

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS FÍSICAS E MATEMÁTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MAYARA SANTANA PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS DE
LIGNINA EM SEDIMENTOS POR SPME-GC/FID**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção de título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química Analítica

Orientador: Luiz Augusto dos Santos Madureira

Florianópolis

2015

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

Pinto, Mayara

Desenvolvimento de metodologia analítica para a
determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos
por SPME-GC/FID. / Mayara Pinto ; orientador, Luiz Augusto
dos Santos Madureira - Florianópolis, SC, 2015.

66 p.

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

Inclui referências

1. Química. 2. Lignina. 3. BSTFA. 4. SPME. 5. FID. I.
Augusto dos Santos Madureira, Luiz. II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Química. III. Título.

MAYARA SANTANA PINTO

**DESENVOLVIMENTO DE METODOLOGIA ANALÍTICA
PARA A DETERMINAÇÃO DE DERIVADOS FENÓLICOS DE
LIGNINA EM SEDIMENTOS POR SPME-GC/FID**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química,
Centro de Ciências Físicas e Matemáticas da Universidade Federal de
Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre
em Química pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof.^a Dra. Cristiane Luisa Jost

Prof.^a Dra. Dilma Budziak

Prof.^a Dra. Vera L. A. Frescura Bascunã

RESUMO

Neste trabalho avaliou-se a eficiência da extração de derivados fenólicos de lignina, mais especificamente, os compostos acetossiringona, acetovanilona, os ácidos *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, síringico e vanílico, vanilina e siringaldeído através da pré-concentração destes analitos em uma fibra de poliacrilato (85 μm) seguido da análise por cromatografia a gás com detecção por ionização em chama (SPME-GC/FID). Devido à massa molar dos derivados de lignina ser relativamente alta (por exemplo, acetossiringona 196,2 g mol^{-1}) fez-se necessária uma adequação do método para a análise por GC/FID. Os compostos foram submetidos a uma reação de derivação com o agente silanizante *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA). As etapas de extração e derivação dos compostos seguiram dois procedimentos: o primeiro, extração seguido de derivação; o segundo, sorção do agente derivatizante na fibra e posterior extração dos analitos. O objetivo principal foi desenvolver uma metodologia analítica capaz de proporcionar a determinação dos derivados de lignina em amostras de sedimentos. Tais compostos são uma subclasse dos biomarcadores geoquímicos de grande importância em estudos sobre transporte de matéria orgânica na interface continente-oceano. Em relação às variáveis estudadas, para se obter as melhores condições de extração e separação, verificou-se a influência do volume de agente silanizante, sendo o mais adequado 60 μL de BSTFA por amostra. Para os parâmetros temperatura, tempo de extração e de sorção em BSTFA na fibra, as melhores respostas foram obtidas com os valores de 80 °C, 35 e 15 minutos, respectivamente. Aplicou-se o método proposto em matrizes sedimentares, o qual apresentou boa linearidade em uma faixa de 35 a 225 $\mu\text{g g}^{-1}$ para a acetossiringona, acetovanilona, vanilina e o siringaldeído e de 2500 a 9000 $\mu\text{g g}^{-1}$ para os demais analitos. Os limites de quantificação obtidos variaram entre 73 e 2471 $\mu\text{g g}^{-1}$, para a vanilina e para o ácido vanílico, respectivamente. O método mostrou-se adequado para a determinação desses derivados fenólicos em matrizes ambientais reduzindo consideravelmente o grande volume do solvente utilizado nos procedimentos convencionais de extração e análise por GC/FID.

Palavras-chave: lignina; BSTFA; SPME; derivação; cromatografia a gás.

ABSTRACT

In this study it has been assessed the efficiency of extraction of phenolic lignin derivatives, namely, acetosyringone, acetovanillone, *p*-coumaric, ferulic, *p*-hydroxybenzoic, vanillic and syringic acids, as well as syringaldehyde and vanillin by pre-concentration of the analytes in a polyacrylate fiber (85 μm) followed by analysis with gas chromatography with flame ionization detection (SPME-GC/FID). Due to the relatively high molar mass of some lignin derivatives (i.e. acetosyringone 196.2 g mol^{-1}) it was required changes in the method procedure previous the GC/FID analysis. Compounds were subjected to a derivatization reaction in which *N,O*-bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) was used as a silylation agent. The extraction and derivatization steps of the compounds were carried out according to two procedures; first, derivatization followed by extraction; and the second, sorption of the derivatizing agent on the fiber and subsequent extraction. The main objective was the development of an analytical methodology able to provide a simple and fast procedure for the determination of lignin derivatives in sediments samples. Such compounds are a subclass of geochemical biomarkers of great importance in studies of transport of organic matter across the continent-water interface. The best conditions for the extraction and separation conditions were obtained with the volume of BSTFA derivatizing reagent of 60 μL per sample. For the parameters temperature, extraction time and BSTFA sorption on the fiber, the best results were achieved with values of 80 $^{\circ}\text{C}$, 35 and 15 minutes, respectively. We applied the proposed method in sedimentary matrix, which showed good linearity in a range 35 - 225 $\mu\text{g g}^{-1}$ for acetosyringone, acetovanilona, vanillin and syringaldehyde and 2500 - 9000 $\mu\text{g g}^{-1}$ for the other analytes. The quantification limit obtained ranged between and 73 and 2471 $\mu\text{g g}^{-1}$, for vanilin and acid vanilic, respectively. The method was suitable for the determination of the phenolic derivatives in environmental matrices with a considerable reduction of the large volume of solvent conventionally used in extraction procedures and analysis by GC/FID.

Keywords: lignin; BSTFA; SPME; derivatization; gas chromatography.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estruturas química das moléculas de pristano (1) e fitano (2). Elaborado pelo autor (a).....	4
Figura 2. Estrutura química da molécula de coprostanol (3). Elaborado pelo autor (a).....	5
Figura 3. Estrutura proposta para a lignina de <i>Picea abies</i> (madeira mole). Adaptação de Piló-Veloso, 1993.....	6
Figura 4. Fenóis derivados de lignina após reação de oxidação com CuO em meio alcalino. Adaptação de Hedges, 1982.....	8
Figura 5. Relação das razões S/V em função de C/V e dos principais grupos de plantas vasculares. Adaptação a partir de Hedges et al., 1988.	10
Figura 6. Modos de operação em SPME: (a) extração direta, (b) <i>headspace</i> SPME, (c) membrana de proteção SPME. Adaptação de PAWLISZYN, 2009.....	15
Figura 7. Representação gráfica do planejamento composto central para a otimização de: (a) duas variáveis ($\alpha=1,41$) e (b) três variáveis ($\alpha=1,68$). (●) pontos do <i>design</i> fatorial, (○) pontos axiais e (□) ponto central. Fonte: BEZERRA et al., 2008.....	22
Figura 8. Fibra de SPME com e sem adaptador (holder). Elaborado pelo autor (a).....	27
Figura 9. Sistema termostaticado composto pelo termostato, à esquerda e o reator, à direita. Elaborado pelo autor (a).....	29
Figura 10. Respostas cromatográficas para cada um dos derivados fenólicos de lignina após a reação de silanização quando o volume de	

BSTFA varia (tempo de exposição ao BSTFA de 30 minutos; tempo de extração de 30 minutos; temperatura de 60 °C; 150 mg L⁻¹ para a acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina e 1500 mg L⁻¹ para os ácidos ferúlico, siríntrico e vanílico)..... 34

Figura 11. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina (tempo de extração de 30 minutos; tempo de exposição ao BSTFA de 30 minutos nesta ordem de procedimentos; temperatura de 60 °C; 150 mg L⁻¹ para a acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina e 1500 mg L⁻¹ para os ácidos ferúlico, siríntrico e vanílico).... 35

Figura 12. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis tempo de extração e de exposição ao agente derivatizante por SPME para a média geométrica dos analitos. 36

Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis tempo de exposição ao agente derivatizante e temperatura de extração por SPME para a média geométrica dos analitos..... 37

Figura 14. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis temperatura e tempo de extração por SPME para a média geométrica dos analitos. 38

Figura 15. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração *via* HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; tempo de extração de 35 minutos nesta ordem de procedimentos; temperatura de 80 °C; padrões sem grupamento ácido a 150 mg L⁻¹; padrões com grupamento ácidos a 1500 mg L⁻¹; 60 µL de BSTFA)..... 39

Figura 16. Cromatograma obtidos por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para uma amostra que não contém os compostos fenólicos derivados de lignina (branco) (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; de extração de 35 minutos; temperatura de 80 °C; 60 µL de BSTFA). 42

Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC para a comparação do método proposto para a determinação de compostos fenólicos derivados de lignina denominados ácidos *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico (concentração dos padrões de 6000 µg g⁻¹). 49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Concentrações de grupos fenólicos, em percentual de carbono orgânico, encontrados nos tipos de vegetais.	9
Tabela 2. Faixa de variação para os valores de LPVI em acordo ao tipo vegetal.	11
Tabela 3. Variáveis e níveis empregados no Planejamento composto central para a etapa da otimização do processo de extração.	28
Tabela 4. Parâmetros analíticos de mérito obtidos pelo método proposto de determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimento por SPME e GC/FID.	40
Tabela 5. Valores de desvio padrão relativo entre as amostras de 100, 150 e 200 mg de sedimento.	43
Tabela 6. Valores de desvio padrão relativo obtidos para as replicatas (10x).....	44
Tabela 7. Parâmetros analíticos de mérito obtidos pelo método proposto de determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimento por HPLC.	44
Tabela 8. Concentrações de derivados fenólicos de lignina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de sedimento obtidos pela comparação entre os métodos de cromatografia a gás e líquida.	46
Tabela 9. Tratamento estatístico (teste t para duas médias experimentais) dos dados para o desenvolvimento da metodologia proposta para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos.	47

Tabela 10. Tratamento estatístico (teste F) de dados para o desenvolvimento de metodologia proposta para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos.	48
Tabela 11. Valores, em porcentagem, de derivados fenólicos encontrados nas amostras de sedimento enriquecidas para os ensaios de recuperação.	50

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Representação de uma reação de sililação.....	18
Esquema 2. Reação de derivação entre uma molécula genérica que contém um grupo funcional protônico, cujos pré-requisitos para a reação de derivação com a <i>N,O</i> -bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) são obedecidos, o que gera um derivado acrescido de um grupo de trimetilsilil.....	19

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

BSTFA – *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida

(*Bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

BTSA – Bis(trimetilsilil)acetamida (*Bis(trimethylsilyl)acetamide*)

BTMSTFA – *N*-metil-*N*-(*tert*-butildimetilsilil)trifluoroacetamida (*N-methyl-N-(tert-butyl)dimethylsilyl)trifluoroacetamide*)

FID – Detector por ionização em chama (*Flame ionization detector*)

GC – Cromatografia a gás (*Gas chromatography*)

HPLC – Cromatografia líquida de alta eficiência (*High performance liquid chromatography*)

HS – Espaço vazio (*Headspace*)

IUPAC – União Internacional de Química Pura e Aplicada (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)

LOD – Limite de detecção (*Limit of detection*)

LOQ – Limite de quantificação (*Limit of quantification*)

LPME – Microextração em fase líquida (*Liquid phase microextraction*)

LPVI – Índice de Fenol de Lignina Vegetal (*Lignin Phenol Vegetation Index*)

MEPS – Microextração em sorvente empacotado (*Microextraction by packed sorbent*)

MS – Espectrometria de massas (*Mass spectrometry*)

PA – Poliacrilato (*Polyacrylate*)

PDMS – Polidimetilsiloxano (*Polydimethylsiloxane*)

NMR – Ressonância magnética nuclear (*Nuclear magnetic resonance*)

RSD – Desvio padrão relativo (*Relative standard deviation*)

RSM – Superfície de resposta (*Response surface*)

SBSE – Extração sortiva em barras de agitação (*Stir bar sortive extraction*)

S_N2 – Substituição nucleofílica de segunda ordem (*Nucleophilic substitution of second order*)

SPE – Extração em fase sólida (*Solid phase extraction*)

SPME – Microextração em fase sólida (*Solid phase microextraction*)

TMCS – Trimetilclorosilil (*Trimethylchlorosilyl*)

USA – Estados Unidos da América (*United States of America*)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1. Biomarcadores geoquímicos.....	3
2.2. Ligninas.....	5
2.2.1. Derivados fenólicos da lignina.....	7
2.3. Preparo de amostra.....	12
2.3.1. Microextração em fase sólida (SPME).....	13
2.3.2. Derivação.....	18
2.3.3. Otimização multivariada.....	20
2.3.3.1. Planejamento Composto Central.....	21
2.4. Estado da arte: determinação de derivados de lignina.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos.....	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1. Reagentes e soluções.....	25
4.2. Limpeza de vidrarias.....	26
4.3. Instrumentação.....	26
4.4. Influência do volume de BSTFA.....	27

4.5. Otimização das condições de HS-SPME.....	27
<i>4.5.1. Avaliação do procedimento de extração e sorção.....</i>	<i>29</i>
4.6. Preparo de amostra.....	29
4.7. Identificação e quantificação de derivados fenólicos de lignina.....	30
4.8. Desenvolvimento do método e aplicação.....	30
<i>4.8.1. Método comparativo: cromatografia líquida de alta eficiência.....</i>	<i>31</i>
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1. Planejamento univariado.....	33
5.2. Planejamento multivariado.....	35
5.3. Desenvolvimento e aplicação do método.....	39
6. CONCLUSÕES.....	52
7. PERSPECTIVAS.....	53
GLOSSÁRIO.....	54
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
APÊNDICE.....	63

1. INTRODUÇÃO

Na área de geoquímica orgânica estudam-se diversos compostos presentes em solos e sedimentos cujas estruturas são associadas a grupos específicos de organismos. A identificação desses compostos em ambientes naturais contribui para o conhecimento sobre a origem e os processos de evolução da matéria orgânica. Os marcadores geoquímicos caracterizam a matéria orgânica quanto à presença de compostos moleculares derivados de lignina, esteróis e hidrocarbonetos (POYNTER; EGLINTON, 1991; TISSOT; WELTE, 1984).

As plantas, a partir de sua composição bioquímica, dividem-se em dois grupos; plantas não vasculares (avasculares) e plantas vasculares. As algas e briófitas, por exemplo, representam as plantas não vasculares. Além de apresentarem-se em terra, as plantas vasculares (gramíneas, arbustos e árvores) aparecem em partes rasas de lagos (macrófitas aquáticas flutuantes, submersas e enraizadas). A lignina provém de plantas vasculares e constitui-se por grupos de polifenóis tridimensionais ligados entre si por meio de monômeros de fenilpropano; caracteriza-se por apresentar estruturas poliméricas amorfas e complexas de alta massa molar. Apresenta ainda elevada resistência à biodegradação e portanto, é um exemplo de biomarcadores geoquímicos oriundo de solos e sedimentos (FENGEL; WEGNER, 1984; HEDGES; PARKER, 1976; MEYERS, 2003).

A partir destas características, os produtos da oxidação da lignina têm sido utilizados como potenciais biomarcadores. As espécies vegetais são singulares quanto à estrutura da lignina. Logo, a avaliação de distintas quantidades dos derivados fenólicos de lignina contidos em plantas, as diferenciam umas das outras. Por exemplo, dentre estes produtos da reação de oxidação da lignina destacam-se os fenóis vanilílicos e siringílicos e dois fenóis cinâmicos, sendo que estes subgrupos remetem a determinada origem biológica. Esses fenóis são únicos às plantas vasculares e podem refletir a taxonomia, o tipo de tecido e o conteúdo de lignina (HEDGES; ERTEL, 1982).

Atualmente, estudos ambientais empregam como ferramenta a determinação de derivados fenólicos de lignina, tais como; caracterização da origem da matéria orgânica em sedimentos;

diferenciação da matéria orgânica de origem alóctone ou autóctone e estudo da dispersão de material terrestre em gradientes salinos e/ou estuarinos.

As características estruturais da lignina inviabilizam a análise direta por cromatografia a gás, isto é, faz-se necessária a manipulação prévia da amostra. Uma alternativa consiste em submeter a amostra que contém os derivados fenólicos obtidos previamente através de reações de oxidação da lignina, a uma etapa de extração e posteriormente derivação destes compostos. Por outro lado os métodos convencionais de extração (líquido-líquido ou líquido-sólido) requerem o consumo de grande quantidade de solventes.

A microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) apresenta-se como uma alternativa promissora para procedimentos de preparo de amostras especialmente para cromatografia a gás (GC, do inglês *gas chromatography*) e oferece uma série de vantagens, entre estas a alta eficiência, boa precisão, baixo limite de detecção e facilidade para automação.

