



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

Maria Johann Fensterseifer

**Uso da microextração sortiva em fase têxtil fixado no sistema 96 well plate para
determinação de ácidos orgânicos em vinho empregando LC-MS/MS**

Florianópolis
2022

Maria Johann Fensterseifer

**Uso da microextração sortiva em fase têxtil fixado no sistema 96 well plate para
determinação de ácidos orgânicos em vinho empregando LC-MS/MS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Química.

Orientador: Prof. Luciano Vitali, Dr.

Coorientador: Prof. Eduardo Carasek da Rocha, Dr.

Florianópolis

2022

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

Fensterseifer, Maria Johann

Uso da microextração sortiva em fase têxtil fixado no sistema 96 well plate para determinação de ácidos orgânicos em vinho empregando LC-MS/MS / Maria Johann Fensterseifer ; orientador, Luciano Vitali, coorientador, Eduardo Carasek da Rocha, 2022.

87 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Físicas e Matemáticas, Programa de Pós-Graduação em Química, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Química. 2. Preparo de amostra. 3. Sal amônio quaternário de quitosana. 4. Ácidos orgânicos alifáticos. 5. Amostras de vinho. I. Vitali, Luciano. II. da Rocha, Eduardo Carasek. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

Maria Johann Fensterseifer

**Uso da microextração sortiva em fase têxtil fixado no sistema 96 well plate para
determinação de ácidos orgânicos em vinho empregando LC-MS/MS**

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca
examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Diogo Alexandre Siebert, Dr.
Universidade Regional de Blumenau (FURB)

Prof. Luiz Augusto do Santos Madureira, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi
julgado adequado para obtenção do título de mestre em Química.

Prof. Giovanni Finoto Caramori, Dr.
Coordenador do Programa

Prof. Luciano Vitali, Dr.
Orientador

Florianópolis, 26 de outubro de 2022.

Este trabalho é dedicado aos meus pais, Paulo e Regina.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, gostaria de agradecer imensamente aos meus pais, Paulo e Regina, por me proporcionarem tantas coisas nesses 27 anos de vida. Pelo apoio, incentivo e suporte em todos os momentos. Vocês são a razão de tudo isso.

Ao meu orientador professor Dr. Luciano Vitali, por toda as contribuições, disposição em ajudar, ensinamentos e paciência, ao longo desta jornada. Ao meu coorientador professor Dr. Eduardo Carasek, assim como todos os professores que contribuíram para minha formação e para que esse dia chegasse.

Agradeço a professora Giane Gonçalves Lenzi e ao laboratório multiusuário (UTFPR), pelas análises de MEV. Agradeço ao Rodrigo Hoff, e aos demais funcionários do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), especialmente Carolina e Cristian, por terem colaborado imensamente pra que eu pudesse realizar meus experimentos e concluir este trabalho. Muito obrigada!

Aos colegas do LABECC, não tenho palavras pra expressar a gratidão que sinto em ter conhecido cada um de vocês e dividido tantos momentos ao longo dessa jornada, vocês fizeram com que fosse mais alegre e cheia de aprendizados. Agradeço especialmente ao Victor e a Samantha, que me receberam e por algum tempo foram minhas únicas companhias no laboratório, vocês foram maravilhosos comigo. A Riani, pelas correções e auxílio na escrita do trabalho, à Carolina, pela ajuda, pelos momentos de reflexão, de trabalho e risadas, que não foram poucos. Agradeço também a Mayara, Kheyti, Camila e Vinícius. Todos vocês me estenderam a mão quando eu precisei, me ouviram, me ajudaram, e comemoraram comigo o final desse ciclo. Sou muito grata por ter conhecido e dividido tanto com cada um de vocês. Muito obrigada por tudo, mesmo!

Aos colegas do CroMaas, agradeço pelas contribuições durante as reuniões de grupo. Especialmente Lucas Morés, por sempre estar disposto a tirar minhas dúvidas e Camila Will, pela parceria e compreensão quando ambas precisávamos usar o equipamento.

