) dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel:

$$K = \frac{C_{fe}}{C_{fm}} \quad (1)$$

onde:  $C_{fe}$  é a concentração do analito na fase estacionária e  $C_{fm}$  é a concentração dos analitos na fase móvel. Portanto, compostos com diferentes constantes de partição  $K$  podem ser separados por cromatografia a gás.

Embora a técnica de cromatografia a gás seja uma poderosa técnica de separação, ela apresenta algumas características inerentes à amostra a ser injetada. Primeiramente, uma amostra a ser analisada por GC deve conter componentes que sejam vaporizáveis a uma temperatura não superior a 400 °C e estes não podem se decompor, ou seja, devem ser termicamente estáveis. Desta maneira, substâncias como polímeros, proteínas, materiais particulados jamais podem ser injetados em um cromatógrafo a gás. Outra limitação da técnica é referente a amostras aquosas. Água hidrolisa a fase estacionária, diminuindo drasticamente a

vida útil desta. Além disso, por possuir uma massa molar muito baixa, mínimas quantidades de água, quando vaporizadas, ocupam um grande volume, aumentando a pressão demasiadamente dentro do injetor do instrumento, podendo causar vazamentos e atrasando drasticamente a entrada rápida da mistura na coluna cromatográfica, o que torna a separação bastante deficiente. Assim, injeção direta de amostras aquosas no cromatógrafo a gás é um procedimento incompatível. Como então lidar com determinação de analitos em matrizes complexas, tal como solo, sedimento, papel, tecido, sangue, urina ou mesmo água? Para responder essa pergunta o analista deve partir do princípio que para injeção no GC os analitos devem estar dissolvidos em um solvente orgânico apropriado, estar na forma gasosa ou sorvidos em um sorvente adequado, o qual então, se possível, pode ser termicamente dessorvido na porta de injeção do instrumento. Para que isso ocorra, faz-se necessário o emprego de técnicas apropriadas para a preparação destas amostras antes da separação/detecção por GC.

## **1.2. Métodos de preparo de amostra**

Preparar a amostra significa adequá-la para introdução no instrumento de análise. Esse procedimento pode visar tanto à transferência do analito para um meio físico compatível com o instrumento quanto à adequação da concentração desses para que fiquem dentro da faixa linear de trabalho do instrumento, ou ambos. Esse último procedimento é chamado pré-concentração ou concentração pré-análise, e é particularmente necessária para análise em nível traço ou ultra-traço. Em geral, um bom procedimento de preparo de amostra envolve:

- 1) a obtenção de uma sub-fração da amostra original (preferencialmente enriquecida) com os analitos de interesse, denominada extrato;
- 2) a obtenção de um extrato que não contenha substâncias incompatíveis com a introdução no instrumento, por exemplo, para cromatografia a gás, substâncias não volatilizáveis e/ou termolábeis, água, etc, e que contenha o mínimo possível de substâncias que não são de interesse, e possam vir a interferir na análise;
- 3) o mínimo de manipulação da amostra, fato que evita perda dos analitos e minimiza o risco de contaminação desta.

O primeiro item está relacionado a um alto fator de pré-concentração, ou fator de enriquecimento. O segundo caracteriza-se pela seletividade do método e o terceiro pela simplicidade.

Obviamente existem outras características que podem ser utilizadas para comparar métodos de preparo de amostras, tais como: complexidade dos aparatos utilizados, tempo de preparo da amostra e uso ou não de solventes orgânicos. Este último quesito vem exatamente de encontro ao que defende a Química Verde, que pode ser definida como a utilização de técnicas químicas e metodologias que reduzem ou eliminam o uso de solventes e reagentes ou geração de produtos e subprodutos tóxicos, nocivos à saúde humana ou ao ambiente<sup>1</sup>.

Técnicas clássicas de preparação de amostras utilizadas para separação/detecção por cromatografia a gás compreendem: *headspace* estático/dinâmico<sup>2,3</sup>, extração com solventes<sup>4,5</sup> (líquido-líquido, sólido-líquido) e extração em fase sólida<sup>6</sup>.

Uma amostra líquida ou sólida acondicionada em um frasco fechado hermeticamente compreende-se basicamente em duas partes: fase condensada e fase gasosa. No caso de amostras sólidas, líquidas ou em suspensão, a própria amostra é chamada fase condensada, e sua atmosfera, ou seja, a parte gasosa presente acima da fase condensada é chamada de *headspace* (termo em inglês muito utilizado, para o qual ainda não se encontrou tradução apropriada).

### ***Técnicas clássicas de preparo de amostra para cromatografia a gás***

A técnica de *headspace* estático (SHS – *static headspace*) baseia-se na amostragem de um determinado volume do *headspace* que preferencialmente deve-se encontrar em equilíbrio com a amostra. A amostragem é realizada com uma seringa do tipo *gas-tight* com volume variável. As principais variáveis a serem otimizadas são tempo e temperatura de equilíbrio entre amostra e *headspace*, massa ou volume de amostra, força iônica, pH e volume de injeção. A vantagem da técnica é a simplicidade. Contudo, não há pré-concentração, e a técnica só pode ser utilizada quando a concentração dos analitos na amostra for compatível com a sensibilidade do detector a ser utilizado.

A extração em fase sólida (SPE – *solid-phase extraction*) baseia-se na partição dos analitos entre a amostra e uma fase extratora (fase sólida na qual se suporta um ad/absorvente) acondicionada em um

cartucho. Um volume pré-definido de amostra percola pelo cartucho contendo o material sorvente, e, por maior afinidade pelo sorvente do que pela amostra, os analitos ficam retidos no material sólido ou sorvente (etapa de sorção). Caso haja necessidade, algum solvente pode ser utilizado para remover de maneira seletiva algum interferente antes da etapa de eluição, na qual se utiliza um volume apropriado de um solvente orgânico. Parâmetros importantes que devem ser estudados compreendem a quantidade e tipo de material sorvente, o volume de amostra a ser pré-concentrada, a vazão em que a amostra percola pelo material sorvente, condicionamento da amostra como força iônica e pH, tipo e volume de solvente de eluição e vazão de eluição. Com a devida otimização, uma extração quantitativa pode ser obtida, podendo-se alcançar grandes fatores de enriquecimento e limpeza da amostra. A desvantagem reside no fato de que solventes orgânicos precisam ser utilizados, e, para uma completa eluição, geralmente um volume relativamente grande de solvente precisa ser empregado, não resultando em uma alta razão de fases. Geralmente concentra-se o extrato sob fluxo de um gás inerte ou sob leve aquecimento à pressão reduzida. Contudo, esses procedimentos podem levar a perda dos analitos mais voláteis, e a introdução de mais uma etapa no método pode levar a uma piora na precisão.

Na extração com solventes, da mesma maneira que em SPE, a partição dos analitos entre a matriz da amostra e o solvente orgânico é o princípio básico. Esta é a maneira mais clássica de preparação de amostra, podendo ser utilizada para matrizes aquosas (extração líquido-líquido) ou sólidas (extração sólido-líquido), na qual a extração com solventes pode ser realizada de maneira contínua (extração com Soxhlet) ou descontínua, podendo ser auxiliada por microondas ou ultrassom. Fatores importantes envolvidos no processo são: volume ou massa de amostra, pH e força iônica da amostra, volume e tipo de solvente extrator (ou mistura de solventes) e tempo de extração. Sob uma adequada avaliação desses parâmetros, a técnica possui como vantagem a remoção quantitativa dos analitos da matriz da amostra, permitindo que baixos limites de detecção possam ser atingidos. Contudo, a morosidade do processo, a possível formação de emulsão, a utilização de grandes quantidades de solventes tóxicos e de alta pureza (alto custo) e a necessidade de concentração do extrato por fluxo de gás ou evaporação do solvente são as principais desvantagens. Com o intuito de minimizar o uso de solventes e eliminar a etapa de concentração do extrato, várias adaptações têm sido feitas, dando origem a métodos de

microextração líquido-líquido, onde a razão de fases (volume de amostra/volume de solvente) é superior a  $100^7$ . Como já dito, as vantagens de um sistema de microextração líquido-líquido são a minimização do uso de solventes, eliminação da etapa de concentração do extrato, obtenção de alto fator de enriquecimento e simplificação do procedimento.

### *Microextração em fase sólida (SPME)*

Em meados de 1990, Arthur e Pawlyszin<sup>8</sup> desenvolveram uma microtécnica denominada microextração em fase sólida e que até então vem ganhando cada vez mais importância na área de preparação de amostras para cromatografia a líquido, eletroforese capilar e especialmente cromatografia a gás. A microextração em fase sólida (SPME – *solid-phase microextraction*) é um aparato onde a fase extratora encontra-se aderida a um suporte (haste de sílica fundida ou suporte metálico), sendo que a fase extratora pode ser um polímero orgânico com características de líquido - polidimetilsiloxano (PDMS), poliacrilato (PA) ou polietilenoglicol (PEG) - ou uma suspensão de um sólido (carvão ativo ou divinilbenzeno) em um dos polímeros líquidos acima citados. O que classifica a técnica como uma técnica de microextração é a sua pequena quantidade de material sorvente, decorrente de suas dimensões. Comercialmente, a espessura do recobrimento sobre o suporte varia de 7 a 100  $\mu\text{m}$ , em um comprimento tipicamente de 1 cm. Desta maneira, o volume de fase extratora pode variar de 0,03 a 0,7  $\mu\text{L}$ . Sendo o volume de amostra tipicamente utilizado de 1 a 20 mL, a razão de fases fica geralmente na faixa de 1000 a 20000, respectivamente, caracterizando a SPME como uma microtécnica. Característica inerente aos métodos em escala micro, e não diferente em SPME, é que uma porção não significativa (relativamente ao total contido na amostra) do analito é extraída, não modificando assim substancialmente o equilíbrio entre os constituintes da amostra.

Vários fatores influenciam a velocidade e/ou a quantidade de analito extraída por SPME: tipo de recobrimento da fibra, tempo e temperatura de dessorção, modo de extração (*headspace* ou direto), velocidade e modo de agitação, massa ou volume de amostra, pH e força iônica da amostra e tempo e temperatura de extração. A técnica de

SPME será utilizada nesse trabalho, desta forma, alguns aspectos teóricos serão discutidos. Maiores detalhes podem ser encontrados na referência 9.

### *Aspectos termodinâmicos<sup>9</sup>*

A técnica de SPME baseia-se na partição do(s) analito(s) entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra, sendo que esse equilíbrio pode ser representado por uma constante de equilíbrio de partição fibra-matriz ( $K_{fm}$ ). Em extrações realizadas a partir do *headspace* da amostra (HS-SPME), que são comuns quando a amostra é complexa e/ou os analitos são voláteis, os analitos distribuem-se entre a matriz da amostra e o *headspace* conforme suas constantes de partição matriz-*headspace*:  $K_{hsm}$ . Encontrando-se os analitos no *headspace* da amostra, esses são particionados entre o *headspace* e o recobrimento da fibra:  $K_{fhs}$ . Um esquema da distribuição dos analitos por essas três fases bem como das respectivas constantes de partição são mostrados abaixo:



Escrevendo o balanço de massa para esse sistema trifásico tem-se:

$$n_o = n_m + n_{HS} + n_f = c_o V_m, \quad \text{onde :} \quad (5)$$

$n_o$  = quantidade inicial de analito presente na matriz da amostra;

$n_m$  = quantidade de analito restante na matriz da amostra no equilíbrio;

$n_{HS}$  = quantidade de analito em fase gasosa (no *headspace*) no equilíbrio;

$n_f$  = quantidade de analito no recobrimento da fibra no equilíbrio.

$c_o$  = concentração de analito na amostra

$V_m$  = volume ou massa de amostra.

Seja  $V_f$  o volume do recobrimento da fibra e  $V_{HS}$  o volume de *headspace*. Utilizando as equações de 2 a 5, e isolando  $n_f$  em função de  $c_o$ , chega-se a seguinte relação:

$$n_f = \frac{C_o V_m V_f K_{fhs} K_{hsm}}{V_m + V_{hs} K_{hsm} + V_f K_{fhs} K_{hsm}} \quad (6)$$

A Eq. 6 mostra que a quantidade extraída pela fibra de SPME  $n_f$  é diretamente proporcional à concentração inicial do(s) analito(s) na matriz da amostra  $c_o$ , fato que possibilita a análise quantitativa. Através da equação 6, pode-se observar também outros fatores que interferem na quantidade extraída pela fibra no equilíbrio ( $n_f$ ), como os volumes de amostra, *headspace* e da fase extratora. Assim como todas as constantes de equilíbrio,  $K_{fhs}$  e  $K_{mhs}$  também são funções da temperatura. A constante  $K_{mhs}$  diz respeito à evaporação do analito da matriz da amostra, e, portanto, pode ser deslocado para a direita pelo aumento da temperatura de extração, ou seja, é um processo endotérmico. Já o equilíbrio de sorção do analito pela fibra (eq. 3) é um processo exotérmico, e um aumento da temperatura de extração leva a uma diminuição da quantidade extraída em condições de equilíbrio. A conclusão é que a temperatura afeta de maneira complicada o equilíbrio final (eq. 4), sendo que a temperatura de extração deve ser necessariamente objeto de avaliação empírica em um desenvolvimento de método por SPME.

### *Aspectos cinéticos*<sup>9</sup>

Em uma extração com SPME a partir do *headspace* (HS-SPME) as seguintes etapas ocorrem:

- 1) evaporação dos analitos da fase condensada;
- 2) convecção dos analitos até as proximidades da fase extratora (no caso da amostra ser agitada de alguma maneira);
- 3) difusão dos analitos pela camada estática que envolve a fibra;
- 4) difusão dos analitos através da fase extratora.



A velocidade de transferência de massa da matriz da amostra até o interior do recobrimento da fibra será controlada pela etapa mais lenta. Em uma extração a partir do *headspace*, as etapas 2 e 3 são rápidas, uma vez que ocorrem em fase gasosa, onde os coeficientes de difusão são cerca de três ordens de grandeza maiores comparativamente à fases condensadas. Portanto, são processos rápidos, e não será a etapa determinante da velocidade. Já as etapas 1 ou 4 podem ser etapas lentas. Os fatores que afetam a etapa 1 são: volatilidade dos analitos (a qual é uma função da temperatura), complexidade da amostra (presença de substâncias que adsorvem os analitos na matriz) e velocidade de agitação. Já os fatores que influenciam a etapa 4 são puramente aqueles que afetam a difusão de uma substância em um meio, ou seja, o raio da molécula, a viscosidade do meio difusor e a temperatura. A relação de Einstein-Stokes demonstra a relação quantitativa entre o coeficiente de difusão  $D$  de uma substância com raio molecular  $r$  em um meio difusor com viscosidade  $\mu$  em temperatura absoluta  $T$ , sendo a constante de proporcionalidade  $k$  a constante de Boltzmann ( $1,3806503 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$ ):

$$D = \frac{kT}{\pi \mu r} \quad (7)$$

Como se pode observar na eq. 7 acima, o coeficiente de difusão é diretamente proporcional à temperatura absoluta, e inversamente proporcional ao raio da molécula e à viscosidade do meio difusor. Como a viscosidade diminui com o aumento da temperatura na maioria dos casos, um aumento de temperatura sempre vai favorecer um aumento do valor do coeficiente de difusão.

A conclusão é que sendo a etapa lenta do processo a etapa de evaporação dos analitos da matriz da amostra ou a difusão desses pelo recobrimento da fibra, um aumento da temperatura vai sempre favorecer uma maior velocidade de transferência de massa da matriz da amostra em direção ao recobrimento da fibra. A literatura mostra claramente que o processo de transferência de massa da amostra para o recobrimento da fibra em SPME segue uma cinética de primeira ordem, ou seja:

$$n_t = n_{\infty}[1 - e^{-at}] \quad (8)$$

Na eq.8,  $n_t$  é a quantidade de analito extraída pelo recobrimento no tempo  $t$ ,  $n_\infty$  é a quantidade de analito extraído pela fibra no equilíbrio (em  $t=\infty$ ) e  $a$  é a constante de velocidade do processo de transferência de massa (em  $\text{min}^{-1}$ ). O parâmetro  $a$  é uma função do coeficiente de transferência de massa no recobrimento da fibra  $m_f$  ( $\text{m min}^{-1}$ ), da área superficial do recobrimento da fibra  $A_f$ , da taxa de evaporação dos analitos da amostra para o *headspace*  $k$  ( $\text{min}^{-1}$ ), das constantes de partição  $K_{fhs}$  e  $K_{hsm}$ , e dos volumes de fase extratora, de *headspace* e de matriz  $V_f$ ,  $V_{hs}$  e  $V_m$ .

Quando a etapa lenta é a difusão pelo recobrimento (líquido) da fibra ou a evaporação dos analitos da matriz o parâmetro  $a$  é definido pelas equações 9 e 10, respectivamente.

$$a = \frac{(2A_f m_f) (K_{fhs} K_{hsm} V_f + K_{hsm} V_{hs} + V_m)}{K_{hsm} V_f V_{hs} + V_f V_m} \quad (9)$$

$$a = \frac{(k V_{hs}) (K_{fhs} K_{hsm} V_f + K_{hsm} V_{hs} + V_m)}{K_{fhs} V_f V_m} \quad (10)$$

A Eq. 9 é aplicável a analitos de alta volatilidade, ou seja, com a taxa de evaporação  $k$  muito maior que o coeficiente de difusão dos analitos pelo revestimento da fibra. Nesse caso, o equilíbrio é mais rapidamente atingido, pois a constante de velocidade  $a$  é maior comparativamente a quando a taxa de evaporação dos analitos da matriz torna-se a etapa determinante da velocidade. Já a eq. 10 aplica-se a analitos semi-voláteis e pouco voláteis, e a quantidade extraída pelo recobrimento  $n_f$  em função do tempo pode ser simplificada pela eq. 11.

$$n_t = k K_{hsm} V_{hs} c_o t \quad (11)$$

Pode-se observar que a quantidade extraída é linearmente proporcional ao tempo de extração até certo período, fato que torna a extração no equilíbrio uma tarefa demorada para analitos pouco voláteis. Contudo, mantido o tempo de extração constante, quantificação fora do estado de equilíbrio pode ser realizada, uma vez que na Eq. 11,  $n_t$  continua sendo proporcional a  $c_o$ . Aumentando-se a temperatura de extração pode-se aumentar a volatilidade dos analitos, e fazer com que a

etapa lenta seja a difusão pela fibra, fazendo assim com que se atinja o equilíbrio mais rapidamente. Contudo, uma menor quantidade de analito vai ser extraída, visto que a sorção dos analitos pelo recobrimento é um processo exotérmico.

### *Termodinâmica x cinética*<sup>9</sup>

De maneira geral em uma extração no *headspace* por SPME para análise de traço, deseja-se que os analitos sejam retirados da matriz da amostra e extraídos pelo recobrimento da fibra na maior quantidade possível e em um menor tempo. Alcançar plenamente esses dois objetivos torna-se um desafio, principalmente no caso de amostras complexas, onde os analitos podem estar fortemente “presos” à matriz. Maneiras de deslocar o equilíbrio matriz-*headspace* (representado na Eq. 2) em direção ao *headspace* incluem o estudo da força iônica e pH da amostra (ou da suspensão quando for o caso), uso de algum solvente auxiliar, e, ultimamente e mais importante, a temperatura de extração. A temperatura não somente auxilia na dessorção térmica dos analitos da matriz, mas também aumenta a volatilidade dos analitos e facilita a difusão desses pelo recobrimento da fibra. Então realizar a extração sempre em uma elevada temperatura poderia ser uma excelente alternativa para sobrepor-se a esses problemas. Entretanto, como já dito, o equilíbrio de sorção dos analitos pela fibra (eq. 3) é um processo exotérmico. Assim, a temperatura de extração influencia de maneira contrária a termodinâmica (negativamente) e cinética do processo (positivamente). Na prática, a temperatura precisa ser cuidadosamente estudada de maneira a atingir-se um compromisso entre velocidade de extração e quantidade extraída pela fibra, onde geralmente obtém-se um perfil de máximo em um gráfico relacionando quantidade extraída por temperatura de extração. Entretanto, no caso de matrizes complexas, geralmente essa temperatura ótima auxilia muito pouco na liberação dos analitos para o *headspace*, tornando muitas vezes o método inviável por falta de sensibilidade adequada.

Como então utilizar a técnica de SPME para análise de traço em matrizes complexas? Uma alternativa seria tomar vantagem do uso de altas temperaturas de extração e simultaneamente resfriar o recobrimento da fibra. Esse sistema foi inicialmente proposto por Pawliszyn no ano de 1995, que o denominou de microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (*internally cooled solid-phase microextraction*). Como esse sistema será utilizado nesse

trabalho, seu histórico até então será relatado, bem como uma descrição dos fundamentos teóricos.

### *Microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado*

Em 1995, Zhang e Pawliszyn introduziram a técnica denominada microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado<sup>10</sup>, ou simplesmente *cold fiber* (CF-SPME), e demonstraram sua viabilidade para extração quantitativa de compostos orgânicos voláteis (especificamente benzeno, tolueno, etilbenzeno e orto, meta e para xilenos) de matrizes complexas tais como solo e sedimentos. O dispositivo de *cold fiber* utilizado nesse primeiro trabalho foi miniaturizado e automatizado em 2006<sup>11</sup>, de maneira a tornar mais viável o trabalho experimental. Esse dispositivo é demonstrado nas Figuras 1-2 e é idêntico ao utilizado na presente Tese. Também nesse trabalho<sup>11</sup>, uma válvula solenóide que permite a entrada de CO<sub>2</sub> líquido vindo do cilindro até a seringa *gas-tight* contendo a fase extratora, foi acoplada a um controlador de temperatura, o qual envia o comando para a válvula abrir ou fechar conforme a temperatura lida pelo termopar seja diferente da temperatura pré-programada para a fibra.

O menor tubo selecionado como suporte para o recobrimento da fibra, também servindo como um êmbolo foi um tubo de aço inoxidável com diâmetro externo (d.e.) e interno (d.i.) de 0,71 e 0,60 mm respectivamente. Essas dimensões foram compatíveis com o tubo de CO<sub>2</sub> (0,13 mm de d.i. e 0,30 mm de d.e.) e o fio de termopar ( $\approx$  0,08 mm). Uma das extremidades deste tubo foi selada com cimento de alta temperatura. O termopar do tipo K usado para monitorar a temperatura do recobrimento da fibra foi fixado no cimento a aproximadamente 2 mm da extremidade (ver parte ampliada da Fig. 1). Aproximadamente 1 cm de uma membrana tubular polimérica de PDMS com 0,30 mm d.i. e 0,178 mm de espessura de filme, foi mergulhada em hexano ou tolueno até que se expandisse para que então fosse colocada na extremidade do tubo selado com cimento.

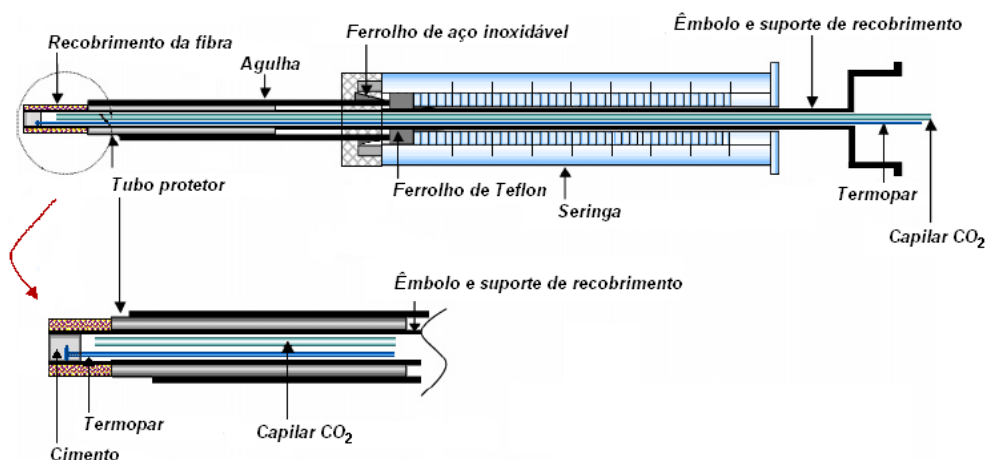


Figura 1. Esquema do dispositivo de SPME resfriado internamente.

A evaporação do hexano/tolueno promove uma forte adaptação do tubo de PDMS sobre o suporte. Um tubo auxiliar de aço inoxidável (0,81 mm de d.i. e 1,07 mm de d.e.) foi posicionado a aproximadamente 1 cm da ponta selada do êmbolo/suporte para proteger o recobrimento da fibra durante o procedimento de exposição e retração do recobrimento. E finalmente o menor tubo externo, com capacidade para acomodar o dispositivo de êmbolo/suporte mais o tubo protetor foi um tubo de aço inoxidável com 1,14 mm de d.i. e 1,27 mm de d.e., o qual trabalha como protetor e agulha na perfuração de septos de frascos ou de GC.

Durante a evaporação do  $\text{CO}_2$  líquido, energia térmica é absorvida do ambiente ao redor a aproximadamente  $2,52 \text{ kJ min}^{-1}$  (calculado usando a densidade do  $\text{CO}_2$  líquido de  $0,2 \text{ g mL}^{-1}$  e entalpia de evaporação de  $25,23 \text{ kJ mol}^{-1}$ ). Como resultado, o recobrimento da fibra colocado sobre a superfície externa do capilar pode ser efetivamente resfriado enquanto a amostra no frasco é aquecida.

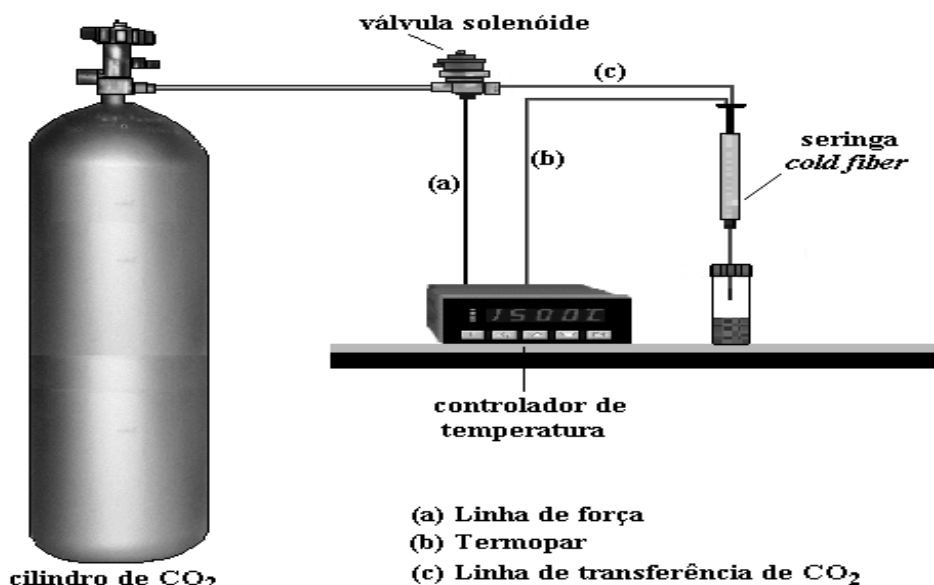


Figura 2. Dispositivo de CF-SPME, mostrando em (a) a linha que liga o controlador de temperatura à fonte de alimentação externa, (b) o fio de termopar cimentado internamente na ponta da fibra e conectado ao controlador de temperatura e em (c) a linha de transferência que leva o CO<sub>2</sub> líquido vindo do cilindro, passando pela válvula solenóide até chegar à ponta do recobrimento.

Usando esta estratégia de amostragem, a transferência de massa é favorecida e uma diferença de temperatura é criada entre o recobrimento da fibra resfriada e o *headspace* quente, com significativo aumento nos coeficientes de distribuição. Com este arranjo, a temperatura pode ser muito elevada e é limitada somente pela estabilidade dos analitos e da matriz da amostra. Um esquema de todo o aparato de CF-SPME é mostrado na Figura 2.

Já na Figura 3 é mostrada uma foto de todo sistema de extração utilizado nesse trabalho.