Nesta pesquisa, a técnica de SPME aliada a reações de derivação e cromatografia a gás com detector por ionização em chama (GC/FID, do inglês *gas chromatography with flame ionization detector*) serão aplicados à Geoquímica para a determinação de derivados fenólicos de lignina, uma subclasse dos denominados biomarcadores geoquímicos.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

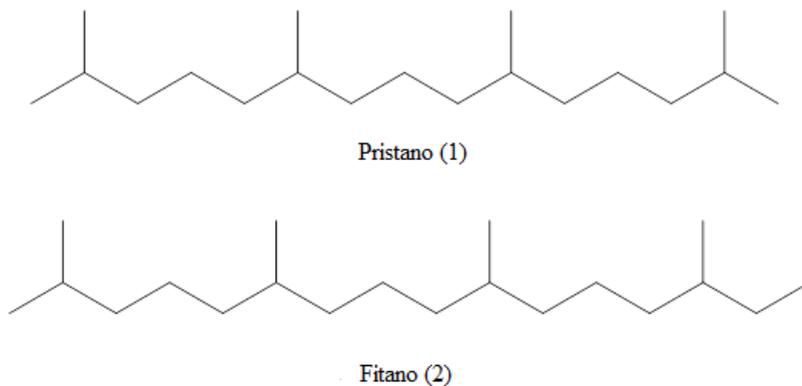
2.1. Biomarcadores geoquímicos

Os primeiros relatos de marcadores são oriundos da década de trinta quando Treibs descobriu pigmentos de porfirina, provenientes da degradação da clorofila, em xisto, óleo e carvão (HUNT et al., 2002). Em 1967, Eglinton e Calvin utilizaram pela primeira vez o termo “fóssil químico” para descrever compostos orgânicos encontrados na geosfera. Mais recentemente, Meyers definiu o termo biomarcador molecular como sendo “compostos característicos de certas fontes bióticas que retém informações sedimentares mesmo após alguma alteração”. Biomarcadores, marcadores biológicos ou fósseis químicos são, portanto, compostos complexos e estáveis cujas estruturas sofreram pouca ou nenhuma alteração físico-química em relação à estrutura das substâncias orgânicas dos organismos vivos (bactérias, fitoplâncton, zooplâncton e vegetais superiores) originários, isto é, mantêm o esqueleto carbônico original (POYNTER; EGLINTON, 1991; BIANCHI, 2007).

Estas moléculas derivam de compostos provenientes de sedimentos terrestres como as plantas, sedimento marinho pelágico como os plânctons, marinho bentônico como as algas e bactérias ou de sedimentos límnicos (TISSOT; WELT, 1984) e caracterizam óleos em termos de correlação óleo/óleo e óleo/rocha originária, classificação da maturidade térmica do petróleo, avaliação da migração, do grau de biodegradação, determinação das condições do ambiente deposicional, além de informar a idade da rocha originária do petróleo (WANG et al., 2007). Portanto, classificam-se os biomarcadores como indicadores de ambiente deposicional, indicadores de maturação, identidade, migração e degradação (NETO, 1984).

Parâmetros como pH, salinidade e toxicidade do ambiente deposicional são determinados através da análise da “composição genética” que a rocha original transmite aos óleos (NETO, 1984; PHILP, 1985). A razão de pristano/fitano (Figura 1) é um exemplo de biomarcador e serve como registro do ambiente deposicional e descreve o ambiente como oxidante (pristano/fitano > 1) ou redutor (pristano/fitano < 1) (PETERES; MOLDOVAN, 1993).

Figura 1. Estruturas química das moléculas de pristano (1) e fitano (2).
Elaborado pelo autor (a).

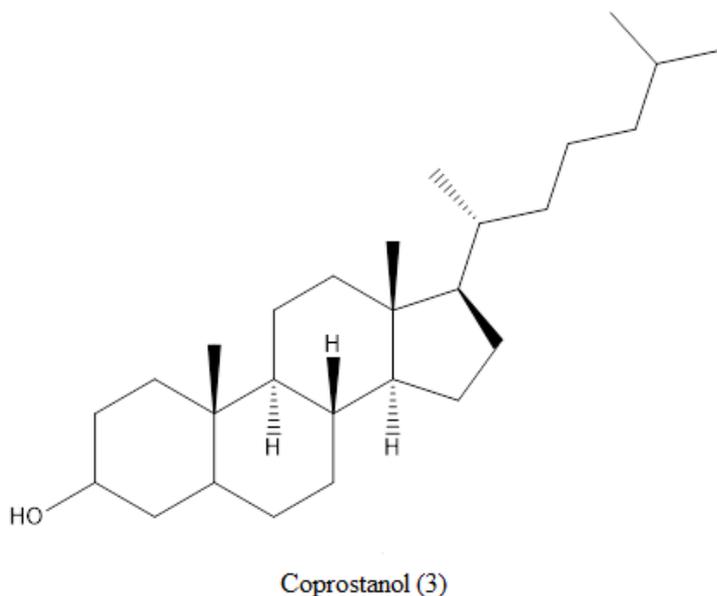


Os biomarcadores são classificados, por exemplo, como indicadores de maturação, pois apresentam alterações estruturais (isomerização e aromatização) e degradação térmica (formação dos compostos mais estáveis) devido ao incremento da temperatura ocasionado pelo aumento do grau geotérmico. A sobreposição dos compostos mais estáveis, em acordo com os níveis de maturação, sob os compostos menos estáveis e o monitoramento das alterações ocorridas durante este processo proporcionam estabelecer o grau de maturação da matéria orgânica em óleos, sedimentos e rochas (KILLOPS; KILLOPS, 2005; BROCKS, 2003).

Geralmente, os biomarcadores são hidrocarbonetos saturados, insaturados e aromáticos ou compostos com grupos funcionais (álcoois, ácido, cetona, ésteres, etc.) ou ainda contém heteroátomos (N e S). Estes também são classificados segundo sua origem biogênica, antropogênica ou fóssil. Os primeiros identificam as fontes biogênicas de matéria orgânica e caracterizam a estrutura e atividade das comunidades microbianas, como por exemplo, a lignina, os esteróis, os pigmentos (clorofilas e carotenoides), os ácidos e álcoois graxos, os terpenóides e os fosfolipídios (TAKADA; EGANHOUSE, 1998). Os marcadores moleculares fósseis são resíduos da matéria orgânica biogênica e de seus produtos diagenéticos e, englobam os *n*-alcanos, os triterpenos, os esteranos, os isoprenóides acíclicos, entre outros (VOLKMAN;

REVILL, MURRAY, 1997). Os biomarcadores antropogênicos são introduzidos no ambiente através de atividades humanas consideravelmente recentes e estão relacionados à contaminação ambiental. O coprostanol (Figura 2) e outros esteróis são exemplos de marcadores moleculares antropogênicos amplamente empregado no mapeamento de contaminação por esgotos (TAKADA, 1997).

Figura 2. Estrutura química da molécula de coprostanol (3). Elaborado pelo autor (a).



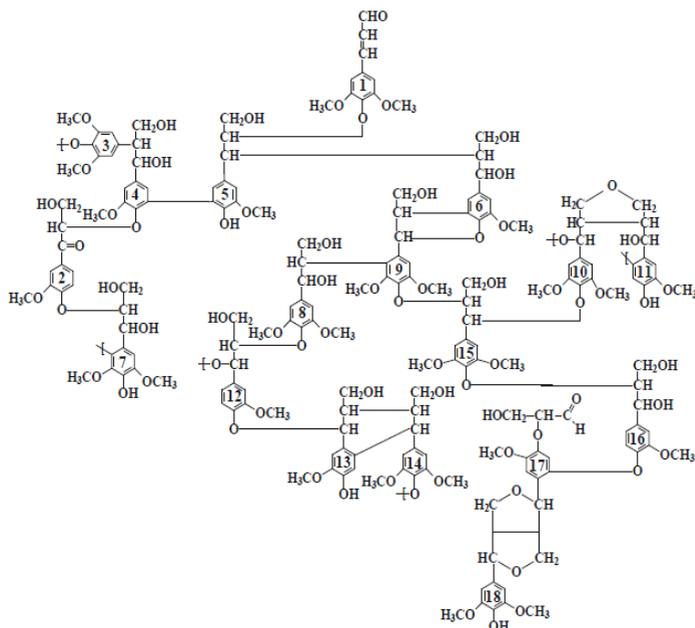
2.2. Ligninas

O termo lignina provém do latim *lignum* e refere-se à madeira. Anselm Payen, em 1838, estudou a separação dos constituintes da madeira. Este estudo trata-se do primeiro registro experimental de um “material incrustado” presente na madeira, incluindo a celulose, cuja composição química era desconhecida. Apenas em 1865, Schulze

atribuiu o termo lignina a este material incrustado (MACCARTHY; ISLAM, 1999).

As ligninas representam a segunda maior fonte de carbono da biosfera e são o segundo maior biopolímero abundante em plantas, depois da celulose. São macromoléculas amorfas de alta massa molar e de natureza aromática, bastante complexas, constituídas por polifenóis estruturados tridimensionalmente por unidades monoméricas de fenilpropano (Figura 3) unidas entre si por ligações C-O-C e C-C (FENGEL; WEGNER, 1984; HEDGES; PARKER, 1976; LOUCHOUARN et al., 1997; LOUCHOUARN et al., 2010; PEMOKOWIAKI et al., 2006).

Figura 3. Estrutura proposta para a lignina de *Picea abies* (madeira mole). Adaptação de Piló-Veloso, 1993.



As ligninas encontram-se exclusivamente em vegetais superiores. Embora sejam identificadas em sedimentos marinhos, não são sintetizadas por organismos marinhos e são distribuídas nestes ambientes por fortes escoamentos continentais. É o constituinte mais

abundante das plantas, cujo papel importantíssimo nos processos de humificação de áreas terrestres ocorre por meio de queda de folhas, brotos, pólen e contato direto com a raiz (THEVENOT et al., 2010; MEYERS, 2003). As ligninas constituem principalmente o tecido vegetal e atuam no transporte de água, nutrientes e metabólitos, além de promover resistência mecânica, impermeabilização e proteção aos tecidos contra a ação de microrganismos. Não são encontradas livres em plantas superiores, ou seja, são encontradas associadas a polissacarídeos, como a celulose ou a hemicelulose, principais componentes da parede celular das plantas vasculares (PERISSOTTO, 2005; RASHID, 1985). As gramíneas, angiospermas e gimnospermas são exemplos de vegetais onde as ligninas são encontradas.

A síntese das ligninas ocorre a partir de uma reação enzimática entre a celulose, tirosina e fenilalanina para a construção de tecidos vasculares e componentes estruturais das plantas. A morte dos vegetais ocasiona a degradação bioquímica das ligninas e os produtos desta degradação, formados por monômeros carboxilados, relativamente resistentes à biodegradação e diagênese em condições anaeróbicas, são responsáveis pela preservação das ligninas em solos e sedimentos, o oposto dos compostos celulósicos que se degradam rapidamente (PEMOKOWIAKI et al., 2006; LOUCHOUARN et al., 2010; MEYERS, 2003).

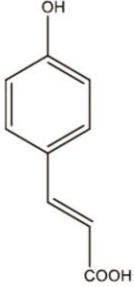
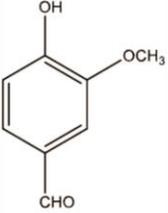
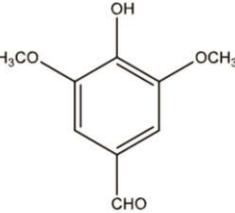
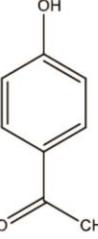
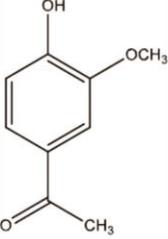
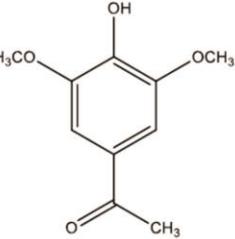
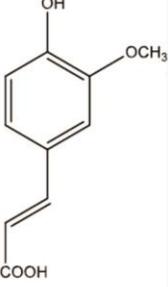
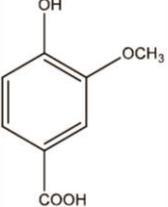
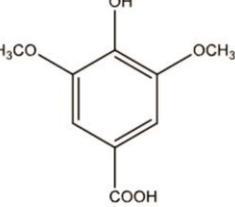
2.2.1. Derivados fenólicos da lignina

As unidades de ligação das ligninas são resistentes à decomposição, particularmente os compostos de fenilpropano, os quais são unidos por ligações C-O-C e C-C que não se rompem facilmente. No entanto, a degradação da lignina por alguns microrganismos, origina compostos fenólicos e polifenólicos. O primeiro estágio de decomposição da lignina envolve a dissociação a partir da celulose por meio da quebra das ligações glicosídicas, e após uma série de reações enzimáticas seguidas por clivagens, a divisão oxidativa das ligninas origina unidades de estrutura primária. Entre os produtos de oxidação detectam-se a vanilina, o siringaldeído, os ácidos ferúlico, siringico e vanílico, entre outros (RASHID, 1985).

Os principais produtos da degradação da lignina dividem-se em quatro classes; vanila (V), siringila (S), cinamofla (C) e *p*-hidróxi (P). A

Figura 4 apresenta os onze compostos fenólicos derivados de lignina, obtidos a partir da oxidação da lignina com óxido cúprico em meio alcalino, como proposto por Hedges e Ertel, em 1982.

Figura 4. Fenóis derivados de lignina após reação de oxidação com CuO em meio alcalino. Adaptação de Hedges, 1982.

Fenóis Cinamílicos (S)	Fenóis <i>p</i> -Hidroxílicos (P)	Fenóis Vanílicos (V)	Fenóis Siringicos (S)	
	 <i>p</i> -Hidroxibenzaldeído (5)	 Vanilina (6)	 Siringaldeído (7)	Aldeídos
Ácido <i>p</i> -Cumárico (4)	 <i>p</i> -Hidróxiacetofenona (9)	 Ácetovanilona (10)	 Ácetossiringona (11)	
	 Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico (12)	 Ácido Vanílico (13)	 Ácido Siringico (14)	Ácidos

Cada um dos 11 compostos derivados de lignina apresentam um anel aromático e são classificados de acordo com sua semelhança estrutural, isto é, em acordo à taxonomia vegetal. Estas estruturas estão relacionadas aos tipos de tecidos e plantas dos quais provém estes compostos. Pode-se identificar e/ou distinguir estas classes em relação aos tecidos e plantas originários, tais como tecidos lenhosos e não lenhosos de plantas vasculares, angiosperma ou gimnosperma (FARELLA et al., 2001; GÖNI; HEDGES, 1992; HEDGES; MANN, 1979).

Os fenóis pertencentes aos grupos vanila, siringila e *p*-hidróxi apresentam-se em forma ácida, aldeídica e cetônica. O grupo cinamoíla se apresenta somente na forma ácida e é encontrado em tecidos de angiospermas não lenhosas, enquanto os fenóis do grupo siringila em angiospermas lenhosas. Os produtos da degradação de lignina presentes em angiospermas e gimnospermas, independente do tecido, são os fenóis referentes ao grupo vanila (Tabela 1) (GÖNI; HEDGES, 1992; HEDGES; MANN, 1979).

Tabela 1. Concentrações de grupos fenólicos, em percentual de carbono orgânico, encontrados nos tipos de vegetais.

Grupo	Vegetação			
	Gimnospermas lenhosas	Angiospermas lenhosas	Gimnospermas não-lenhosas	Angiospermas não lenhosas
Vanila	4,0 – 13,0	2,7 – 8,0	1,9 – 2,1	0,6 – 3,0
Siringila		7,0 – 8,0		1,0 – 3,0
Cinamoíla			0,8 – 1,2	0,4 – 3,1
Exemplos	Coníferas	Árvores com flores		Gramíneas

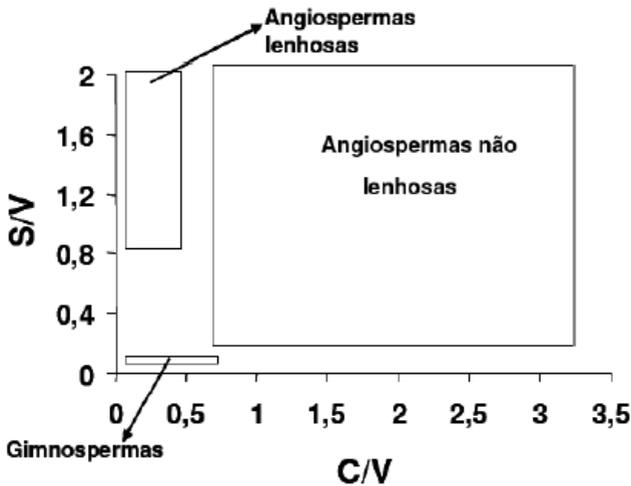
Fonte: Adaptado de KILLOPS; KILLOPS, 2005.