Passar por uma pandemia durante o mestrado foi desafiador, e com certeza teria sido muito mais se eu não tivesse algumas pessoas ao meu lado, especialmente Luísa, Renan e Roberto, com quem dividi tanto, e ao Mateus e Vinícius, amigos que a química me deu e também fizeram parte dessa caminhada. Vocês terão sempre um lugar especial na minha vida. A vocês, e todos os demais amigos, da vida, do laboratório, da graduação, agradeço imensamente por terem entendido os momentos de ausência nesse período, pelos momentos de descontração e alegria, pelo apoio nos momentos difíceis e por estarem comemorando comigo essa conquista.

À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), ao Programa de Pós Graduação em Química (PPGQ) e aos Departamentos de Química (QMC) pelos recursos e

estruturas fornecidas para a realização deste trabalho. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Tecnológico e Científico (CNPq) e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Catálise em Sistemas Moleculares e Nanoestruturados (INCT-Catálise) pelo auxílio financeiro prestado.

- *Quem estará nas trincheiras ao seu lado?*
- *E isso importa?*
- *Mais do que a própria guerra.*
(Ernest Hemingway, 1899)

RESUMO

Amostras alimentícias normalmente apresentam matrizes complexas e as metodologias analíticas muitas vezes requerem métodos de preparo de amostras mais elaborados para minimizar interferências nas determinações de compostos de interesse. O efeito de matriz pode estar presente nesses casos, que a complexidade das amostras pode interferir nos resultados, além de prejudicar instrumentos e exigir métodos trabalhosos para a quantificação dos analitos, como calibração por adição de padrão. Para contornar essas questões, este trabalho busca avaliar uma metodologia de preparo de amostra para extração e determinação de ácidos orgânicos alifáticos de cadeia curta em amostras de vinho empregando microextração em fase sólida por filme fino (TF-SPME, do inglês Thin Film Solid Phase Microextraction). Os analitos utilizados para averiguação da viabilidade da metodologia proposta foram os ácidos succínico e láctico. A proposta de extração, além de contemplar várias vantagens inerentes às técnicas de microextração, explora a interação entre a fase extratora e seu respectivo suporte e seus benefícios, como na maior estabilidade do recobrimento e tempos menores de equilíbrio da extração. No presente trabalho, foram utilizadas hastes flexíveis do tipo *swab*. A porção de algodão da haste foi o substrato para um filme polimérico em multicamadas de sal amônio quaternário de quitosana e reticulante glutaraldeído. A produção do filme consistiu em mergulhar a porção de algodão da haste em solução de biopolímero (0,2%, m/m) e reticulante (2,5%, v/v) e manter em contato pelo tempo de 20 min, de forma intercalada, totalizando sete camadas e os resultados mostraram uma boa reprodutibilidade na preparação do filme (coeficiente de variação obtido ao comparar as massas das hastes depois de preparado o filme, $CV < 7\%$, $n = 8$). As hastes foram fixadas em dispositivos como *96 well plate*, a fim de conferir ao método alta frequência analítica. Para otimização, foram feitos experimentos multivariados e univariados. As condições experimentais de extração selecionadas incluíram tempo de 30 min, pH de 5,5 e cloreto de sódio adicionado de 10% (m/v). As condições experimentais de dessorção utilizadas foram uma solução composta de ácido clorídrico em pH 1,0 contendo 20% (v/v) de acetonitrila e tempo de dessorção de 20 min. O monitoramento dos analitos foi realizado por LC-MS/MS empregando uma coluna LARIHC-CF6-P (5 μm , 150 x 4,6 mm) com eluição no modo gradiente e volume de amostra injetado de 5 μL . Os parâmetros de validação revelaram limites de quantificação para o ácido succínico e ácido láctico de 2,63 mg L^{-1} e 0,35 mg L^{-1} respectivamente. Os estudos de recuperação e precisão realizados em três níveis de fortificação, revelaram uma variação de 59% a 115% para recuperação e de 10 % a 46% para precisão. A avaliação do efeito de matriz por meio da comparação dos coeficientes angulares das calibrações por adição de padrão e calibrações externas empregando o teste-t, indicaram que não houve efeito de matriz nas quantificações dos dois analitos estudados. O método foi aplicado em amostras de vinho adquiridos do comércio local e mostrou potencial para ser empregado nas extrações e determinações de ácidos orgânicos alifáticos nessas amostras.