Figura 3. Foto do sistema de CF-SPME utilizado nesse trabalho. O cilindro à esquerda é o reservatório de  $\text{CO}_2$  líquido, o qual está conectado à válvula solenóide. O tubo capilar de aço inoxidável leva o  $\text{CO}_2$  líquido da válvula solenóide até a ponta do recobrimento. A foto mostra o dispositivo de CF-SPME inserido dentro de um frasco à temperatura de  $143\text{ }^\circ\text{C}$  e o controlador de temperatura ao lado do bloco aquecedor mostra a temperatura do recobrimento em  $4,8\text{ }^\circ\text{C}$ .

Segundo Pawliszyn<sup>10</sup>, a força motriz da transferência do analito da fase gasosa para o recobrimento da fibra é o aumento da entropia do sistema. 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. A seguir será apresentada uma dedução simplificada da expressão para o cálculo da variação de entropia do processo de extração por um polímero líquido de um analito hipotético presente em fase gasosa que culminará em uma expressão para o cálculo da constante de partição do analito entre a fase gasosa a uma temperatura  $T_s$  e o recobrimento a uma temperatura  $T_f$ . A dedução completa pode ser encontrada na referência 10. Inicialmente pode-se

supor que o processo ocorra em três etapas, cada uma com sua variação de entropia  $\Delta S$ :

- 1) mistura do vapor do analito com o ar do *headspace* à temperatura e pressão constantes ( $T_s$  e  $P_s$ , respectivamente):  $\Delta S_1$ ;
- 2) resfriamento do vapor do analito de  $T_s$  para  $T_f$  nas proximidades do recobrimento resfriado:  $\Delta S_2$ ;
- 3) absorção do analito à temperatura constante  $T_f$  pelo recobrimento líquido:  $\Delta S_3$ .

A variação de entropia total do processo é representada por:

$$\Delta S = \Delta S_1 + \Delta S_2 + \Delta S_3 \quad (12)$$

$\Delta S_1$ ,  $\Delta S_2$  e  $\Delta S_3$  podem ser estimados, respectivamente, pelas equações 13, 14 e 15:

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

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

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

Onde:  $n_s$  é a quantidade do analito no *headspace* quando o equilíbrio é alcançado;  $n_0$  é a quantidade do analito inicialmente presente no *headspace*;  $n_H$  é a quantidade de ar no *headspace*, o qual é constante durante todo o processo e a consideração  $n_H \gg n_0$  pode ser feita, uma vez que o analito na maioria dos casos encontra-se em muito menor quantidade;  $n_f$  é a quantidade de analito absorvida pelo recobrimento da fibra no equilíbrio;  $C_p$  é a capacidade calorífica do analito à pressão constante, onde se assumiu que este valor é aproximadamente constante entre  $T_s$  e  $T_f$ ;  $K_0$  é a constante de distribuição do analito entre o *headspace* e o recobrimento da fibra quando ambos se encontram na temperatura da fibra  $T_f$ .

Tem-se que, no equilíbrio, a taxa de variação da entropia  $\Delta S$  em relação à quantidade absorvida pela fibra  $n_f$  é igual à zero. Matematicamente, essa condição equivale à:



$$\frac{\partial \Delta S}{\partial n_f} = 0 \quad (16)$$

Derivando-se  $\Delta S = \Delta S_1 + \Delta S_2 + \Delta S_3$  (a soma das equações 13 a 15) em relação à  $n_f$ , lembrando que  $n_o = n_f + n_s$ , obtém-se:

$$C_p \left( \frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) - R \ln \frac{T_f n_f V_s}{T_s V_f K_o n_H} = 0 \quad (17)$$

A constante de distribuição do analito entre o recobrimento 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 17, e isolando o termo  $K_T$ , tem-se:

$$K_T = K_o \frac{T_s}{T_f} \exp \left[ \frac{C_p}{R} \left( \frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_s} \right) \right] \quad (18)$$

$K_o$  é o coeficiente de partição quando tanto o recobrimento da fibra quanto o *headspace* estão na mesma temperatura da fibra  $T_f$  (ou seja, quando  $\Delta T = 0$ ) e  $\Delta T$  é a diferença de temperatura entre o *headspace* e o recobrimento da fibra:  $T_s - T_f$ .

A Eq. 18 mostra claramente o aumento do coeficiente de partição  $K_T$  conforme o aumento da variação de temperatura entre o *headspace* e o recobrimento da fibra. Desta maneira, pode-se utilizar uma alta temperatura para auxiliar na dessorção térmica dos analitos da matriz e aumentar a volatilidade desses, e simultaneamente resfriar o recobrimento da fibra, podendo-se alcançar extrações exaustivas, fato que com SPME não refrigerada isto poderia somente ser realizado em condições extremas, ou seja, quantidades de amostra muito pequenas e coeficientes de partição fibra-matriz muito altos.

À seguir, uma revisão dos artigos publicados relacionados ao uso da técnica de CF-SPME e outras estratégias de refrigeração da fibra é apresentada.

Em 2006, Guiasvand e colaboradores<sup>12</sup> utilizaram o dispositivo miniaturizado de CF-SPME para a determinação de naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno, antraceno, fluoranteno e pireno em

amostras de areia e sedimento. Neste trabalho, os efeitos da temperatura e tempo de extração foram inicialmente estudados de forma univariada no sentido de maximizar a quantidade extraída de cada HPA de uma amostra de areia previamente adicionada com os analitos. A temperatura do recobrimento da fibra foi fixada em todos os experimentos em 5 °C. Dessa matriz, como temperatura de extração ótima foi obtido 150 °C e como tempo de extração 40 minutos. Limites de detecção na faixa de 0,3 a 3 pg g<sup>-1</sup> (para uma massa de amostra de 2 g) foram obtidos. Duas amostras de referência de sedimento foram submetidas ao método proposto. Para naftaleno, acenaftileno, acenafteno, fluoreno e antraceno os resultados foram concordantes com os certificados. Já para fluoranteno e pireno, recuperações na faixa de 40 a 60% foram obtidas. De maneira a melhorar a recuperação para esses compostos, alguns modificadores foram utilizados, como metanol, sulfato de sódio e água. Apenas com o uso de água os autores relatam uma melhora significativa na recuperação, contudo, a evaporação desta a 150 °C causa um grande aumento na pressão interna e pode levar a vazamentos, deteriorando a precisão e exatidão do método. Assim, maiores tempos de extração foram estudados, atingindo-se uma extração exaustiva e concordância com os valores certificados para esses compostos em 180 min.

Outra aplicação do dispositivo de CF foi realizada em 2006 por Carasek e Pawliszyn<sup>13</sup> agora para análise de compostos provenientes do aroma de frutas tropicais como maracujá, caju, tamarindo, acerola e goiaba. Uma comparação foi realizada entre fibras comercialmente disponíveis e CF-SPME, sendo que o sistema CF-SPME mostrou-se mais atrativo, uma vez que um maior número de compostos pôde ser tentativamente identificado, devido ao maior poder de extração. As variáveis que influenciam no processo foram otimizadas através de ferramentas quimiométricas como planejamento fatorial e matriz Doehlert. Com o método utilizando fibra comercial (DVB/CAR/PDMS) foram estudadas a velocidade de agitação, tempo de incubação e tempo e temperatura de extração. As condições ótimas foram: 10 min de tempo de incubação, agitação da amostra em 500 rpm, tempo de extração de 25 min e temperatura de extração de 60 °C. Para a otimização utilizando CF-SPME, o tempo de incubação e tempo de extração foram fixados em 10 e 25 min, respectivamente, de maneira a permitir uma comparação com o método que utiliza fibra comercial. As variáveis avaliadas foram as temperaturas da fibra e da amostra através de metodologia de superfície de resposta. Levando em consideração um compromisso entre a extração dos compostos mais voláteis e os semi-voláteis, a condição

ótima foi avaliada como 60 °C para temperatura da amostra e 0 °C para temperatura da fibra. Os resultados da análise das amostras de frutas mostraram que, exceto para a polpa de maracujá, o método utilizando CF-SPME foi mais eficiente, pois foi possível identificar um maior número de compostos comparativamente às outras fibras comerciais avaliadas. A maior eficiência foi atribuída ao aumento da capacidade de extração do sistema de CF devido à capacidade de resfriamento do recobrimento simultaneamente ao aquecimento da amostra.

Em 2007, Carasek e colaboradores<sup>14</sup> novamente utilizaram o dispositivo de CF-SPME, desta vez para determinação de compostos que causam cheiro de mofo em vinhos engarrafados: 2,4 dicloroanisol, 2,6 dicloroanisol, 2,4,6 tricloroanisol e pentacloroanisol em amostras de rolha de cortiça. As condições experimentais foram otimizadas tanto para fibra comercial quanto para CF-SPME através de planejamento fatorial completo e matriz Doehlert. As melhores condições de extração usando CF foram: 10 min de tempo de incubação, 10 min de tempo de extração, temperaturas da amostra e da fibra de 130 e 10 °C, respectivamente. Para a fibra comercial avaliada (DVB/PDMS), as condições ótimas foram: 10 min de incubação, 75 min de tempo de extração à 85 °C, adição de 8 mL de água sobre 200 mg de amostra e agitação magnética de 500 rpm. Os limites de detecção do método utilizando fibra comercial foram cerca de uma ordem de grandeza superiores comparativamente ao método que utilizou CF-SPME (1,2 a 1,8 ng g<sup>-1</sup> contra 0,25 a 0,45 ng g<sup>-1</sup>), mais uma vez demonstrando uma melhora no poder de detecção do sistema internamente refrigerado sobre a fibra não-refrigerada comercial. Além dessa vantagem, deve-se destacar a diferença no tempo de extração entre os dois métodos (10 min para CF-SPME contra 75 min para SPME comercial). Essa diferença pode ser explicada com base nas equações 9 e 10. Com a temperatura da amostra em 130 °C, a taxa de evaporação dos analitos da matriz ( $k$  na eq. 10 e 11) para o *headspace* é alta. Assim, a constante de velocidade  $a$  pode ser definida pela equação 9, ou seja, com a etapa determinante da velocidade sendo a difusão dos analitos pelo recobrimento da fibra, e não pela taxa de evaporação desses da matriz. Como já discutido, quando essa situação ocorre, as extrações são mais rápidas, exatamente como obtido por Carasek e colaboradores<sup>14</sup>. Contrariamente, com a temperatura da amostra em 85 °C, provavelmente a etapa determinante da velocidade deve ser a evaporação dos analitos da matriz, fato que torna necessário um maior tempo de extração para que se atinja o equilíbrio.

Ghiasvand e colaboradores<sup>15</sup>, no ano de 2007, desenvolveram um método para determinação do perfil aromático de amostras de arroz. Nove amostras analisadas são variedades cultivadas e consumidas principalmente no Irã. Também foram analisadas duas amostras de arroz cultivadas na Índia e bastante consumidas na América do Norte, especialmente Canadá. Os autores basearam a otimização na maximização da área de quatro compostos selecionados: hexanal, D-limoneno, tetradecano e 2-acetil-1-pirrolina, sendo este último composto importante componente do aroma do arroz, persistente mesmo depois do cozimento e sua presença na amostra é desejável por conferir qualidade à mesma. As variáveis mais importantes otimizadas para o método utilizando fibra comercial foram: tipo de fibra, adição de água, tempo e temperatura de extração. As melhores condições obtidas foram: fibra CAR/DVB/PDMS, adição de 200 µL de água em 2 g de amostra e 30 minutos de extração à 60 °C. Com essas condições, os autores identificaram tentativamente cerca de 30 compostos em cada amostra analisada. Utilizando o sistema CF-SPME, as seguintes condições ótimas foram obtidas: temperatura da amostra de 100 °C, sem adição de água e 30 min de extração. Vale ressaltar que a temperatura da fibra não foi otimizada, sendo em todos os estudos fixada em 5 °C. Cerca de 50 compostos foram tentativamente identificados utilizando CF-SPME, demonstrando que o sistema de refrigeração da fibra torna o aparato mais eficiente comparado ao comercial.

Yong Chen e colaboradores<sup>16</sup>, no ano de 2007, analisaram amostras de xampu com o objetivo de quantificar compostos que são responsáveis pelo perfume e pelo *flavor* dessas amostras. Os compostos estudados foram divididos em dois grupos: (1) hexenal, acetato de butila, (E)-2-hexenal, acetato de isoamila, isobutirato de isobutila, acetato de hexila e acetato de heptila foram extraídos de soluções aquosas e (2) acetato de benzila, 3,7-dimetil-2,6-octadien-1-ol (geraniol) e ((±)-8,12-epoxi-13,14,15,16-tetranorlabdano (Cetalox<sup>®</sup>) foram extraídos de solução aquosa contendo 1% de xampu. O grupo (1) foi considerado responsável pelo *flavor* da amostra, e o grupo (2) pelo perfume. As condições ótimas para o grupo dos flavorizantes foram: extração por 20 min à 60 °C com a temperatura do recobrimento fixada em 1 °C, volume de 8 mL de amostra em frasco de 20 mL com agitação magnética. A temperatura máxima da amostra avaliada foi limitada a 60 °C para preservar a integridade dos analitos e da amostra. Já para fibra comercial de PDMS 100 µm, a extração foi realizada à 45 °C por 20 min, com agitação magnética, volume de amostra de 8 mL em frasco de

20 mL. Limites de detecção de 2 a 10 vezes menores foram obtidos com o sistema internamente refrigerado para o grupo dos aromatizantes. Para o grupo (2) utilizando CF-SPME, as condições otimizadas foram: volume de amostra de 50  $\mu\text{L}$  em frasco de 20 mL com agitação magnética, tempo e temperatura de extração de 45 min e 60  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente e a temperatura da fibra não foi estudada, sendo fixada em todo o trabalho em 1  $^{\circ}\text{C}$ . Com essas condições, a extração foi praticamente quantitativa, com recuperações de 83, 87 e 90% para Cetalex<sup>®</sup>, acetato de benzila e geraniol, respectivamente. Os limites de quantificação (para 50  $\mu\text{L}$  de amostra diluída a 1%) foram de 1 a 8  $\mu\text{g g}^{-1}$ . As condições para fibra comercial foram otimizadas em um trabalho posterior dos mesmo autores<sup>17</sup>, sendo: fibra de poliácrlato (PA 85  $\mu\text{m}$ ), tempo e temperatura de 45 min e 45  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente, 8 mL de amostra diluída a 0,01% em frasco de 20 mL saturada com NaCl e agitação magnética. Nessas condições, os limites de quantificação ficaram na faixa de 2 a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ . Embora nesse caso o melhoramento no poder de detecção do sistema CF-SPME não tenha ficado muito óbvio comparativamente ao sistema comercial, deve-se destacar as diferenças entre os volumes de amostra (50  $\mu\text{L}$  contra 8 mL) e o fator de diluição (1% contra 0,01%) empregado em cada caso, o uso de NaCl no caso do método com fibra comercial, e a facilidade no procedimento de calibração quando o método de preparo de amostra empregado funciona de maneira exaustiva.

CF-SPME foi utilizada por Haddadi e colaboradores<sup>18</sup> (2009) como ferramenta para estudar a cinética de dessorção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos de matrizes sólidas (solo e sedimento). Inicialmente os autores apresentam a cinética de sorção dos HPA presentes em fase gasosa pelo sistema de CF. Com a amostra à 150  $^{\circ}\text{C}$  e o recobrimento da fibra em 25  $^{\circ}\text{C}$ , os analitos foram extraídos quase exaustivamente (80% ou mais) da fase gasosa em apenas 5 minutos. Esse curto tempo de extração é previsto pela teoria, visto que a difusão pela matriz gasosa é rápida, e sendo a difusão pelo recobrimento a etapa lenta do processo, as velocidades de transferência de massa são altas (apenas 5 min para atingir o equilíbrio, neste caso). Sabendo-se o tempo de equilíbrio entre a fração dos compostos em fase gasosa e o recobrimento da fibra quando não há matriz (frasco vazio), o atraso na absorção dos analitos pela fibra quando a matriz está presente é responsabilizado pela dessorção lenta desses da matriz da amostra. O coeficiente angular do gráfico relacionando o logaritmo natural da fração dessorvida no tempo  $t$  em função do tempo de dessorção fornece

a constante de dessorção. Valores dessa constante foram obtidos em temperaturas na faixa de 90 a 180 °C, e, com isso, as energias de ativação aparente de dessorção puderam ser estimadas.

Outra aplicação físico-química do dispositivo de SPME internamente refrigerado foi realizada em 2009 por Sanchez-Prado e colaboradores<sup>19</sup>. Neste trabalho, hexaclorobenzeno foi inicialmente absorvido pelo recobrimento do sistema de CF a partir de 10 mL de solução 5 µg L<sup>-1</sup> contida em frasco de 22 mL. A temperatura da amostra foi de 100 °C, o tempo de extração foi de 45 min e a temperatura da fibra de 50 °C. Após esse período, o sistema foi retirado do frasco contendo a amostra, a temperatura do recobrimento foi ajustada para 0 °C, e o recobrimento foi exposto a irradiação na região do ultravioleta (254 nm) a uma potência de 16 W por diferentes tempos (0 a 20 min). Após o tempo de exposição à radiação, os compostos dissolvidos no recobrimento da fibra foram termicamente dessorvidos no injetor do cromatógrafo a gás e analisados. Os autores relatam a identificação de quatro compostos durante o intervalo estudado de fotodegradação: pentaclorobenzeno, dois isômeros do tetraclorobenzeno (1,2,3,5 e 1,2,4,5-tetraclorobenzenos) e pequenas quantidades de 1,3,5-triclorobenzeno. Em 20 min de irradiação, hexaclorobenzeno foi praticamente todo convertido. Baseado também em outros estudos da literatura, os autores sugerem que a principal rota de fotodegradação foi de descloração redutiva, seguida por uma sucessiva perda de átomos de cloro. Resultados similares foram obtidos em outros trabalhos quando a fotodegradação foi realizada em meio orgânico. O sistema de CF-SPME mostrou-se uma efetiva e conveniente ferramenta para estudar a cinética de fotodegradação, bem como a análise dos compostos formados, pois utiliza o próprio recobrimento da fibra como um meio orgânico para a reação e facilita a introdução dos produtos formados diretamente no cromatógrafo para separação e identificação.

Em 2009, Haddadi e colaboradores<sup>20</sup> desenvolveram um novo dispositivo de resfriamento do recobrimento, baseado em resfriamento termoelétrico. Um resfriador termoelétrico de três estágios (*TEC-thermoelectric cooler*) foi utilizado para resfriar um fio de cobre revestido com uma membrana tubular oca de PDMS. O suporte revestido de cobre foi montado em um sistema comercial de SPME e exposto à superfície resfriada do TEC, o qual fica inserido dentro de uma pequena caixa de alumínio. Um dissipador de calor e um pequeno ventilador foram utilizados para dissipar o calor na parte aquecida do TEC. Um termopar foi inserido na parte resfriada do dispositivo para

indiretamente medir a temperatura do recobrimento da fibra. Esse dispositivo foi então aplicado na determinação de três aldeídos que causam mau cheiro em amostras de arroz (hexanal, nonanal e undecanal). Diferentemente do que ocorre com o primeiro protótipo de CF, no qual o recobrimento é internamente refrigerado por CO<sub>2</sub> líquido e a temperatura do recobrimento é também internamente avaliada pelo termopar cimentado a aproximadamente 2 mm da ponta da fibra, o resfriamento do recobrimento nesse segundo protótipo ocorre por transferência de calor da parte quente da fibra (exposta à amostra aquecida) para a parte resfriada (exposta à parte resfriada do TEC). Desta maneira, há sempre um gradiente de temperatura no recobrimento, ou seja, a temperatura do recobrimento não é a mesma em todos os pontos. Para estimar a temperatura do recobrimento nesse caso, os autores propõem uma medida indireta, na qual eles relacionam a temperatura ajustada no dispositivo com a temperatura lida pelo termopar. Por exemplo, para uma temperatura ajustada de 0 °C no dispositivo, a temperatura lida pelo termopar foi de 13, 18, 24 e 28 °C para temperaturas da amostra de 40, 60, 80 e 100 °C, respectivamente. Perfis de quantidade extraída (em ng) contra temperatura de extração (50 a 110 °C) foram obtidos para fibra comercial de SPME (DVB/CAR/PDMS) e para o sistema proposto, em ambos os casos com 20 min de extração. Como temperatura ótima para a fibra comercial obteve-se 70 °C para hexanal e nonanal e 90 °C para undecanal. Já para o sistema TEC-SPME, a temperatura ótima foi de 110 °C para os três compostos. As quantidades extraídas nas condições ótimas em cada caso foram 12, 5 e 2 vezes maiores para hexanal, nonanal e undecanal, respectivamente, quando foi utilizado o sistema TEC-SPME (temperatura do recobrimento em torno de 20 °C quando a temperatura da amostra é de 100 °C) comparativamente ao uso de fibra comercial. Demonstrado que o sistema TEC-SPME é superior ao sistema comercial, perfis de extração no tempo foram realizados em temperaturas de 70 e 110 °C. Na temperatura de 70 °C, 30 min de extração foram requeridos para atingir o equilíbrio. Já em 110 °C, o equilíbrio foi alcançado em apenas 5 min de extração, indicando que a 110 °C os analitos estão mais fracamente adsorvidos pela matriz comparativamente a 70 °C. Uma amostra de arroz foi analisada pelo método proposto e também pelo método padrão de extração com solventes. Os resultados não foram estatisticamente diferentes, contudo, o método que utilizou TEC-SPME mostrou-se mais preciso, além de não utilizar solventes, ser mais rápido e simples.

Como já observado pelos resultados de trabalhos que utilizam resfriamento da fibra, há sempre uma melhora significativa no poder de detecção quanto mais volátil é o composto que está sendo extraído. Isso ocorre porque os compostos mais pesados já possuem um alto valor da constante de partição fibra-*headspace*  $K_{fhs}$ , e são extraídos mesmo quando a fibra não é refrigerada. Já para os compostos mais voláteis, a constante  $K_{fhs}$  é baixa, e a diminuição da temperatura do recobrimento aumenta significativamente o valor dessa constante (como indicado pela Eq. 18), o que resulta em uma maior quantidade extraída em relação à fibra não refrigerada. Outra consideração que deve ser feita é em relação à cinética de sorção dos analitos do *headspace* para o recobrimento. A eq. 7 mostra claramente que a diminuição da temperatura do recobrimento pode afetar significativamente a difusão dos analitos pela fibra, especialmente os analitos menos voláteis, pois esses são geralmente mais pesados e com maior raio molecular. Desta maneira, para atingir um compromisso entre cinética e termodinâmica da extração principalmente para os compostos mais pesados, dever-se-ia estudar cuidadosamente a temperatura do recobrimento da fibra, de maneira a maximizar a quantidade extraída, mas não prejudicar a cinética de sorção. A temperatura do recobrimento só foi estudada até então nos trabalhos de Carasek e colaboradores<sup>13,14</sup> já comentados previamente e foi também objeto de estudo do presente trabalho.

Outro procedimento visando refrigerar o recobrimento da fibra e simultaneamente aquecer a amostra foi demonstrado por Chia e colaboradores<sup>21</sup> em 2004 para determinação de policlorodibenzo-p-dioxinas e policlorodibenzofuranos em amostras de solo. Neste trabalho, os autores apresentam um dispositivo bastante simples, que consiste em refrigerar a parte superior do *headspace* externamente através de um fluxo de etanol refrigerado. Um termopar foi colocado próximo à fibra no *headspace* para monitoramento da temperatura. A extração foi realizada em frasco de 8 mL contendo 500 mg de amostra de solo contaminado com os analitos, 1 mL de água, temperatura da amostra de 85 °C, agitação ultrassônica, tempo de extração de 60 min e fibra de PDMS 100  $\mu\text{m}$ . A temperatura do *headspace* foi, segundo os autores, de 4 °C. Foi realizada uma comparação do sistema com e sem circulação do fluido refrigerante, sendo que foi obtida uma melhora de 2 a 22 vezes utilizando o sistema refrigerado, dependendo do composto.

De um modo geral, os trabalhos desenvolvidos até o momento com CF-SPME demonstram que: i) a temperatura da fibra é um parâmetro importante a ser estudado, contudo, em grande parte dos



trabalhos, ela foi fixada em uma temperatura mais baixa possível baseando-se apenas na termodinâmica do processo. Entretanto, esta variável também influencia na cinética, como já discutido no texto. ii) no caso de matrizes complexas, o uso de água como modificador da amostra leva a melhoras na quantidade extraída, mas por outro lado também leva a deterioração nos resultados devido aos freqüentes vazamentos.

Esta Tese, portanto, tem como objetivo proporcionar duas novas estratégias de otimização usando a técnica de CF-SPME nas quais estes dois problemas sejam contornados. No primeiro caso, propôs-se um método no qual foram utilizadas duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento, visando proporcionar uma condição facilitada de difusão de compostos com tamanhos distintos pela fase extratora em um único procedimento. No segundo caso, de maneira a minimizar vazamentos e tomar vantagem do uso de água como extrator, estudou-se criteriosamente a quantidade de água adicionada ao sistema com temperatura da amostra fixa (90 °C). Também como novidade metodológica nesta parte do trabalho, foi proposta o uso de dois modos de extração no mesmo procedimento, aumentando significativamente a velocidade de extração dos compostos mais pesados da mistura analisada. Já na terceira parte deste trabalho, utilizou-se fibra comercial de SPME para extração da fração volátil de matrizes vegetais, modificando desta vez não a temperatura do recobrimento como na primeira parte do trabalho, mas a temperatura de extração, maximizando desta forma a extração de compostos com volatilidades distintas.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Esta tese tem como objetivo geral propor três novas abordagens de otimização, sendo duas para a técnica de CF-SPME, e a outra para a técnica de SPME não refrigerada (comercialmente disponível). Estas novas abordagens de otimização tem como objetivo melhorar o desempenho das referidas técnicas em relação à quantidade extraída e ao tempo total de extração comparativamente aos procedimentos convencionalmente adotados. Pelo melhor do nosso conhecimento, todas as estratégias de otimização apresentadas nesta Tese não constam na literatura especializada até o presente momento, representando assim novidades metodológicas no campo da Química Analítica voltada ao preparo de amostras.

### 2.2. Objetivos específicos

1) Desenvolver uma nova metodologia de extração de EF e HPA a partir do *headspace* utilizando CF-SPME, estudando criteriosamente as variáveis temperatura da fibra e tempo de extração. Este trabalho também tem como objetivo propor a modificação da temperatura do recobrimento no mesmo procedimento de extração, de maneira a maximizar a quantidade extraída de compostos com volatilidades distintas e simultaneamente minimizar o tempo total de extração.

2) Desenvolver uma nova metodologia de extração de HPA e EF de amostras de solo utilizando CF-SPME, com auxílio de água em excesso para auxiliar na dessorção dos analitos da matriz, mas com minimização da perda desses por vazamento pela utilização de temperatura de extração intermediária. Este trabalho objetiva propor a utilização dos modos de extração direta e a partir do *headspace* da suspensão formada no mesmo procedimento de extração de maneira a extrair os compostos menos voláteis no modo direto e os voláteis através do *headspace*. Otimizar variáveis como temperatura do recobrimento, tempo de extração em cada modo, adição de NaCl, adição de água e pH da suspensão, além de comparar o método proposto otimizado com a

abordagem usual da CF-SPME também são objetivos dessa parte do trabalho.

3) Desenvolver um método de extração de compostos voláteis das matrizes café, maracujá, manga, banana e pitanga utilizando o dispositivo comercial de SPME (especificamente a fibra CAR/DVB/PDMS), focalizando a otimização nas variáveis tempo e temperatura de extração. O estudo com fibra comercial também tem como objetivo avaliar a utilização de duas temperaturas de extração no mesmo procedimento, de maneira a maximizar a quantidade extraída de compostos com volatilidades bastante diferentes. Comparar a eficiência entre os métodos convencional da SPME com uma única temperatura de extração e o método proposto baseado em duas temperaturas de extração também são objetivos desse trabalho.

Os resultados obtidos nesta Tese serão apresentados em três partes, sendo que cada parte contém uma pequena introdução, parte experimental, resultados e discussão e conclusões parciais. Ao final das três partes são apresentadas as considerações finais e as perspectivas futuras.