Para identificar os principais grupos de plantas presentes em sedimentos e as principais fontes de matéria orgânica alóctone presentes nos ambientes aquáticos empregam-se razões entre os componentes dos grupos vegetais. Por exemplo, a presença de derivados fenólicos dos grupos vanila, siringila e cinamoíla em diferentes tecidos de plantas

vasculares varia em acordo com as reações diagenéticas sofridas (GOÑI; HEDGES, 1992; HEDGES; MANN, 1979; GORDON; GOÑI, 2004).

Embora as ligninas sejam relativamente resistentes, estas sofrem alterações durante o período de diagênese e a razão entre as formas ácidas e aldeídicas dos fenóis do grupo vanila e siringila (Ac/Al)V,S indica o grau de degradação (índice diagenético de matéria orgânica) aos quais são submetidas (HEDGES; MANN, 1979). Geralmente, observa-se o maior grau de oxidação microbiana da lignina associado a maior razão (Ac/Al)V,S. Pode-se utilizar também como indicador diagenético a razão $P/(V + S)$, devido a desmetilação ocorrida durante a oxidação da matéria orgânica que favorece a perda seletiva dos grupos fenólicos metoxilados (V e S) em relação aos não metoxilados (P) e não oxidados (DITTMAR; LARA; KATNER, 2001). Os fenóis do grupo siringila e cinamoíla são indicados por apresentarem altos valores da razão S/V e C/V, respectivamente (Figura 5).

Figura 5. Relação das razões S/V em função de C/V e dos principais grupos de plantas vasculares. Adaptação a partir de Hedges et al., 1988.



Tareq e col. (2004) desenvolveram o índice para a identificação das diferentes fontes de vegetação originárias da matéria orgânica sedimentar denominado Índice de Fenol de Lignina Vegetal (LPVI, do

inglês *Lignin Phenol Vegetation Index*) que complementa os cálculos clássicos das razões de S/V, C/V e Ac/Ad. Este, é expresso pela Equação 1;

$$LPVI = \left\{ \left[\frac{S(S+1)}{V+1} + 1 \right] \cdot \left[\frac{C(C+1)}{V+1} + 1 \right] \right\} \quad \text{Equação (1)}$$

onde V, S e C expressam a percentagem dos grupos vanila, siringila e cinamoíla, respectivamente.

As diferentes razões de derivados fenólicos presentes nos tecidos de angiosperma lenhosa, gimnosperma lenhosa, angiosperma não lenhosa, e gimnosperma não lenhosa, são resolvidas em intervalos ao longo do eixo de LPVI. Tecidos de gramíneas têm os maiores valores LPVI. O índice não é linear e varia de 1 (gimnosperma lenhosa) para aproximadamente 3000 (gramínea) (Tabela 2). O LPVI não contabiliza efeitos diagenéticos, embora esteja embasado na labilidade dos grupos fenólicos (TAREQ; TANAKA; OTHA, 2004).

Tabela 2. Faixa de variação para os valores de LPVI em acordo ao tipo vegetal.

Tipo de vegetação	LPVI
Gimnospermas lenhosas	1
Gimnospermas não lenhosas	12 a 27
Angiospermas lenhosas	67 a 415
Angiospermas não lenhosas	378 a 2782

Fonte: adaptação de Tareq et al., 2004.

Além dos produtos fenólicos originados a partir da oxidação das ligninas apresentarem resistência à biodegradação, estes também contribuem para a avaliação da composição da matéria orgânica sedimentar proveniente de diversos tipos de vegetais, uma vez que sua composição química depende dos diferentes tipos de plantas originários, isto é, a caracterização da matéria orgânica, a diferenciação da matéria orgânica de origem alóctone de autóctone e o estudo da dispersão de material terrestre em gradientes salinos e/ou estuarinos. Estes fatores

caracterizam as ligninas como biomarcadores de plantas terrestres (TAREQ; TANAKA; OTHA, 2004).

Na literatura, em diversos estudos ambientais estão reportadas diversas pesquisas, entre estas as de Tareq e col. (2011) que determinaram os isótopos estáveis de carbono e de nitrogênio e biomarcadores de lignina da matéria orgânica sedimentar do Lago Erhai (sudoeste da China) para reconstruir a paleovegetação e correlacioná-los ao clima e a vegetação (TAREQ; KITAGAWA; OTHA, 2011). O mesmo grupo de pesquisa analisou os destinos iniciais diagenéticos de lignina em uma área de vegetação tropical para reconstituir alterações do passado e as mudanças climáticas (TAREQ; TANAKA; OTHA, 2004). A preservação de ligninas em sedimentos lacustres ao longo dos anos é objeto de estudo para o grupo de pesquisa composto por Ishiwatari e Uzaki (ISHIWATARI; UZAKI, 1997). Hedges e col. (1982) também estudaram a preservação de ligninas em lagos anóxicos (HEDGES; ERTEL; LEOPOLD, 1982).

A alta massa molar associada às macromoléculas amorfas e aromáticas das ligninas, além das irregularidades em sua constituição, alta polaridade e baixa volatilidade inviabilizam a análise direta de seus derivados. Consequentemente, faz-se necessário a adequação das amostras, isto é, a transformação do analito em uma substância com características apropriadas para ser analisada por cromatografia gasosa, por exemplo (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

2.3. Preparo de amostra

Um procedimento analítico compreende diversas etapas, entre elas, a amostragem, o preparo da amostra, separação e quantificação dos analitos e avaliação estatística. A obtenção de resultados coerentes depende diretamente de cada uma destas etapas (PAWLISZYN, 2009).

Considera-se o preparo de amostra uma das etapas mais críticas de uma metodologia analítica. Esta, consiste no isolamento e concentração dos analitos a partir da matriz da amostra, a fim de adequá-los para a introdução nos instrumentos de análise e para os níveis de detecção ideais do próprio equipamento. Os procedimentos de preparo de amostra incluem extração, remoção de interferentes e/ou limpeza e derivação (item 2.3.2) e são influenciados por fatores, tais como massa de amostra, pH, volume e natureza do solvente extrator e tempo de extração, entre outros (LANÇAS, 2004).

Normalmente, entre as técnicas clássicas, o preparo de amostra consome um maior tempo por conta das várias etapas empregadas, gera um maior erro instrumental, apresenta um alto risco de perda de analitos, além de utilizar grandes quantidades de solventes. Atualmente, destacam-se técnicas alternativas de preparo de amostra, principalmente, pela considerável redução ou eliminação de solventes orgânicos e consequente redução dos custos financeiros e danos ambientais (RAMOS, 2012).

Evidenciam-se neste contexto as técnicas de extração sortiva em barras de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sortive extraction*), microextração em fase líquida (LPME, do inglês *Liquid phase microextraction*), microextração em sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*) e a microextração em fase sólida (SPME).

2.3.1. Microextração em fase sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME), descrita por Arthur e Pawliszyn na década de 1990, consiste em uma técnica de extração e pré-concentração livre de solventes extratores. É relativamente rápida, seletiva e amplamente empregada como método de preparo de amostras em diversas matrizes ambientais e biológicas, entre outras (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990).

A técnica de SPME se baseia na partição do analito entre a matriz da amostra e um microcomponente extrator, isto é, uma fina fase polimérica líquida ou sólida imobilizada sob uma fibra de sílica fundida ou em um suporte metálico. Duas etapas compreendem a extração por SPME; sorção e dessorção dos analitos. A primeira etapa delimita-se pela exposição do recobrimento da fibra à amostra, em um intervalo de tempo pré-determinado, e consequente extração dos analitos. Nesta etapa, as moléculas do analito deslocam-se da matriz para a fase extratora até alcançarem o equilíbrio entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra. A segunda etapa compreende a remoção da fibra do compartimento da amostra e dessorção dos analitos em um instrumento analítico compatível para posterior separação e quantificação. Parâmetros experimentais tais como o recobrimento e espessura da fibra, modo de extração, volume da amostra, temperatura e tempo de extração, agitação e força iônica, entre outros, influenciam

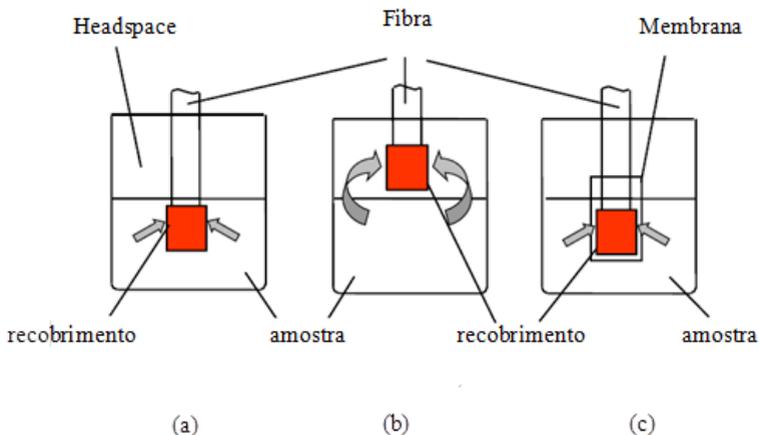
diretamente a eficiência de extração (PAWLISZYN, 1999; PAWLISZYN, 2009).

Comercialmente, são encontrados diversos tipos de recobrimento de fibras de SPME, entre estes os recobrimentos de poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS) e fibras de recobrimento misto como a carboxen-PMDS cujas características como polaridade, mecanismo de extração, espessura da fase estacionária e comprimento do recobrimento divergem entre si. A escolha do recobrimento baseia-se nas características de volatilidade e polaridade dos analitos e determina a seletividade. A espessura do recobrimento também determina a capacidade extratora, isto é, quanto maior o filme extrator, maior a capacidade de extração, porém acentua-se o tempo das extrações (PAWLISZYN, 2009).

São empregados três modos básicos de extração em SPME; extração direta, extração no modo *headspace* e extração envolvendo uma membrana protetora. No modo de imersão direta (Figura 6a), insere-se a fibra no compartimento da amostra e os analitos – de baixa volatilidade – são diretamente transportados da matriz da amostra para a fase extratora. O modo de extração *headspace* ilustrado pela Figura 6b, demonstra eficiência apenas para compostos relativamente voláteis, uma vez que a fibra permanece confinada na região sobre a matriz da amostra (*headspace* = cabeça vazia = espaço vazio). Verifica-se a principal vantagem desta amostragem ao considerar os interferentes de alta massa molar possivelmente presentes na amostra. A presença destes interferentes e de analitos não voláteis em amostras inviabiliza a análise em ambos os modos de operação citados. Consequentemente, aplica-se o modo de extração acrescido de membrana protetora que implica em melhor reprodutibilidade e exatidão (Figura 6c) (PAWLISZYN, 2009).

A agitação da amostra no modo de operação em *headspace*, por exemplo, implica na diminuição do tempo necessário para estabelecer o equilíbrio, uma vez que se aumenta a difusão dos analitos e, consequentemente, a transferência de massas entre amostra, *headspace* e membrana extratora (PAWLISZYN, 2009).

Figura 6. Modos de operação em SPME: (a) extração direta, (b) *headspace* SPME, (c) membrana de proteção SPME. Adaptação de PAWLISZYN, 2009.



Geralmente, a adição de sal à solução da amostra aprimora a extração. Este efeito, denominado *salting out*, aumenta a força iônica da solução da amostra e provoca a redução de solubilidade dos analitos na matriz, o que facilita a extração pela fibra. Entretanto, o efeito determinado empiricamente e, que não descarta o efeito reverso, depende dos compostos de interesse, da matriz destes compostos e da concentração de sal. Normalmente, o efeito *salting out* aumenta à medida que a polaridade dos compostos aumenta (PAWLISZYN, 2009).

Os processos de SPME baseiam-se em equilíbrios simultâneos em sistemas multifásicos. O modo de operação direto inclui o equilíbrio dos compostos de interesse entre duas fases e o modo *headspace*, entre três – a amostra (matriz homogênea), a fase gasosa sob a amostra (*headspace*) e a fase extratora (recobrimento da fibra). Tipicamente, considera-se o processo de microextração completo quando o equilíbrio é atingido, cujas condições estão descritas pela Equação 2, segundo a lei de conservação de massas;

$$C_0V_s = C_fV_f + C_hV_h + C_sV_s \quad \text{Equação (2)}$$

onde, C_0 é a concentração inicial do analito na amostra; C_f , C_h e C_s são as concentrações no equilíbrio dos analitos na fibra, no *headspace* e na amostra, respectivamente; V_f , V_h e V_s os volumes de recobrimento da fibra, do *headspace* e da amostra.

Este tratamento e aspectos termodinâmicos referem-se ao processo de partição característico de recobrimentos poliméricos líquidos, embora as equações sejam semelhantes, em nível traço, ao empregar sólidos como fase extratora. Define-se, a partir da razão entre as fases da fibra/*headspace* (K_{fh}) e *headspace*/amostra (K_{hs}), a constante de partição do analito; Equações 3 e 4.

$$K_{fh} = \frac{C_f}{C_h} \quad \text{Equação (3)}$$

$$K_{hs} = \frac{C_h}{C_s} \quad \text{Equação (4)}$$

Expressa-se a quantidade de analito (n), em mol, extraído pelo recobrimento extrator no sistema em equilíbrio pelas Equações 5 e 6;

$$n = C_f V_f \quad \text{Equação (5)}$$

ou

$$n = \frac{K_{fh} K_{hs} V_f C_0 V_s}{K_{fh} K_{hs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Equação (6)}$$

A constante de partição do analito entre as fases da fibra/amostra é igual ao produto $K_{hs} K_{fh}$, logo;

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_0 V_s}{K_{fs} V_f + K_{hs} V_h + V_s} \quad \text{Equação (7)}$$

A operação em modo direto despreza a parcela $K_{hs} V_h$, portanto:

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + V_s} \quad \text{Equação (8)}$$

Além da constante de partição do analito entre as fases da fibra e da amostra, K_{fs} , apresentar uma ínfima ordem de grandeza, usa-se, normalmente um volume de amostra, V_s , bastante superior ao volume do recobrimento da fibra, V_f . Ao aplicar a aproximação $K_{fs} V_f \ll V_s$, a equação 8 é simplificada para a Equação 9;

$$n = K_{fs}V_f C_0 \quad \text{Equação (9)}$$

Para a operação em modo *headspace*, considera-se o volume igual tanto para a amostra quanto para a fase em *headspace* ($V_s = V_h$). A partir da equação 7, tem-se:

$$n = \frac{K_{fs}V_f C_0 V_s}{K_{fs}V_f + (1 + K_{hs})V_s} \quad \text{Equação (10)}$$

Ao seguir o mesmo raciocínio do modo de extração direto, a quantidade de analito extraído pela fibra extratora é expressa pela Equação 11;

$$K_{fs}V_f \ll (1 + K_{hs})V_s \quad \text{Equação (11)}$$

logo:

$$n = \frac{K_{fs}V_f}{1 + K_{hs}} C_0 \quad \text{Equação (12)}$$

Observa-se, em ambos os modos de extração, uma relação linear entre a quantidade de analito extraído da amostra e a concentração inicial deste na matriz. Muito embora a técnica de SPME seja uma técnica de equilíbrio, certas condições implicam em uma extração quantitativa dos analitos (PAWLISZYN, 2009).

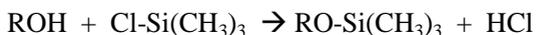
2.3.2. Derivação

Emprega-se a cromatografia a gás na análise de substâncias gasosas, voláteis e termicamente estáveis. Quando as substâncias em análise não correspondem a estes pré-requisitos são necessárias transformações na substância de interesse para adequá-la à técnica. Particularmente, para substâncias de alta massa molar e/ou contendo grupos funcionais fortemente polares, por exemplo, emprega-se a derivação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

As reações de derivação ou derivatização (do inglês *derivatization*) incrementam volatilidade aos analitos presentes na amostra, sensibilidade à detecção e os adaptam às propriedades cromatográficas. A reação de derivação corresponde à introdução de grupos específicos ao analito para aumentar a eficiência cromatográfica da análise, como por exemplo, melhorar as características de separação e aumentar a detectabilidade. Alquilação, esterificação, acetilação e silição são alguns exemplos de reações de derivação comumente empregados (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Nas reações de silição, isto é, reações de derivação de moléculas polares que contém um grupo funcional protônico, empregam-se os reagentes de alquisilil, geralmente o cloreto de trimetilsilil, como exemplificado pelo esquema 1.