Palavras-chave: Microextração em filme fino. Sal amônio quaternário de quitosana. Ácidos orgânicos alifáticos. Vinho.

ABSTRACT

Food samples that usually present complex matrices and analytical methodologies often require more elaborate sample preparation methods to minimize interferences in the determination of compounds of interest. The matrix effect is often present in these cases, and the complexity of the samples can interfere with the results, in addition to damaging instruments and demanding laborious methods for the quantification of analytes, such as calibration by standard addition. To overcome these issues, this work proposed to evaluate a sample preparation methodology for the extraction and determination of short-chain aliphatic organic acids in wine samples using Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME). The analytes used to verify the feasibility of the proposed methodology were succinic and lactic acids. Besides contemplating several advantages inherent to microextraction techniques, the method proposed explores the interaction between the extraction phase and the support and its benefits, such as the stability of the coating and shorter equilibrium time. In the present study, cotton swabs were used as support. The cotton portion was the substrate for a multilayer polymeric film of quaternary ammonium chitosan salt and glutaraldehyde was used as cross-linker. For the preparation of the film, the cotton portion was immersed in a solution of polymer (0.2%, m/m) and kept in contact for 20 minutes, followed by an immersion in a solution of crosslinker (2.5%, v/v) and kept in contact for another 20 minutes. This process was repeated until a coating with a total of seven layers was obtained. The results showed a good reproducibility in the preparation of the film (coefficient of variation obtained when comparing the masses of the swabs after preparing the film, $CV < 7\%$, $n = 8$). The swabs were fixed in devices similar to a 96 well plate to ensure a high throughput extraction method. For optimization, multivariate and univariate experiments were performed and the experimental conditions were selected based on the results. The extraction time selected was 30 min, pH around 5.5 and sodium chloride (10% m/v) was added. For the desorption step a solution of hydrochloric acid at pH 1.0 containing 20% (v/v) acetonitrile was used and the desorption time was 20 min. Analyte monitoring was performed using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) using a LARIHC-CF6-P column (5 μm 150 x 4.6 mm) in gradient mode and an injection volume of 5 μL . Validation parameters revealed quantification limits of 2.63 mgL^{-1} for succinic acid and 0.35 mgL^{-1} for lactic acid and. The recovery and precision studies were carried out at three levels of fortification, with results showing a variation between 59% and 114% for recovery and 10% and 46% for precision. The matrix effect was evaluated using the t-test to compare the angular coefficients of the calibration curves obtained by standard addition and external calibration. The result indicated that there was no matrix effect in the quantification of the two analytes studied. The method was applied to wine samples purchased in the local market. It showed potential to be applied to the extraction and determination of aliphatic organic acids in these samples.