### 3. Capítulo 1

#### **Uma nova abordagem para otimização de SPME internamente refrigerada para amostragem em fase gasosa: uso de diferentes temperaturas do recobrimento durante um único procedimento de extração**

A eficiência do sistema internamente refrigerado tem sido demonstrada pelos trabalhos publicados até o presente momento, eficiência esta destacada especialmente quando comparada com o sistema comercialmente disponível não refrigerado. Contudo, observa-se que uma importante variável - a temperatura do recobrimento - foi alvo de estudo em somente dois trabalhos, para análise do perfil aromático de frutas<sup>13</sup> e de *off-flavours* em amostras de rolha de cortiça<sup>14</sup>, ou seja, compostos voláteis. Em ambos os casos, uma baixa temperatura do recobrimento (0 e 10 °C) foi a condição de melhor resposta, provavelmente por se tratar de compostos voláteis. Já no trabalho de Ghiasvand e colaboradores<sup>12</sup>, para determinação de HPA em amostras de solo, observou-se que para dois compostos mais pesados da classe estudada foi necessário um tempo de extração bastante longo (180 min) para que o equilíbrio fosse atingido. Esse fato pode ter ocorrido por dois motivos: temperatura da amostra baixa, baixa temperatura do recobrimento, ou ambos. Uma baixa temperatura da amostra torna mais lenta a dessorção/evaporação dos analitos da matriz, fazendo com que essa seja a etapa lenta do processo. Contudo, os resultados demonstrados pelos autores indicam que uma temperatura maior do que a utilizada (150 °C) não leva a melhora na quantidade extraída. Sendo assim, essa hipótese fica descartada, e assume-se que a etapa lenta do processo foi a difusão desses compostos pelo recobrimento. No referido trabalho, a temperatura do recobrimento foi fixada em todos os experimentos em 5 °C. O efeito da temperatura do recobrimento na termodinâmica e cinética do processo de extração já foi demonstrada no texto, nas equações 18 e 7, respectivamente. Na eq. 7, observa-se que o coeficiente de difusão  $D$  decresce com o decréscimo da temperatura absoluta  $T$  e com o aumento da viscosidade do meio (o qual também usualmente aumenta com a diminuição de  $T$ ). Desta maneira, especialmente para compostos pesados, a difusão desses pelo recobrimento pode ser dificultada caso a temperatura do recobrimento não seja cuidadosamente selecionada de maneira empírica. Assim,

sugere-se que o longo tempo de extração de 180 min necessário para extração de fluoreno e pireno de amostras de sedimento pode ter sido necessário pela dificuldade de difusão desses pela fibra devido à sua baixa temperatura.

A conclusão acima aliada à necessidade de extração de compostos com diferentes volatilidades em um menor tempo possível foram os fatos que motivaram estudar mais detalhadamente a temperatura do recobrimento, o que deu origem ao estudo abaixo detalhado.

## **Parte experimental**

### **Reagentes e materiais**

Solução estoque de dezoito HPA incluindo 1-metilnaftaleno, antraceno, fluoranteno, naftaleno, acenafteno, benzo(a)antraceno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, criseno, acenaftileno, pireno, benzo(ghi)perileno, fluoreno, fenantreno, dibenz(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno e 2-metilnaftaleno foi obtida da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) na concentração de 2000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em benzeno: diclorometano 50:50. Esta solução foi diluída a 1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$  com a mesma mistura de solventes. Solução padrão contendo ftalato de dimetila, ftalato de dietila, ftalato de dibutila, ftalato de butil e benzila, ftalato de di(2-etilhexila) e adipato de di(2-etilhexila) foi obtida da Supelco a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol. O dispositivo de CF-SPME, controlador de temperatura e válvula solenóide utilizados em todos os trabalhos está descrita na parte introdutória da Tese. Membrana oca de PDMS com 178  $\mu\text{m}$  de espessura e 1 cm de comprimento foi utilizada como fase extratora. Dióxido de carbono líquido foi utilizado para resfriar o recobrimento.

### **Procedimento experimental e estratégia de otimização**

Para ambas as classes estudadas (HPA e EF), a otimização foi realizada pela transferência de 400 ng de cada composto para frascos vazios de 15 mL para SPME (Supelco). Em todos os casos, a temperatura das amostras foi controlada por meio de um bloco

aquecedor (faixa operacional a partir da temperatura ambiente até 200°C) especialmente desenvolvido para este trabalho (Dist, Florianópolis, Brasil). Uma foto deste bloco aquecedor pode ser encontrada na parte introdutória da Tese, na Figura 3. Incubação e estabilização da temperatura das amostras foram mantidas constantes em 10 minutos 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 minutos em modo sem divisão de fluxo (*splitless*). Utilizou-se um *liner* (inserção de vidro) para injeção de líquido no modo *splitless* com pequena quantidade de lã de vidro. Nenhum efeito de memória foi observado.

A estratégia de otimização consistiu em três etapas. A primeira consistiu da obtenção de um perfil de temperatura de extração utilizando fibra comercial de PDMS 100 µm. A temperatura na qual o composto menos volátil ainda pode ser detectado foi selecionada. Na segunda etapa realizou-se a otimização simultânea do tempo de extração e da temperatura do recobrimento. Com esses dados, construiu-se superfícies de resposta para cada um dos compostos, e duas temperaturas de recobrimento foram selecionadas para serem utilizadas na terceira etapa. O último procedimento de otimização consistiu em otimizar o tempo total de extração e a fração deste tempo no qual o recobrimento deve ser resfriado na temperatura mais baixa escolhida na etapa anterior. Nesta 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 CF durante todo o trabalho.

## **Instrumentação**

Análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás da Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com injetor do tipo *split-splitless* e detector por ionização em chama (FID). Nitrogênio ultrapuro foi utilizado como gás de arraste e auxiliar a uma vazão de 1,2 e 40 mL

$\text{min}^{-1}$ , respectivamente. O programa de temperatura do forno da coluna para separação dos ésteres de ftalato foi:  $80^{\circ}\text{C}$  (1 min), aumentada a  $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$  até  $300^{\circ}\text{C}$  (1 min). Para separação dos HPA's, o forno foi inicialmente mantido a  $80^{\circ}\text{C}$  por 1 min, seguido de aquecimento até  $320^{\circ}\text{C}$  a uma taxa de  $8^{\circ}\text{C min}^{-1}$ , sendo essa temperatura final mantida por 10 min. Para as duas classes avaliadas, a separação foi realizada em uma coluna capilar de polidimetilsiloxano com 5% de grupos fenila (OV-5, obtida da OV Specialty Chemical com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura de filme). Fibra comercial de PDMS 100  $\mu\text{m}$  foi obtida da Supelco.

## Resultados e Discussão

### Temperatura da amostra

A temperatura da amostra é um parâmetro importante que influencia a dessorção dos analitos da matriz para o *headspace*, especialmente no caso de compostos mais pesados/semi-voláteis, e também influencia a difusão dos analitos através do recobrimento no caso deste não ser refrigerado. Para este estudo, a temperatura da amostra foi escolhida a partir de uma estratégia de otimização univariada. O perfil de temperatura otimizado de extração ( $60\text{-}160^{\circ}\text{C}$ ) durante uma extração de 30 min obtidos para PEs com a fibra comercial de PDMS 100  $\mu\text{m}$  mostraram uma rápida diminuição na quantidade extraída de compostos que podem ser facilmente volatilizados, DMP, DEP e DnBP com o aumento da temperatura da amostra. Por outro lado, para os semi-voláteis mais pesados (BBP, DEHA e DEHP), o perfil de temperatura de extração atingiu um valor máximo antes da queda do sinal analítico. Esta observação indica que, mesmo em temperaturas elevadas da amostra (e também do recobrimento da fibra), os compostos mais pesados podem ser extraídos devido ao seu elevado coeficiente de partição com PDMS. O mesmo estudo do perfil de temperatura de extração ( $50\text{-}180^{\circ}\text{C}$ ) utilizando 50 min de extração foi aplicado para os HPA, sendo escolhida uma temperatura de  $160^{\circ}\text{C}$  para HPA e  $140^{\circ}\text{C}$  para os EF.

## Otimização multivariada do tempo de extração e temperatura da fibra

A importância de otimizar o tempo de extração e a temperatura da fibra deve-se ao fato de que a quantidade de analito extraída depende fortemente da temperatura do recobrimento da fibra, o qual, por sua vez, afeta o coeficiente de partição do analito com o *headspace*, tal como sugerido pela Eq. 18. A temperatura do recobrimento também afeta a difusibilidade dos analitos pelo mesmo, podendo afetar a velocidade de extração, como sugerido pela Eq. 7. A Figura 4 mostra as superfícies de resposta obtidas para DMP e DEHP representando os EF e fluoreno e benzo (k)fluoranteno como compostos representativos do comportamento para a série dos HPA.

Para os compostos mais voláteis, como DMP e fluoreno, a resposta foi melhorada com a diminuição da temperatura da fibra, comportamento que está de acordo com a Eq. 18, ou seja, uma grande diferença de temperatura entre a fibra e a amostra leva a um aumento dos coeficientes de partição dos analitos entre o recobrimento e o *headspace*. Para os analitos mais leves de cada classe, o equilíbrio foi alcançado em 5 e 20 minutos (EF e HPA, respectivamente) com uma temperatura da fibra de 10 °C para o EF e 5 °C para os HPA, respectivamente. No entanto, a superfície de resposta para o semi-volátil DEHP (Fig. 4) em relação à temperatura da fibra foi bastante diferente em relação ao DMP. Isso se deveu ao fato de que uma maior temperatura da fibra (140 °C) favoreceu a extração desse analito.



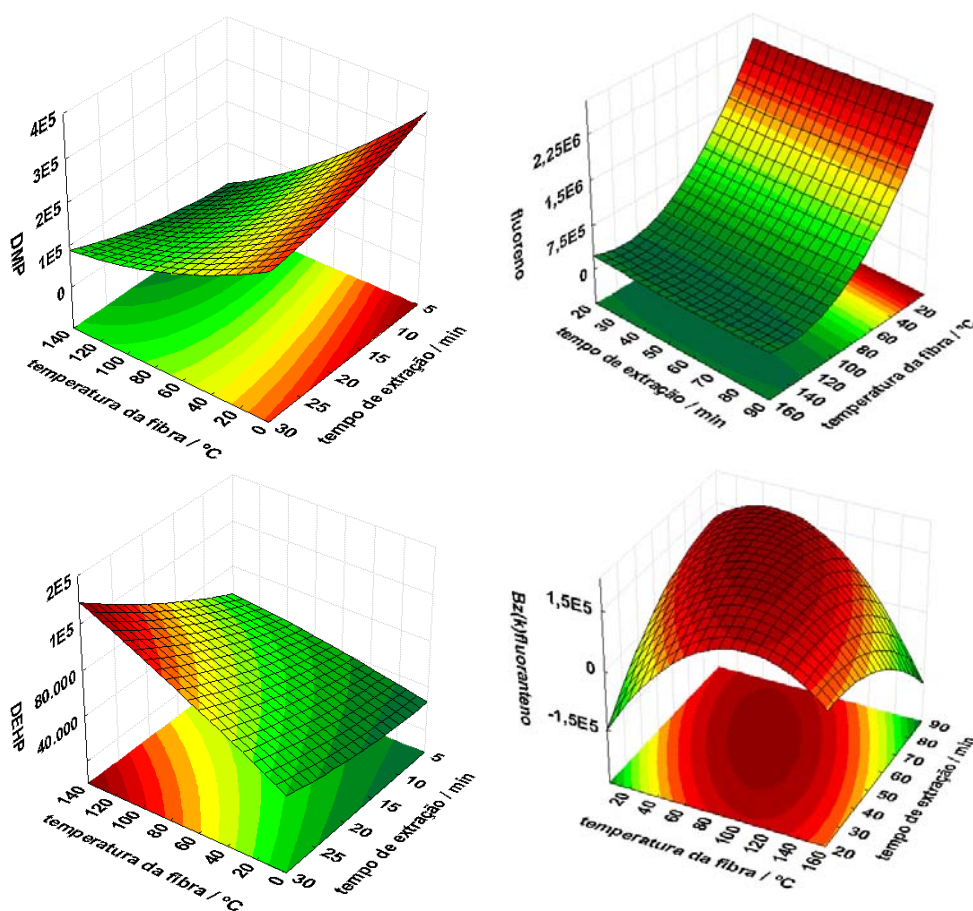


Figura 4. Superfícies de resposta de compostos representativos para cada classe obtidas pela otimização do tempo de extração e temperatura da fibra. Temperatura da amostra fixada em 160 e 140 °C para HPA e EF, respectivamente.

Além disso, a velocidade de extração também foi melhorada a uma temperatura alta da fibra de 140 °C, em comparação a 10 °C. Resposta semelhante foi observada para o benzo(k)fluoranteno, onde uma temperatura da fibra relativamente elevada resultou em uma maior quantidade extraída com menor tempo de equilíbrio. Os resultados para a temperatura ótima da fibra para cada analito estudado são apresentados na Tabela 1. O comportamento contrastante destes compostos em relação à temperatura da fibra sugere que a difusão dos compostos pela fibra é a etapa limitante do processo de transferência de massa. Através desse comportamento, sugere-se que há dificuldade de difusão dos analitos mais pesados através do revestimento em temperaturas muito baixas e, portanto, esses podem ser extraídos

preferencialmente por condensação sobre a superfície do PDMS e em menor extensão por processo de absorção. Para comprovar esta afirmação, foram realizados experimentos para verificar se, especialmente para os analitos mais pesados, o recobrimento de PDMS pode mudar suas características de extração em baixas temperaturas.

Tabela 1. Faixa de temperatura ótima da fibra para cada analito estudado. Temperatura de extração de 140 e 160 °C para EF e HPA, respectivamente.

<b>Analitos<sup>a</sup></b>	<b>Temperatura ótima da fibra /°C</b>
Naftaleno	<5
1-metilnaftaleno	<5
2-metilnaftaleno	<5
Acenafteno	<5
Acenaftileno	<5
Fluoreno	<5
Fenantreno	<5
Antraceno	<5
Fluoranteno	25-35
Pireno	30-40
benzo(a)antraceno/criseno <sup>b</sup>	55-65
Benzo(b)fluoranteno/benzo(k)fluoranteno <sup>b</sup>	75-85
Benzo(a)pireno	65-75
Indeno(1,2,3-cd)pireno/dibenz(a,h)antraceno <sup>b</sup>	70-90
Benzo(ghi)perileno	80-100
Ftalato de dimetila	10-15
Ftalato de dietila	10-20
Ftalato de n-butila	45-65
Ftalato de butil e benzila	100-120
Adipato de bis (2-etilexila)	80-100
Ftalato de bis(2-etilexila)	>140

<sup>a</sup> A ordem dos compostos na tabela é a ordem de eluição no sistema cromatográfico para cada classe.

<sup>b</sup>Estes compostos co-eluem, e, portanto, foram analisados como a soma de suas áreas de pico.

Os EF foram utilizados como compostos modelo e extrações foram realizadas com e sem a membrana de PDMS sobre o suporte de aço inoxidável que serve como êmbolo da seringa (ver Figura 1). Todos

os experimentos foram realizados em uma temperatura da fibra de 10 °C nesse estudo. Além disso, experimentos usando o mesmo conjunto de compostos com o dispositivo de CF com PDMS foram realizadas, mas com a temperatura da fibra ótima para cada composto.

Os experimentos foram realizados para demonstrar a importância da utilização de uma alta temperatura da fibra, a qual é necessária para a extração eficiente dos compostos semi-voláteis. Os resultados são apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Comparação do desempenho do dispositivo de CF-SPME em baixa temperatura com e sem o recobrimento de PDMS. O tempo de extração e a temperatura da fibra foram fixados em 30 min e 10 °C, respectivamente. As áreas de pico foram ajustadas como 100 para CF com PDMS a 10 °C. Todos os valores de RSD (n=6) foram menores de 10%.

<b>Compostos</b>	<b>CF com PDMS a 10°C</b>	<b>CF sem PDMS a 10°C</b>	<b>CF com PDMS a T<sub>f</sub> ótima</b>
DMP	100,00	18,85	100,00 (T <sub>f</sub> = 10-15°C)
DEP	100,00	32,14	100,00 (T <sub>f</sub> = 10-20°C)
DnBP	100,00	43,68	120,00 (T <sub>f</sub> = 45-65°C)
BBP	100,00	58,75	175,13 (T <sub>f</sub> = 100-120°C)
DEHA	100,00	81,34	266,52 (T <sub>f</sub> = 80-100°C)
DEHP	100,00	99,92	384,32 (T <sub>f</sub> = 135-140°C)

Pode-se observar na Tabela 2 que a CF-SPME com PDMS a 10 °C apresentou melhores resultados para todos os compostos em relação à CF sem PDMS (somente o suporte de aço inoxidável) também a 10 °C. No entanto, no caso do material de aço inoxidável, onde o mecanismo de extração, obviamente, não foi devido a um processo de absorção, mas somente adsorção, observou-se uma tendência de aumento de eficiência de extração com o aumento da massa molar dos analitos. Por exemplo, a eficiência de extração para o DEHP (composto de elevada massa molar), com e sem o revestimento de PDMS não foi estatisticamente diferente na temperatura da fibra de 10 °C. Esta observação sugere que as propriedades de extração do recobrimento foram semelhantes tanto com o PDMS quanto o aço inoxidável ambos

em temperatura baixa. Portanto, em um método CF-SPME convencional, onde a temperatura do recobrimento é mantida baixa e constante durante todo o processo de extração, é possível que a fibra de PDMS possa estar atuando como um material rígido, embora ainda esteja acima da temperatura de transição vítrea. Esta mudança de propriedade do PDMS leva a um aumento na viscosidade do polímero, que por sua vez, afeta a difusão dos analitos através do recobrimento.

O resultado final é que a eficiência de extração do PDMS será diminuída para os semi-voláteis em baixa temperatura, mas será melhorada para os mais voláteis conforme sua temperatura for reduzida (Tabela 2). Desta forma, é conveniente usar uma temperatura mais elevada da fibra para a extração dos analitos mais pesados (semi-voláteis) pois há uma melhora na difusão destes através do revestimento.

Isto implica que, para melhorar a eficiência de extração para todos os analitos, é importante determinar uma adequada temperatura inicial da fibra, especialmente para os compostos mais pesados, de modo a melhorar a sua difusão através do PDMS durante a extração, em vez de manter uma temperatura constante em um valor baixo durante todo período de extração. Ao selecionar uma adequada temperatura inicial da fibra, as prováveis perdas que podem ocorrer em temperaturas mais baixas devido à pobre difusão dos analitos podem ser minimizadas ou mesmo evitadas para a maioria dos semi-voláteis.

### **Otimização multivariada do tempo de extração total e fração do tempo total para resfriamento do recobrimento**

Pela Tabela 1, pode-se observar que em geral as temperaturas ótimas para extração dos analitos mais voláteis foram baixas, enquanto que para os semi-voláteis foram mais altas, como esperado. Portanto, para os compostos selecionados neste estudo, uma temperatura da fibra inicial de 140 °C e 60 °C foi escolhida para EF e HPA, respectivamente. Devido às diferentes temperaturas da fibra necessárias para diferentes analitos, além da temperatura superior, uma temperatura inferior da fibra também foi escolhida para aumentar a eficiência de extração dos mais voláteis. No caso do EF a temperatura mais baixa foi fixada em 10 °C, enquanto que para os HPA foi de 5 °C como condições otimizadas de temperatura baixa da fibra.

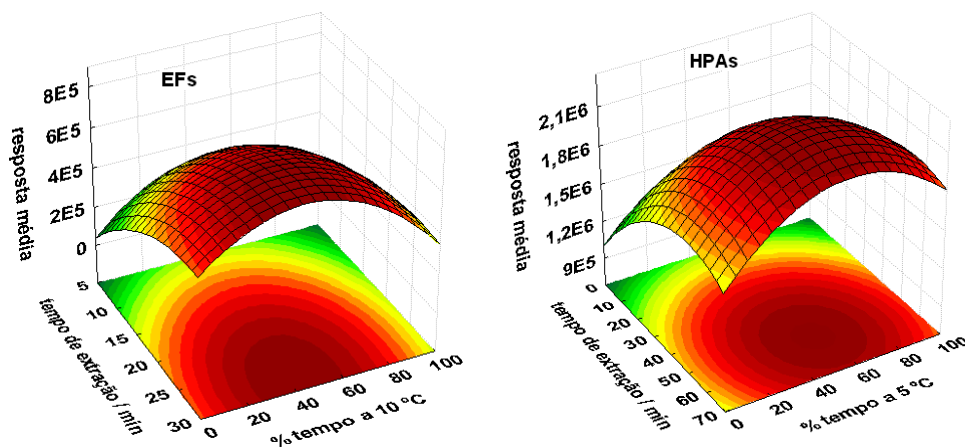


Figura 5. Superfícies de resposta compromisso para todos os compostos obtidas pela otimização do tempo total de extração e fração deste tempo em que o recobrimento foi resfriado a 10 °C para EF e a 5 °C para HPA. Temperatura da amostra fixada em 160 e 140 °C para HPA e EF, respectivamente.

De maneira a melhorar a eficiência da extração, a fração do tempo total de extração em que o recobrimento deve ser resfriado na temperatura inferior seleccionada foi investigada. Detalhes dos resultados são mostrados na Fig. 3, na qual a superfície de resposta do tempo de extração total e fração do tempo total em que a temperatura do recobrimento permaneceu na temperatura mais baixa seleccionada foram monitorados. Neste estudo, um compromisso entre os compostos foi obtida por meio da resposta média calculada como a média geométrica de todas as áreas de pico.

Como resultado para os EF, obteve-se um tempo de extração de 23 min à 140 °C devido aos compostos dessa classe com menores volatilidades. Este foi seguido por um menor tempo de extração de 7 minutos a uma temperatura da fibra inferior de 10 °C. O tempo usado para a segunda parte da extração foi mantido em 7 min, pois maiores tempos de extração com a temperatura da fibra em 10 °C não melhoram a eficiência de extração dos compostos mais pesados, uma vez que o recobrimento se torna mais viscoso. O tempo de extração total otimizado foi, portanto, de 30 min. Por outro lado, o tempo de extração ótimo para os HPA na temperatura mais alta do recobrimento (60 °C) foi atribuído como 20 minutos, sendo este período seguido por mais 20 minutos de extração com a temperatura da fibra em 5 °C. As diferentes combinações otimizadas de tempos de extração e temperaturas de recobrimento obtidas para cada uma das classes é resultado de uma combinação da volatilidade dos analitos, da quantidade relativa de

voláteis e semi-voláteis dentro da mesma classe, da facilidade de difusão dos diferentes analitos pelo recobrimento e dos valores dos coeficientes de partição que cada analito possui com o revestimento de PDMS.

### **Estudo comparativo entre as abordagens de otimização multivariada e convencionais da CF-SPME**

A fim de demonstrar a vantagem da nova estratégia de otimização multivariada da CF-SPME como um potencial método analítico alternativo em relação ao método convencional univariado, os resultados de suas eficiências de extração foram comparadas. A Figura 5 apresenta as eficiências de extração para EF usando a estratégia de otimização proposta multivariada, o método convencional univariada e um método utilizando SPME (CF sem resfriamento do recobrimento). De maneira geral, a abordagem proposta multivariada levou a uma maior eficiência de extração para todos os analitos estudados em relação aos outros dois métodos. Observa-se também que em temperaturas mais elevadas, o método de SPME regular (30 min de extração a 140 °C sem resfriamento do recobrimento) e o método proposto multivariado (23 min de extração com a fibra a 140 °C seguido por 7 min com a fibra a 10 °C) efetivamente extrai maior quantidade de semi-voláteis. Vale notar que a diminuição da temperatura da fibra de 140 para 10 °C não resultou em nenhuma perda de analitos. Isso ocorre porque a diminuição na temperatura resulta apenas no aprisionamento dos analitos extraídos na fase extratora de PDMS. No entanto, os voláteis são extraídos em baixas quantidades em temperaturas relativamente altas do recobrimento devido à diminuição dos seus coeficientes de sua partição com PDMS. Por outro lado, em temperaturas mais baixas, todos os compostos voláteis foram efetivamente extraídos. Novamente a abordagem proposta multivariada demonstrou uma vantagem significativa, uma vez que integra no mesmo procedimento condições favoráveis para que compostos com diferentes volatilidades possam ser extraídos eficientemente pelo recobrimento de PDMS.

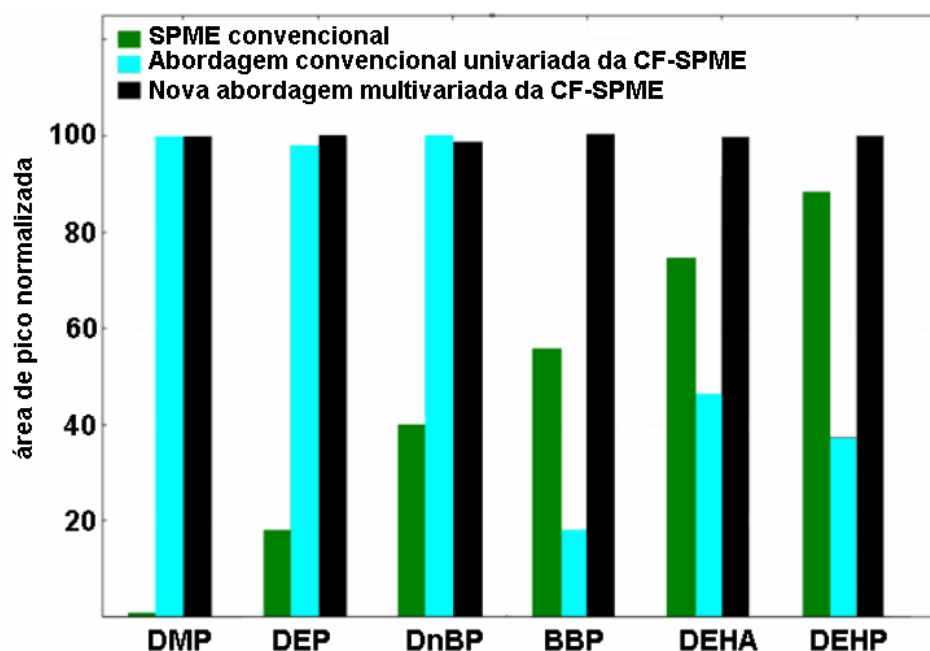


Figura 6. Comparação da eficiência de extração entre os procedimentos utilizando SPME convencional (sem refrigeração do recobrimento), abordagem convencional univariada (temperatura do recobrimento fixada em 10 °C durante todo tempo de extração) e o procedimento proposto neste trabalho baseado em duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento.

Um padrão similar é observado para extração dos HPA conforme indicado na Figura 7, onde a comparação da eficiência de extração do método proposto multivariado é estabelecida com o da abordagem convencional univariado. O método convencional univariado (com a temperatura do recobrimento a 5 °C durante toda a extração) mostrou eficiência de extração relativamente pobre para o semi-voláteis, devido à possível mudança nas características de extração de revestimento.