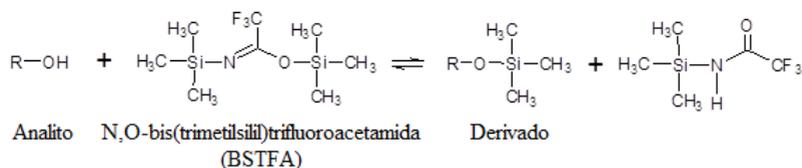
Esquema 1. Representação de uma reação de silição.



Estas reações são, usualmente, instantâneas a temperatura ambiente ou aceleradas pelo aquecimento ou adição de catalisadores. Em contrapartida, os reagentes que promovem reações de silanização, como por exemplo, o trimetilclorosilil (TMCS), bis(trimetilsilil)acetamida (BTSA), N-metil-N-(tertbutildimetilsilil)trifluoroacetamida (BTMSTFA), entre outros, são sensíveis a umidade e sofrem reação de hidrólise (FARAJZADEH et al., 2014). Portanto, a reação necessita de ausência rigorosa de água. Entre os compostos derivados por este tipo de reagente estão os açúcares, álcoois, aminas, aminoácidos, ácidos carboxílicos e fenóis, entre outros (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

O esquema 2, representa a reação de silanização, ao empregar o agente silanizante conhecido como BSTFA. A reação envolve a substituição do hidrogênio reativo por um grupo trimetilsilil/trimetilsilila. O ataque da espécie nucleofílica ao átomo de silício ligado ao oxigênio governa a velocidade da reação nucleofílica de segunda ordem (S_N2). A velocidade desta reação depende diretamente do impedimento estérico do nucleófilo.

Esquema 2. Reação de derivação entre uma molécula genérica que contém um grupo funcional protônico, cujos pré-requisitos para a reação de derivação com a *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) são obedecidos, o que gera um derivado acrescido de um grupo de trimetilsilil.



Para os fenóis e álcoois, a reação para formação do derivado ocorre de maneira rápida se realizada em estufa a 60 °C, por aproximadamente uma hora e apresenta elevado grau de conversão (TAREQ et al., 2004).

O interesse em derivar os compostos fenólicos de lignina está na presença da hidroxila (-OH) fenólica. Especificamente para os fenóis, a etapa de derivação elimina os problemas relativos a elevada polaridade, baixos coeficientes de partição e volatilidade, o que contribui diretamente na eficiência de extração e sensibilidade do método de detecção (PAWLISZYN, 2009).

Recentemente, são estudados outros métodos de análise aliados as reações de derivação em química analítica, como por exemplo, confirmação estrutural de moléculas a partir de compostos derivados cujo espectro contém sinais do íon molecular por meio do espectrômetro de massas (MS) e métodos de preparo de amostras associados às reações de derivação tais como a microextração em fase sólida (SPME) (STASHENKO; MARTÍNEZ, 2004).

Estão descritos na literatura quatro modos de associação distintos entre derivação e SPME; derivação antes da extração, derivação durante a extração, derivação no próprio recobrimento da fibra de SPME após a extração e anteriormente à dessorção (PAWLISZYN, 2009). Os planejamentos experimentais, a otimização e os experimentos são alternativas para a escolha destes modos de associação entre outros parâmetros empíricos, dentre estas, destaca-se em química analítica a otimização multivariada.

2.3.3. Otimização multivariada

Normalmente, os estudos objetivam a otimização de variáveis experimentais e são realizados através de procedimentos que avaliam o efeito de uma variável individualmente, o que geralmente impossibilita o estabelecimento de ótimos verdadeiros, em razão da frequência de correlação entre estas variáveis. Devido a estes fatos e a relevância crítica desta etapa para um trabalho científico, acentua-se a conveniência da aplicação de procedimentos multivariados de otimização (ZAMORA et al., 2005).

Os procedimentos de otimização multivariados permitem a avaliação simultânea do efeito de um grande número de variáveis, a partir de um número reduzido de ensaios experimentais, o que contribui para a redução do consumo de reagentes e do tempo de trabalho em laboratório e para a eficiência da metodologia (ZAMORA et al., 2005).

A seleção das variáveis empregadas, os níveis em que serão ensaiados e a resposta para processar o planejamento são criteriosamente estabelecidos pelo usuário. Entre as técnicas multivariadas mais difundidas em otimização analítica, cita-se a metodologia de superfície de resposta (RSM, do inglês *response surface*). Esta é aplicada, principalmente, quando a resposta ou um conjunto de respostas influenciam-se por outras variáveis. Uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas descreve o comportamento e as previsões estatísticas para um conjunto de dados. Entre os planejamentos multivariados que permitem a obtenção de uma superfície de resposta indicativa da melhor região de desempenho do sistema, destacam-se o planejamento Composto Central, o planejamento Doehlert e o Box-Benken (BEZERRA et al., 2008; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

2.3.3.1. Planejamento Composto Central

Desenvolvido por Box e Wilson na década de 1950, o planejamento composto central resulta da superposição do planejamento fatorial em dois níveis e do planejamento estelar e consiste, basicamente, das seguintes partes: (1) um planejamento fatorial completo ou um planejamento fracionário, (2) uma parte axial (ou estelar) em que os pontos experimentais estão a uma distância α do centro e (3) um ponto central (ARAUJO; BRERETON, 1996; BEZERRA et al., 2008; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010).

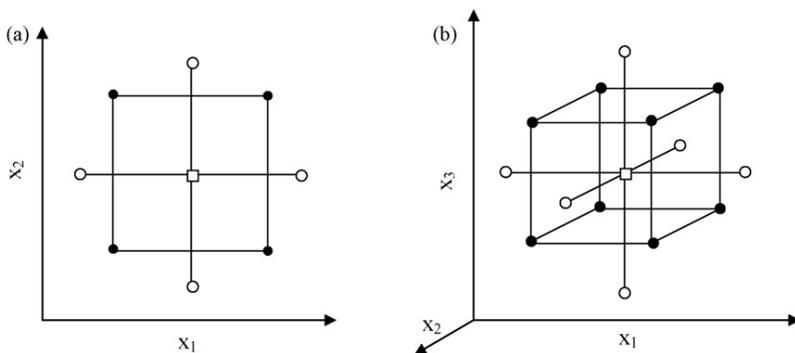
Bezerra e col. (2008) enumeram as características do planejamento composto central:

- (1) A equação $N = k^2 + 2k + C_p$ descreve o número de experimentos, onde k e C_p correspondem, respectivamente, ao número de variáveis ou fatores e ao número de replicatas do ponto central;
- (2) A partir de $\alpha = 2^{(k - p) / 4}$ calcula-se o α , em acordo ao número de variáveis. Para duas, três e quatro variáveis, os valores são: 1,41; 1,68 e 2,00, respectivamente;
- (3) Estudam-se em cinco níveis todos os fatores ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

A Figura 7 ilustra, graficamente, o planejamento composto central para otimização de duas e três variáveis.

O planejamento experimental representa uma etapa estatística crítica e mais importante até que a análise de dados. Através das respostas obtidas, admite-se uma condição ótima e as influências e efeitos prováveis ao sistema empírico, além de limitar a quantidade de experimentos necessários. A área da química analítica, mais especificamente as técnicas voltamétricas, cromatográficas e eletroforéticas, entre outras técnicas, abrangem amplamente os planejamentos experimentais como o composto central (ARAUJO; BRERETON, 1996; NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2010; TERLAY et al., 2009).

Figura 7. Representação gráfica do planejamento composto central para a otimização de: (a) duas variáveis ($\alpha=1,41$) e (b) três variáveis ($\alpha=1,68$). (●) pontos do *design* fatorial, (○) pontos axiais e (□) ponto central. Fonte: BEZERRA et al., 2008.



2.4. Estado da arte: determinação de derivados de lignina

Reporta-se na literatura uma série de técnicas, as quais são capazes de avaliar e determinar compostos derivados de lignina. Dentre estas, encontram-se as técnicas de cromatografia gasosa e líquida, técnicas eletroforéticas, bem como técnicas de ressonância magnética nuclear (NMR, do inglês *nuclear magnetic resonance*) e raios-x, entre outras.

Dupont e col. (2007) caracterizaram produtos de degradação de compostos derivados de celulose e lignina de papéis envelhecidos via eletroforese capilar e os limites de detecção são inferiores a $0,5 \text{ mg L}^{-1}$. Fu e col. (2014) determinaram ligninas em biomassa para a produção de combustíveis alternativos através de ressonância magnética nuclear. LV e col. (2012) estudaram os mecanismos de adsorção de mercúrio em lignina através de técnicas espectroscópicas de raios-x, sistema este em crescente desenvolvimento, uma vez que auxilia a remoção de potenciais elementos tóxicos aos ambientes aquáticos e terrestres, como o mercúrio. Hage e Boon (1996) desenvolveram, otimizaram e validaram um método analítico para a determinação de polímeros de lignina por meio de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas e obtiveram valores de limites de detecção inferiores a $1,5 \times 10^{-6} \text{ mg L}^{-1}$ para os derivados fenólicos de lignina.

Louchouart e col. (2010) desenvolveram e validaram uma metodologia analítica para a análise de produtos derivados de lignina através da técnica de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. Os limites de detecção são inferiores a $15 \times 10^{-3} \text{ mg L}^{-1}$.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Desenvolver uma metodologia analítica para a determinação de nove compostos derivados de lignina (acetossiringona, acetovanilona, ácidos *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico, siringaldeído e vanilina) por microextração em fase sólida (SPME) em amostras de sedimentos provenientes de um ambiente estuarino, utilizando cromatografia a gás com detecção por ionização em chama.

3.2. Objetivos específicos

- ✓ Aliar a técnica de extração dos derivados fenólicos de lignina por SPME à derivação, empregando BSTFA como agente derivatizante ou silanizante;
- ✓ Desenvolver um método cromatográfico adequado para a separação dos diferentes derivados fenólicos de lignina previamente silanizados;
- ✓ Avaliar a resposta cromatográfica em função da variação de fatores na etapa de extração, tais como; tempo de exposição da fibra poliacrilato (PA) ao agente derivatizante e aos analitos, volume de BSTFA e sorção do agente derivatizante anterior e posterior à extração;
- ✓ Obter os principais parâmetros analíticos de mérito a fim de avaliar o desempenho da metodologia em desenvolvimento;
- ✓ Comparar a metodologia analítica proposta a uma metodologia reportada na literatura que utiliza HPLC a fim de verificar a exatidão e precisão do método proposto.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Reagentes e soluções

Os derivados fenólicos de lignina (acetossiringona 97%, acetovanilona 98%, os ácidos *p*-cumárico 98%, ferúlico 99%, *p*-hidroxibenzóico 99%, siríngico 98% e vanílico 97%, siringaldeído 98% e vanilina 99%) são padrões sólidos adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

Prepararam-se soluções estoque dos derivados fenólicos de lignina, na concentração de 1500 mg L⁻¹ em diclorometano a partir dos padrões sólidos. Prepararam-se as soluções de trabalho (150 mg L⁻¹) a partir da solução estoque com diclorometano grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil).

Para as reações de derivação utilizou-se o agente derivatizante *N,O*-bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) 99% (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

O diclorometano grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil) e acetonitrila grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil), foram utilizados no preparo das amostras de sedimento.

Realizaram-se todas as extrações em frascos de vidro (Supelco, Saint Louis, Missouri, USA) com capacidade para 40 mL e 20 mL para os analitos e BSTFA, respectivamente.

Utilizou-se água desionizada (Milli-Q Millipore Bedford, Massachusetts, USA) para o preparo das soluções para a curva de calibração para as determinações de derivados fenólicos de lignina em cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC).

Preparou-se a fase móvel para as determinações de derivados fenólicos de lignina em HPLC a partir da acetonitrila grau UV/HPLC (Tedia, Rio de Janeiro, Brasil), água desionizada (Milli-Q Millipore Bedford, Massachusetts, USA) e ácido trifluoracético (TFA) 99% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA).

Para a limpeza dos materiais utilizou-se Extran (detergente neutro) da Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA.

4.2. Limpeza de vidrarias

A fim de remover possíveis resíduos, lavou-se os materiais de vidro em água corrente, detergente comercial diluído e escova. Após enxágue, os materiais foram mergulhados em solução de Extran 5% (v/v), mantidos por pelo menos 24 horas em recipiente fechado e posteriormente enxaguados com água desionizada. Para eliminar resíduos orgânicos, calcinou-se a vidraria em mufla da Quimis aparelhos científicos LTDA. (Diadema, São Paulo), modelo 31824 a 400 °C durante quatro horas, exceto os materiais volumétricos. Após as etapas de limpeza, acondicionou-se a vidraria em local apropriado, envolta em papel alumínio e manuseada apenas com o uso de luvas de polietileno para evitar contaminações.

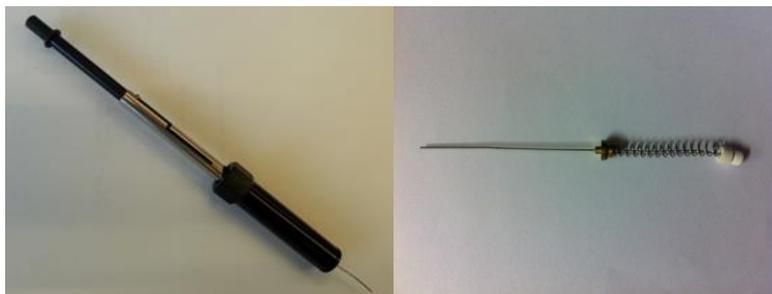
4.3. Instrumentação

Realizaram-se as análises cromatográficas em um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japão) equipado com detector de ionização em chama e injetor *split/splitless*. Como gás de arraste empregou-se hidrogênio ultrapuro (99,995%). A coluna capilar utilizada Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) é composta de 95% de polidimetilsiloxano e 5% de fenila, obtida da Restek (Bellefonte, PA, USA). O programa de temperatura no forno da coluna iniciou em 40 °C (mantidos por 2 minutos). Em seguida, a temperatura foi aumentada a uma taxa de aquecimento de 10 °C por minuto, até atingir 190 °C quando se alterou a taxa de aquecimento para 2 °C por minuto até 210 °C. Posteriormente a taxa retornou para 10 °C por minuto até finalmente atingir 250 °C. A temperatura do injetor de 280 °C em modo *split* a uma razão de 1:50 e manteve-se também a temperatura do detector em 280 °C.

Para controlar a temperatura na etapa de extração, utilizou-se um banho termostatizado (Microquímica, Florianópolis, Brasil).

A fibra de SPME obtida da Supelco (Bellefonte, PA, USA) recoberta com 85 μ m de poliacrilato (PA), acondicionada em um suporte (*holder*) proveniente da mesma empresa, condicionada durante 3 h no próprio cromatógrafo a gás com a mesma metodologia, exceto pela temperatura do injetor que foi de 300 °C, em acordo com as instruções do fabricante (Figura 8).

Figura 8. Fibra de SPME com e sem adaptador (holder). Elaborado pelo autor (a).



4.4. Influência do volume de BSTFA

Testaram-se diferentes volumes do agente derivatizante (10 a 60 μL). As condições cromatográficas para estes testes são as mesmas citadas anteriormente.

Nos ensaios para a escolha de um volume de BSTFA que proporciona a melhor resposta cromatográfica, fixaram-se os parâmetros tempo de extração dos analitos e sorção em BSTFA por 30 minutos cada etapa, temperatura em 60 °C e as concentrações dos analitos em 150 mg L^{-1} para a acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina e 1500 mg L^{-1} para os ácidos ferúlico, siríngico e vanílico.

Para verificar a melhor resposta cromatográfica, observaram-se as áreas dos picos referentes aos 7 analitos. Nesta etapa os ácidos *p*-hidroxibenzóico e *p*-cumárico não estavam resolvidos.

4.5. Otimização das condições de HS-SPME

Empregou-se a metodologia baseada em um planejamento denominado Composto Central para otimizar as condições de extração. A área dos picos cromatográficos dos analitos obtida individualmente e a média geométrica da área destes picos referentes aos analitos estudados proporcionou o processamento dos dados no *software* Statística 8.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA) a fim de obter um resultado representativo da condição de compromisso para todos os analitos avaliados.

Transferiram-se para os frascos de extração, em uma faixa de 50 a 500 μ L dos padrões de derivados fenólicos de lignina (150 e 1500 mg L⁻¹ para os derivados não ácidos e ácidos, respectivamente) e lacraram-se os frascos. Os compostos acetossiringona, acetovanilona, ácidos *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzóico, siríngico e vanílico, siringaldeído e vanilina foram extraídos por SPME a partir do *headspace* da amostra.