Keywords: Thin Film Solid Phase Microextraction. Chitosan quaternary ammonium salt. Organic acids. Wine.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1 – Representação dos modos de SPME: a) extração por <i>headspace</i> . b) Extração por imersão direta. | 23 |
| Figura 2 – Representação da extração através de TF-SPME. | 26 |
| Figura 3 – Representação das etapas de limpeza, lavagem, extração e dessorção da porção de tecido utilizada como substrato para fase extratora, como proposto pela FPSE. | 27 |
| Figura 4 – Representação das estruturas da quitina e do produto da sua desacetilação, a quitosana. | 29 |
| Figura 5 – Esquema da reação entre a quitosana e cloreto de trimetil glicidil amônio. | 30 |
| Figura 6 – Esquema da reação de reticulação entre o biopolímero SAQQ e o reticulante GLU. | 31 |
| Figura 7 – Estrutura do biopolímero celulose com grupos hidroxilas destacados. | 32 |
| Figura 8 – Procedimento da FPSE reportado na literatura: a) FPSE armazenado em vidro relógio; b) FPSE em uma pinça; c) Extração sortiva em fase têxtil; d) Transferência do eluente para o frasco de injeção. | 34 |
| Figura 9 – Esquema relacionando a utilização de fibras de algodão provenientes de hastes flexíveis. | 35 |
| Figura 10 – Pente com 12 pinos e representação da escova contendo 8 pentes e 96 pinos revestidos com fase extratora. | 36 |
| Figura 11 – Dispositivo 96 well plate com pente fixado na escova e em contato com a placa de 96 poços sobre um suporte de agitação com ajuste manual. | 37 |
| Figura 12 – Estrutura e propriedades dos analitos | 39 |
| Figura 13 – Esquema representativo da haste flexível com filme polimérico multicamadas disposto sobre a porção de algodão da haste. | 45 |
| Figura 14 – Materiais utilizados para fixação das hastes flexíveis no pente. | 46 |
| Figura 15 – Demonstração da produção do swab revestido com duas camadas de polímero (SAQQ) e uma de reticulante (GLU). | 47 |
| Figura 16 – Demonstração da produção do swab revestido com quatro camadas de polímero (SAQQ) e três de reticulante (GLU). | 47 |
| Figura 17 – Demonstração da utilização das hastes flexíveis utilizadas acopladas ao 96 well plate: a) materiais utilizados; b) hastes fixadas no pente; c) utensílios para fixação do pente na escova; d) pente fixado à escova; e) dispositivo pronto para ser utilizado com a placa de 96 poços com capacidade de 2 mL cada. | 48 |
| Figura 18 – Demonstração da utilização das hastes flexíveis convencionais e swab. | 51 |