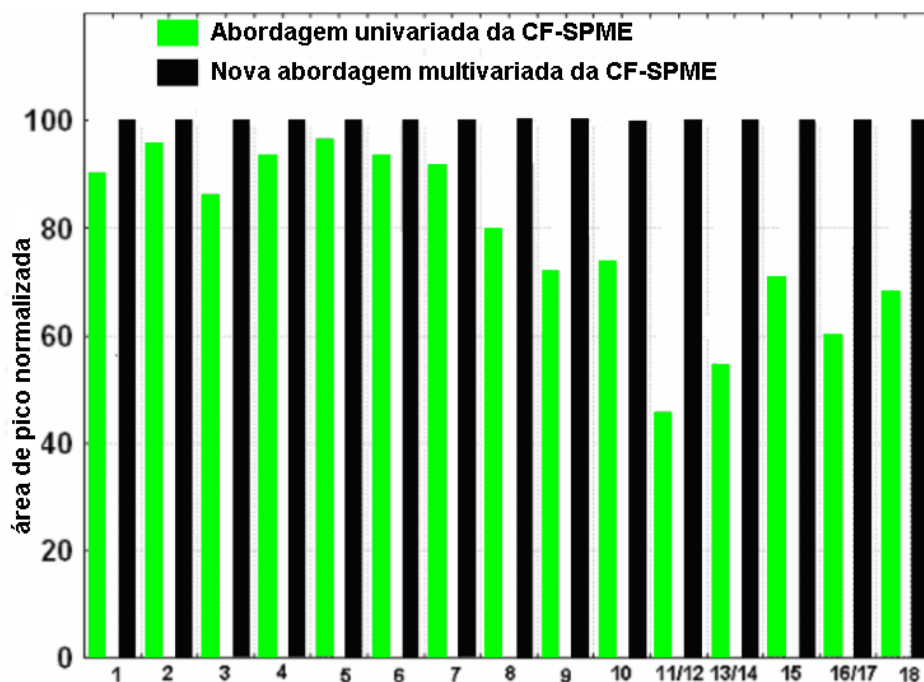


Figura 7. Comparação da eficiência de extração entre os procedimentos utilizando abordagem convencional univariada (temperatura do recobrimento fixada em 5 °C durante todo tempo de extração) e o procedimento proposto neste trabalho baseado em duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento.

Isso ocorre porque a temperaturas mais baixas o revestimento tem sua viscosidade aumentada e, portanto, dificulta a difusão efetiva dos semi-voláteis devido ao seus maiores tamanhos moleculares. No entanto, com o novo método proposto, a combinação de 20 min de extração com a temperatura inicial do recobrimento a 60 °C permitiu uma extração efetiva dos semi-voláteis antes do abaixamento da temperatura da fibra para extração mais efetiva dos voláteis.



## Parâmetros analíticos e aplicação

Os principais parâmetros analíticos foram obtidos utilizando as condições otimizadas baseadas em duas temperaturas da fibra para EF e HPA usando CF-SPME. Os resultados estão dispostos na Tabela 3.

As curvas de calibração (em massa) foram lineares de 5 até pelo menos 700 ng para os EF e de 4 a 1000 ng dependendo do HPA. Os limites de detecção foram estimados como três vezes a relação sinal/ruído, sendo obtidos satisfatórios valores, especialmente se for levado em consideração a instrumentação utilizada.

Tabela 3. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de EF e HPA de amostras gasosas através da nova abordagem proposta nesse trabalho.

<b>Analitos</b>	<b>LD (ng)</b>	<b>Faixa linear (ng)</b>	<b>R</b>	<b>RSD<sup>b</sup>%</b>
Naftaleno	5	20-1000	0,9967	8
1-metilnaftaleno	4	15-1000	0,9986	8
2-metilnaftaleno	4	15-1000	0,9983	7
Acenafteno	4	15-1000	0,9948	10
Acenaftileno	4	10-1000	0,9939	14
Fluoreno	4	15-1000	0,9972	13
Fenantreno	4	15-1000	0,9969	12
Antraceno	8	20-1000	0,9986	7
Fluoranteno	5	15-1000	0,9979	9
Pireno	5	15-1000	0,9966	8
benzo(a)antraceno/criseno <sup>a</sup>	13	40-1000	0,9990	7
Benzo(b)fluoranteno/benzo(k)fluoranteno <sup>a</sup>	17	50-1000	0,9949	12
Benzo(a)pireno	23	70-1000	0,9918	15
Indeno(1,2,3-cd)pireno/dibenz(a,h)antraceno <sup>a</sup>	48	150-1000	0,9904	16
Benzo(ghi)perileno	72	200-1000	0,9941	13
Ftalato de dimetila	5	15-700	0,9956	15
Ftalato de dietila	2	7-700	0,9978	7
Ftalato de n-butila	2	5-700	0,9988	7
Ftalato de butil e benzila	3	10-700	0,9980	9
Adipato de bis (2-etilexila)	2	5-700	0,9998	7
Ftalato de bis(2-etilexila)	2	7-700	0,9993	8

<sup>a</sup> Esses compostos coeluem, portanto, foram analisados como a soma de suas áreas de pico. <sup>b</sup> RSD obtido para n=5.

Deve ser mencionado que se limites de detecção mais baixos precisem ser alcançados, este parâmetro pode ser melhorado através do uso de uma instrumentação mais sensível, como GC acoplada a espectrometria de massas, especialmente no modo de monitoramento de íons seleccionados (SIM). A precisão do método também foi avaliada e os desvios padrão relativo variaram de 7 a 15% para os EF e de 7 a 16% para os HPA. A potencialidade do método desenvolvido para determinação de HPA foi testada por meio da extração destes compostos em amostras de arroz enriquecida com os analitos. De maneira a determinar a recuperação absoluta, o procedimento de extração foi realizado duas vezes sobre a mesma amostra. Considerando que o frasco de extração permanece bem fechado entre uma extração e outra, a fração dos analitos recuperados da amostra também permanece constante.

Se essa fração é estatisticamente superior ao erro experimental (na prática, acima de 10% de recuperação absoluta), extrações múltiplas do *headspace* podem ser matematicamente tratadas como uma progressão geométrica (PG), onde a razão da PG pode ser calculada dividindo-se a massa extraída da segunda extração ( $A_2$ ) pela massa de analito extraída da primeira extração ( $A_1$ ), de acordo com a Eq. 19:

$$\beta = \frac{A_2}{A_1}$$

(19)

A soma de todos os termos da PG ( $A_1 + A_2 + A_3 + \dots + A_\infty = A_T$ ) fornece a massa total do analito presente na amostra. A soma dos infinitos termos dessa PG ( $A_T$ ) com  $\beta$  entre 0 e 1 pode ser calculada como mostra a Eq. 20:

$$A_T = \frac{A_1}{(1 - \beta)} \quad (20)$$

Rearranjando as Eq. 19 e Eq. 20,  $A_T$  pode ser estimada a partir de  $A_1$  e  $A_2$ , como sugere a Eq. 21:

$$A_T = \frac{A_1^2}{(A_1 - A_2)} \quad (21)$$

Assim, a recuperação absoluta R da primeira extração pode ser estimada através da Eq. 22:

$$R = \frac{A_1}{A_T} \quad (22)$$

Caso a recuperação da primeira extração não seja satisfatória, uma melhor estimativa da recuperação a partir de duas extrações sucessivas da mesma amostra pode ser realizada através da comparação de  $A_T$  (obtida da Eq. 21) com a área do pico obtido por injeção direta ou extração exaustiva de uma quantidade conhecida do analito.

Tabela 4. Concentração determinada, estimativas de recuperação da primeira extração e recuperação total e limites de detecção do método desenvolvido calculado usando 0,5 g de massa de amostra para HPA e 2,5 mg para EF.

<b>Analitos</b>	<b>Concentração encontrada (ng mg<sup>-1</sup>)</b>	<b>%Rec. estimada de A<sub>1</sub></b>	<b>%Rec. total</b>	<b>LD ng mg<sup>-1</sup></b>
Naftaleno	Nd	96	98	0,010
1-metilnaftaleno	Nd	98	98	0,008
1-metilnaftaleno	Nd	99	100	0,008
Acenafteno	Nd	96	97	0,008
Acenaftileno	Nd	97	98	0,007
Fluoreno	Nd	98	99	0,008
Fenantreno	Nd	98	98	0,008
Antraceno	Nd	98	99	0,015
Fluoranteno	Nd	98	99	0,009
Pireno	Nd	98	99	0,010
benzo(a)antraceno/ criseno <sup>b</sup>	Nd	80	95	0,026
Benzo(b)fluorante no/benzo(k)fluoran teno <sup>b</sup>	Nd	71	92	0,035
Benzo(a)pireno	Nd	Nd	Nd	nd
Indo(1,2,3- cd)pireno/dibenz(a, h)antracen <sup>b</sup>	Nd	Nd	Nd	nd
Benzo(ghi)perileno	Nd	Nd	Nd	nd
Ftalato de dimetila	Nd	72	97	3,0
Ftalato de dietila	Nd	60	95	1,5
Ftalato de n-butila	83 ± 7	71	99	1,0
Ftalato de butil e benzila	Nd	70	98	2,0
Adipato de bis (2- etilexila)	72 ± 5	87	95	1,0
Ftalato de bis(2- etilexila)	310 ± 8	69	73	1,0

<sup>a</sup> Esses compostos coeluem, portanto, foram analisados como a soma de suas áreas de pico. Nd = não detectado.

Os parâmetros analíticos da Tabela 3 foram obtidos para a extração da amostra gasosa (frasco vazio adicionado dos analitos). Tanto para EF quanto para HPA, duas extrações sucessivas da amostra gasosa foram realizadas (no nível mais alto em massa estudado para

cada classe) para estimar a recuperação da primeira extração, e valores acima de 90% foram obtidos para todos os compostos.

Assim, os dados a partir da curva de calibração podem ser comparados com o valor obtido de  $A_T$  a partir de duas extrações com a mesma amostra para estimar a recuperação total dos analitos. A Tabela 4 mostra a concentração encontrada dos analitos em 500 mg de uma amostra de arroz (HPA) e 2,5 mg de uma amostra de borracha escolar a base de látex (EF), as estimativas de recuperação para a primeira extração, a estimativa de recuperação total obtidas por extração da mesma amostra por duas vezes e os limites de detecção dos métodos que utilizam as massas de amostra acima citadas.

Recuperações excelentes para a primeira extração (71-99%) foram obtidas para catorze dos dezoito HPA, demonstrando o grande potencial da técnica. Os quatro compostos mais pesados da série dos HPA não foram liberados da amostra sólida para o *headspace* a 160 nem a 190°C. Algum modificador da amostra deve, portanto, ser utilizado para auxiliar a liberação destes compostos da matriz, tal como a água. Entretanto, como a adição de água a altas temperaturas aumenta consideravelmente a pressão interna do frasco de extração levando a vazamentos e deterioramento da precisão e exatidão, esta não foi testada. O desenvolvimento de uma substância não-volátil e adequada como modificador da amostra ainda precisa ser realizado.

Para EF, as recuperações para a primeira extração variaram de 60 a 87%, dependendo do analito. No entanto, as estimativas de recuperação usando duas extrações sucessivas variaram de 73 a 99%, demonstrando que para a determinação dos EF nessa amostra, o método é mais exato se a concentração for calculada pela extração por duas vezes da mesma amostra. Para os HPA, este procedimento não é necessário.

### **Conclusões parciais**

Os resultados deste estudo mostraram que, para obter o melhor desempenho de qualquer dispositivo de CF-SPME, otimização cuidadosa da temperatura da amostra, tempo de extração e, principalmente, das temperaturas superiores e inferiores da fibra são necessárias. Demonstrou-se também que a temperatura ótima da fibra foi diferente em função da volatilidade e tamanho dos analitos. Este fato, portanto, permitiu uma abordagem alternativa para o desenvolvimento de um método por CF-SPME. A nova estratégia de

otimização proposta, que foi baseado no uso de temperaturas diferentes da fibra durante o mesmo processo de extração mostrou-se como uma excelente alternativa para melhorar a extração de ambos os compostos voláteis e semi-voláteis em uma dada mistura gasosa. A abordagem multivariada foi escolhida porque fornece informações sobre a interação de dois ou mais parâmetros do sistema em estudo.

## 4. Capítulo 2

### **Determinação de HPA e EF em suspensões de solo em água usando extração direta seguida de amostragem no *headspace* durante o mesmo procedimento de extração por CF-SPME**

Se considerarmos uma matriz tal como solo ou sedimento, que são formadas em grande parte por óxidos e podem ter grande área superficial específica, espera-se que esse tipo de matriz possa adsorver fortemente tanto íons quanto compostos orgânicos neutros. Desta maneira, a determinação quantitativa de contaminantes orgânicos em importantes matrizes do ponto de vista ambiental tais como solo e sedimentos podem ser considerados um desafio analítico, devido à dificuldade de liberação desses analitos para o meio extrator. Extrações com solventes podem ser uma alternativa. Contudo, a minimização da utilização e manipulação de grandes quantidades de solventes orgânicos de alta pureza e difícil descarte tem sido uma tendência atual em Química. A técnica de SPME tem sido utilizada com sucesso na determinação de compostos em matrizes sólidas, sendo que variáveis importantes no processo precisam ser avaliadas, como massa de amostra, porcentagem de umidade (adição de água), modificação do pH da suspensão, adição de eletrólitos fortes, tempo e temperatura de extração. A importância da temperatura de extração já foi demonstrada neste presente trabalho, sendo que há sempre uma melhora na cinética de dessorção dos analitos da matriz e cinética de sorção pela fibra com o aumento da temperatura da amostra. Já a melhora na fração extraída com o aumento da quantidade de água em relação à amostra sólida tem sido explicada em termos da maior afinidade da água pela matriz do que dos analitos pela mesma. Água é considerada um bom solvente para muitos compostos, provavelmente devido a sua notável constante dielétrica ( $78,54 \text{ C}^2 \text{ N}^{-1} \text{ m}^{-2}$ ) comparada a outras substâncias. Esta propriedade aliada faz com que ela interaja fortemente com a superfície polar da matriz, deslocando o analito. Desta forma, a combinação de adição de água e aumento da temperatura de extração apresenta-se como uma alternativa razoável para promover uma eficiente dessorção de compostos orgânicos de tais amostras. Contudo, especialmente para analitos pouco voláteis, a temperatura de extração ótima ainda pode ser

alta o suficiente para que uma fibra comercial (com recobrimento não refrigerado) tenha sucesso.

Zhang e Pawliszyn<sup>10</sup> e Ghiasvand e colaboradores<sup>12</sup> relataram em seus trabalhos o aumento da quantidade extraída pelo sistema de CF com o aumento da umidade da amostra. Entretanto, também relatam um aumento exorbitante da pressão interna dentro do frasco de amostragem devido à evaporação da água adicionada, levando ao deterioramento na precisão e exatidão. Os resultados decorrentes da adição de água à amostra, a necessidade de tomar vantagem disso sem prejudicar precisão e exatidão da metodologia e o desafio de analisar amostras complexas como solo e sedimentos nos motivaram ao desenvolvimento dessa parte do trabalho, que consiste em uma nova abordagem de otimização da técnica de CF-SPME.

## **Parte experimental**

### **Instrumentação**

As análises cromatográficas foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-14B Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com um injetor split-splitless e detector por ionização em chama (*Flame Ionization Detector* -FID). Nitrogênio ultra puro foi utilizado como gás de arraste e gás auxiliar à vazões de 1,8 e 40 mL min<sup>-1</sup>, respectivamente. Hidrogênio e ar sintético ultrapuros foram utilizados para a detecção por FID. Em todas as corridas, as temperaturas injetor e do detector foram fixadas em 300 e 320 °C, respectivamente. O programa de temperatura do forno para a separação dos analitos foi: 50 °C (1 min), 6 °C min<sup>-1</sup> até 300 °C (10 min). A separação dos analitos foi realizada em uma coluna OV-5 capilar (OV-Specialty Chemical, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm espessura de filme).

### **Reagentes e materiais**

Uma solução estoque contendo os 18 HPA na concentração de 2000 µg mL<sup>-1</sup> em uma mistura de benzeno:diclorometano 50:50 foi obtida da Supelco. Essa solução contém: naftaleno, 1-metilnaftaleno, 2-metilnaftaleno, acenafteno, acenaftileno, antraceno, fenantreno, fluoreno, pireno, fluoranteno, benzo(k)fluoranteno, benzo(b)fluoranteno, benzo(a)pireno, criseno, dibenzo(a,h)antraceno, indeno(1,2,3-cd)pireno,



benzo(a)antraceno e benzo(ghi)perileno. Essa mistura foi diluída para uma concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  com a mesma mistura de solventes.

Uma mistura padrão de ftalato de dimetila (DMP), ftalato de dietila (DEP), ftalato de dibutila (DnBP), ftalato de bis (2-etil-hexila) (DEHP), adipato de bis (2-etil-hexila) (DEHA) e ftalato de butila e benzila (BBP) na concentração de  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  em metanol foi obtida da Supelco. Uma solução contendo as duas classes de compostos a uma concentração de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  foi preparada em metanol. Cloreto de sódio foi obtido da Nuclear (Diadema, SP). Antes de ser utilizado, permaneceu na mufla a  $350^\circ\text{C}$ , com aberturas eventuais por pelo menos 48 horas para remover possíveis impurezas vaporizáveis. O dispositivo de CF-SPME, incluindo o controlador de temperatura e válvula solenoide utilizados neste estudo foram os mesmos utilizados em trabalhos anteriores<sup>11-16</sup>, o mesmo utilizado na primeira parte desta Tese e está descrito na parte introdutória. A fase extratora utilizada foi uma membrana de PDMS com  $178 \mu\text{m}$  de espessura e 1 cm de comprimento. Dióxido de carbono líquido foi usado para resfriar o revestimento da fibra. Os analitos eluíram na seguinte ordem: (1), naftaleno (2) 1-metilnaftaleno, (3) 2-metilnaftaleno (4), acenafteno, (5) ftalato de dimetila, (6) acenaftileno, (7) fluoreno, (8) ftalato de dietila, (9) fenantreno, (10) antraceno, (11) ftalato de dibutila, (12) fluoranteno, (13) pireno, (14) ftalato de butila e benzila, (15) adipato de bis(2-etil-hexila), (16) benzo(a)antraceno, (17) criseno, (18) ftalato de bis(2-etil-hexila), (19) benzo(b)fluoranteno, (20) benzo(k)fluoranteno, (21) benzo (a) pireno, (22) indeno(1,2,3-cd)pireno, (23) dibenzo(a,h)antraceno e (24) benzo(ghi)perileno. Os picos 8 e 9, 15 e 16, 18-20, e 22 e 23 coeluem, e foram, portanto, analisados através da soma de suas áreas de pico.

### **Procedimento Experimental e estratégia de otimização**

Todas as etapas de otimização foram realizados pela pesagem de 50 mg de sílica em frascos de SPME de 15 mL com tampa de rosca e septo de silicone revestido com PTFE. Um volume adequado de solução estoque (cinco microlitros da solução de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  no caso das etapas de otimização e estudo de repetibilidade) foi adicionado sobre as amostras de sílica ou solo, o frasco foi rapidamente fechado e mantido no freezer a  $-20^\circ\text{C}$  durante pelo menos 48 horas para estabilização. Para a análise, o frasco foi retirado do congelador e o volume requerido de água ou solução aquosa de cloreto de sódio no pH desejado foi

adicionado com o auxílio de uma micropipeta. Uma barra de agitação magnética foi adicionada ao frasco, o qual foi hermeticamente fechado e submetido ao procedimento de extração. Agitação magnética constante foi utilizada em todos os experimentos. Todos os experimentos foram realizados com a temperatura da amostra de 90 °C para minimizar o vazamento dos analitos do frasco de extração. A estratégia de otimização foi realizada em seis etapas, usando planejamentos compostos centrais, quando mais de uma variável foi avaliada simultaneamente.

1) Avaliação simultânea do pH da suspensão e efeito salting-out no modo *headspace*. Soluções tampão fosfato em água (concentração final de 5 mmol L<sup>-1</sup>) foram preparadas em pHs 3, 8 e 14, e com concentrações de NaCl desde 0 até a saturação (aproximadamente 360 g L<sup>-1</sup>). O objetivo deste estudo foi verificar se alguma combinação de pH da amostra e concentração de NaCl poderia hidrolisar os ésteres de ftalato.

2) Otimização simultânea de volume de água e concentração de NaCl para o modo *headspace*. O volume de água ou solução de NaCl variou de 0 a 12 mL, e a concentração de NaCl de zero à saturação.

3) Avaliação do tempo de extração e temperatura da fibra para a extração no *headspace*. Tempo de extração foi avaliado na faixa de 15 a 60 min, e a temperatura da fibra na faixa de 15 a 75 °C.

4) Avaliação do tempo de extração com a fibra em diferentes temperaturas no modo direto. Duas temperaturas da fibra foram selecionadas para a realização deste estudo: 90 °C (sem refrigeração) e 60 °C. Várias combinações de tempos de extração (30-160 min) foram avaliadas com a temperatura da fibra mantida inicialmente a 90 °C por um período determinado, e, finalmente, o tempo de extração total planejado foi concluído com a fibra a 60 °C.

5) Otimização da concentração de NaCl no modo de extração direta. A concentração de cloreto de sódio foi avaliada desde a não adição até a saturação para o modo de extração direto.

6) Otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e fração do tempo total em que o modo de extração será no modo

*headspace*. Esses fatores foram simultaneamente otimizados variando concentração de NaCl de zero a saturação, tempo de extração 30-120 min e a % do tempo total de extração no modo *headspace* de 0 (todo o tempo no modo direto) até 100% (todo o tempo no modo *headspace*). O tempo de extração total desta etapa foi definido como a soma do tempo de extração no modo direto e do tempo de extração no modo *headspace*. Essa etapa sempre foi realizada na mesma seqüência: inicialmente no modo direto, e, por último, no modo *headspace*.

## **Resultados e Discussão**

A estratégia de otimização neste trabalho foi dividida nas seguintes partes: otimização das variáveis para a extração no modo *headspace*, otimização para o modo de extração direta e, finalmente, a nova proposta do presente estudo, que consiste em uma combinação dos dois modos de extração no mesmo procedimento. O foco principal desta proposta é maximizar a quantidade extraída de todos os analitos alvo de uma amostra complexa no menor tempo possível. Ao longo do estudo, superfícies de resposta foram plotadas para cada um dos analitos de interesse e as condições ótimas foram comparadas. Para os compostos cujas melhores condições de extração foram semelhantes, o conjunto de respostas (área de pico) para esse grupo de analitos foi transformada em uma única resposta através do cálculo da média geométrica (uma resposta média). Assim, a influência das condições de extração para cada grupo de analitos foi melhor compreendida, assim como tornou mais fácil a apresentação e discussão dos resultados.

### **Otimização da adição de sal e pH da amostra**

O principal objetivo de se estudar o pH da amostra e da força iônica conjuntamente foi avaliar se o EF poderiam ser hidrolisados, uma vez que uma alta temperatura de extração é empregada (90 ° C) em toda o estudo. Desta forma, para este estudo, foram considerados apenas os EF.

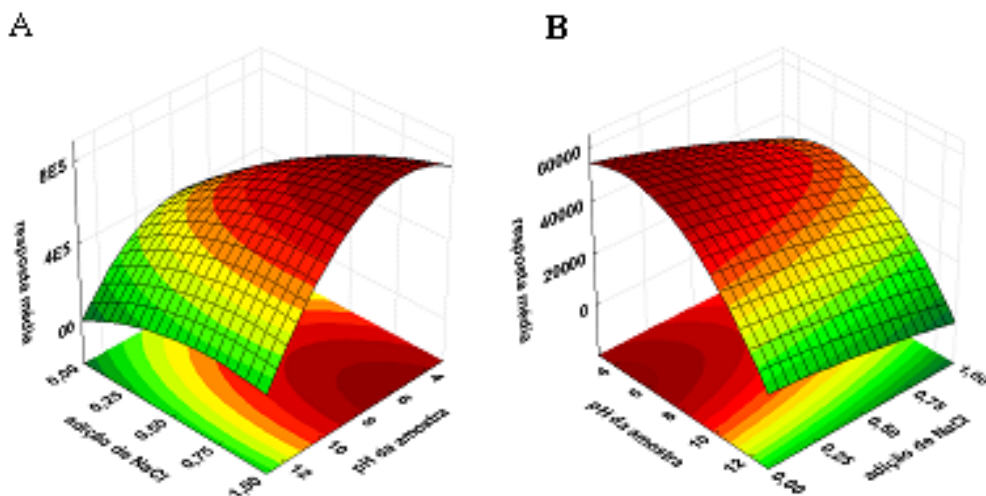


Figura 8. Superfícies de resposta obtida por meio da otimização da adição de NaCl e pH da suspensão. No eixo de NaCl, 0 significa sem adição de sal, e 1, saturação com NaCl. 8A: superfície de resposta para os três mais leves EF. 8B: superfície de resposta para os três mais pesados EF. Tempo de extração: 60 min. Temperatura da fibra:  $35 \pm 5$  °C. Temperatura da amostra: 90 °C. Volume de solução aquosa: 2 mL. Modo de extração: *headspace*.

A Figura 8 mostra claramente que o pH da amostra deve ser controlado, uma vez que o sinal analítico é muito influenciado por esta variável. Também pode ser visto que para todos os seis EF, um pH superior a 8 produz uma forte diminuição na quantidade extraída, provavelmente devido à hidrólise desses ésteres. Assim, para os experimentos posteriores, pH da suspensão na faixa de 4-7 deve ser utilizado. Adicionalmente, o cloreto de sódio provocou efeitos diferentes na resposta dependendo da volatilidade do EF, conforme a Fig. 8 indica. Para os três EF mais leves, a saturação com NaCl levou a melhor condição de extração, e para os três EF mais pesados, um aumento da força iônica desfavorece a extração. O comportamento dos EF mais pesados pode ser explicado pelo aumento da viscosidade da amostra com o aumento da concentração de NaCl. Além disso, a área de pico para os três EF mais pesados foi consideravelmente menor do que para os três mais leves, indicando que a extração direta para os compostos mais pesados deva ser o modo mais adequado.

### **Otimização do volume de água e concentração de NaCl para a extração a partir do *headspace* da amostra**

Neste estágio de otimização, considerando as duas classes de analitos (EF e HPA), os compostos foram claramente separados em dois grupos com base na intensidade das respostas: compostos eluídos antes de 213 °C, cuja resposta foi satisfatória, e os picos eluídos na faixa de 213-300 ° C, cuja resposta foi muito baixa. Este comportamento pode ser explicado pelo fato de que mesmo a 90 °C há uma baixa taxa de evaporação dos compostos mais pesados da fase condensada para o *headspace* da amostra, e esta etapa torna-se a etapa determinante da velocidade da transferência dos analitos da amostra para o recobrimento da fibra. Esse resultado indica que, para esses compostos, o modo de extração direta produziria extrações mais rápidas. Por este motivo, a Figura 10 mostra somente as respostas combinadas para o grupo de analitos eluídos até 213 °C.

Pode-se observar a partir da Fig. 9 o forte efeito da água (ou solução aquosa de NaCl) na quantidade extraída. Esse comportamento tem algumas explicações possíveis: a primeira é que as moléculas de água desativam as partículas de sílica, fazendo com que haja uma menor interação dessas com os analitos. Em segundo lugar, o aumento do volume de água (ou solução de NaCl) promove uma redução no volume de *headspace*, com um conseqüente aumento na concentração dos analitos no *headspace* da amostra, sendo este efeito mais pronunciado quando a água está saturada com NaCl.

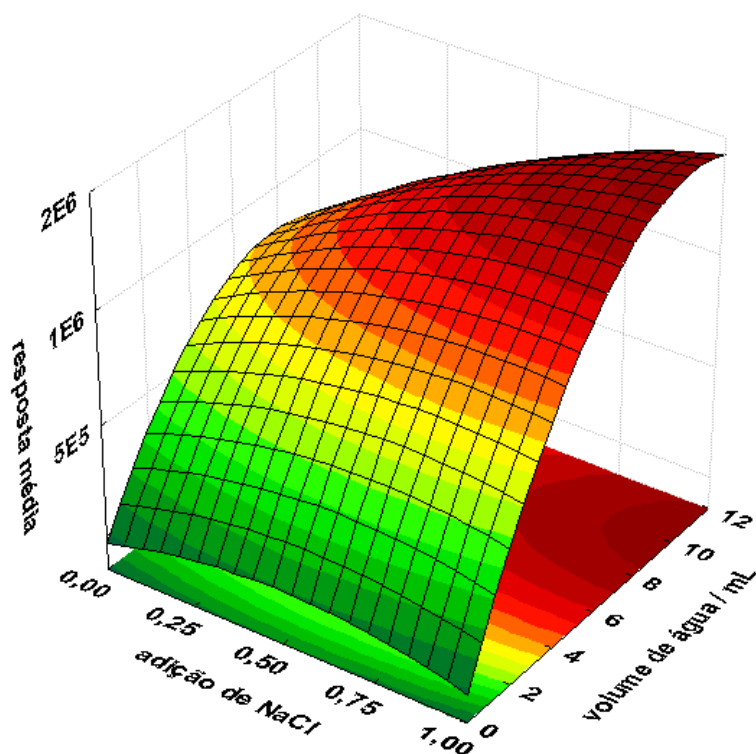


Figura 9. Superfície de resposta obtida para a otimização da adição de NaCl e volume de água. No eixo NaCl, 0 significa sem adição de sal, e 1 significa que o volume de água adicionada está saturada com NaCl. Temperatura da amostra: 90 °C. Tempo de extração: 60 min. Temperatura da fibra:  $35 \pm 5$  °C. Modo de extração: headspace. Volume total do frasco de amostragem: 15 mL.