As variáveis tempo de extração dos analitos (10 – 50 minutos), tempo de sorção do BSTFA (10 – 50 minutos) e temperatura (60 – 80 °C) foram avaliadas pelo planejamento composto central. A Tabela 3 apresenta os níveis estudados para cada variável.

Tabela 3. Variáveis e níveis empregados no Planejamento composto central para a etapa da otimização do processo de extração.

Ensaio	Tempo sorção BSTFA (em minutos)	Tempo extração analitos (em minutos)	Temperatura (°C)
1	20	20	65
2	20	40	75
3	40	20	75
4	40	40	65
5	30	30	70
6	20	20	75
7	20	40	65
8	40	20	65
9	40	40	75
10	30	30	70
11	10	30	70
12	50	30	70
13	30	10	70
14	30	50	70
15	30	30	60
16	30	30	80
17	30	30	70

4.5.1. Avaliação do procedimento de extração e sorção

Os mesmos parâmetros do item 4.4 foram fixados, além do volume de BSTFA em 60 μL para a avaliação da extração dos analitos com anterior e/ou posterior sorção do agente derivatizante. Isto é, em um procedimento a fibra é exposta ao agente derivatizante e posteriormente aos analitos, e em um segundo procedimento a exposição da fibra acontece primeiro nos analitos e posteriormente no BSTFA. A Figura 9 ilustra o sistema termostaticado composto por um reator de vidro conectado por mangueiras a um reservatório de água aquecida na temperatura desejada. Mantém-se constante a temperatura do sistema pelo fluxo da água que passa entre as paredes internas deste reator.

Figura 9. Sistema termostaticado composto pelo termostato, à esquerda e o reator, à direita. Elaborado pelo autor (a).



4.6. Preparo de amostra

As amostras de sedimentos obtidas de ambiente estuarino foram extraídas com 10 mL de diclorometano (em triplicata) e colocadas em uma chapa de aquecimento a 80 $^{\circ}\text{C}$, a fim de remover qualquer traço orgânico e os compostos voláteis remanescentes.

Estas amostras foram empregadas nos procedimentos para a construção da curva de calibração e para os ensaios de recuperação nas amostras de sedimento.

4.7. Identificação e quantificação de derivados fenólicos de lignina

A obtenção dos tempos de retenção proporcionou a quantificação e identificação dos derivados de lignina *via* SPME, por meio do CG-FID. A partir de soluções padrão de 150 e 1500 mg L⁻¹ construiu-se a curva de calibração em sedimentos para os analitos sem agrupamento ácido (Apêndice A) e para os compostos acrescidos de agrupamento ácido (Apêndice B), respectivamente. A divisão em dois grupos de análise deve-se à complexidade em separar todos os analitos na matriz sedimentar principalmente pela técnica de HPLC

4.8. Desenvolvimento do método e aplicação

A obtenção dos principais parâmetros analíticos de mérito, tais como, faixa linear (faixa de trabalho), coeficiente de correlação, seletividade, robustez, precisão, exatidão e limites de quantificação e detecção possibilitou a avaliar o desempenho da metodologia em desenvolvimento proposta neste estudo.

Verificou-se a precisão do método por meio do desvio padrão relativo obtido a partir das análises em triplicatas. Aceitou-se, criteriosamente, valores inferiores a 20% de variação (RIBANI et al., 2004). As triplicatas de amostras em três níveis proporcionaram a avaliação da exatidão do método em desenvolvimento. A fim de confirmar a exatidão do método, compararam-se estes valores aos valores obtidos ao analisar as mesmas quantidades de padrões por meio da cromatografia líquida (HPLC) (BARBOSA et al., 2008; HUNG; HATCHER; BARKER, 2011).

Obtiveram-se os limites de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantification*) e detecção (LOD, do inglês *limit of detection*) através da razão entre o desvio padrão do coeficiente linear (s) e o valor do coeficiente angular da curva de calibração (S) multiplicados por 10 e 3,3, respectivamente, exemplificados pelas equações 13 e 14 (RIBANI et al., 2004);

$$LOQ = 10 \times \left(\frac{s}{S}\right) \quad \text{Equação (13)}$$

$$LOD = 3,3 \times \left(\frac{s}{S}\right) \quad \text{Equação (14)}$$

A obtenção de amostras de sedimentos de ambiente estuarino permitiu a aplicação do método em uma matriz semelhante a matriz de uma amostra real, na qual possivelmente encontram-se razões entre os derivados fenólicos de lignina. A simulação da matriz e seu enriquecimento com os padrões de derivados fenólicos de lignina permitiu a determinação destes.

4.8.1. Método comparativo: cromatografia líquida de alta eficiência

Realizaram-se as análises cromatográficas, em caráter de comparação entre os métodos, em um cromatógrafo líquido de alta eficiência Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA), modelo 1260 Infinity composto por bomba quaternária, modelo G1311B com sistema misturador e degaseificador; injetor manual, modelo G1328C, com loop de 20 μL e pressão máxima de 600 mbar; compartimento para coluna termostaticado, modelo G1316A; coluna Agilent C18 (150 mm x 4,6 mm ID, 5 μm) e detector de arranjos de diodos, modelo G4212B. Como fase móvel empregou-se acetonitrila:água, 30:70 acrescidos ou não de 0,1% de TFA. O programa de temperatura na coluna e no detector manteve-se a 40 °C. Manteve-se o fluxo da fase móvel para os analitos sem caráter ácido em 1,5 mL min^{-1} e para os demais 1,0 mL min^{-1} . O comprimento de onda selecionado foi de 280 nm.

Devido a co-eluição dos analitos por HPLC (Figura 15), dividiu-se em duas partes a análise por ambas as técnicas, como dito anteriormente, a fim de facilitar tanto a análise quanto a comparação entre os resultados obtidos. A primeira reunia os analitos sem grupamento ácido (Apêndice C) e a segunda os compostos acrescidos de grupamento ácido (Apêndice D). Para a melhor separação dos analitos, a fase móvel para o primeiro grupo consistia apenas de acetonitrila:água 30:70 durante toda a corrida cromatográfica (12 minutos) e para o segundo a mesma percentagem acrescida de 0,1% de TFA em ambos os componentes da fase móvel, nas seguintes condições metodológicas: em 0 minutos 95% de água, em 2 minutos 90% de água, em 4 minutos 85%, em 6 minutos 75% de água, 8,4 minutos 0% de água e em 10 minutos 95 % de água até o término da corrida (30 minutos).

As condições cromatográficas adotadas para a realização do método comparativo são embasadas pelas metodologias propostas por Barbosa e col. (2008) e Hung, Hatcher e Barker (2011).

Os analitos foram extraídas de modo convencional, uma vez que o recobrimento da fibra (PA) é sensível à exposição a acetonitrila e não é recomendado para este tipo de análise (PAWLISZYN, 2009). Pesou-se 100 mg de sedimento em um frasco de extração e adicionou-se 10 mL de acetonitrila (em triplicata). Este sistema permaneceu em banho de ultrassom Ultra Cleaner Unique (Indaiatuba, São Paulo) modelo 1400 por aproximadamente 30 minutos. Submeteram-se as alíquotas recolhidas e reunidas à centrifuga da Fanem – Excelsa Baby II - 206R (São Paulo, SP, Brasil) para separação da fase sólida e líquida, em seguida a um fluxo de nitrogênio para a completa secagem e posteriormente recuperou-se a amostra em 1 mL de acetonitrila:água 1:1.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

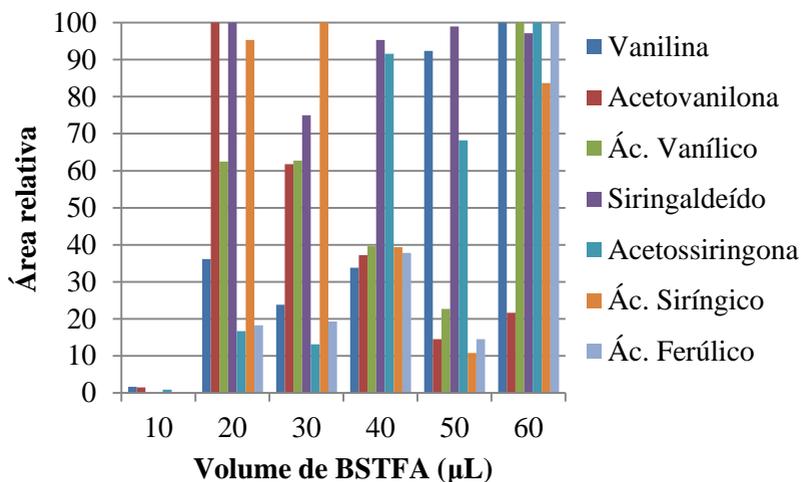
Discutir-se-á a seguir os parâmetros que influenciam a extração e as reações de derivação, tais como influência da quantidade de agente derivatizante, tempo de exposição ao agente derivatizante, tempo e temperatura de extração, além dos parâmetros de desenvolvimento de método.

5.1. Planejamento univariado

Para estudar as condições ótimas de derivação utilizou-se um planejamento simples em triplicata das extrações dos padrões sem a simulação da matriz da amostra, ou seja, dos padrões secos sob fluxo de N_2 . As variáveis tempo de extração (30 minutos), tempo de exposição (30 minutos), temperatura de 60 °C, concentração dos analitos de 150 (acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina) e 1500 mg L⁻¹ (ácidos ferúlico, siríngico e vanílico) foram fixadas e variou-se em seis níveis (10, 20, 30, 40, 50 e 60 µL) o volume do agente derivatizante e a ordem dos procedimentos de derivação e extração. Como resposta, utilizou-se a média geométrica das áreas dos picos referentes aos 7 derivados fenólicos da lignina (acetossiringona, acetovanilona, os ácidos vanílico, siríngico e ferúlico, siringaldeído e vanilina) analisados neste estudo. Os resultados são apresentados pela Figura 10.

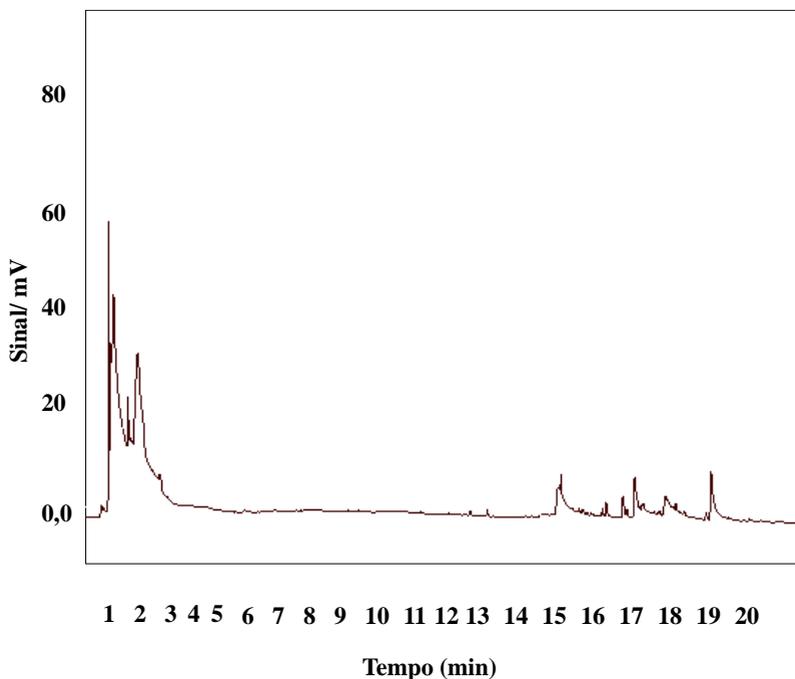
Observou-se em função da área relativa a melhor resposta analítica para a condição ótima, na qual o volume de 60 µL de BSTFA é empregado e selecionado para a continuidade deste estudo. Muito embora a resposta analítica para a acetovanilona, ao empregar volumes menores de agente derivatizante, alcançou valores de áreas relativa mais significativos, considerou-se neste estudo a melhor resposta para a maior quantidade possível dos analitos avaliados. De acordo com os resultados obtidos, ao considerar o volume de 10 µL de BSTFA, por exemplo, a reação de derivação não ocorreu. As respostas analíticas para os volumes de BSTFA entre 20 e 50 µL são ainda inferiores, se comparadas a condição adequada (60 µL). Silveira e col. (2012) determinaram por meio do planejamento Doehlert, entre outros parâmetros, o volume de 70 µL de agente derivatizante (BSTFA) como condição adequada na derivação de clorofenóis por SPME o que corrobora com os resultados obtidos nesta pesquisa.

Figura 10. Respostas cromatográficas para cada um dos derivados fenólicos de lignina após a reação de silanização quando o volume de BSTFA varia (tempo de exposição ao BSTFA de 30 minutos; tempo de extração de 30 minutos; temperatura de 60 °C; 150 mg L⁻¹ para a acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina e 1500 mg L⁻¹ para os ácidos ferúlico, siríngico e vanílico).



Os resultados apresentados pela Figura 11 referem-se a extração e posterior exposição da fibra ao agente derivatizante e, uma vez que a resposta analítica para este procedimento mostrou-se inadequada, adotou-se a ordem inversa, isto é, a exposição da fibra ao BSTFA e conseguinte extração para os experimentos subsequentes.

Figura 11. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina (tempo de extração de 30 minutos; tempo de exposição ao BSTFA de 30 minutos nesta ordem de procedimentos; temperatura de 60 °C; 150 mg L⁻¹ para a acetossiringona, acetovanilona, siringaldeído e vanilina e 1500 mg L⁻¹ para os ácidos ferúlico, siríngico e vanílico).



Observa-se pela Figura 11 o pico característico ao agente derivatizante (BSTFA) anterior aos 4 minutos de eluição, os demais picos são praticamente impossíveis de relacionar aos analitos presentes na amostra. Logo, a ordem de procedimentos na qual a fibra é exposta anteriormente ao agente silanizante e posteriormente aos analitos é a condição ótima e de compromisso para a continuidade deste estudo.

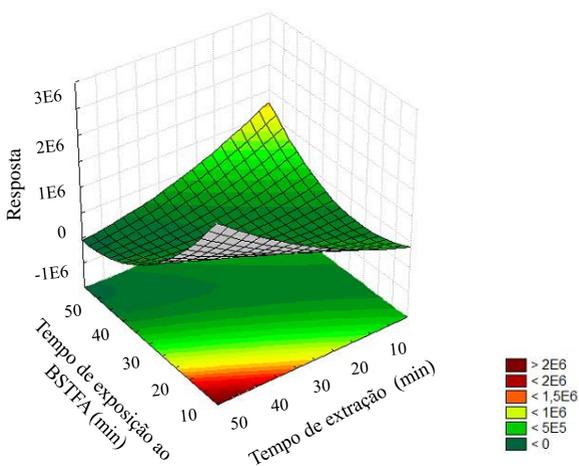
5.2. Planejamento multivariado

O recobrimento da fibra, modo, tempo e temperatura de extração, volume de amostra, agitação e a força iônica são alguns dos parâmetros

limitantes da eficiência da extração de um analito em SPME (PAWLISZYN, 2009). Portanto, a temperatura e os tempos de exposição da fibra são parâmetros essenciais para a eficiência desta técnica. Para determiná-los, aplicou-se a metodologia do planejamento composto central. Os demais parâmetros foram tratados de maneira univariada ou fixa.

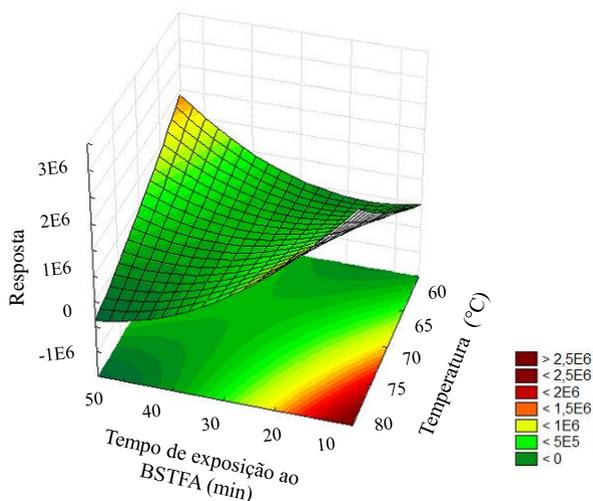
A superfície representada pela Figura 13 apresenta a resposta para a avaliação do tempo de extração em função do tempo de exposição ao BSTFA para a média geométrica dos analitos estudados. Adotou-se o tempo de 35 minutos como condição de compromisso para a extração dos compostos e 15 minutos de exposição da fibra ao BSTFA para a derivação destes, de acordo com a indicação da superfície de resposta. Atribuiu-se, a tendência à formação de um segundo ponto de máximo na superfície das Figura 12, Figura 13 e Figura 14, a extrapolação acarretada pelo próprio *software* Statística 8.0 para a obtenção das superfícies, pois o tempo de 5 minutos de extração não seria suficiente para a adsorção dos analitos à fibra. Um tempo superior a 50 minutos de exposição ao BSTFA, além de exagerado, não fornece uma boa frequência analítica.