| | |
|--|----|
| Figura 19 – Cromatograma contendo os analitos e seus respectivos tempos de retenção. Condições experimentais: vide metodologia | 53 |
| Figura 20 – Gráfico de barras para avaliação da variação da massa das hastes flexíveis sem e com o filme de SAQQ. Dados de massa de 8 hastes flexíveis avaliadas individualmente sem e com o filme de SAQQ. | 55 |
| Figura 21 – Gráfico de barras para avaliação da variação da massa das hastes flexíveis sem e com o filme de SAQQ. Dados de massa média das 8 unidades avaliadas sem e com o filme de SAQQ. | 56 |
| Figura 22 – Imagem obtida por MEV da porção de algodão com filme polimérico (FM-4C) com aproximação de 200x. | 57 |
| Figura 23 – Comparação entre o fluxo de líquido através de um substrato de microextração permeável e impermeável. | 58 |
| Figura 24 – Espectro de IV para as hastes flexíveis sem o filme polimérico, com filme polimérico e polímero SAQQ | 59 |
| Figura 25 – Gráfico de barras para avaliação simultânea do número de camadas de filme e solução de dessorção. Filmes poliméricos: FM-2C (filme multicamadas com 2 camadas de SAQQ); FM-4C (filme multicamadas com 4 camadas de SAQQ). Condição 1: 0,1 mol L ⁻¹ de HCl e 20% ACN; Condição 2: 0,01 mol L ⁻¹ de HCl. | 61 |
| Figura 26 – Gráfico de Pareto gerado pelos experimentos de planejamento fatorial fracionário relacionados na Tabela 5, seção Metodologia. | 63 |
| Figura 27 – Gráfico de barras para avaliação da resposta dos analitos em relação à quantidade de NaCl em 3 níveis de concentração: 1%, 5% e 10%. | 64 |
| Figura 28 – Gráfico de barras para comparativo da utilização das hastes flexíveis convencionais e <i>swab</i> com filme polimérico. | 66 |
| Figura 29 – Gráfico de barras para comparativo da reutilização das hastes flexíveis <i>swab</i> com filme polimérico. | 67 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 – Exemplos de aplicação da técnica FPSE como preparo de amostra utilizada com diferentes técnicas cromatográficas, para analitos e matrizes diversas. | 33 |
| Tabela 2 – Gradiente de fase móvel utilizado na separação cromatográfica dos analitos. | 43 |
| Tabela 3 – Parâmetros de cada ácido orgânico analisado no LC-MS/MS (modo negativo). Otimização do espectrômetro de massas feito através de infusões diretas de soluções aquosas contendo os analitos. | 44 |
| Tabela 4 – Relação de experimentos para avaliação do filme polimérico, número de camadas de polímero e solução de dessorção. | 49 |
| Tabela 5 – Relação de experimentos para o Gráfico de Pareto. | 50 |
| Tabela 6 – Resultados do teste t de Student para comparação das áreas obtidas para os analitos para avaliação da reutilização da haste flexível com filme polimérico por 3 ciclos de extração. | 68 |
| Tabela 7 – Resultados do teste t de Student para comparação das inclinações das curvas com padronização por adição de padrão e por calibração externa para os dois analitos. | 68 |
| Tabela 8 – Parâmetros analíticos de mérito para o método proposto. | 69 |
| Tabela 9 – Resultados da recuperação relativa e respectivos desvios para o método proposto. | 69 |
| Tabela 10 – Resultados da precisão para o método proposto. | 70 |
| Tabela 11 – Resultados da aplicação do método em amostras de vinho tinto e branco. | 70 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|---|
| Anvisa | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| CE | energia de colisão, do inglês <i>collision energy</i> |
| CEP | potencial de entrada na célula de colisão, do inglês <i>collision cell entrance potential</i> |
| CXP | potencial da célula de saída, do inglês <i>collision cell exit potential</i> |
| CZE | eletroforese capilar, do inglês <i>Capillary zone electrophoresis</i> |
| DIPOV | Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal |
| DP | potencial de desagregação, do inglês <i>declustering potential</i> |
| EP | potencial de entrada, do inglês <i>entrance potential</i> |
| FM-2C | filme polimérico multicamadas com 2 camadas de SAQQ |
| FM-4C | filme polimérico multicamadas com 4 camadas de SAQQ |
| FPSE | extração sortiva em fase têxtil, do inglês <i>Fabric Phase Sorptive Extraction</i> |
| FT-IR | espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês <i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i> |
| GLU | Glutaraldeído |
| HILIC | cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês <i>hydrophilic interaction liquid chromatography</i> |
| HPLC | cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês <i>High Performance Liquid Chromatography</i> |
| LABINC | Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia |
| LC-MS | cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês <i>Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry</i> |
| LC-MS/MS | cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, do inglês <i>Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry</i> |
| LLE | extração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Extraction</i> |
| LLME | microextração líquido-líquido, do inglês <i>Liquid-Liquid Microextraction</i> |
| LOD | limite de detecção, do inglês <i>Limit of Detection</i> |
| LOQ | limite de quantificação, do inglês <i>Limit of quantification</i> |
| MAPA | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MRM | monitoramento de reações múltiplas |
| NPLC | cromatografia líquida de fase normal, do inglês <i>normal phase liquid chromatography</i> |
| PDMS | polidimetilsiloxano |
| PEG | polietilenoglicol |