Quando uma solução aquosa saturada com NaCl é utilizada, a resposta permanece constante e no seu valor máximo na faixa de 9 a 12 mL. No entanto, quando água sem NaCl é utilizada, o perfil atinge um máximo (mas com respostas mais baixas em relação à saturação com NaCl) em 8 mL e diminui a partir deste ponto. Em outras palavras, a força iônica elevada compensa a diluição dos analitos na fase líquida conforme o volume de água é aumentado. Assim, para a extração destes compostos a partir do *headspace*, recomenda-se utilizar 12 mL de solução aquosa saturada com NaCl. Felizmente, este volume otimizado para extração a partir do *headspace* é também adequado para extração direta. Assim, essa variável não foi avaliada para este modo de extração.

## Otimização do tempo de extração e temperatura da fibra para a extração a partir do *headspace* da amostra

O tempo de extração no modo *headspace* foi avaliado na faixa de 15 a 60 min, simultaneamente com temperaturas da fibra na faixa de 15 a 75 ° C. A Figura 10 mostra os resultados para este estudo.

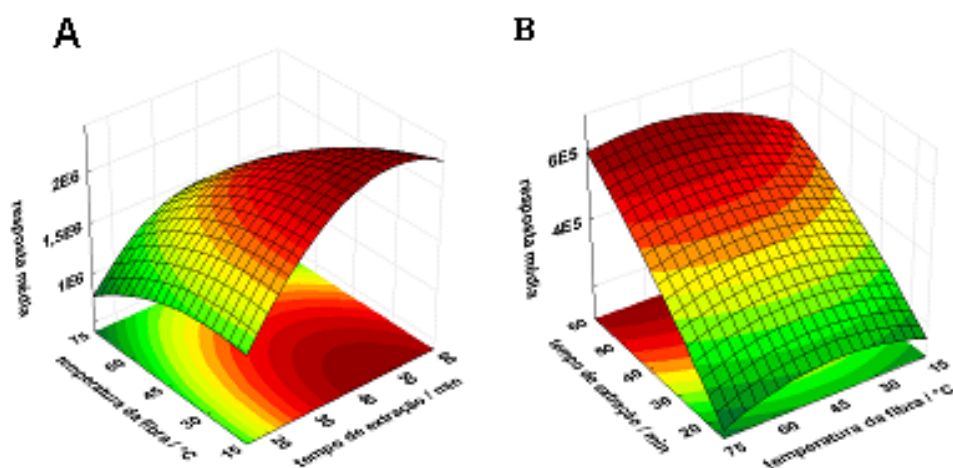


Figura 10. Superfícies de resposta para avaliação do tempo de extração e temperatura da fibra. 10A: resposta combinada para os compostos eluídos antes de 213 °C. 10B: resposta combinada para dois compostos eluídos na faixa de 230 a 238 °C. Temperatura da amostra: 90 °C. Volume de solução aquosa saturada com NaCl: 12 mL. Modo de extração: *headspace*.

A Fig. 10A representa a resposta média para os compostos eluídos antes de 213 °C (os primeiros 12 compostos), e a Fig. 10B, a resposta combinada de dois compostos (13 e 14) eluídos na faixa de 230-238 °C. Os outros analitos tiveram uma resposta muito baixa, provavelmente devido à sua concentração muito baixa no *headspace*. Pode-se observar que a condição ideal para os analitos leves (Fig. 10A) é atingido em cerca de 40 min de extração com a temperatura do revestimento na faixa de 15 a 30 °C. No entanto, a Fig. 10B mostra que o equilíbrio para esses dois compostos (13° e 14°) está longe de ser alcançado, sendo esta também a tendência para os compostos mais pesados (que eluem de 238 a 300 °C). Deve também ser mencionado o aumento no poder de

extração promovido pelo ambiente de aquecimento-resfriamento unicamente proporcionado pelo dispositivo de CF-SPME. Comparando-se as superfícies de resposta para cada analito eluídos antes 213 °C, o aumento na quantidade extraída ficou na faixa de 3,5 a 1,5 vezes, dependendo da volatilidade do analito. No entanto, a Fig. 10B mostra que para esses compostos, a temperatura da fibra exerce pouca influência na absorção dos analitos. Na verdade, baixas temperaturas da fibra diminuíram ligeiramente a quantidade extraída desses compostos, estando o valor ótimo na faixa de 45 a 65 °C. As diferenças no comportamento da temperatura da fibra em relação à quantidade extraída conforme o tamanho dos compostos muda pode estar baseada em uma combinação de fatores:

i) os coeficientes de partição dos compostos entre a água e a fibra ou *headspace* e a fibra aumentam conforme aumentam suas massas molares (ou diminuem suas volatilidades). Assim, mesmo em altas temperaturas, a termodinâmica não é significativamente afetada para compostos com alto valor de  $K_{hsm}$ .

ii) a extração depende da difusão dos analitos pela fibra. Assim, como o coeficiente de difusão é uma função da temperatura e viscosidade do meio de difusão (no caso, o revestimento da fibra) e do volume molecular da substância que se difunde, espera-se que a taxa de extração será afetada negativamente conforme a temperatura da fase extratora é diminuída, sendo este efeito mais pronunciado a medida que a massa molar da substância aumenta. Os principais objetivos de um método para análise de traços são maximizar a quantidade extraída (que exigiria uma alta diferença de temperatura entre a amostra e a fibra no caso da CF-SPME) minimizando o tempo de preparação da amostra, fato que exige uma diferença de temperatura baixa ou nula entre a amostra e a fibra. Desta forma, a melhor temperatura da fibra precisa ser avaliada empiricamente, especialmente quando compostos com tamanhos muito diferentes são os analitos alvo.

Em conclusão, para os compostos eluídos a partir de 214 °C, o modo de extração direta é recomendado, e para o modo *headspace*, 40 min de extração com a temperatura da fibra na faixa de 15 a 30 °C são as condições otimizadas.



### **Avaliação do tempo de extração e da temperatura da fibra no modo de extração direto**

Neste estudo, duas temperaturas da fibra foram avaliadas simultaneamente com diferentes tempos de extração para o modo de extração direta. As temperaturas da fibra estudadas foram 90 °C (sem resfriamento do recobrimento) e 60 °C. Comparado com extrações do *headspace* da amostra, a situação para o modo direto de extração inverteu-se, uma vez que a quantidade extraída dos analitos mais pesados (eluição na faixa de 214-300 °C) foi mais eficiente do que para os analitos mais leves. A Fig. 11 mostra a superfície de resposta para essa etapa de otimização utilizando-se como resposta a média geométrica da área do pico para os compostos mais pesados. As superfícies de resposta para os compostos mais leves também foram geradas, sendo os perfis bastante similares ao da Fig. 11. No entanto, como já mencionado, a intensidade dos picos foi muito baixa, sendo observada uma tendência de aumento na recuperação conforme a massa molar dos analitos aumentava. A Fig. 11 mostra também que a temperatura da fibra não alterou a quantidade extraída na faixa avaliada, e que o equilíbrio foi alcançado após cerca de 100 min de extração. A razão pela qual a temperatura da fibra não provocou efeito significativo sobre a eficiência de extração pode ser sugerida pela dificuldade de resfriamento de todo o recobrimento, especialmente a parte mais externa que fica em contato com a água, que possui capacidade calorífica bastante elevada.

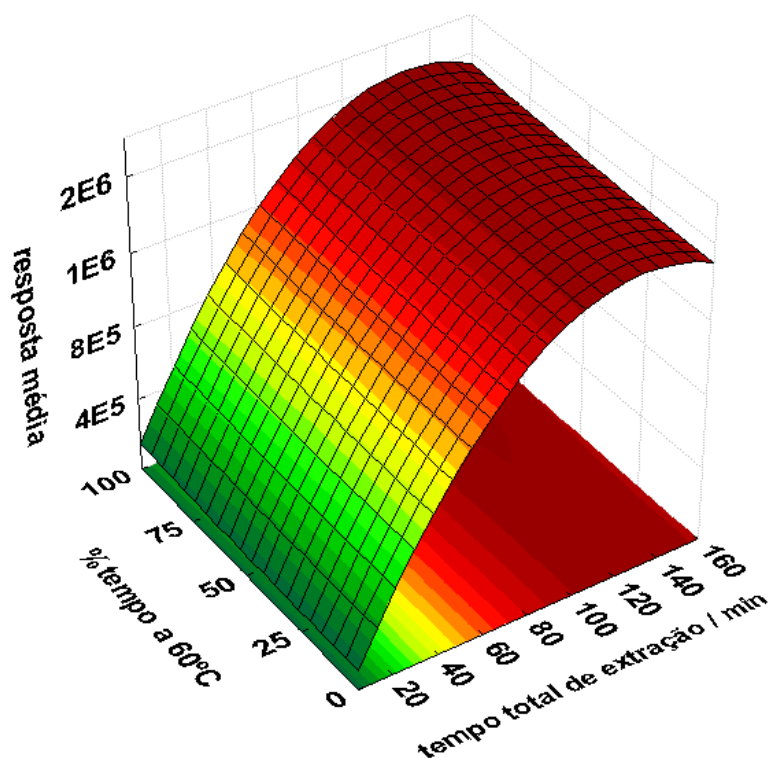


Figura 11. Superfície de resposta obtida para a otimização do tempo de extração total com a fibra em diferentes temperaturas: 90 °C (sem refrigeração) e 60 °C. Volume de água: 12 ml sem NaCl. Temperatura da amostra: 90 °C. A resposta média foi calculada para os compostos eluídos na faixa de 214-300 °C.

A fim de verificar como temperaturas mais baixas da fibra poderiam afetar a capacidade de extração de PDMS, e, principalmente, aumentar a recuperação dos compostos mais leves, realizou-se uma extração de 80 min no modo direto, com 14 mL de água (para minimizar o particionamento dos compostos mais leves com o *headspace* da amostra) e com o revestimento a 30 °C. O resultado obtido não foi satisfatório, uma vez que a quantidade extraída para todos os compostos (incluindo os voláteis) diminuiu em comparação ao uso de temperaturas da fibra na faixa de 60 a 90 °C para a extração direta. Este fato pode ser devido à diminuição na velocidade de extração dos analitos, quer pela redução da difusividade desses dentro do recobrimento ou pelo aumento do caminho de difusão na camada estática em torno do revestimento da fibra. Assim, para o modo de extração direta, 80 min de extração com a temperatura do revestimento na faixa de 60 a 90 °C são os valores otimizados para essas variáveis. Como não houve diferença entre a temperatura do recobrimento na faixa de 60 a 90 °C, escolheu-se 90 °C

(sem refrigeração) de maneira a aumentar a vida útil da válvula solenóide e minimizar o gasto com CO<sub>2</sub> líquido.

### Otimização da concentração de NaCl no modo de extração direta

Para a avaliação do efeito da força iônica no modo de extração direta, a concentração de cloreto de sódio foi variada de zero até a saturação. Dois grupos foram claramente separados com base na similaridade do efeito da variável sobre a resposta: compostos eluídos antes e depois de 213 °C. A Figura 12 mostra o perfil obtido.

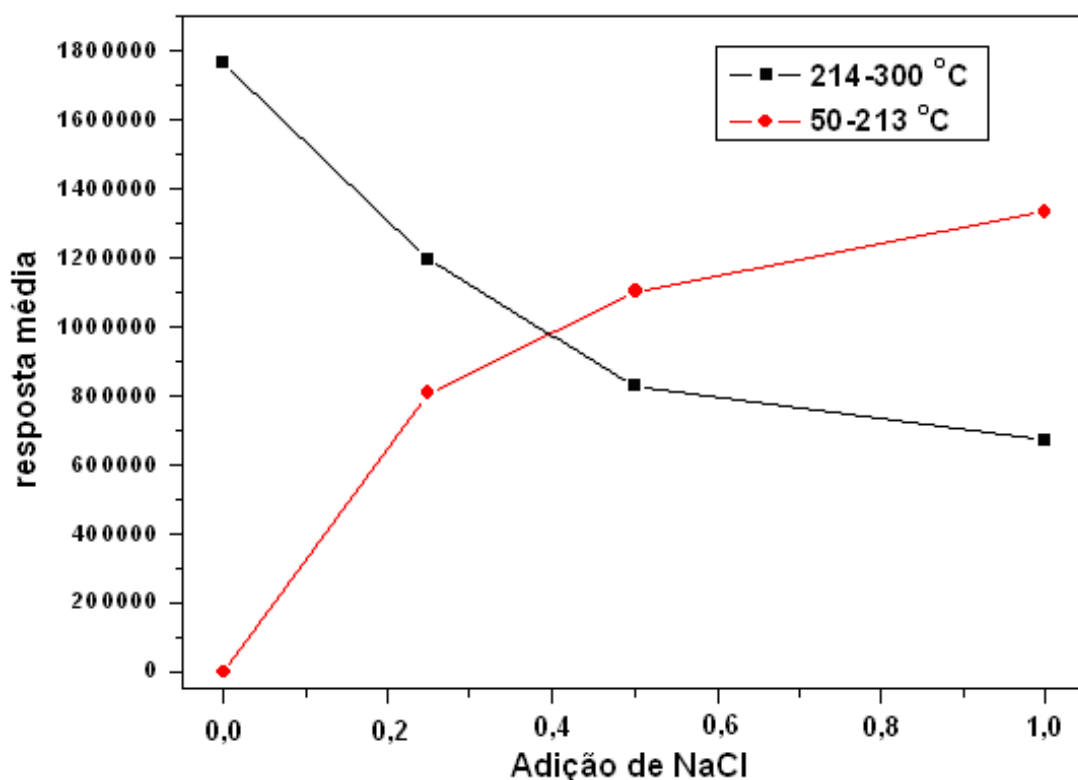


Figura 12. Perfil da variação da resposta dos compostos eluídos antes e depois de 213 °C em relação à concentração de NaCl. Temperatura da fibra: 90 °C. Tempo de extração: 80 min. Volume de água ou de solução aquosa de NaCl: 12 mL.

Pode-se observar na Fig. 12 que a melhor condição para os compostos eluídos até 213 °C é a saturação com NaCl. Por outro lado, para os compostos mais pesados, não se deve adicionar NaCl. A diminuição na eficiência de extração dos compostos mais pesados à

medida que aumenta a concentração de NaCl pode estar relacionada com o aumento da viscosidade da amostra, aumentando o tempo para que se atinja o equilíbrio. Como condição de compromisso para ambos os grupos, 40% da saturação com NaCl pode ser adotado se somente o modo de extração direto fosse utilizado. Entretanto, como já dito, a resposta para os compostos eluídos antes de 213 °C não foi satisfatória, não sendo então o método direto adequado para todos os compostos da mistura analisada.

### **Otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e fração do tempo total de extração no modo *headspace***

Como se pode observar nas etapas de otimização acima, nenhum dos modos de extração isoladamente foram eficientes para extrair todos os analitos alvo. Assim, nesta etapa de otimização, os fatores concentração de NaCl, tempo de extração total e fração do tempo total de extração em que a fibra será exposta ao *headspace* da amostra foram avaliadas simultaneamente por meio de um planejamento composto central para três variáveis. Nesta abordagem, a extração começa sempre com o modo de extração direta e, após o tempo planejado, o revestimento é exposto ao *headspace* da amostra até que o tempo de extração total seja concluído. As Figs. 13, 14 e 15 mostram as superfícies de resposta obtidas.

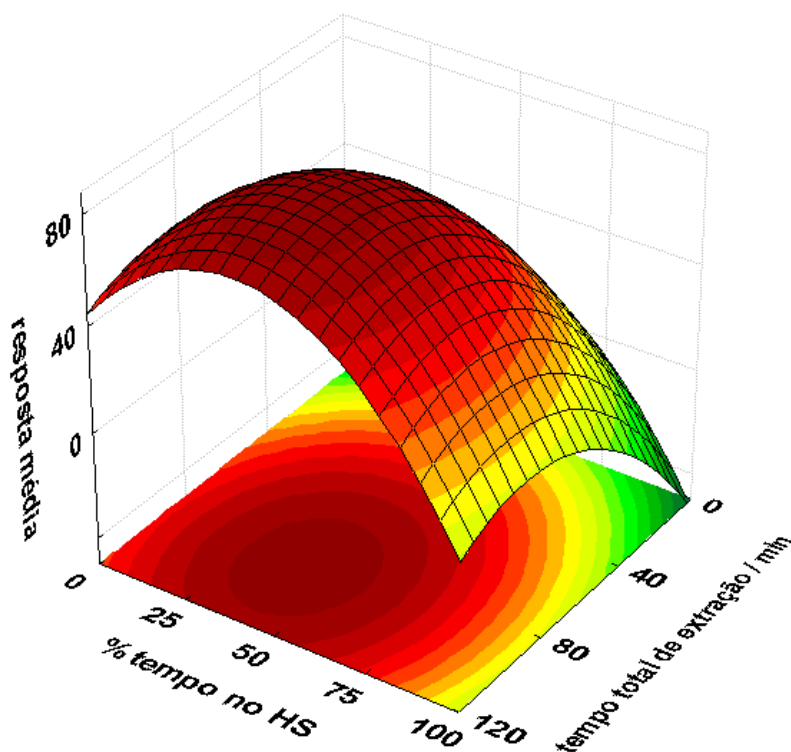


Figura 13. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no *headspace* da amostra. Temperaturas da fibra: 90 °C (modo direto) e 30 °C (modo HS). Volume de água ou solução aquosa de NaCl: 12 mL. Concentração de NaCl: 54% da saturação. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos.

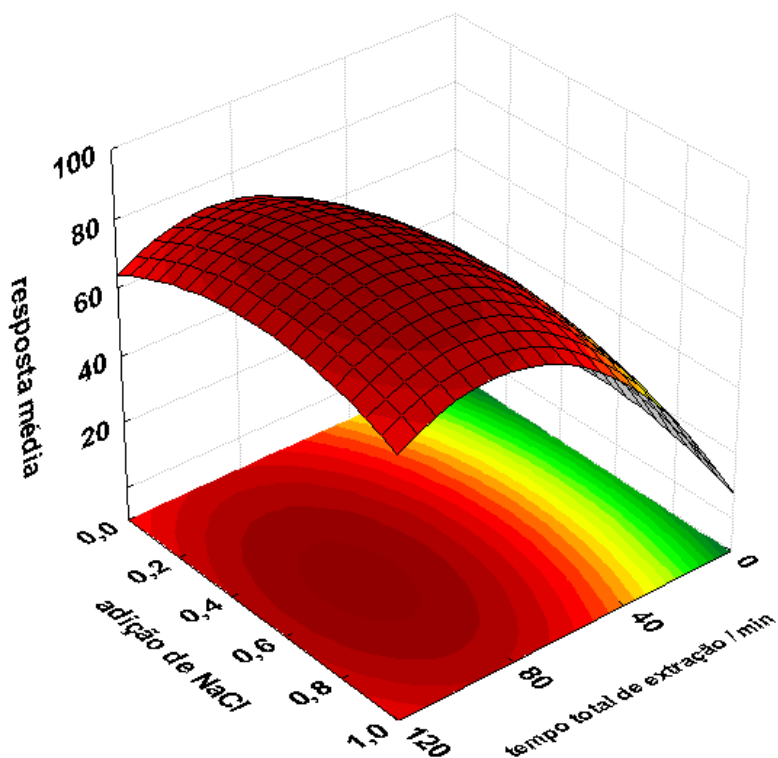


Figura 14. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no *headspace* da amostra. Temperaturas da fibra: 90 °C (modo direto) e 30 °C (modo HS). Volume de água ou solução aquosa de NaCl: 12 ml. % tempo no HS: 40% do tempo de extração total. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos.

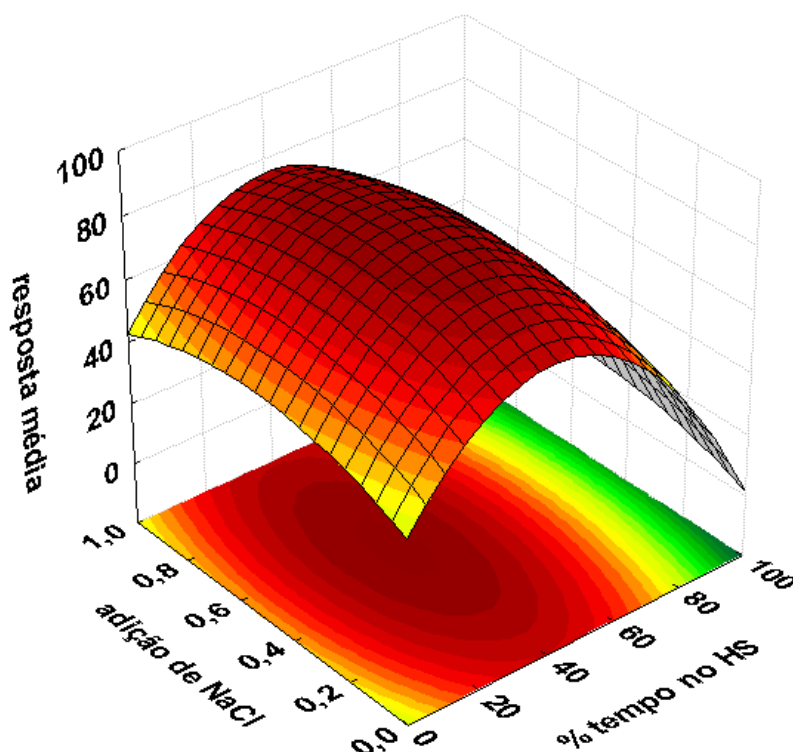


Figura 15. Superfície de resposta obtida para a otimização simultânea da concentração de NaCl, tempo de extração total e % do tempo de extração com a fibra no *headspace* da amostra. Temperaturas da fibra: 90 °C (modo direto) e 30 °C (modo HS). Volume de água ou solução aquosa de NaCl: 12 mL. Tempo de extração total: 80 min. Resposta média foi calculada como a média geométrica da área do pico para todos os compostos.

Deve-se ressaltar que a resposta utilizada para gerar as Figs. 13, 14 e 15 foi a média geométrica das áreas de pico para todos os compostos, o que representa uma resposta compromisso para todos os analitos. Como pode ser visto nas Figs. 14 e 15, a concentração de NaCl ótima foi de 54% da concentração da saturação de NaCl em água, que é igual a  $194 \text{ g L}^{-1}$ . Considerando todos os compostos, foi um valor intermediário entre a não adição (a melhor condição para os compostos mais pesados) e a saturação, que é o valor ideal para os compostos mais leves. Este resultado está de acordo com os resultados anteriores de otimização. Assim, a concentração de NaCl de  $194 \text{ g L}^{-1}$  foi adotada como condição otimizada.

Pode-se também observar nas Figs. 13 e 14 que o equilíbrio é alcançado em cerca de 80 min. Apesar de 80 min parecer ser um tempo de extração muito longo, deve-se considerar que 24 compostos com

diferentes volatilidades estão sendo extraídos de uma amostra complexa, e que qualquer outro método para preparo desse tipo de amostra deva consumir um tempo consideravelmente maior que esse.

E, finalmente, a partir das Figs. 13 e 15 observa-se que a proposta deste trabalho, que consiste em uma combinação de modos de extração no mesmo procedimento, leva a resultados melhores em comparação com o uso de somente um ou outro modo de extração. O valor ótimo de tempo de extração obtido para cada modo de extração foi de 50 min no modo direto, seguido de 30 min de extração no modo *headspace*, o que corresponde a aproximadamente 40% do tempo total de extração (80 min) no modo *headspace*.

A razão pela qual a nossa proposta é mais eficiente é clara: a utilização do modo de extração direta faz com que o processo de extração dos compostos mais pesados seja muito mais rápido em relação à extração dos mesmos pelo modo *headspace*, já que tanto a difusão dos analitos pela camada estática ou pela fibra são etapas mais rápidas do que a evaporação dos compostos da amostra aquosa para o *headspace*, que é a etapa determinante da velocidade de transferência dos analitos pouco voláteis da fase condensada para o interior do recobrimento da fibra em uma extração a partir do *headspace*. Assim, enquanto a extração no modo direto ocorre, os compostos voláteis tendem a ser concentrados no *headspace* da amostra. Quando o tempo de extração no modo direto é concluído, a fibra é posicionada no *headspace* da amostra e sua temperatura é alterada para 30 °C, e os voláteis podem ser eficientemente extraídos. Deve-se enfatizar que os compostos já absorvidos pelo recobrimento na extração direta não são perdidos durante a extração no *headspace*, uma vez que estes são mantidos “presos” no recobrimento resfriado.

### **Comparações entre diferentes condições**

De maneira a melhor visualizar as diferenças entre os resultados da proposta deste estudo baseada no uso dos modos de extração direta e no *headspace* no mesmo procedimento com o uso somente de um ou outro modo de extração, realizou-se algumas comparações. As condições fixadas para esta comparação foram: pH da suspensão na faixa de 4 a 7, 12 mL de NaCl 194 g L<sup>-1</sup>, as temperaturas da fibra de 90 e 30 °C para a extração direta e no *headspace*, respectivamente, temperatura da amostra de 90 °C e 80 min como tempo de extração total. A comparação pode ser encontrada na Fig. 16.



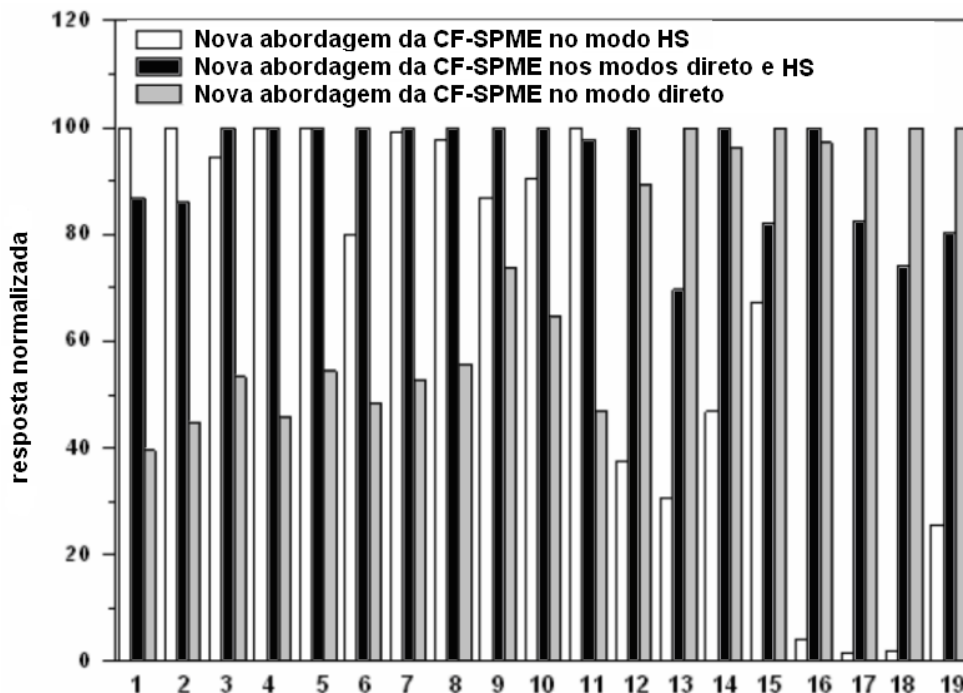


Figura 16. Comparação entre diferentes condições de extração. Números no eixo x representam os analitos na ordem de eluição. Co-eluição entre picos podem ser encontrados na parte experimental deste capítulo. Nova abordagem da CF-SPME no modo HS: 80 min de extração no modo HS com a fibra em 30 °C. Nova abordagem da CF-SPME nos modos direto e HS: 50 min de extração no modo direto sem resfriamento da fibra seguido por 30 min no HS com a fibra a 30 °C. SPME convencional: 80 min de extração com a CF-SPME sem resfriamento da fibra no modo direto.