Figura 12. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis tempo de extração e de exposição ao agente derivatizante por SPME para a média geométrica dos analitos.



Assim como os tempos de extração e exposição ao BSTFA, a temperatura afeta essencialmente o sistema de SPME, já que é uma técnica de equilíbrios. Portanto, a resposta para a avaliação da temperatura em função do tempo de exposição ao BSTFA, estão ilustradas pela Figura 13.

Figura 13. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis tempo de exposição ao agente derivatizante e temperatura de extração por SPME para a média geométrica dos analitos.

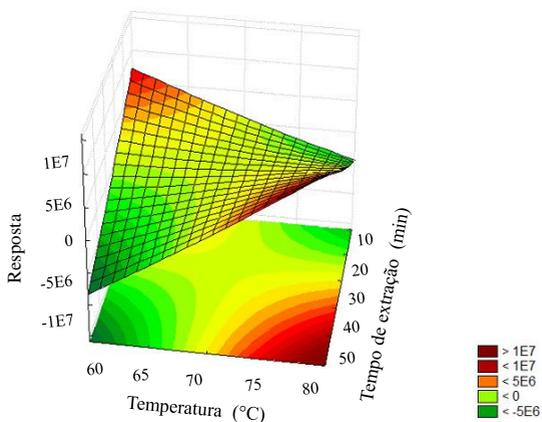


A temperatura ótima, de acordo com os tempos, indicada pelo ponto de máximo está entre 70 e 80 °C. Portanto, adotou-se a temperatura de 80 °C como condição de compromisso para a continuação deste estudo. Segundo Silveira e col. (2012), altas temperaturas de extração incrementam a eficiência de extração, bem como minimizam as perdas de analitos. Silveira e col. otimizaram as condições de extração de clorofenóis, na qual a temperatura de extração foi fixada em 75 °C.

A superfície de resposta exposta pela Figura 14 corrobora os resultados apresentados pelas superfícies anteriores. Esta superfície

apresenta a resposta para a avaliação da temperatura em função do tempo de extração.

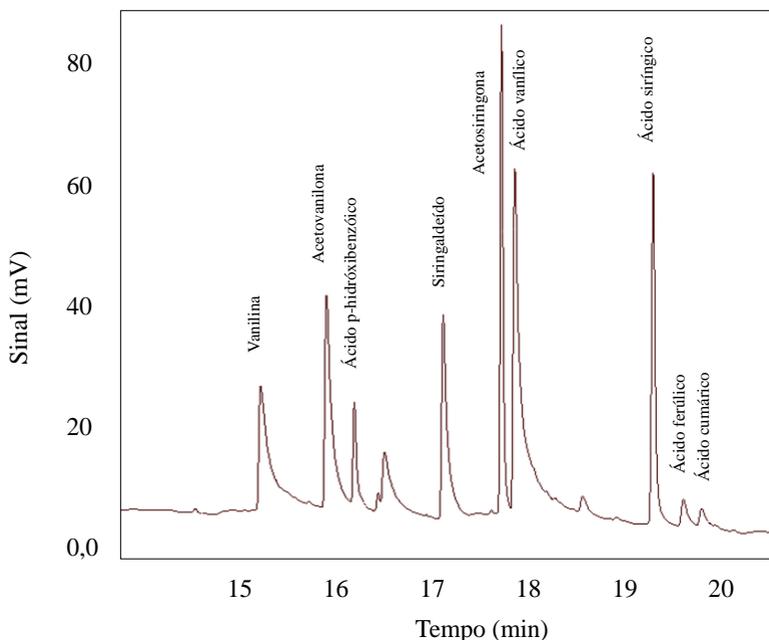
Figura 14. Superfície de resposta obtida a partir do planejamento composto central para as variáveis temperatura e tempo de extração por SPME para a média geométrica dos analitos.



A temperatura ótima, de acordo com os tempos, indicada pelo ponto de máximo permanece entre 70 e 80 °C, assim como o tempo necessário para a extração permanece entre 30 e 50 minutos, o que permite manter a condição estabelecida de 35 minutos de extração como apropriada para a continuidade deste estudo.

A partir das condições de compromisso mencionadas e ilustradas anteriormente, obteve-se o cromatograma para os derivados fenólicos de lignina, ilustrados pela Figura 15.

Figura 15. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração *via* HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; tempo de extração de 35 minutos nesta ordem de procedimentos; temperatura de 80 °C; padrões sem grupamento ácido a 150 mg L⁻¹; padrões com grupamento ácidos a 1500 mg L⁻¹; 60 µL de BSTFA).



Os 9 analitos estudados são identificados pela Figura 15. Os picos não identificados referem-se, possivelmente, a subprodutos das reações de derivação, reações entre os próprios reagentes e a coluna cromatográfica e/ou impurezas presentes nos padrões ou coluna, porém ressalta-se que estes não interferem na análise.

5.3. Desenvolvimento e aplicação do método

A avaliação dos parâmetros necessários para o desenvolvimento da metodologia proposta neste estudo, iniciou-se posteriormente à definição das condições ótimas de extração de derivados fenólicos de lignina, tais como a temperatura de 80 °C, os tempos de extração de 35

minutos e exposição ao agente derivatizante de 15 minutos, a ordem de derivação e posterior extração e o volume de 60 μL de BSTFA. Os principais parâmetros de mérito que foram avaliados são; faixa linear, coeficiente de correlação, limites de quantificação e detecção, seletividade, robustez, precisão e exatidão.

A linearidade corresponde à capacidade do método em fornecer resultados diretamente proporcionais à concentração da substância analisada, dentro de uma determinada faixa de aplicação (MOFFAT et al., 2000). A Tabela 4, além de outros parâmetros, apresenta a faixa linear (faixa de trabalho) para os analitos avaliados neste estudo.

Tabela 4. Parâmetros analíticos de mérito obtidos pelo método proposto de determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimento por SPME e GC/FID.

Analito	R ²	Faixa de trabalho ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD ^a (%)
Siringaldeído	0,9952	35 – 225	27,0	9,0	11,0
Acetossiringona	0,9900	65 – 225	62,8	20,9	6,0
Vanilina	0,9905	75 – 225	75,0	25,0	8,0
Acetovanilona	0,9936	75 – 225	73,5	24,5	17,0
Ácido Vanílico	0,9907	2500 – 9000	2419,7	806,6	7,0
Ácido Siríntrico	0,9902	2500 – 9000	2096,1	698,7	5,0
Ácido Ferúlico	0,9910	2500 – 9000	2249,9	750,0	10,0
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	0,9933	2500 – 9000	2376,4	792,1	10,0
Ácido <i>p</i> -Cumárico	0,9990	2500 – 9000	2471,3	823,8	8,8

R²: coeficiente de correlação; LOQ: limite de quantificação; LOD: limite de detecção; ^aRSD: desvio-padrão relativo.

Através do método matemático conhecido como regressão linear, efetuou-se a estimativa dos coeficientes da curva de calibração a partir de um conjunto de medidas experimentais. Além dos coeficientes de regressão *a* e *b*, também é possível calcular o coeficiente de correlação. Este parâmetro permite uma estimativa da qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão

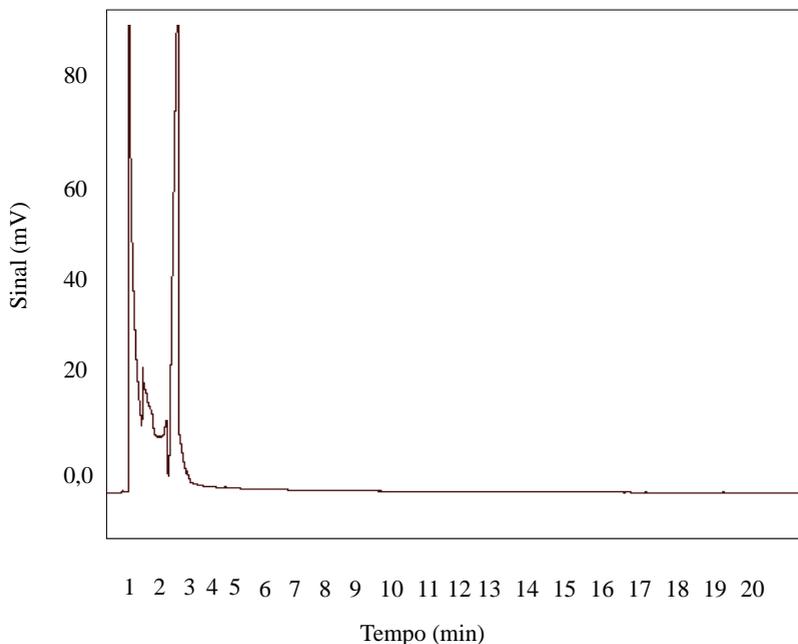
estimados (RIBANI et al., 2004). Os coeficientes de correlação obtidos variam entre 0,9900 e 0,9990 para a acetossiringona e ácido *p*-cumárico, respectivamente.

O limite de quantificação representa a menor concentração da substância em exame que pode ser medida, ao utilizar um determinado procedimento experimental. O limite de detecção representa a menor concentração da substância que pode ser detectada, mas não necessariamente quantificada (MOFFAT et al., 2010). Estimaram-se os limites de quantificação e detecção através do método baseado em parâmetros da curva de calibração expressos como $10s/S$ e $3,3 s/S$, equações 13 e 14 respectivamente, onde s representa a estimativa do desvio padrão do coeficiente linear da equação e a inclinação (s , do inglês *slope*) ou coeficiente angular da curva de calibração é representado por S (RIBANI et al., 2004). A Tabela 5 apresenta a variação dos limites de quantificação obtidos para a determinação de derivados fenólicos de lignina, entre 27,0 e 2471,3 $\mu\text{g g}^{-1}$ e também os valores obtidos para o limite de detecção (9,0 a 823,8 $\mu\text{g g}^{-1}$). Os resultados obtidos para LOQ e LOD evidenciam a sensibilidade do método.

Observa-se pela Tabela 4 uma significável distinção entre as faixas de trabalho para os grupos de analitos estudados. Esta diferença pode ser atribuída a baixa volatilidade e/ou sensibilidade (LOD) dos compostos também exibida na Tabela 4.

A seletividade de um método instrumental de separação é a capacidade de avaliar, de forma inequívoca, as substâncias em exame na presença de componentes que podem interferir em sua determinação em uma amostra complexa. A seletividade garante que o pico de resposta seja exclusivamente do composto de interesse (RIBANI et al., 2004). Para avaliar a seletividade do método, faz-se necessária a análise de uma amostra que não contenha os analitos (branco). Deve-se fazer a injeção do “branco da amostra” (Figura 16) em replicatas. Para este estudo, as injeções foram repetidas sete vezes e os procedimentos de preparo das amostras, derivação e extração equivalem aos procedimentos dos demais estudos, porém sem adição de padrões dos derivados fenólicos de lignina.

Figura 16. Cromatograma obtidos por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para uma amostra que não contém os compostos fenólicos derivados de lignina (branco) (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; de extração de 35 minutos; temperatura de 80 °C; 60 µL de BSTFA).



Comprovou-se a seletividade do método proposto, uma vez que nenhum composto interferente eluiu ao mesmo tempo (tempo de retenção) que os analitos como pode ser observado pela Figura 16. Os picos observados são referentes a eluição do agente derivatizante empregado (BSTFA).

De acordo com o INMETRO, a robustez de um método mede a sensibilidade que este apresenta em relação a pequenas variações. A IUPAC e a USP utilizam o mesmo conceito de robustez para a palavra “ruggedness”. No entanto, a USP agrega a este termo uma definição próxima ao conceito de reprodutibilidade. Por isso, pode-se avaliar a robustez pela variação de parâmetros como programação da temperatura, natureza do gás de arraste, bem como o tempo e temperatura de extração e agitação, entre outros (RIBANI et al., 2004).

Fez-se, então, o estudo da robustez do método através de ensaios com diferentes massas de sedimento para a extração dos analitos. Os valores de massa de sedimento utilizados foram de 100, 150 e 200 mg. Os valores de desvio padrão relativo menores do que 15%, caracterizam a robustez do método e estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Valores de desvio padrão relativo entre as amostras de 100, 150 e 200 mg de sedimento.

Analitos ^a	RSD (%) ^b
Vanilina	14,2
Acetovanilona	8,8
Siringaldeído	11,2
Acetossiringona	9,2
Ácido Vanílico	7,4
Ácido Siríngico	13,0
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	9,6
Ácido <i>p</i> -Cumárico	11,4
Ácido Ferúlico	11,0

^a Analitos presentes nas amostras de sedimentos; ^b Desvio padrão relativo (RSD)

A eventual troca de equipamentos, reagentes e caráter do meio, como por exemplo a temperatura reacional, poderia interferir no resultado analítico ainda que sejam estas variações muito sutis (LEITE, 2002). Neste estudo, a alteração da temperatura de reação em cinco níveis (60, 65, 70, 75 e 80 °C) propiciou resultados aceitáveis em uma de faixa de desvio considerável, 14% < RSD < 19%, o que implica novamente a robustez do método proposto.

A precisão representa a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes, ou padrões, sob condições definidas. A precisão pode ser expressa por meio do desvio padrão absoluto, pelo intervalo de confiança da média e através da estimativa do desvio padrão relativo (RIBANI et al., 2004).

Neste estudo, determinou-se a precisão do método a partir da análise de dez replicatas de sedimento (100 mg) forticado com derivados fenólicos de lignina a uma concentração de 150 e 1500 mg L⁻¹ para os analitos sem e com grupamento ácido, respectivamente. Consideram-se ótimos os valores de RSD obtidos entre 8 e 17% (Tabela 6).

Tabela 6. Valores de desvio padrão relativo obtidos para as replicatas (10x).

Analitos ^a	RSD (%) ^b
Vanilina	17,2
Acetovanilona	8,1
Siringaldeído	12,4
Acetossiringona	10,3
Ácido Vanílico	8,4
Ácido Siríngico	13,0
Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	9,9
Ácido <i>p</i> -Cumárico	12,8
Ácido Ferúlico	10,0

^a Analitos presentes nas amostras de sedimentos; ^b Desvio padrão relativo (RSD)

O grau de discordância entre os resultados individuais encontrados em um determinado ensaio e um valor de referência aceito como verdadeiro caracteriza a exatidão de um método. Os procedimentos mais difundidos para a avaliação da exatidão de um método são; materiais de referência, ensaios de recuperação, adição de padrão e a comparação entre métodos (RIBANI et al., 2004).

A Tabela 7, além de outros parâmetros, apresenta a faixa de trabalho para os analitos (acetossiringona, acetovanilona, ácidos *p*-hidroxibenzóico e vanílico, siringaldeído e vanilina) analisados por HPLC.

Tabela 7. Parâmetros analíticos de mérito obtidos pelo método proposto de determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimento por HPLC.

Analito	R ²	Faixa linear ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g g}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g g}^{-1}$)	RSD /(%) ^a
Siringaldeído	0,9837	45 – 225	39,3	13,1	17,0
Acetossiringona	0,9743	75 – 225	61,1	20,4	16,0
Vanilina	0,9986	45 – 225	42,1	14,0	8,0
Acetovanilona	0,9899	45 – 225	38,0	12,7	12,0
Ácido Vanílico	0,9893	2000 – 9000	1567,0	522,3	16,0
Ácido <i>p</i> - Hidroxibenzóico	0,9804	2500 – 9000	2128,9	709,6	9,0

R²: coeficiente de correlação; LOQ: limite de quantificação; LOD: limite de detecção; ^aRSD: desvio-padrão relativo.

A fim de verificar a exatidão do método, os resultados obtidos para o método em desenvolvimento foram comparados aos resultados obtidos através de um método reportado na literatura, neste caso, a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), por meio de ensaios de recuperação. Avaliou-se, então, o grau de proximidade entre estes resultados para ambos os métodos. Esta abordagem, porém, assume a incerteza do método de referência (RIBANI et al., 2004).