De uma maneira geral, pode-se observar na Fig. 16 que o modo *headspace* conduz a melhores respostas para os analitos mais leves, diminuindo a quantidade extraída conforme a volatilidade dos analitos diminui. O comportamento contrário também é verdadeiro para o modo direto. Portanto, se o objetivo é extrair os dois grupos de analitos, nenhum dos modos de extração sozinhos mostrou-se útil. Nossa condição proposta, no entanto, levou a uma extração satisfatória para todos os analitos, pois ele integra no mesmo processo dois modos de extração, ou seja, o método proposto mostrou-se adequado para ambos os compostos de alta e baixa volatilidades.

A fim de tornar mais claras as diferenças entre os métodos, comparou-se a relação da resposta de cada composto entre a proposta deste trabalho com as demais condições. A relação de resposta entre a

proposta deste trabalho e a utilização de 80 min de extração direta ficou na faixa de 0,7 a 2,2 vezes, dependendo do composto. No entanto, quando a condição otimizada é comparada com o uso de 80 min de extração a partir do *headspace*, essa relação cai na faixa de 0,9 a 51 vezes. Novamente, pode-se ver que o método proposto é mais eficiente que outros métodos baseados em um único modo de extração.

Outra comparação importante que deve ser realizada está relacionado ao uso ou não de água como modificador da amostra. Neste estudo, optou-se por usar a água em abundância com objetivo de diminuir a capacidade adsorptiva da matriz. Por esse motivo, foi necessário restringir a temperatura da amostra para um valor no qual as perdas dos analitos devido a vazamentos fosse minimizado (90 °C). As abordagens usualmente encontradas na literatura para o desenvolvimento de um método por CF-SPME são contrários: a temperatura da amostra é otimizada em primeiro lugar e sem adição de água, e, por último, avalia-se a umidade da amostra. Assim, a adição de água é normalmente evitada, uma vez que esta é avaliada com a temperatura da amostra otimizada (alto valor), o que leva a uma alta pressão interna no frasco de extração. Neste contexto, é útil testar qual dessas abordagens produz melhores resultados. A condição otimizada neste trabalho foi comparada com o resultado da extração dos analitos adicionados em sílica, sem adição de água, temperatura da amostra de 160 °C, 15 min de tempo de incubação a 160 °C e 80 min de extração com a fibra a 5 °C. Os resultados são apresentados na Fig. 17.

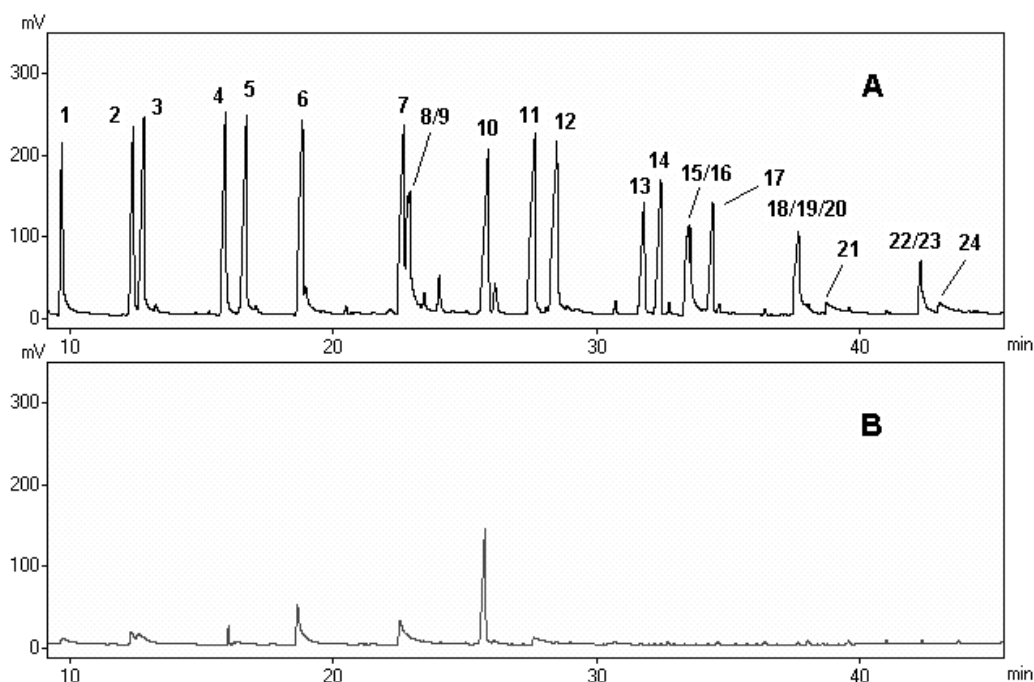


Figura 17. Comparação entre diferentes métodos de extração usando CF-SPME e 50 mg de sílica adicionada de  $10 \mu\text{g g}^{-1}$  de cada analito. 17A . Condição otimizada proposta neste estudo: temperatura da amostra:  $90^\circ\text{C}$ , 12 mL de solução aquosa de NaCl em  $194 \text{ g L}^{-1}$  e pH 5,5 em frasco de 15 mL, 80 min de extração, sendo os primeiros 50 min em modo direto com a fibra a  $90^\circ\text{C}$ , seguida de 30 min de extração no headspace com a fibra a  $30^\circ\text{C}$ . 17B. Abordagem usual da CF-SPME: sem adição de água, temperatura da amostra:  $160^\circ\text{C}$ , tempo de incubação: 15 min a  $160^\circ\text{C}$ , temperatura da fibra:  $5^\circ\text{C}$ , tempo de extração: 80 min. Identificação dos picos pode ser encontrado na parte experimental deste capítulo.

A Fig. 17A mostra que a abordagem baseada no uso de alta quantidade de água e temperatura da amostra intermediária ( $90^\circ\text{C}$ ), juntamente com o uso de uma combinação de 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 (Fig. 17B). Esse resultado indica mais uma vez que o uso de uma alta diferença de temperatura entre a amostra e a fibra em si não é garantia de sucesso pleno da CF-SPME. Esse resultado também mostra que a liberação dos analitos da matriz sólida é muito mais afetada pela adição de água do que somente o uso de alta temperatura de extração.

## **Parâmetros analíticos e aplicação do método**

Os principais parâmetros analíticos de mérito foram determinados para nova abordagem de extração proposta nesse trabalho. A curva de calibração foi construída com 50 mg de amostra de sílica adicionada dos analitos e com as condições previamente otimizadas. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 5.

Pode-se observar na Tabela 5 que satisfatórios dados analíticos foram obtidos para todos os compostos, especialmente se forem levadas em conta as dificuldades no tratamento de amostras sólidas para a determinação por cromatografia a gás. Especialmente em relação a detectabilidade, se menores limites de detecção precisem ser atingidos, um detector de maior sensibilidade devem ser utilizado, tais como espectrometria de massa no modo de monitoramento de íons seleccionados (SIM-MS).

Tabela 5. Dados analíticos obtidos para a nova proposta de uso da CF-SPME utilizando 50 mg de amostra de sílica.

<b>Analitos<sup>a</sup></b>	<b>R<sup>b</sup></b>	<b>LD<sup>c</sup>, <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>	<b>Faixa linear, <math>\mu\text{g g}^{-1}</math></b>	<b>RSD %<sup>d</sup></b>
1	0,9999	0,2	0,7-40	5
2	0,9993	0,4	1,3-40	12
3	0,9976	0,7	2,0-40	16
4	0,9970	0,7	2,0-40	16
5	0,9999	0,2	0,6-40	4
6	0,9966	0,7	2,0-40	17
7	0,9989	0,5	1,2-40	12
8/9	0,9950	0,9	3,0-40	23
10	0,9974	0,7	2,0-40	15
11	0,9986	0,5	1,5-40	11
12	0,9998	0,4	1,2-40	6
13	0,9965	0,8	3,0-40	19
14	0,9942	0,9	3,0-40	16
15/16	0,9936	0,8	2,8-40	21
17	0,9983	0,7	2,4-40	15
18-20	0,9946	0,8	2,5-40	19
21	0,9999	0,3	0,8-40	4
22/23	0,9921	2,0	6,7-40	19
24	0,9967	1,0	3,3-40	18

<sup>a</sup>Identificação dos analitos pode ser encontrada na parte experimental deste capítulo. <sup>b</sup>Coefficiente de correlação. <sup>c</sup>Limite de detecção estimado como três vezes a relação sinal/ruído. <sup>d</sup>Desvio padrão relativo estimado para n=5 e a 10  $\mu\text{g g}^{-1}$ .

A verificação da exatidão do método foi realizada em cinco amostras de solo fortificadas (50 mg a 20  $\mu\text{g g}^{-1}$ ) com diferentes teores de argila e matéria orgânica. Os resultados podem ser encontrados na Tabela 6. Os valores de recuperação foram são relativos aos resultados da curva de calibração sobre amostra de sílica.

Tabela 6. Recuperações relativas obtidas para amostras de solos com diferentes teores de argila e matéria orgânica através do método otimizado proposto neste estudo.

<b>Matéria org. %</b>	<b>8,4</b>	<b>2,5</b>	<b>1,5</b>	<b>0,8</b>	<b>2,9</b>	<b>0</b>
<b>Argila %</b>	<b>32</b>	<b>58</b>	<b>24</b>	<b>14</b>	<b>65</b>	<b>0</b>
<b>Analitos</b>						
1	99,0	91,3	100,6	97,6	95,7	100,0
2	98,7	111,8	112,2	113,8	110,6	100,0
3	94,9	106,6	108,3	109,7	107,7	100,0
4	85,3	103,4	103,2	105,1	104,7	100,0
5	90,3	106,4	109,4	111,3	110,0	100,0
6	96,0	103,6	101,9	103,9	94,2	100,0
7	76,6	105,8	103,3	104,7	104,7	100,0
8/9	83,2	105,4	107,3	106,4	101,0	100,0
10	65,7	90,0	84,1	86,1	85,3	100,0
11	58,9	86,0	88,8	89,4	81,2	100,0
12	73,2	84,0	104,9	99,5	92,5	100,0
13	53,7	50,1	61,3	46,1	63,6	100,0
14	84,3	94,5	45,5	26,1	49,9	100,0
15/16	98,2	60,5	59,5	49,4	60,9	100,0
17	71,7	50,6	48,0	21,7	15,5	100,0

Pode-se observar pela Tabela 6 que há uma tendência de decréscimo da recuperação conforme o aumento da massa molar dos analitos. Este fato pode ser devido ao aumento da lipofilicidade dos compostos, e, portanto, maior interação com a matéria orgânica presente nas amostras de solo. Mesmo que o método proposto não tenha sido capaz de extrair eficientemente todos os analitos estudados, um resultado bastante satisfatório foi obtido para a maioria deles. A abordagem convencional da CF-SPME (160 °C como temperatura da amostra, 15 min de tempo de incubação a 160 °C, 80 min de extração com a fibra a 5 °C e nenhuma adição de água) também foi aplicada às mesmas amostras fortificadas, mas nenhum dos analitos foi detectado.

Este fato demonstra que o método proposto é muito superior em comparação com a abordagem convencional.

### **Conclusões parciais**

Neste estudo, mostrou-se que a introdução das inovações metodológicas aqui apresentadas foram capazes de melhorar as abordagens já existentes na utilização da técnica de CF-SPME. A utilização de água em abundância e uma temperatura da amostra intermediária mostrou-se ser significativamente mais eficiente no sentido de liberar os analitos da fase sólida e minimizar vazamentos em comparação com o método convencional de CF-SPME. Além disso, o uso de uma combinação dos modos de extração no mesmo procedimento mostrou-se útil para o aumento da velocidade de extração dos analitos, especialmente os mais pesados. Deve-se ressaltar que esta abordagem baseada na utilização de ambos os modos de extração direta e *headspace* no mesmo procedimento também pode ser aplicado para fibras de SPME comercialmente disponíveis, especialmente para matrizes em que o modo direto de extração seja viável e que contenha os analitos alvo com volatilidades bem diferentes. Além disso, este procedimento pode ser facilmente automatizado tanto para a técnica de CF-SPME quanto para a SPME comercial, bastando para isso apenas uma adequada programação de qualquer auto-amostrador para SPME já disponível.

## 5. Capítulo 3

### **Uma nova estratégia de otimização para determinação do perfil aromático de matrizes vegetais por HS-SPME: uso de diferentes temperaturas de extração no mesmo procedimento**

O aroma é um dos mais importantes atributos de qualidade de frutas e o parâmetro mais significativo de qualidade em produtos comestíveis e processados.

Do ponto de vista da indústria de alimentos e/ou de cosméticos, a determinação do perfil aromático de uma matriz vegetal reveste-se de apreciável importância, uma vez que, é fundamental o conhecimento da composição volátil e semi-volátil do vegetal, a fim de melhorar a qualidade dos produtos, bem como a inserção de novos produtos no mercado, além do conhecimento da viabilidade econômica da extração do óleo essencial do produto, ou a síntese dos compostos do óleo, nos casos que seja mais viável economicamente.

A técnica de HS-SPME acoplada à cromatografia a gás tem sido aplicada com sucesso na determinação do perfil aromático de matrizes vegetais, incluindo figo, melão, pêssigo, maçã, pimenta, trufas, entre outros<sup>22-28</sup>. Estas amostras geralmente possuem componentes que podem passar por processos de decomposição térmica, oxidação, fotólise, etc. Logo, uma técnica que reduza o tempo de preparo de amostra e a manipulação da amostras são essenciais, características estas da SPME<sup>29-30</sup>.

Entre as fases extratoras comercialmente disponíveis, o desempenho da fibra CAR/DVB/PDMS precisa ser destacado para determinação do perfil aromático de matrizes vegetais, uma vez que é o recobrimento mais utilizado juntamente com o recobrimento de DVB/PDMS<sup>31-34</sup>. Esta escolha deve-se à presença de PDMS (mecanismo de absorção) juntamente com divinilbenzeno (DVB) e/ou carboxen (carvão ativado – CAR), os quais são partículas sólidas, e, portanto, extraem pelo mecanismo de adsorção, sendo assim bastante apropriadas para retenção de moléculas pequenas (voláteis).

O aroma é formado por um complexo grupo de substâncias químicas (por exemplo, aldeídos, álcoois, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos, etc)<sup>35</sup>. Desta forma, possuindo analitos de volatilidades e polaridades bem distintas, encontrar uma condição de extração compromisso utilizando a técnica de SPME para todos os compostos



pode ser considerado um desafio analítico. Especialmente em relação à temperatura de extração, temperaturas baixas favorecem a extração de compostos mais voláteis, já para temperaturas mais altas os compostos semi-voláteis são favorecidos, onde há uma maior concentração desses compostos no headspace, e, portanto, há maior probabilidade desses serem extraídos pelo recobrimento da fibra, especialmente se a constante de partição for favorável. Desta forma, uma temperatura intermediária geralmente é adotada como condição compromisso, com conseqüente diminuição na quantidade extraída para ambos os grupos de analitos (voláteis e semi-voláteis). Neste sentido, o objetivo desta parte do trabalho é obter uma condição compromisso em que a quantidade extraída de compostos com volatilidades distintas se mantenha bem próxima da condição ótima para cada grupo de analitos separadamente. Para que esse objetivo fosse atingido, focalizou-se a otimização nas variáveis tempo e temperatura de extração com a fibra CAR/DVB/PDMS e separação/detecção por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) e GC com detecção por ionização em chama (FID), propondo-se uma nova metodologia de otimização baseada na utilização de duas temperaturas de extração no mesmo procedimento experimental.

### **Parte experimental**

Uma mistura contendo 10 g de cada um dos seguintes componentes: banana, raspas de limão, manjeriço e salsa foi preparada pela mistura em liquidificador até completa homogeneização. Essa mistura foi acondicionada em frasco selado no refrigerador a -15 °C. Para análise, a mistura foi retirada do refrigerador, e com auxílio de uma espátula, pesou-se  $100 \pm 5$  mg diretamente no frasco de SPME, sendo este fechado e imediatamente submetido ao procedimento de extração.

### **Procedimento experimental com fibra comercial**

Todos os experimentos de otimização com a fibra comercial CAR/DVB/PDMS foram realizados expondo a fibra ao headspace da amostra, em frascos de 15 mL para SPME, agitação magnética constante, sem adição de água, com tempo de pré-equilíbrio de 5 min na temperatura de extração a ser avaliada no momento. A estratégia de otimização consistiu de duas etapas:

- 1) Otimização do tempo e temperatura de extração utilizando planejamento composto central. A temperatura de extração foi avaliada na faixa de 5 a 60 °C, e o tempo de extração na faixa de 10 a 60 min. Nessa etapa, o cromatograma foi dividido em quatro regiões, e a soma das áreas de pico de cada grupo foi utilizada como resposta para gerar as superfícies. Com base nos resultados de temperatura ótima obtida para cada grupo, escolheram-se duas temperaturas para a etapa posterior de otimização.
- 2) Otimização do tempo total de extração e tempo de extração em cada uma das temperaturas escolhidas na etapa 1. Nessa etapa de otimização, o processo de extração sempre inicia com a temperatura superior (60 °C), permanecendo por um tempo de acordo com o planejamento. Terminado esse tempo, o frasco é retirado do banho termostatizado na temperatura superior e rapidamente transferido para o banho na temperatura inferior (5 °C), no qual permanece até que o tempo total de extração requerido pelo planejamento seja finalizado. Os analitos retidos na fibra foram termicamente desorvidos na porta de injeção por 8 min. Nenhum efeito de memória foi observado.

## **Instrumentação**

As etapas de otimização e aplicação foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-14B da Shimadzu, equipado com detector por ionização em chama e coluna Rtx-WAX (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm f.e.) da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA). A programação do forno da coluna foi: 40 °C (4 min), 4 °C min<sup>-1</sup> até 230 °C (1 min). As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas em 240 e 260 °C, respectivamente. Para identificação, utilizou-se um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 plus da Shimadzu. A identificação foi realizada por comparação do espectro obtido com os espectros contidos na biblioteca Nist Mass Spectral Library (2005).

## **Resultados e discussão**

Os fatores tempo e temperatura de extração foram avaliados utilizando planejamento composto central. O tempo de extração foi

avaliado no intervalo de 10 a 60 min, e a temperatura de extração na faixa de 5 a 60 °C. De maneira à melhor compreender como cada variável afeta a eficiência de extração de compostos com diferentes volatilidades/polaridades, o cromatograma foi dividido em 4 grupos, baseado em faixas de temperatura de eluição: 40-88 °C ( $G_1$ ), 88-135 °C ( $G_2$ ), 135-183 °C ( $G_3$ ) e 183-230 °C ( $G_4$ ). As superfícies de resposta obtidas são mostradas na Fig. 16. Para cada grupo, utilizou-se como resposta a soma das áreas de pico, e para a superfície de resposta compromisso para todos os compostos (Fig. 18), utilizou-se como resposta a média geométrica da soma das áreas de pico para cada grupo.

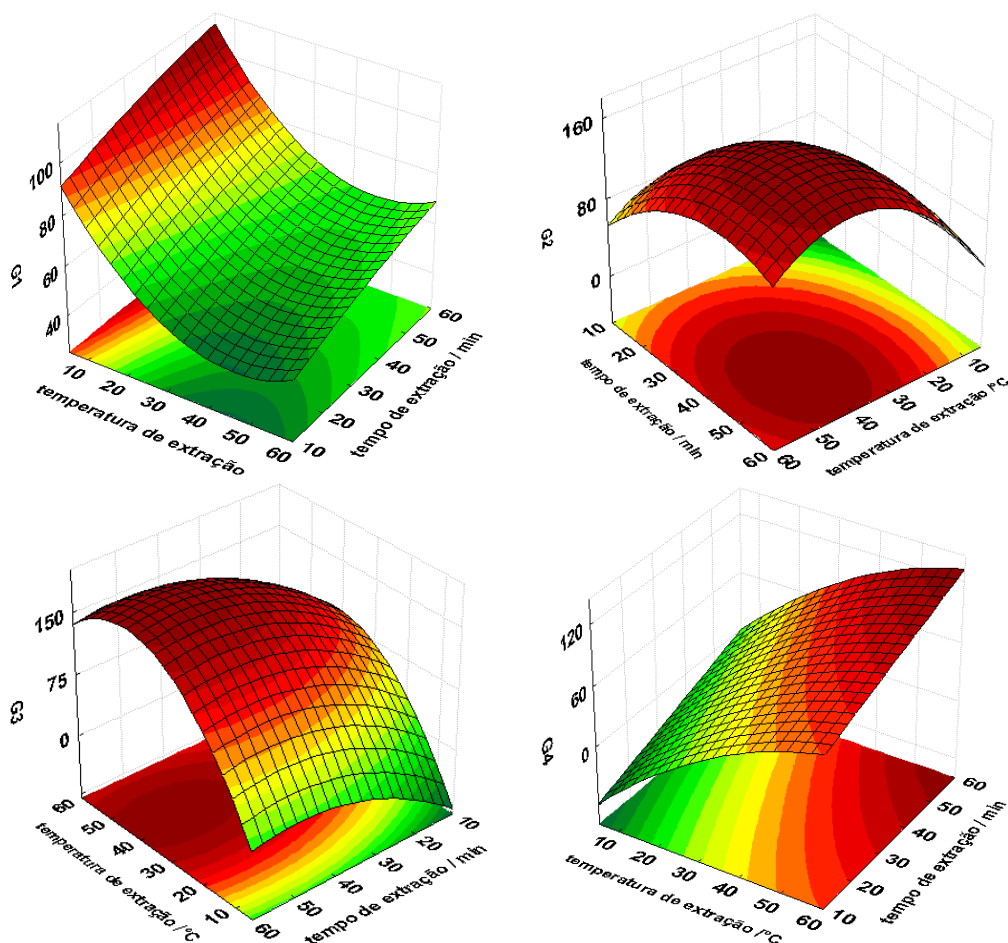


Figura 18. Superfícies de resposta obtidas pela otimização das variáveis tempo e temperatura de extração através de planejamento composto central. Massa de amostra: 100 mg, fibra: DVB/CAR/PDMS.

A Fig. 18 mostra claramente que as condições ótimas de tempo e principalmente temperatura de extração são uma função da volatilidade/polaridade dos analitos. Por exemplo, para o grupo dos mais voláteis ( $G_1$ ) observa-se que temperaturas ainda mais baixas do que  $5\text{ }^\circ\text{C}$  levam a significativa melhora na quantidade extraída relativamente a temperaturas mais altas. Este é um resultado esperado, uma vez que sendo bastante voláteis, o aumento da concentração desses compostos no headspace da amostra com o aumento da temperatura não é capaz de compensar a diminuição do valor da constante de equilíbrio dos compostos com o recobrimento. Já o comportamento frente à temperatura para os grupos  $G_2$  e  $G_3$  é bastante diferente do primeiro grupo, visto que temperaturas na faixa de  $40\text{-}50\text{ }^\circ\text{C}$  foram atribuídas como ótimas. Isto se deve a uma diminuição da volatilidade dos analitos desses grupos comparado aos mais voláteis do  $G_1$ . A superfície de resposta obtida para  $G_4$  mostra que há uma tendência de aumento da resposta com o aumento da temperatura de extração avaliada. Entretanto, temperaturas mais altas que  $60\text{ }^\circ\text{C}$  não foram estudadas de maneira a preservar a integridade dos analitos e da amostra.

De uma maneira geral, observa-se que as condições ótimas de extração (principalmente a temperatura) são bastante diferentes para cada grupo, e que qualquer condição compromisso irá comprometer a eficiência de extração para um ou mais grupos de analitos. A Fig. 19 mostra a superfície de resposta compromisso para todos os grupos.

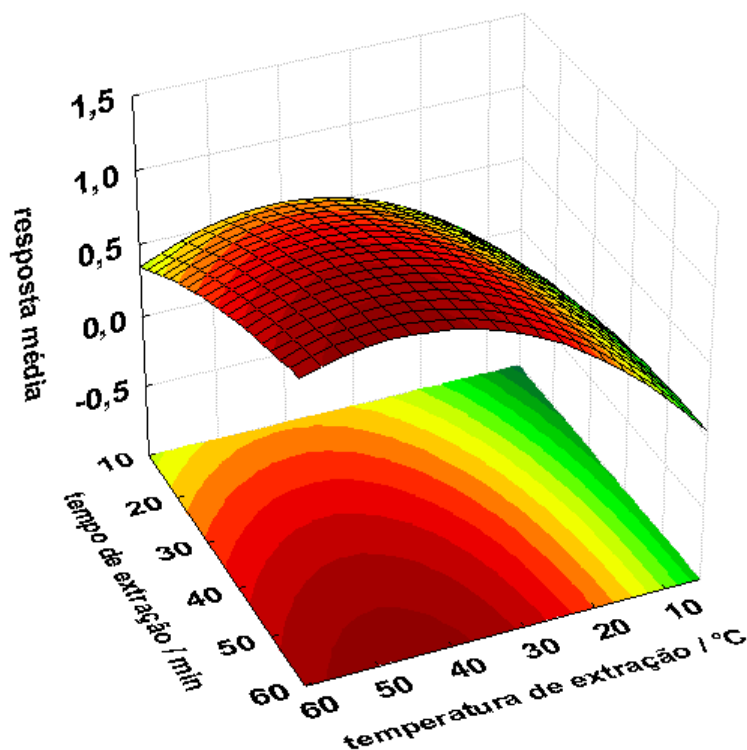


Figura 19. Superfície de resposta compromisso obtida pela avaliação de tempo e temperatura de extração para todos os grupos.

Observa-se pela Fig. 19 que a condição ótima de temperatura de extração considerando todos os compostos é de aproximadamente 50 °C. Já a condição ótima de tempo de extração parece estar localizada acima da faixa avaliada (60 min). Entretanto, levando-se em conta um compromisso entre frequência analítica e sensibilidade, 45 min de extração pode ser considerado um valor que atinge esses dois objetivos. Desta forma, a condição ótima de tempo e temperatura de extração de compostos da fração volátil de matrizes vegetais e frutas foi estabelecida como 45 min a 50 °C utilizando a fibra DVB/CAR/PDMS.

Com o objetivo de contornar os problemas relacionados às diferenças de temperatura de extração ótima para cada grupo de analitos, estudou-se a possibilidade do uso de duas temperaturas, onde na temperatura mais alta os compostos menos voláteis seriam extraídos preferencialmente, e, na temperatura mais baixa, os mais voláteis.

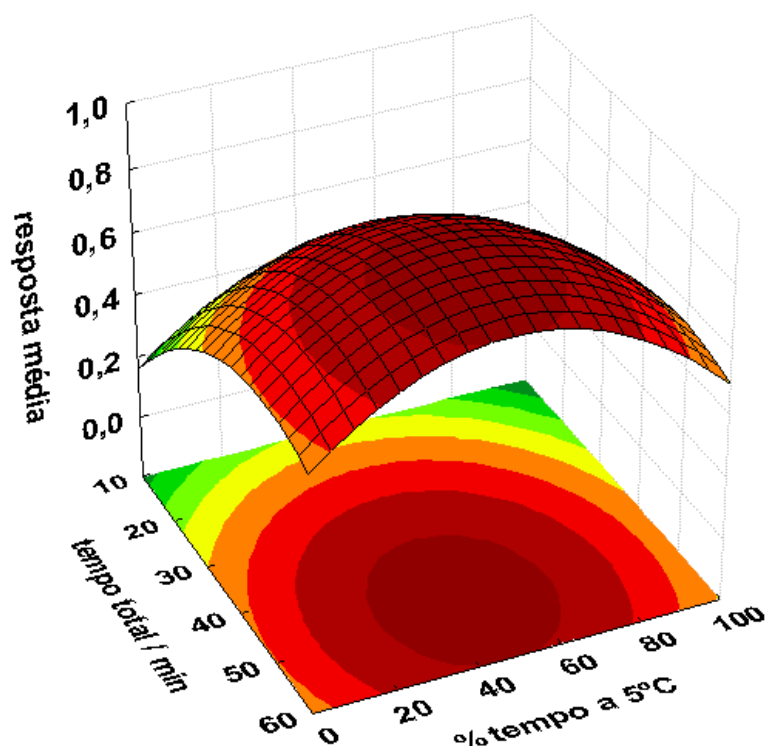


Figura 20. Superfície de resposta obtida pela otimização do tempo total de extração e fração desse tempo com a temperatura da amostra em 5 °C. Temperatura inicial: 60 °C. Fibra: DVB/CAR/PDMS. Massa de amostra: 100 mg.

As temperaturas alta e baixa foram selecionadas com base nos resultados da Fig. 18: temperatura alta de 60 °C e temperatura baixa de 5°C. Os resultados podem ser encontrados na Fig. 20, sendo a resposta utilizada para gerar a superfície a média geométrica da soma das áreas de pico para cada grupo.

De maneira a permitir uma comparação direta entre a nova metodologia de otimização proposta com a condição compromisso (convencional) baseada em uma única temperatura de extração, o tempo total de extração ótimo foi atribuído como 45 min (Fig. 20). Nesse tempo total de extração, a fração ótima dos 45 min em que a extração deve ser realizada na temperatura de 5 °C é de cerca de 33%. Assim, a condição ótima pode ser assim estabelecida: 30 min de extração a 60 °C, seguida de 15 min de extração na temperatura de 5 °C.

O perfil da Fig. 20 pode ser explicado com base nos resultados da Fig. 18. Quando a extração é realizada totalmente a 5 °C ou a 60 °C, a eficiência de extração para um ou outro grupo vai ser prejudicada. Desta

forma, a utilização de duas temperaturas de extração parece satisfazer a condição ótima (ao menos de temperatura) para diferentes grupos de analitos com volatilidades distintas presentes na amostra.

De maneira a comparar os dois métodos, cinco amostras foram submetidas aos dois procedimentos: 45 min a 50 °C (método convencional com uma única temperatura da amostra) e o método proposto nesse trabalho, que compreende 30 min de extração a 60 °C seguido de 15 min de extração a 5 °C. As Figuras 21-25 mostram os resultados obtidos para as matrizes banana, maracujá, manga, pitanga e café torrado e moído, respectivamente.

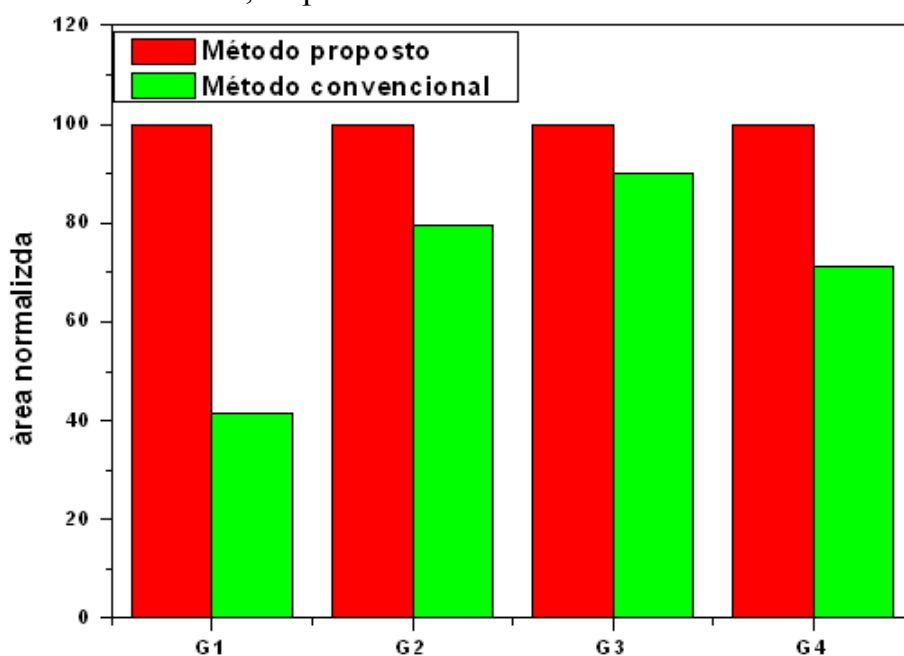


Figura 21. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis da banana.

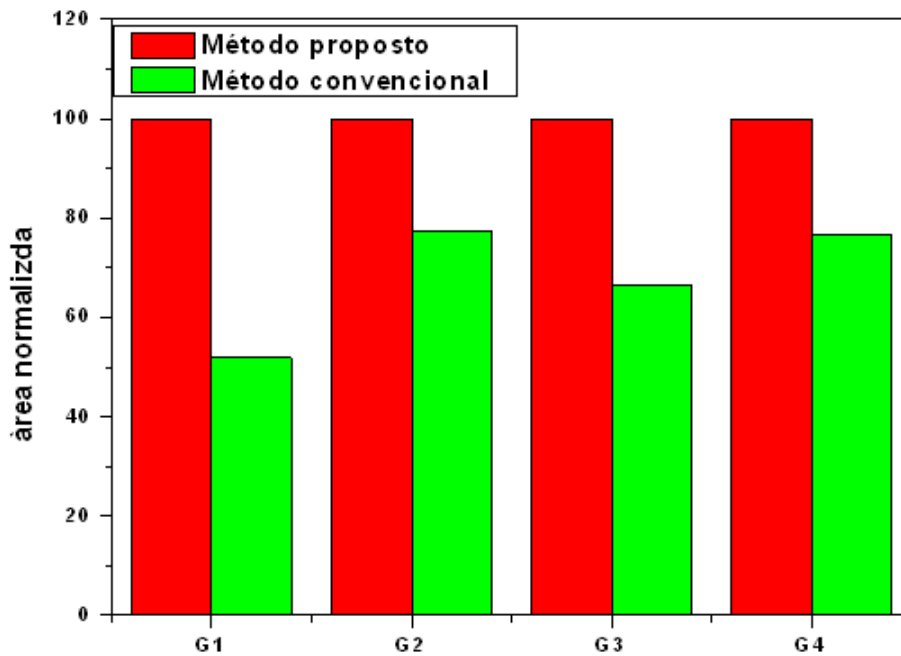


Figura 22. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de maracujá.

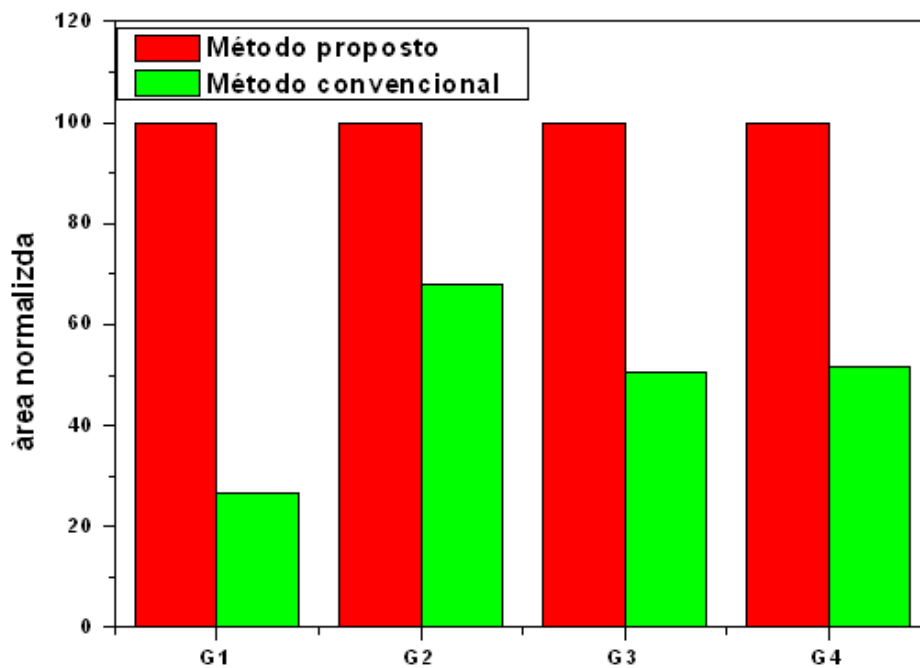


Figura 23. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de manga.



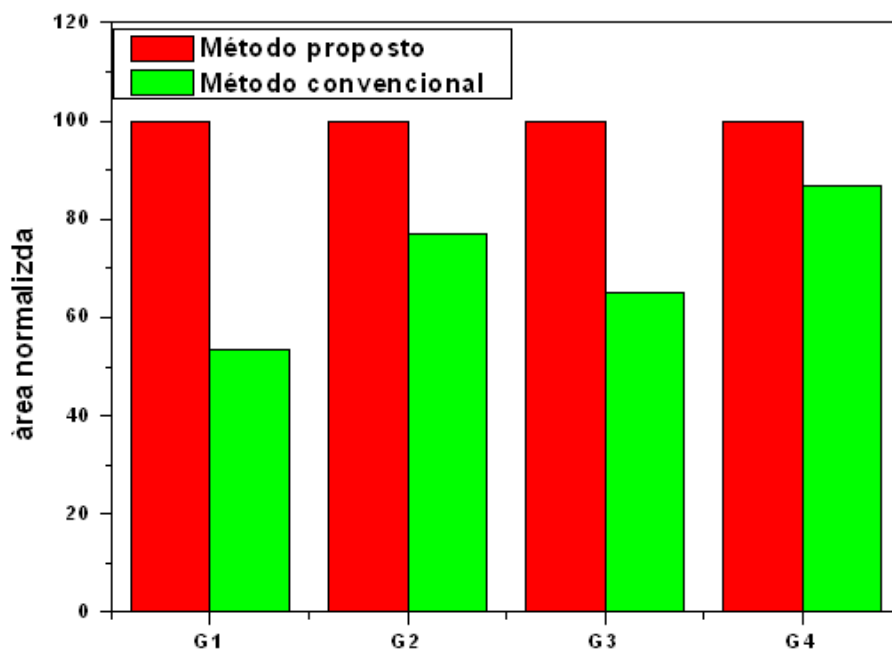


Figura 24. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de pitanga.

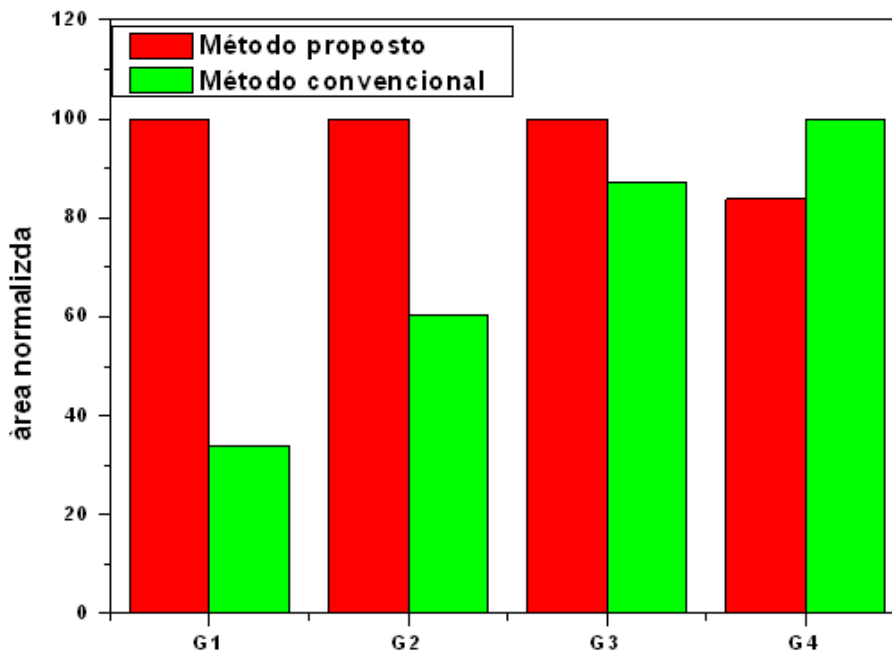


Figura 25. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração dos compostos voláteis de café torrado e moído.

Nas Figs. 21-25, observa-se que o método proposto mostrou-se mais eficiente na extração dos compostos dos quatro grupos e para todas as amostras avaliadas. As Figuras 26 e 27 mostram as comparações utilizando como resposta a área total do GC-FID (Fig. 26) ou a somatória das áreas de pico somente dos compostos que puderam ser identificados no GC-MS (Fig. 27).

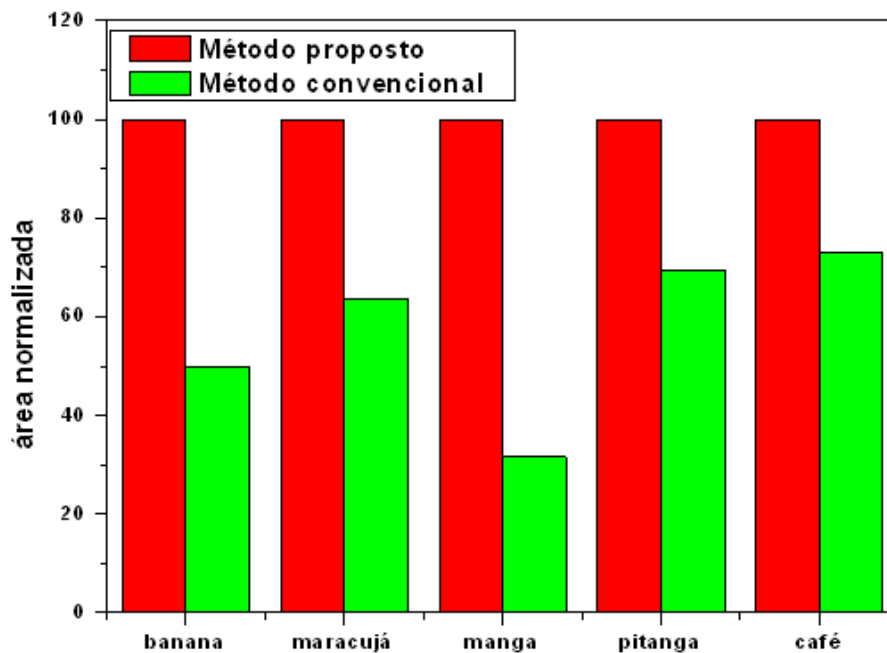


Figura 26. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta a área total do cromatograma obtido no GC-FID.

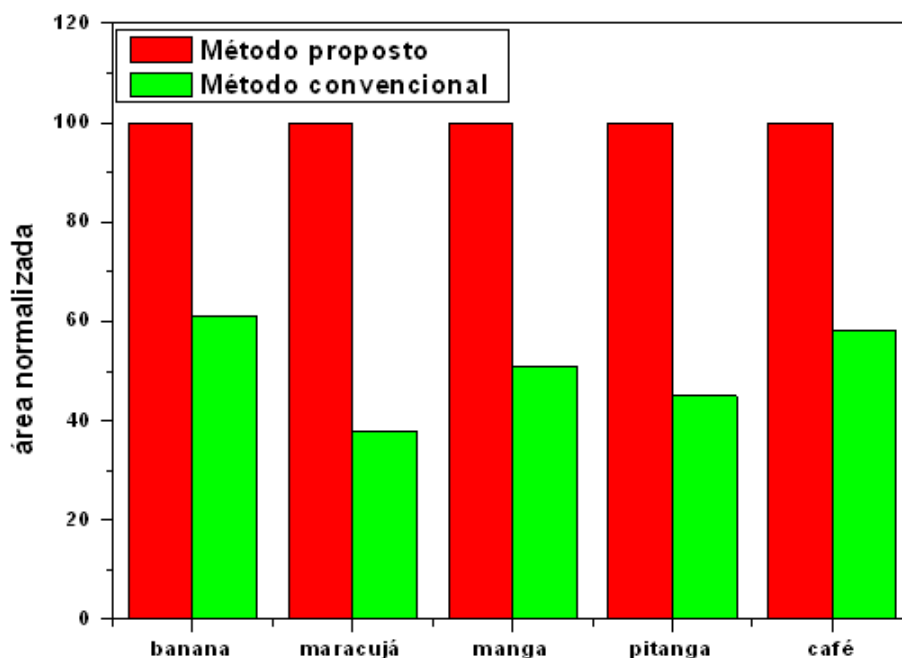


Figura 27. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta a somatória da área dos picos identificados por GC-MS.

Como pode ser visto pelas Figuras 26 e 27, o método proposto mostrou-se mais vantajoso, utilizando-se tanto como resposta tanto a área total obtida no GC-FID quanto somente a área total somente dos compostos que puderam ser identificados com probabilidade maior que 85% no GC-MS.

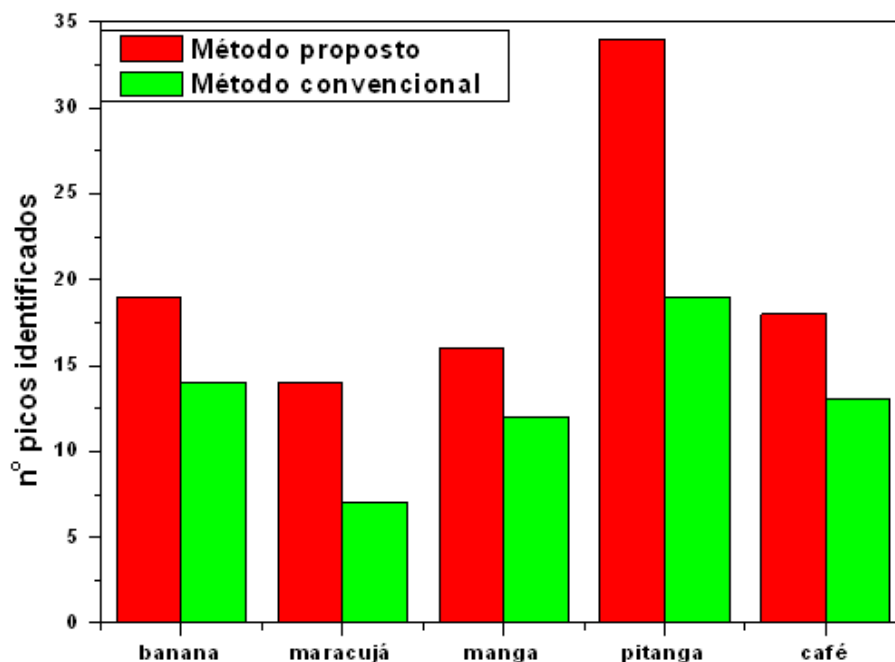


Figura 28. Comparação entre o método proposto e o convencional para extração da fração volátil de matrizes vegetais utilizando como resposta o número de picos identificados por GC-MS (similaridade maior que 85%).

Finalmente, a Figura 28 compara o número de picos identificados com similaridade maior que 85% entre o método proposto nesse trabalho baseado no uso de duas temperaturas de extração com o método convencional com uma única temperatura. Observa-se novamente que método proposto proporciona ao analista a possibilidade de identificação de um maior número de compostos na mesma amostra, devido a sua maior capacidade de extração comparado ao método convencional.

Essa versatilidade quanto à extração efetiva de compostos com volatilidades relativamente diferentes deve-se ao uso de duas temperaturas diferentes no mesmo procedimento. No período em que a extração é realizada em temperatura alta (60 °C), os compostos semi-voláteis são preferencialmente extraídos, enquanto o headspace da amostra é enriquecido pelos mais voláteis. Assim que a temperatura da amostra é diminuída (5 °C), cria-se uma condição favorável para extração dos compostos mais voláteis. Já os semi-voláteis são mais prováveis de sofrer condensação e/ou serem ad/absorvidos de volta sobre a amostra. Durante o processo de resfriamento da amostra de 60

para 5 °C e, portanto, de condensação de uma fração dos compostos presentes no headspace, há uma certa probabilidade, ainda que baixa, desses compostos condensarem sobre o recobrimento da fibra, também contribuindo para o aumento da eficiência de extração em relação ao procedimento convencional baseado em uma única temperatura de extração.

As Figs. 29-34 mostram cromatogramas ilustrativos obtidos no GC-MS através do procedimento proposto nesse trabalho.

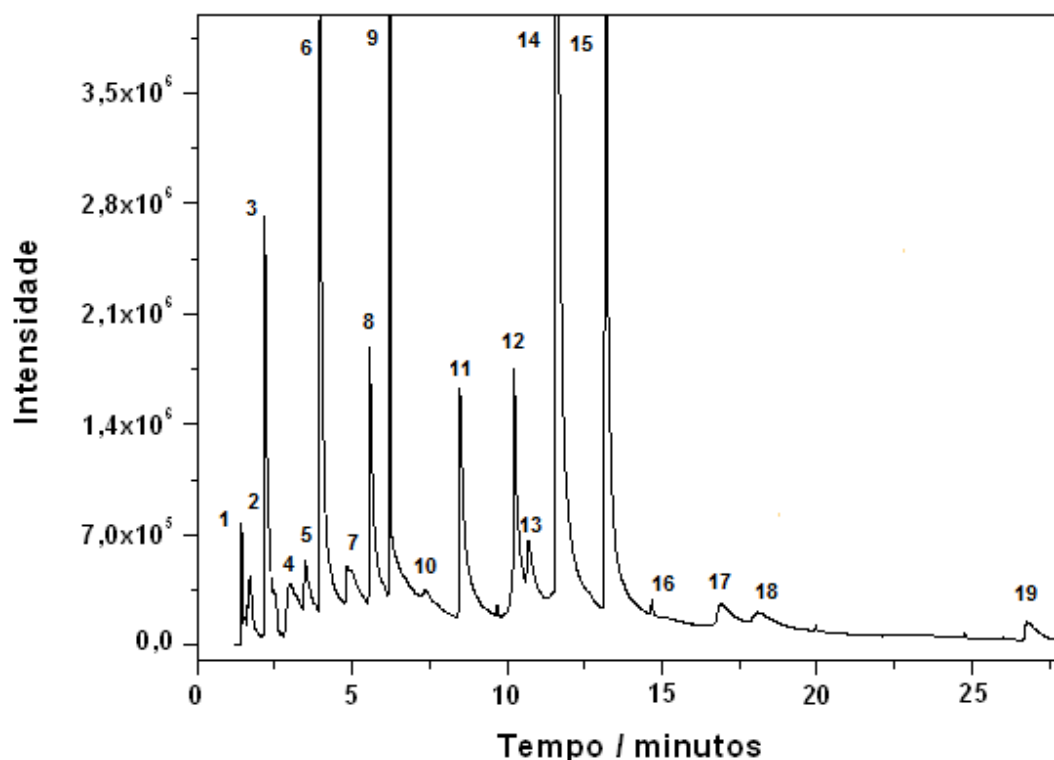


Figura 29. Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando banana como amostra. Identificação dos picos na Tabela 7.

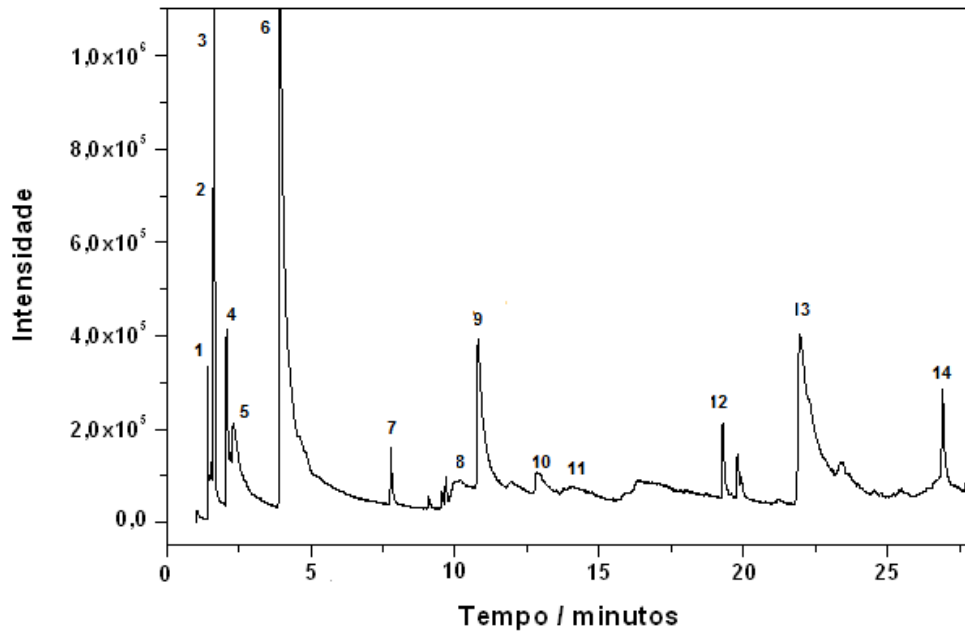


Figura 30: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando maracujá como amostra. Identificação dos picos na Tabela 8.

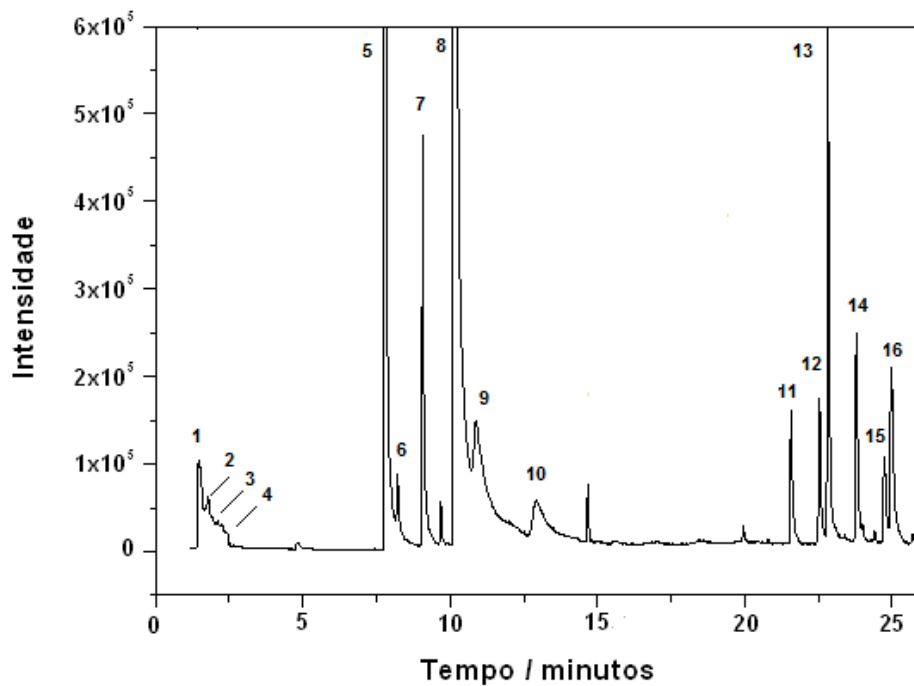


Figura 31: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando manga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 9.

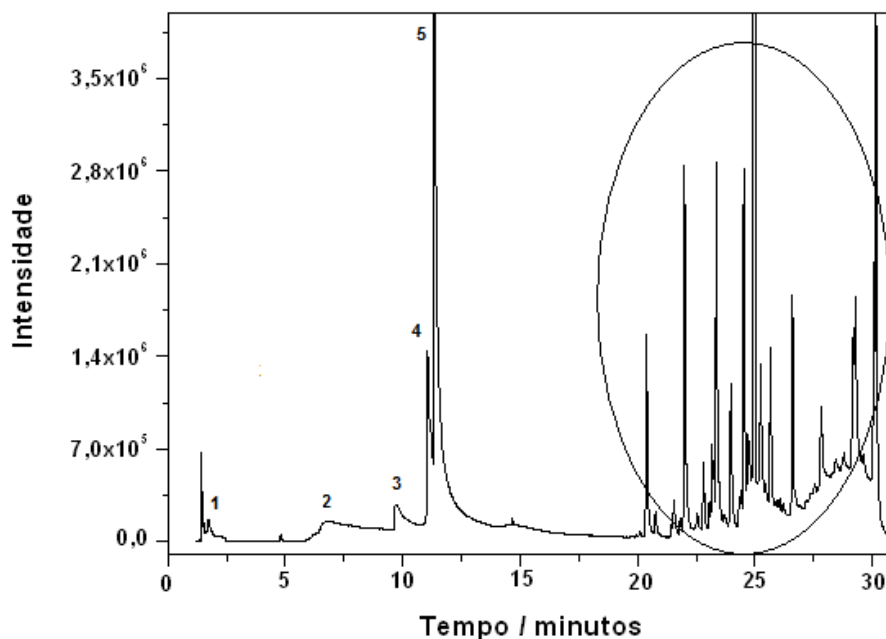


Figura 32: Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando pitanga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 10. A parte do cromatograma indicada é mostrada na Figura 33.