Determinou-se, em triplicatas, os derivados fenólicos nas amostras de sedimento enriquecidas com $90 \mu\text{g g}^{-1}$ (amostra A) e $165 \mu\text{g g}^{-1}$ (amostra B) de cada um dos seguintes padrões: acetovanilina, acetossiringona, siringaldeído e vanilina e $3750 \mu\text{g g}^{-1}$ (amostra C) e $8250 \mu\text{g g}^{-1}$ (amostra D) de cada um dos padrões ácidos: *p*-hidroxibenzóico e vanílico em ambos os métodos.

Os resultados obtidos para as concentrações de recuperação dos analitos nas amostras A, B, C e D pelos métodos proposto e comparativo estão apresentados na Tabela 8 e denotam a semelhança entre as medidas encontrados para cada determinação e em cada amostra. Os resultados obtidos para as metodologias avaliadas mostraram-se equivalentes, ou seja, não foram observadas diferenças significativas. Estes resultados indicam ainda a precisão do método comparativo e, deste modo, assegura-se sua utilização como um fator comparativo.

A obtenção de resultados através de cálculos estatísticos proporciona a avaliação de métodos quanto à exatidão, precisão e confiabilidade dos resultados obtidos em determinações experimentais. A exatidão indica quão próximos são os valores medidos dos valores verdadeiros. Uma das maneiras de determinar a exatidão obtida no desenvolvimento de um método é comparar estes resultados obtidos com os resultados obtidos em um método padrão ou comparativo. Logo, viabiliza-se esta comparação através do cálculo do erro relativo (Er) entre os valores obtidos pelos métodos proposto e comparativo. Para as amostras de recuperação analisadas, foram obtidos erros relativos próximos a 9% para os analitos contidos nas amostras A e B e para os demais os valores foram próximos a 4%. Estes valores são apresentados na Tabela 9, e são julgados aceitáveis ao considerar o método por CG proposto para a determinação de derivados fenólicos de lignina em amostras de sedimentos, ao empregar a técnica de SPME e demonstra razoável exatidão quando comparada a metodologia em HPLC.

Tabela 8. Concentrações de derivados fenólicos de lignina ($\mu\text{g g}^{-1}$) em amostras de sedimento obtidos pela comparação entre os métodos de cromatografia a gás e líquida.

Amostra	Analitos	CG ^a	HPLC ^a
A ($90 \mu\text{g g}^{-1}$)	Vanilina	$75,9 \pm 12,8$	$71,1 \pm 20,1$
	Acetovanilona	$76,8 \pm 7,7$	$72,3 \pm 11,1$
	Siringaldeído	$76,1 \pm 9,3$	$72,9 \pm 5,3$
	Acetossiringona	$81,5 \pm 6,4$	$74,2 \pm 10,8$
B ($165 \mu\text{g g}^{-1}$)	Vanilina	$157,5 \pm 7,5$	$147,9 \pm 10,4$
	Acetovanilona	$154,0 \pm 9,3$	$148,8 \pm 12,5$
	Siringaldeído	$162,3 \pm 25,3$	$161,2 \pm 13,7$
	Acetossiringona	$157,7 \pm 10,5$	$153,6 \pm 11,6$
C ($3750 \mu\text{g g}^{-1}$)	Ácido Vanílico	$3750,3 \pm 80,1$	$3695,4 \pm 28,2$
	Ácido Siríngico	$3550,4 \pm 35,5$	-
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	$3710,5 \pm 53,2$	$3576,8 \pm 83,6$
	Ácido <i>p</i> -Cumárico	$3220,1 \pm 32,2$	-
	Ácido Ferúlico	$3456,7 \pm 34,5$	-
D ($8250 \mu\text{g g}^{-1}$)	Ácido Vanílico	$8137,3 \pm 45,4$	$8006,4 \pm 27,4$
	Ácido Siríngico	$8059,7 \pm 80,5$	-
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	$8138,7 \pm 82,3$	$8039,8 \pm 36,8$
	Ácido <i>p</i> -Cumárico	$7666,6 \pm 76,6$	-
	Ácido Ferúlico	$7980,8 \pm 79,8$	-

^a Média \pm IC = intervalo de confiança

A comparação entre os valores obtidos a partir dos métodos proposto e comparativo possibilita a determinação da exatidão, precisão e/ou diferenciação para os procedimentos. As alternativas comuns para a comparação dos resultados são os testes t para duas médias experimentais e o teste para comparação da precisão (teste F) (MILLER e MILLER, 2010). O teste t neste estudo, apresenta três graus de liberdade a um nível de confiança de 95% e é aplicado para a comparação das médias obtidas em CG e por HPLC. Para as quatro

amostras de recuperação analisadas, os valores de teste t calculados para as diferenças entre as médias das duas técnicas empregadas (Tabela 9), apresentam-se inferiores ao valor t crítico (2,78; 3 graus de liberdade e a um nível de confiança de 95%). Estes valores sugerem equivalências entre as médias obtidas e conseqüentemente, entre os métodos.

Tabela 9. Tratamento estatístico (teste t para duas médias experimentais) dos dados para o desenvolvimento da metodologia proposta para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos.

Amostra	Analito	SD ^a	SD ^b	t ^c calculado	Er ^d (%)
A (90 µg g ⁻¹)	Vanilina	6,85	10,96	0,344	6,3
	Acetovanilona	3,59	6,15	1,076	5,8
	Siringaldeído	4,84	2,50	1,311	4,2
	Acetossiringona	3,42	5,31	2,209	9,0
B (265 µg g ⁻¹)	Vanilina	4,07	5,36	2,565	6,1
	Acetovanilona	5,03	6,33	0,965	3,4
	Siringaldeído	13,64	7,04	5,129	0,6
	Acetossiringona	5,22	5,78	0,791	2,6
C (3750 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	43,66	15,36	0,306	1,7
	Ácido <i>p</i> - Hidroxibenzóico	28,89	45,29	0,593	3,8
D (8250 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	24,60	14,83	1,906	1,6
	Ácido <i>p</i> - Hidroxibenzóico	44,46	19,53	0,503	1,2

^a SD: Desvio Padrão GC; ^b SD: Desvio Padrão HPLC; ^c t crítico = 2,78; ^d Er: Erro relativo.

Uma vez que os valores de t obtidos são inferiores ao t crítico, em um nível de 95% de confiança, conclui-se que não há diferença significativa entre os métodos, exceto para o valor de teste t encontrado para o siringaldeído na amostra B.

Esse resultado corrobora as considerações apresentadas anteriormente e confirma a exatidão na determinação de derivados fenólicos de lignina, pois o pareamento dos dados permite focalizar nas diferenças entre estes.

Finalmente, empregou-se o teste F para comparar a precisão entre ambos os métodos usados para determinar derivados fenólicos de lignina em sedimentos. O valor teórico (F) considerável é igual a 9,28 para um nível de 95% de confiança e três graus de liberdade e os valores encontrados para as quatro amostras de recuperação analisadas são menores do que o valor crítico de F, o que indica a não distinção significativa entre os valores referente à precisão oferecida pelos métodos de análise. Os resultados estão apresentados na Tabela 10 e demonstram a exatidão e precisão da determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos via CG e são comparáveis à determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos via HPLC.

Tabela 10. Tratamento estatístico (teste F) de dados para o desenvolvimento de metodologia proposta para a determinação de derivados fenólicos de lignina em sedimentos.

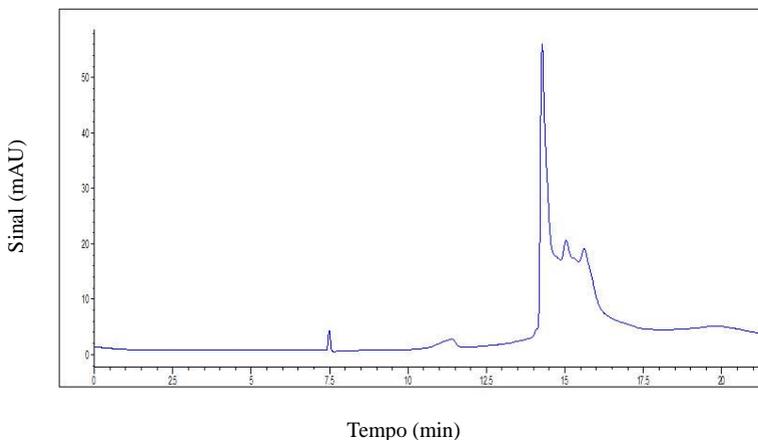
Amostra	Analito	SD ^a	SD ^b	F _{calculado} ^c
A (90 µg g ⁻¹)	Vanilina	6,85	10,96	0,388
	Acetovanilona	3,59	6,15	0,343
	Siringaldeído	4,84	2,50	3,750
	Acetossiringona	3,42	5,31	0,415
B (165 µg g ⁻¹)	Vanilina	4,07	5,36	0,576
	Acetovanilona	5,03	6,33	0,631
	Siringaldeído	13,64	7,04	3,730
	Acetossiringona	5,22	5,78	0,827
C (3750 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	43,66	15,36	8,050
	Ácido <i>p</i> - Hidroxibenzóico	28,89	45,29	0,410
D (8250 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	24,60	14,83	2,760
	Ácido <i>p</i> - Hidroxibenzóico	44,46	19,53	5,210

^a SD: Desvio Padrão GC; ^b SD: Desvio Padrão HPLC; ^c F_{crítico} = 9,28

Vale ressaltar que a ordem de apresentação dos resultados obtidos para os teste estatísticos implica em uma melhor organização e compreensão dos parâmetros estudados, pois sabe-se que o cálculo do teste t depende dos resultados não significativos obtidos para F (LEITE, 2002).

Observa-se a ausência dos analitos ácido siríngico, *p*-cumárico e ferúlico nos resultados referentes à comparação entre os métodos, uma vez que a semelhança entre seus tempos de retenção acarreta a co-eluição destes três derivados fenólicos nesta técnica ou ainda devido aos ínfimos valores de limites de detecção destes compostos. Salienta-se aqui a ótima resolução do método proposto (Figura 13) por cromatografia a gás em relação ao comparativo, cromatografia líquida (Figura 15). Isto é, ressalta-se a ótima capacidade de separação em GC, o que implica em uma maior eficiência cromatográfica e conseqüentemente um maior número de pratos teóricos. Considera-se um prato equivalente a uma etapa de equilíbrio entre duas fases, ou seja, quanto maior o número de pratos, mais equilíbrios existirão, maior será a eficiência e, portanto, a separação (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Figura 17. Cromatograma obtido por HPLC para a comparação do método proposto para a determinação de compostos fenólicos derivados de lignina denominados ácidos *p*-cumárico, ferúlico, *p*-hidroxibenzoico, siríngico e vanílico (concentração dos padrões de 6000 $\mu\text{g g}^{-1}$).



Os resultados dos testes estatísticos corroboram os resultados obtidos para os ensaios de recuperação. Os valores apresentados na Tabela 8 estão ilustrados também na Tabela 11, e denotam a porcentagem de recuperação das amostras enriquecidas.

Tabela 11. Valores, em porcentagem, de derivados fenólicos encontrados nas amostras de sedimento enriquecidas para os ensaios de recuperação.

Amostra	Analitos	CG (%) ^a	RSD (%) ^b	HPLC (%) ^a	RSD (%) ^b
A (90 µg g ⁻¹)	Vanilina	84	9,0	79	15,4
	Acetovanilona	85	4,7	80	8,5
	Siringaldeído	85	6,4	81	3,4
	Acetossiringona	91	4,2	82	7,1
B (165 µg g ⁻¹)	Vanilina	95	2,6	90	3,6
	Acetovanilona	93	3,3	90	4,2
	Siringaldeído	98	8,4	98	4,4
	Acetossiringona	96	3,3	93	3,8
C (3750 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	100	1,2	99	0,4
	Ácido Siríntrico	95	4,4	-	-
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	99	0,8	95	1,3
	Ácido <i>p</i> -Cumárico	86	8,9	-	-
	Ácido Ferúlico	92	7,9	-	-
D (8250 µg g ⁻¹)	Ácido Vanílico	99	0,3	97	0,2
	Ácido Siríntrico	98	5,6	-	-
	Ácido <i>p</i> -Hidroxibenzóico	99	0,5	97	0,2
	Ácido <i>p</i> -Cumárico	93	10,1	-	-
	Ácido Ferúlico	97	9,6	-	-

^a Porcentagem de recuperação; ^b RSD: desvio padrão relativo.

Conforme observa-se na Tabela 10, os valores em porcentagem de recuperação estão entre 79 e 100% e são considerados ótimos para ambas as técnicas cromatográficas, bem como os valores de desvio padrão relativos (0,2 e 15,4%). Segundo Ribani e col. 2004, os intervalos aceitáveis para amostras ou análises complexas em ensaios de recuperação estão entre 50 e 150 % e precisão de até $\pm 15\%$, o que ressalta e evidencia ainda mais os ótimos valores encontrados para a metodologia analítica proposta e desenvolvida por este estudo.

6. CONCLUSÕES

A metodologia analítica proposta possibilitou a separação das 9 substância de interesse avaliadas neste estudo ao aliar a técnica de SPME à reações de derivação.

A utilização do planejamento denominado composto central, bem como do planejamento univariado, possibilitou de maneira simples e rápida a determinação das variáveis que afetam a eficiência de extração dos analitos. As melhores respostas obtidas foram o volume de BSTFA de 60 μL , os tempos de exposição ao agente derivatizante e extração de 15 e 35 minutos, respectivamente nesta ordem de procedimentos e temperatura de 80 $^{\circ}\text{C}$.

Este estudo proporcionou, portanto, o desenvolvimento de uma metodologia analítica para determinação de derivados fenólicos de lignina em amostras de sedimento por cromatografia gasosa e caracteriza o bom desempenho da metodologia em termos de seletividade, limites de detecção, seletividade, robustez, precisão, exatidão e resolução, principalmente se comparada a uma outra técnica de separação, neste estudo, a HPLC. Ademais, a simplicidade do método que dispensa o uso de solventes, permite uma frequência analítica considerável, emprega pequenas quantidades de amostra e mínima geração de resíduos.

7. PERSPECTIVAS

- ✓ Obtenção dos derivados fenólicos de lignina a partir de reações de oxidação de lignina, catalisadas por óxidos, tal como o óxido de cobre (CuO), como proposto por HEDGES e ERTEL em 1982;
- ✓ Aplicação do método desenvolvido em matrizes aquosas;
- ✓ Aplicação do método desenvolvido em amostras reais, ou seja, obter amostras reais e avaliar quali e quantitativamente as razões de derivados fenólicos presentes nestas matrizes, sem a adição destes.

GLOSSÁRIO

Alóctone – Aquilo que não tem suas origens no lugar onde existe;

Angiospermas – Plantas espermatófitas cujas sementes são protegidas por uma estrutura denominada fruto;

Autóctone – Aquilo que é natural da região onde ocorre;

Bentônico – Diz-se de um animal marinho que vive no fundo do mar, em contato com o substrato e não tem capacidade plena de natação;

Diagênese – Transformação dos sedimentos em rochas consolidadas através de fenômenos físicos e químicos;

Estuarino – Ambiente aquático de transição entre um rio e o mar;

Gimnospermas – São plantas terrestres que vivem, preferencialmente, em ambientes de clima frio ou temperado;

Lacustres – Relativo a lagos;

Lenhosos – Que possui aparência ou características de madeira (designação dada às plantas);

Límnico – Aquilo que se desenvolve em ambiente de lago continental de água doce;

Pelágico – Relativo a mar aberto.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. Experimental desing optimization. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 63-70, 1996.

ARTHUR, C. L.; PAWLISZYN, J. B. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

AUGUSTO, F.; VALENTE, A. L. P. Applications of solid-phase microextraction to chemical analysis of live biological samples. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 21, p. 428-438, 2002.

BARBOSA, L. C. A.; MALTHA, C. R. A.; SILVA, V. L. S.; COLODETTE, J. R. Determinação da relaçãoiringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PY – CG-MS). **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.

BEZERRA, M. A.; SANTELLI, R. E. Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry. **Talanta**, v. 76, p. 965-977, 2008.

BIANCHI, T. S.; **Biogeochemistry of Estuaries**. Nova York: Oxford University Press, 2007, 492 p.

BROCKS, J. J.; LOVE, J. D.; SNAPE, C. E.; LOGAN, G. A.; SUMMONS, R. E.; BUICK, R. Release of bound aromatic hydrocarbons from late Archean and Mesoproterozoic kerogens via hydrolysis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 67, p. 1521–1530, 2003.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de Cromatografia**. 4^a ed. São Paulo: Unicamp, 2006, 429 p.

DITTMAR, T.; LARA, R. J.; KATNER, G. River or mangrove? Tracing major organic matter sources of tropical Brazilian coastal waters. **Marine Chemistry**, v 73, p. 253-271, 2001.

DUPONT, A-L.; EGASSE, C.; MORIN, A.; VASSEUR, F. Comprehensive characterization os cellulose-and lignocellulose-degradation products in aged papers: Capillary zone electrophoresis of low-molar mass organic acids, carbohydrates, and aromatic lignin derivates. **Carbohydrates Polimers**, v. 68, p. 1-16, 2007.

EITH, C.; KOLB, M.; RUMI, A.; SEUBERT, A.; VIEHWEGER, K. H. **Práticas em Cromatografia de íons: Uma Introdução**. 2^a ed. Herisau: Metrohm, 2007, 141 p.

FARAJZADEH, Mir Ali; NOURI, Nina; KHORRAM, Parisa. Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 55, p. 14-23, 2014.

FARELLA, N.; LUCOTTE, P.; LOUCHOUARN, P.; ROULET, M. Deforestation modifying terrestrial organic transport in the Rio Tapajós, Brazilian Amazon. **Organic Geochemistry**, v. 32, p. 1443-1458, 2001.

FENGEL, D., WEGNER, G. **Wood, Chemistry Utrastructure, Reactions**, New York: Walter de Gruyter, 1984, 344 p.

FU, L.; MAcCLUM, S. A.; MIAO, J.; HART, C.; TUDRYN, G.; ZHANG, F.; LINHARDT, R. J. Rapid and accurate determination of the lignin content of lignocellulosic biomass by solid-state NMR. **Fuel**, v. 141, p. 39-45, 2015.

GORDON, E. S.; GOÑI, M. A. Controls on the distribution and accumulation of terrigenous organic matter in sediments from the Mississippi and Atchafalaya river margin. **Marine Chemistry**, v. 92, n. 1-4, p. 331-352, 2004.

GOÑI, M.A.; HEDGES, J.L. Lignin dimmers: structures, distribution and potencial geochemical applications. **Geochimica et Chosmochimica Acta**, v. 56, p. 4025-4043, 1992.

HAYES, M. H. B.; MacCARTHY, P.; MALCOLM, R. L.; SWIFT, R. S. **Structure of Humic substances: the Emergence of 'Forms'**. 1st ed, Oxford, Inglaterra: John Wiley & Sons Ltd, 1989, 730 p.

HEDGES, J. I.; CLARK, W. A.; COWIE, G. L. Organic matter sources to the column and surficial sediments of a marine bay. **Limnology and Oceanography**, v. 33, p. 1116-1136, 1988.

HEDGES, JOHN I.; ERTEL, JOHN R. Characterization of lignin by gas capillary chromatography of cupric oxide oxidation products. **Analytical Chemistry**, v. 54, n. 2, p. 174-178, 1982.

HEDGES, J.I.; MANN, C. The characterization of plant tissues by their lignin oxidation products. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 3, p. 1803-1807, 1979.

HEDGES, J. I.; PARKER, P. L.; Land-derived organic matter in surface sediments from Gulf of Mexico. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 40, p. 1019-1029, 1976.

HUNG, P. V.; HATCHER, D. W.; BARKER, W. Phenolic acid composition of sprouted wheats by ultra-performance liquid chromatography (UPLC) and their oxidants activities. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1896-1901, 2011.

HUNT, J. M.; PHILP, R. P; KVENVOLDEN, K. A. Early developments in petroleum geochemistry. **Organic geochemistry**, v. 33, p. 1025-1052, 2002.

ISHIWATARI, R.; UZAKI, M. Diagenetic changes of lignin compounds in a more than 0,6 million-years-old lacustrine sediments. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 51, p. 321-328, 1987.

LV, J.; LUO, L.; ZHANG, J.; CHRISTIE, P.; ZHANG, S. Adsorption of mercury lignin: Combined surface complexation modeling and X-ray absorption spectroscopy studies. **Environmental Pollution**, v.162, p. 255-261, 2012.

LANÇAS, F. M. The role of the separation sciences in the 21th century. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 183-197, 2003.

LEITE, F. **Validação em Análise Química**. 4^a ed. Campinas, São Paulo: Átomo, 2002, 278 p.

LOUCHOARN, P.; AMON, R. M. W.; DUAN, S.; PONDELL, C.; SEWARD, S. M.; WHITE, N. Analysis of lignin-derived phenols in standard reference materials and ocean dissolved organic matter by gas chromatography/tandem mass spectrometry. **Marine Chemistry**, v. 118, n. 1/2, p. 85-97, 2010.

LOUCHOARN, P.; LUCOTTE, M.; CANUEL, R.; GANGNE, J. P.; RICHARD, L. F. Sources and early diagenesis of lignin and bulk organic matter in the sediments of lower St. Lawrence Estuary and Saguenay Fjord. **Marine Geochemistry**, v. 58, p. 3-26, 1997.

MAGDIC, S.; BOYD-BOLAND, A.; JINNO, K.; PAWLISZYN, J. B. Analysis of organophosphorus insecticides from environmental samples using solid-phase microextraction. **Journal of Chromatography A**, v. 736, p. 219-228, 1996.

MCCARTHY, JOSEPH L.; ISLAM, A. Lignin chemistry, technology, and utilization: a brief history. **ACS Symposium Series**, p. 99, 1999.

MEYERS, P. A. Applications of organic geochemistry to paleolimnological reconstructions: a summary of examples from the Laurentian Great Lakes. **Organic Geochemistry**, v. 34, p. 261-289, 2003.

MILLER, J.N.; MILLER, J. C. **Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry**. 4^a ed. Edinburgh, Inglaterra: Pearson Prentice Hall, 2000, 237 p.

MOFFAT, A. C.; TRAFFORD, A. D.; JEE, R. D.; GRAHAM, P. Meeting the International Conference on Harmonization's Guidelines on Validation of Analytical Procedures: Quantification by exemplified by a near-infrared reflectance assay of paracetamol in intact tablets. **The Royal Society of Chemistry**, v. 125, p. 1341-1351, 2000.

NETO, B. B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria.** 4^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2010, 384 p.

NETO, F. R. N. Hidrocarbonetos saturados como indicadores geoquímicos moleculares. **Química Nova**, v. 7, n. 2, p. 79-85, 1984.

PAWLISZYN, J. B. **Handbook of solid phase microextraction.** Beijing: Chemical Industry Press, 2009, 399 p.

PAWLISZYN, J. B. Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, p. 2145-2148, 1990.

PEMPKOWIAK, J.; TYLMANN, W.; STANISZEWSKI, A.; GOLEBIEWSKI, R. Lignin depolymerization products as biomarkers of the organic matter sedimentary record in 210Pb-Cs-dated lake sediments. **Organic Geochemistry**, v. 37, p. 1452-1464, 2006.

PERALTA-ZAMORA, P.; MORAIS, J. L.; NAGATA, N. Porque otimização multivariada? **Engenharia Sanitária Ambiental**, v. 10, n. 2, p. 106-110, 2005.

PERISSOTO, D. O. **Estudo Comparativo das Propriedades Químicas de Polpas Kraft convencionais e MCC de Eucalipto.** 2005. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Paraná, PR. 113 p.

PETERS, K. E.; MOLDOWAN, J.M. **The Biomarker Guide: Interpreting Molecular Fossils in Petroleum and Ancient Sediments.** New Jersey: Prentice Hall, Englewood Cliffs, 1993, 915 p.

PILÓ-VELOSO, D.; NASCIMENTO, E. S.; MORAIS, S. A. L. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 15, n. 5, p. 435-448, 1993.

PHILP, R. P. Fossil Fuel Biomarkers-Applications and Spectra. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 51, p.3282, 1985.

POYNTER, J.; EGLINGTON, G. The biomarker concept-strengths and weaknesses. **Fresenius Journal of Analytical Chemistry**, v. 339, p. 725-731, 1991.

RAMOS, L. Critical overview of selected contemporary sample preparation techniques. **Journal of Chromatography A**, v. 1221, p. 84-98, 2012.

RASHID, M.A. **Geochemistry of marine humic compounds**. Nova York, USA: Springer Verlag, 1985, 300 p.

RIBANI, M.; BOTOLI, C. B. G.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771-780, 2004.

SILVEIRA, C. D. S.; MARTENDAL, E.; VALDIR, S.; CARASEK, E. Application of solid-phase micro and gas chromatography-mass spectrometry for the determination of chlorophenols in leather. **Journal of Separation Science**, v. 35, p. 602-607, 2012.

SILVEIRA, C. D. S.; MERIB, J.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. Extraction on-Fiber Derivatization of Chlorophenols in Lather by Internally Cooled Solid Phase Microextraction. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 12, p. 2232-2236, 2012.

STASHENKO, ELENA E.; MARTÍNEZ, JAIRO R. Derivatization and solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 23, n. 8, p. 553-561, 2004.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Fundamentos de Química Analítica**. 8^a ed. Porto Alegre: Cengage Learning, 2008, 999 p.

SKOOG, D. A., WEST, D. M., HOLLER, F. J., CROUCH, S. R. **Princípios de Análise Instrumental**. 6^a ed. Porto Alegre: Bookman, 2009, 1007 p.

TAKADA, H.; EGANHOUSE. R. P. **Molecular markers of anthropogenic waste.** R.A. Encyclopedia of Environmental Analysis and Remediation. New York: John Wiley & Sons, Inc., 1998, 2883 p.

TAKADA, H. SATOH, F.; BOTHNER, M. H.; TRIPP, B. W.; JOHNSON, C. G.; FARRINGTON, J. W. **Anthropogenic molecular markers: tools to identify the sources and transport pathways of pollutants.** ACS Symposium Series 671, 1997, 178 p.

TARLEY, C. R. T.; SILVEIRA, G.; SANTOS, V. N. L.; MATOS, G. D.; SILVA, E. G. P.; BEZERRA, M. A.; MIRÓ, M.; FERREIRA, S. L. C. Chemometric tools in electroanalytical chemistry: methods for optimization based on factorial design and response surfacy methodology. **Microchemical Journal**, v. 92, p. 58-67, 2009.

TAREQ, SHAFI M.; TANAKA, NORIYUKI; OHTA, KEIICHI. Biomarker signature in tropical wetland: lignin phenol vegetation index (LPVI) and its implications for reconstructing the paleoenvironment. **Science of the Total Environment**, v. 324, n. 1, p. 91-103, 2004.

TAREQ, S.M.; KITAGAWA, H.; OHTA, K. Lignin biomarker and isotopic records of paleovegetation and climate changes from Lake Erhai, southwest China, since 18.5 ka BP. **Quaternary International**, v. 229, p. 47, 2011.

TISSOT, B.P.; WELTE, D.H. **Petroleum formation and occurrence. Second revised and enlarged.** 2. ed. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1984, 666 p.

THEVENOT, M.; DIGNAC, M-F.; RUMPEL, C. Fate of lignins in soils: a review. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 42, n. 8, p. 1200-1211, 2010.

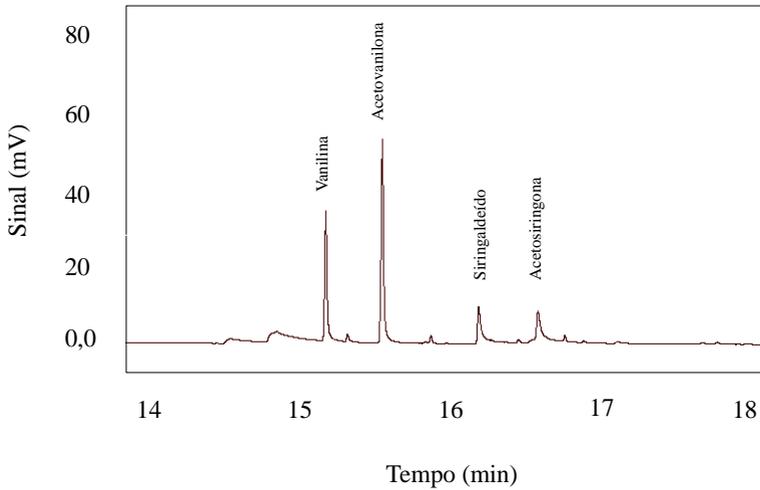
VAN DER HAGE, E. R. A.; BOON, J. J. On-line Curie-point pyrolysis-high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric analysis of lignin polymers. **Journal of Chromatography A**, v.736, p. 61-75, 1996.

VOLKMAN, J.K.; REVILL, A.T. e MURRAY, A.P. **Application of biomarkers for identifying sources of natural and pollutant hydrocarbons in aquatic environments**, in EGANHOUSE, R.P. **Molecular markers in environmental chemistry: American Chemical Society**. ACS Symposium Series 671, p. 110-132, 1997.

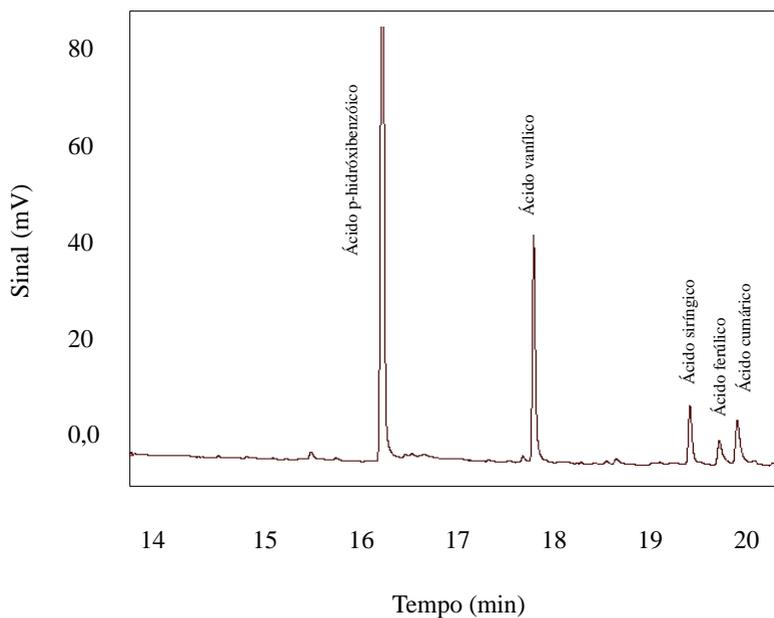
WANG, Z.; STOUT, S. A.; FINGAS, M. Forensic fingerprinting of biomarkers for oil spill characterization and source identification. **Environmental Forensics**, v. 7, p. 105-146, 2007.

APÊNDICE

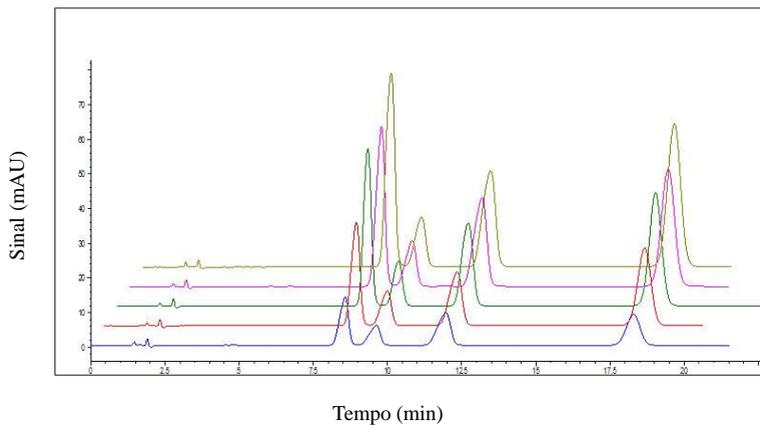
Apêndice A. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina de caráter não ácido (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; de extração de 35 minutos nesta ordem de procedimentos; concentração dos padrões de $100 \mu\text{g g}^{-1}$; $60 \mu\text{L}$ de BSTFA, temperatura de 80°C).



Apêndice B. Cromatograma obtido por GC/FID para o procedimento de extração via HS-SPME para os compostos fenólicos derivados de lignina de caráter ácido (tempo de exposição ao BSTFA de 15 minutos; de extração de 35 minutos nesta ordem de procedimentos; concentração dos padrões de $6000 \mu\text{g g}^{-1}$; $60 \mu\text{L}$ de BSTFA, temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$).



Apêndice C. Cromatogramas obtidos por HPLC para a comparação do método proposto para a determinação de compostos fenólicos derivados de lignina de caráter não ácido, referente a curva de calibração para estes analitos (concentração dos padrões de 75 a 225 $\mu\text{g g}^{-1}$).



Apêndice D. Cromatograma (a) e espectro de UV-VIS (b) obtidos por HPLC para a comparação do método proposto para a determinação de compostos fenólicos derivados de lignina de caráter ácido, especificamente para o ácido vanílico (concentração dos padrões de $6000 \mu\text{g g}^{-1}$).