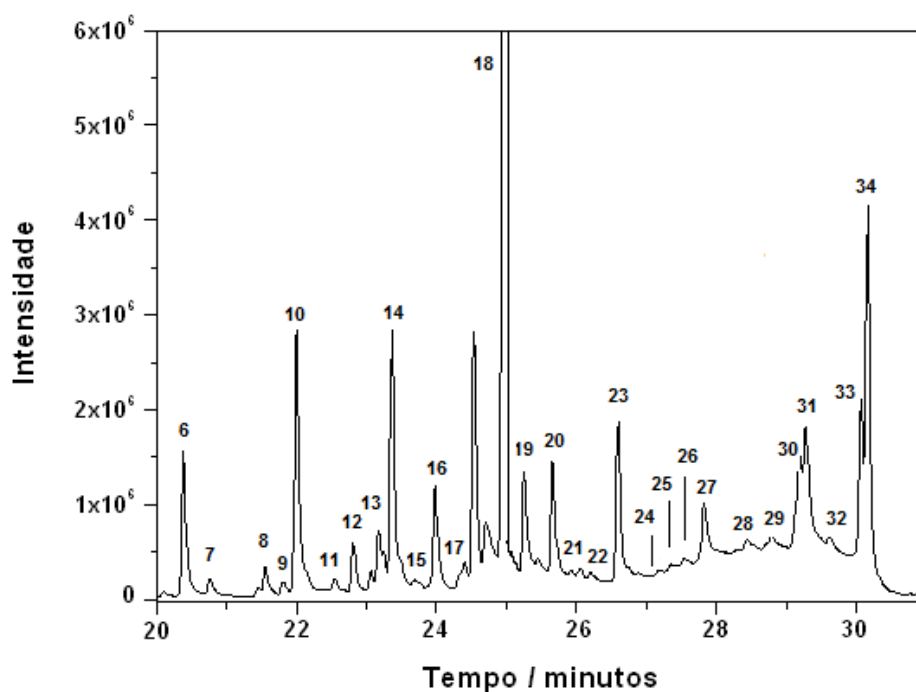


Figura 33. Cromatograma ampliado da parte circulada da Figura 30, obtido pelo método proposto utilizando pitanga como amostra. Identificação dos picos na Tabela 10.

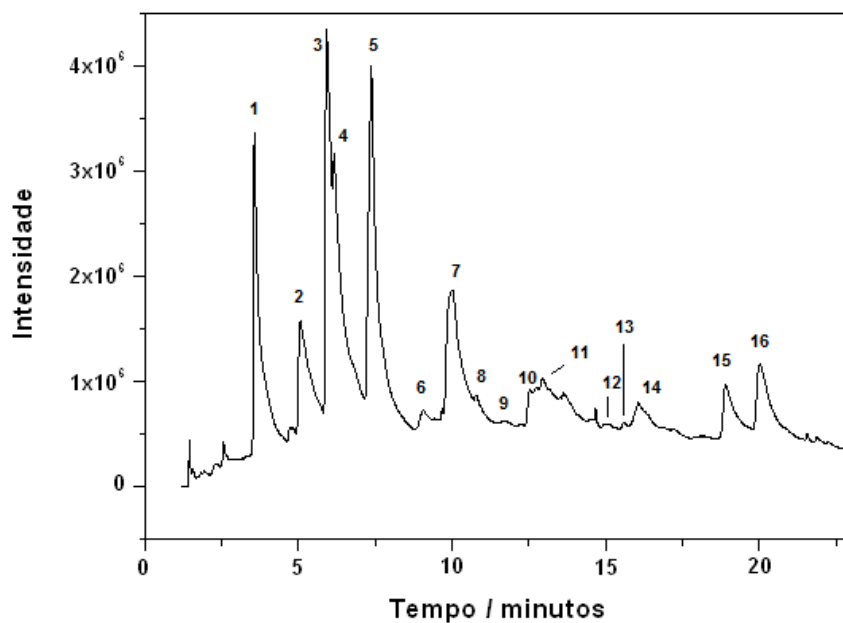


Figura 34. Cromatograma obtido pelo método proposto utilizando café torrado e moído como amostra, sem adição de água. Identificação dos picos na Tabela 11.

As Tabelas 7-11 mostram os compostos tentativamente identificados nas amostras analisadas através da comparação dos espectros de massa obtidos com aqueles contidos na biblioteca.



Tabela 7. Picos identificados pelo método proposto e convencional na banana.

Nº	t <sub>r</sub> /min	Compostos identificados
1	1,719	Etanol
2	2,186	acetato de etila
3	2,482	3-metil-butanal
4	2,996	2-pentanona
5	3,486	acetato de n-isobutila
6	3,968	acetato de n-butila
7	4,968	acetato de n-pentila
8	5,576	acetato de 2-pentanol
9	6,212	acetato de isoamila
10	7,361	Isobutirato de n-butila
11	8,483	butirato de n-butila
12	10,228	Isobutirato de isoamila
13	10,692	butirato de sec-amila
14	11,320	butanoato de n-hexila
15	11,606	butanoato de isoamila
16	13,175	3-metilbutirato de isopentila
17	16,916	butirato de 1-metil-hexila
18	18,089	Hexanoato de de isoamila
19	26,799	3,4,5-trimetoxialilbenzeno

Tabela 8. Picos identificados pelo método proposto no maracujá.

Nº	t <sub>r</sub> /min	Compostos identificados
1	1,535	Acetaldeído
2	1,715	Etanol
3	2,074	3-metilpentano
4	2,196	Hexano
5	2,317	acetato de etila
6	2,731	2,2-dimetilpropano
7	7,782	Alfa-pineno
8	10,050	Beta-mirceno
9	10,799	Limoneno
10	12,875	(+)-4-Careno
11	12,943	Alpha-terpinoleno
12	19,291	2,6,10,10-Tetrametil-1-oxa-spiro[4.5]dec-6-ene
13	21,968	Hexanoato de n-hexila
14	26,914	1-Metil-3-(2,6,6-trimetil-1-ciclohexen-1-il)propil acetato

Tabela 9. Picos identificados pelo método proposto na manga.

<b>Nº</b>	<b>t<sub>r</sub>/min</b>	<b>Compostos identificados</b>
1	1,534	Acetaldeído
2	1,774	sulfeto de dimetila
3	2,091	3-metilpentano
4	2,228	1,6;3,4-Dianidro-2-deoxi-beta-d-ribo-hexopiranosose
5	7,762	alfa-pineno
6	8,217	Canfeno
7	9,068	Beta-pinene
8	10,110	3-Carene
9	10,869	Limoneno
10	12,948	4-Careno
11	21,572	Alfa-copaeno
12	22,543	Alfa-gurjuneno
13	22,827	Beta-cariofileno
14	23,792	Alfa-cariofileno
15	24,738	Eudesma-4(14),11-dieno
16	24,983	delta-guaiaeno

Tabela 10. Picos identificados pelo método proposto na pitanga

Nº	t <sub>r</sub> /min	Compostos identificados
1	1,731	Acetona
2	6,747	3-hexen-1-ol
3	9,700	beta-mirceno
4	11,050	trans-3,7-Dimetil-1,3,6-Octatrieno
5	11,342	cis-3,7-Dimetil-1,3,6-Octatrieno
6	20,386	o-Ment-8-eno, 4-isopropilideno-1-vinil
7	21,996	beta-Elemeno
8	22,545	alfa-gurjuneno
9	22,814	beta-Cariofileno
10	23,176	gama-Elemeno
11	23,364	L-aloaromadendreno
12	23,983	1,1,7-Trimetil-4-metilenodecaidro-1H-ciclopropa[e]azuleno
13	24,402	beta-guaieno
14	24,536	Germacreno D
15	24,710	beta-Eudesmeno
16	24,997	5-Isopropenil-3,6-dimetil-6-vinil-4,5,6,7-tetraidro-1-benzofurano
17	25,449	gama-Cadineno
18	25,659	delta-Cadineno
19	26,059	alfa-guaieno
20	26,201	Eudesma-3,7(11)-dieno
21	26,596	gama-Elemeno
22	26,889	d-Ledol
23	27,186	(-)-Espatulenol
24	27,347	Viridiflorol
25	27,548	Epiglobulol
26	27,820	Germacrona
27	28,444	Cubenol
28	28,794	delta-Cadinol
29	29,188	Triciclo[8.6.0.0(2,9)]hexadeca-3,15-dieno, trans-2,9-anti-9,10-cis-1,10
30	29,280	Triciclo[8.6.0.0(2,9)]hexadeca-3,15-dieno, cis-2,9-anti-9,10-cis-1,10-
31	29,613	4-(3,5-Dimetil-2-benzofuranil)-2-butanona
32	30,070	Triciclo[8.6.0.0(2,9)]hexadeca-3,15-dieno, trans-2,9-anti-9,10-trans-1,10-
33	30,161	10-Isopropenil-3,7-ciclodecadien-1-ona

Tabela 11. Picos identificados pelo método proposto no café torrado e moído.

Nº	t <sub>r</sub> /min	Compostos identificados
1	3,562	Piridina
2	5,071	2-metilpirazina
3	5,925	2-furfuranol
4	6,158	3-furfuranol
5	7,363	2,6-dimetilpirazina
6	9,059	cis-geraniol
7	10,012	acetato de 2-furfuranol
8	10,779	Limoneno
9	11,640	1,5,7-octatrien-3-ol
10	12,538	3-etil-2,5-dimetilpirazina
11	12,735	2-etil-3,5-dimetilpirazina
12	15,047	2,3,5-trimetil-6-etilpirazina
13	15,590	1-(3-Isobutil-2-pirazinil)-1-propanona
14	16,059	1-(2-furanilmetil)-1H-Pirrol
15	18,899	4-etil-guaiacol
16	20,019	4-vinil-guaiacol
17	21,867	beta-Damascenona
18	22,230	3-metil-5-propilnonano

### Conclusões parciais

A nova abordagem proposta nessa parte do trabalho baseada no uso de duas temperaturas de extração no mesmo procedimento mostrou-se uma alternativa bastante interessante em relação ao procedimento convencional, uma vez que o método proposto extraiu uma maior quantidade de compostos com volatilidades diferentes, e, principalmente, permitiu que uma maior quantidade de compostos pudesse ser identificada com segurança no sistema GC-MS. Neste estudo e para as matrizes avaliadas, duas temperaturas da amostra se mostraram eficientes. Entretanto, para extração eficiente de misturas de compostos com volatilidades ainda mais distintas e, dependendo da complexidade da amostra, é possível que o uso três ou mais temperaturas sejam requeridas. Ou ainda, o desenvolvimento de um banho termostatizado com programação de temperatura, no qual seja possível ajustar temperatura inicial, taxa de resfriamento e temperatura final, pode facilitar tanto a automação desse procedimento quanto aumentar ainda mais sua eficiência e aplicabilidade.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Com relação aos métodos desenvolvidos com a técnica de CF-SPME, os resultados obtidos permitiram verificar que a temperatura do recobrimento afeta tanto a termodinâmica quanto a velocidade de extração dos analitos presentes em fase gasosa. Termodinamicamente, há sempre uma melhora na quantidade extraída com a diminuição da temperatura do recobrimento, mas a cinética de extração mostrou-se estar intimamente ligada à facilidade de difusão dos compostos pelo revestimento de PDMS. Em outras palavras, quanto menos volátil e menor a temperatura do recobrimento, menor a taxa de extração. Desta forma, o método proposto nesse trabalho que utiliza duas temperaturas da fibra mostrou-se interessante e eficiente, pois proporciona que analitos de diferentes volatilidades possam ser eficientemente extraídos pelo recobrimento de PDMS em um único procedimento de extração. Deve-se ressaltar que esse procedimento de mudança de temperatura da fibra pode ser facilmente automatizado, bastando para isso somente programar adequadamente o controlador de temperatura do dispositivo de CF. A automação deste procedimento também pode torná-lo ainda mais eficiente, visto que não somente duas temperaturas da fibra, mas tantas quantas forem necessárias poderiam ser utilizadas, aumentando ainda mais a quantidade extraída de compostos com volatilidades distintas e simultaneamente minimizando o tempo total de extração.

A dessorção dos compostos estudados, HPA e EF, de matrizes como solo e sílica é mais influenciada pela umidade da amostra do que pela temperatura de extração somente. O método proposto combinando uma temperatura da amostra que minimizasse as perdas por vazamento e com adição de água em excesso mostrou-se muito mais eficiente na dessorção dos analitos da matriz sólida do que somente o uso de alta temperatura da amostra. Além disso, pela primeira vez, propôs-se um método analítico baseado em SPME no qual dois modos de extração são utilizados no mesmo procedimento. Embora os fundamentos teóricos da SPME já tenham sido bastante discutidos e explorados, e o procedimento proposto seja termodinamicamente “permitido” pela Eq. 6, não há relatos na literatura da utilização dos dois modos de extração no mesmo procedimento.

De uma maneira geral, deve-se destacar que tanto a técnica de SPME convencional (não-refrigerada) quanto CF-SPME são poderosas

ferramentas analíticas para o preparo de amostras para análise cromatográfica. Entretanto, as variáveis que interferem na eficiência de ambos os sistemas o fazem tanto nas questões termodinâmicas quanto na cinética de transferência de massa. Assim, otimizar esses parâmetros torna-se um desafio, e, a utilização de métodos multivariados, tais como metodologias de superfície de resposta e planejamentos fatoriais, torna-se praticamente inevitável.

A técnica de CF-SPME, embora o primeiro artigo no assunto tenha sido publicado em 1995, foi pouco explorada até o momento. Desta forma, ainda há muito que ser feito, como explorar novas fases extratoras, aplicar em matrizes que não foram estudadas até o momento, utilizar o recobrimento como meio orgânico para derivatização de compostos na fibra, miniaturização adicional do sistema, etc. Outra perspectiva promissora seria o acoplamento da técnica de CF-SPME, ou seja, de grande capacidade de extração, com um método de grande capacidade de separação, tal como a cromatografia bidimensional abrangente (GCxGC).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] M. Tobiszewski, A. Mechlińska, B. Zygmunt, J. Namieśnik, Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 28, (2009) 943.
- [2] M. Bröhan, T. Huybrighs, C. Wouters, B. Van der Bruggen, Influence of storage conditions on aroma compounds in coffee pads using static headspace GC–MS. *Food Chemistry*, 116, (2009) 480.
- [3] A. Thierry, M. -B. Maillard, J. -L. Le Quéré, Dynamic headspace analysis of Emmental aqueous phase as a method to quantify changes in volatile flavour compounds during ripening. *International Dairy Journal*, 9, (1999) 453.
- [4] I. Harrison, R.U. Leader, J.J.W. Higgo, J.C. Tjell, Determination of organic pollutants in small samples of groundwaters by liquid-liquid extraction and capillary gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 688, (1994) 181.
- [5] S. B. Hawthorne, C. B. Grabanski, E. Martin, D. J. Miller, Comparisons of Soxhlet extraction, pressurized liquid extraction, supercritical fluid extraction and subcritical water extraction for environmental solids: recovery, selectivity and effects on sample matrix. *Journal of Chromatography A*, 892, (2000) 421.
- [6] B. Jurado-Sánchez, E. Ballesteros, M. Gallego, Comparison of several solid-phase extraction sorbents for continuous determination of amines in water by gas chromatography–mass spectrometry. *Talanta*, 79, (2009) 613.
- [7] E. Carasek, J. W. Tonjes, M. Scharf, A new method of microvolume back-extraction procedure for enrichment of Pb and Cd and determination by flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 56, (2002) 185.
- [8] C. L. Arthur, J. Pawliszyn, Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. *Analytical Chemistry* 62, (1990) 2145.
- [9] J. Pawliszyn, *Solid-phase microextraction: Theory and Practice*. Wiley-VHC, 1997.

- [10] Z. Zhang, J. Pawliszyn, Quantitative Extraction Using an Internally Cooled Solid Phase Microextraction Device, *Analytical Chemistry*, 67, (1995) 34.
- [11] Y. Chen, J. Pawliszyn, Miniaturization and Automation of an Internally Cooled Coated Fiber Device. *Analytical Chemistry*, 78, (2006) 5222.
- [12] A.R. Ghiasvand, S. Hosseinzadeh, J. Pawliszyn, New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment, *Journal of Chromatography A*, 1124, (2006) 35.
- [13] E. Carasek, J. Pawliszyn, Screening of tropical fruit volatile compounds using solid-phase microextraction (SPME) fibers and internally cooled SPME fiber, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, (2006) 8688.
- [14] E. Carasek, E. Cudjoe, J. Pawliszyn, Fast and sensitive method to determine chloroanisoles in cork using an internally cooled solid-phase microextraction fiber. *Journal of Chromatography A*, 1138, (2007) 10.
- [15] A. R. Ghiasvand, L. Setkova, J. Pawliszyn, Determination of flavour profile in Iranian fragrant rice samples using cold-fibre SPME–GC–TOF–MS. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, (2007) 377.
- [16] Y. Chen, F. Begnaud, A. Chaintreau, J. Pawliszyn, Analysis of flavor and perfume using an internally cooled coated fiber device. *Journal of Separation Sciences*, 30, (2007) 1037.
- [17] Y. Chen, F. Begnaud, A. Chaintreau, J. Pawliszyn, Quantification of perfume compounds in shampoo using solid-phase microextraction. *Flavour and Fragrance Journal*, 21, (2006) 822.
- [18] S.H. Haddadi, V.H. Niri, J. Pawliszyn, Study of desorption kinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) from solid matrices using internally cooled coated fiber, *Analytica Chimica Acta* (2008). doi:10.1016/j.aca.2009.05.026. No prelo.



- [19] L. Sanchez-Prado, S. Risticovic, J. Pawliszyn, E. Psillakis, Low temperature SPME device: A convenient and effective tool for investigating photodegradation of volatile analytes. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 206, (2009) 227.
- [20] S. H. Haddadi, J. Pawliszyn, Cold fiber solid-phase microextraction device based on thermoelectric cooling of metal fiber. *Journal of Chromatography A*, 1216, (2009) 2783.
- [21] K. Chia, T. Lee, S. Huang, Simple device for the solid-phase microextraction screening of polychlorodibenzo-p-dioxins and polychlorodibenzofurans in heavily contaminated soil samples. *Analytica Chimica Acta*, 527, (2004) 157.
- [22] M. Riu-Aumatell, M. Castellar, E. López-Tamames, S. Galassi, S. Buxaderas, Characterisation of volatile compounds of fruit juices and nectars by HS/SPME and GC/MS. *Food Chemistry*, 87, (2004) 627.
- [23] A. Verzera, G. Dima, G. Tripodi, M. Ziino, C. M. Lanza, A. Mazzaglia, Fast quantitative determination of aroma volatile constituents in melon fruits headspace-solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Food Analytical Methods* (2010).
- [24] F. Augusto, A. L P. Valente, E. S. Tada, S. R. Rivellino, Screening of Brazilian fruit aromas using solid-phase microextraction–gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 873, (2000) 1170.
- [25] M. M. Mazida, M. M. Salleh, H. Osman, Analysis of volatile aroma compounds of fresh chilli (*Capsicum annum*) during stages of maturity using solid phase microextraction (SPME). *Journal of Food Composition and Analysis*, 18, (2005) 427.
- [26] P. Díaz, E. Ibáñez, G. Reglero, F. J. Señoráns, Optimization of summer truffle aroma analysis by SPME: Comparison of extraction with different polarity fibres. *LWT - Food Science and Technology*, 42, (2009) 1253.

- [27] P. A. Abrodo, D. D. Llorente, S. J. Corujedo, E. D. Fuente, M. D. G. Álvarez, D. B. Gomis, Characterisation of Asturian cider apples on the basis of their aromatic profile by high-speed gas chromatography and solid-phase microextraction. *Food Chemistry*, 121, (2010) 1312.
- [28] A. P. Oliveira, L. R. Silva, P. G. Pinho, A. Gil-Izquierdo, P. Valentão, B. M. Silva, J. A. Pereira, P. B. Andrade, Volatile profiling of *Ficus carica* varieties by HS-SPME and GC-IT-MS. *Food Chemistry*, 123, (2010) 548.
- [29] Y. Wang, C. Yang, S. Li, L. Yang, Y. Wang, Y. J. Zhao, Q. Jiang, Volatile characteristics of 50 peaches and nectarines evaluated by HS-SPME with GC-MS. *Food Chemistry*, 116, (2009) 356.
- [30] S. B. Hawthorne, D. J. Miller, J. Pawliszyn, C. L. Arthur, Solventless determination of caffeine in beverages using solid-phase microextraction with fused-silica fibers. *Journal of Chromatography A*, 603 (1992) 185.
- [31] Z. Zhang, M. J. Yang, J. Pawliszyn, Solid-Phase Microextraction, *Analytical Chemistry*, 66, (1994) 844A.
- [32] C. Bicchi, C. Cordero, E. Liberto, B. Sgorbini, P. Rubiolo, Reliability of fibres in solid-phase microextraction for routine analysis of the headspace of aromatic and medicinal plants. *Journal of Chromatography A*, 1152, (2007) 138.
- [33] C. W. Ho, W. M. Wan Aida, M. Y. Maskat, H. Osman, Optimization of headspace solid phase microextraction (HS-SPME) for gas chromatography mass spectrometry (GC-MS) analysis of aroma compound in palm sugar (*Arenga pinnata*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, (2006) 822.

[34] C. M. Kalua, D. R. Bedgood Jr., P. D. Prenzler, Development of a headspace solid phase microextraction-gas chromatography method for monitoring volatile compounds in extended time-course experiments of olive oil. *Analytica Chimica Acta*, 556, (2006) 407.

[35] S. Ducki, J. Miralles-Garcia, A. Zumbé, A. Tornero, D. M. Storey, Evaluation of solid-phase micro-extraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the headspace analysis of volatile compounds in cocoa products. *Talanta*, 74, (2008) 1166.

### **Produção científica durante o período de pós-graduação**

- 1) Martendal, E., Carasek, E. A new optimization strategy for gaseous phase sampling by an internally-cooled solid-phase microextraction technique. *Journal of Chromatography A (Aceito)*, 2011.
- 2) Augusto, Fabio, Carasek, Eduardo, Silva, Raquel Gomes Costa, Rivellino, Sandra Regina, Batista, Alex Domingues, Martendal, Edmar  
New sorbents for extraction and microextraction techniques. *Journal of Chromatography A*, v.1217, p.2533 - 2542, 2010.
- 3) Martendal, E., Budziak, D., Carasek, E. Application of fractional factorial experimental and Box-Behnken designs for optimization of single-drop microextraction of 2,4,6-trichloroanisole and 2,4,6-tribromoanisole from wine samples. *Journal of Chromatography*, v.1148, p.131 - 136, 2007.
- 4) Martendal, E., Budziak, D., Debastiani, R., Carasek, E. Determination of Haloanisoles in Paper Samples for Food Packaging by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Microchimica Acta (Online)*, v.159, p.229 - 234, 2007.
- 5) Maranhão, T. A., Martendal, E., Borges, D. L. G., Carasek, E., Welz, B., Curtius A. J. Cloud point extraction for the determination of lead and cadmium in urine by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multivariate optimization

- using Box–Behnken design. *Spectrochimica Acta. Part B, Atomic Spectroscopy.* , v.62, p.1019 - 1027, 2007.
- 6) Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E. Preparation and application of NiTi alloy coated with ZrO<sub>2</sub> as a new fiber for solid-phase microextraction. *Journal of Chromatography.* , v.1164, p.18 - 24, 2007.
  - 7) Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E. Application of NiTi alloy coated with ZrO<sub>2</sub> as a new fiber for solid-phase microextraction for determination of halophenols in water samples. *Analytica Chimica Acta.* , v.598, p.254 - 260, 2007.
  - 8) Budziak, Dilma, Martendal, Edmar, Carasek, Eduardo. Application of an NiTi alloy coated with ZrO<sub>2</sub> solid-phase microextraction fiber for determination of haloanisoles in red wine samples. *Mikrochimica Acta.* , v.164, p.197 - 202, 2008.
  - 9) Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E. Preparation and characterization of new solid-phase microextraction fibers obtained by sol-gel technology and zirconium oxide electrodeposited on NiTi alloy. *Journal of Chromatography.* v.1187, p.34 - 39, 2008.
  - 10) Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E. New poly(ethylene glycol) solid-phase microextraction fiber employing zirconium oxide electrolytically deposited onto a NiTi alloy as substrate for sol-gel reactions. *Journal of Chromatography.* , v.1198-1199, p.54 - 58, 2008.
  - 11) Budziak, D., Martendal, E., Carasek, E. Application of robust NiTi–ZrO<sub>2</sub>–PEG SPME fiber in the determination of haloanisoles in cork stopper samples. *Analytica Chimica Acta.* , v.629, p.92 - 97, 2008.
  - 12) Budziak, Dilma, Martendal, Edmar, Carasek, Eduardo. Application of poly(dimethylsiloxane) fiber sol-gel coated onto NiTi alloy electrodeposited with zirconium oxide for the determination of organochlorine pesticides in herbal infusions. *Journal of Separation Science.* , v.31, p.2875 - 2881, 2008.
  - 13) Santos, Marcel Silveira dos, Budziak, Dilma, Martendal, Edmar, Carasek, Eduardo. Determination of Phthalates and Adipate in Physiological Saline Solutions by Solid-Phase Microextraction and Gas Chromatography. *Analytical Sciences.* , v.25, p.865 - 868, 2009.
  - 14) Suchara, E. A., Martendal, E., Budziak, D., Costa, L. F., Carasek, E.

- A combination of statistical and analytical evaluation methods as a new optimization strategy for the quantification of pharmaceutical residues in sewage effluent. *Analytica Chimica Acta.* , v.613, p.169 - 176, 2008.
- 15) Alves, Vanessa Nunes, Mosquetta, Rafael, Coelho, Nívia Maria Melo, Bianchin, Joyce Nunes, Di Pietro Roux, Kalya Cravo, Martendal, Edmar, Carasek, Eduardo. Determination of cadmium in alcohol fuel using *Moringa oleifera* seeds as a biosorbent in an on-line system coupled to FAAS. *Talanta (Oxford).* , v.80, p.1133 - 1138, 2010.
  - 16) Bianchin, J., Martendal, E., Mior, R., Alves, V., Araujo, C., Coelho, N., CARASEK, E. Development of a flow system for the determination of cadmium in fuel alcohol using vermicompost as biosorbent and flame atomic absorption spectrometry. *Talanta (Oxford).* , v.78, p.333 - 336, 2008.
  - 17) Martendal, E., Maltez, H., Carasek, E. Speciation of Cr(III) and Cr(VI) in environmental samples determined by selective separation and preconcentration on silica gel chemically modified with niobium(V) oxide. *Journal of Hazardous Materials.* , v.161, p.450 - 456, 2009.
  - 18) Roux, Kalya Cravo Di Pietro, Martendal, E., Carletto, J. S., Maltez, H. F., CARASEK, E. Application of factorial design and Doehlert matrix for determination of trace lead in environmental samples by on-line column preconcentration F AAS using silica gel chemically modified with niobium (V) oxide. *Analytical Sciences.* , v.24, p.365 - 370, 2008.
  - 19) Bianchin, J. N., Martendal, E., Carletto, J. S., Mior, R., Carasek, E. Otimização multivariada e aplicação do sorvente SiO<sub>2</sub>-Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> para determinação em linha de Ni(II) em matriz aquosa. *Eclética Química (Araraquara).* , v.23, p.25 - 32, 2008.
  - 20) Carletto, J., Roux, K., Martez, H., Martendal, E., Carasek, E. Use of 8-hydroxyquinoline-chitosan chelating resin in an automated on-line preconcentration system for determination of zinc(II) by F AAS. *Journal of Hazardous Materials.* , v.157, p.88 - 93, 2008.