| | |
|----------|---|
| PIQs | Padrões de Identidade e Qualidade |
| PTHF | politetrahydrofurano |
| QuEChERS | do inglês, <i>Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe</i> |
| RPLC | cromatografia líquida de fase reversa, do inglês <i>reverse phase liquid chromatography</i> |
| RSD | desvio padrão relativo, do inglês <i>Relative Standard Deviation</i> |
| SAQQ | sal amônio quaternário de quitosana |
| SBSE | extração sortiva com barra de agitação, do inglês <i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> |
| SDME | microextração em gota única, do inglês <i>Single Drop Microextraction</i> |
| SEM | microscopia eletrônica de varredura, do inglês <i>Scanning Electron Microscopy</i> |
| SPE | extração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Extraction</i> |
| SPME | microextração em fase sólida, do inglês <i>Solid Phase Microextraction</i> |
| TF-SPME | microextração em fase sólida por filme fino, do inglês <i>Thin Film Solid Phase Microextraction</i> |
| UTFPR | Universidade Tecnológica Federal do Paraná |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 17 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 20 |
| 2.1 | PREPARO DE AMOSTRA | 20 |
| 2.2 | INJEÇÃO DE AMOSTRAS COM MATRIZES COMPLEXAS EM LC-MS/MS | 20 |
| 2.3 | TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO | 22 |
| 2.3.1 | Microextração em Fase Sólida | 22 |
| 2.3.2 | Microextração em Filme Fino | 25 |
| 2.3.2.1 | Filmes poliméricos | 28 |
| 2.3.2.2 | Suportes sólidos para TF-SPME | 31 |
| 2.3.2.3 | Dispositivo de alta frequência analítica | 36 |
| 2.3.3 | Ácidos orgânicos em amostras de vinho | 37 |
| 3 | OBJETIVOS | 41 |
| 3.1 | OBJETIVOS GERAIS | 41 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 41 |
| 4 | METODOLOGIA | 42 |
| 4.1 | SOLUÇÕES E REAGENTES | 42 |
| 4.2 | MATERIAIS | 42 |
| 4.3 | CARACTERIZAÇÕES DO FILME BIOPOLIMÉRICO SUPORTADO EM ALGODÃO | 42 |
| 4.4 | INSTRUMENTAÇÃO LC-MS/MS, MÉTODO E CONDIÇÕES DA EXTRAÇÃO POR TF-SPME | 43 |
| 4.5 | PREPARO DOS FILMES COM SAQQ NO SUPORTE DE HASTE FLEXÍVEL <i>SWAB</i> E <i>96 WELL PLATE</i> | 46 |
| 4.6 | AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA EXTRAÇÃO E DESSORÇÃO DOS ANALITOS POR TF-SPME | 48 |
| 4.7 | OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO E DESSORÇÃO POR TF-SPME | 49 |
| 4.8 | ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS TF-SPME E AVALIAÇÃO DO USO DE HASTES FLEXÍVEIS CONVENCIONAIS COMO ALTERNATIVAS DE SUPORTE SÓLIDO | 50 |
| 4.9 | PARÂMETROS DE MÉRITO | 52 |
| 4.10 | APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS DE VINHO | 52 |
| 5 | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 53 |
| 5.1 | SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS ANALITOS POR LC-MS MS | 53 |
| 5.2 | ANÁLISES QUÍMICAS DO FILME POLIMÉRICO PARA UTILIZAÇÃO EM TF-SPME | 54 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 5.2.1 | Massa das hastes flexíveis utilizadas para TF-SPME | 54 |
| 5.2.2 | Microscopia eletrônica de varredura | 57 |
| 5.2.3 | Análise de infravermelho por transformada de Fourier | 58 |
| 5.3 | OTIMIZAÇÕES DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO | 60 |
| 5.3.1 | Avaliação preliminar do filme polimérico, condições de dessorção e diluição pré-injeção | 60 |
| 5.3.2 | Efeito de secagem | 62 |
| 5.3.3 | Adição de sal, tempo de extração, pH da extração, tempo de secagem e tempo de dessorção | 62 |
| 5.4 | AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE HASTES FLEXÍVEIS CONVENCIONAIS E TESTES DE REUTILIZAÇÃO | 65 |
| 5.5 | AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E PARÂMETROS DE MÉRITO DA METODOLOGIA PROPOSTA | 68 |
| 5.6 | APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA EM AMOSTRA DE VINHO | 70 |
| 5.7 | COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DA LITERATURA | 71 |
| 6 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS | 73 |
| 6.1 | CONCLUSÕES | 73 |
| 6.2 | PERSPECTIVAS | 73 |
| | REFERÊNCIAS | 75 |

1 INTRODUÇÃO

A determinação de diversos compostos químicos de interesse são realizadas para fins de controle de qualidade, monitoramento de processos, monitoramento ambiental, caracterização de produtos, entre outros, em amostras de águas de rios e lagos, bem como no solo e no ar, em alimentos, bebidas e fluídos biológicos. Estes são exemplos de amostras cuja matriz normalmente é muito complexa, nas quais o analito está junto de outras substâncias, que muitas vezes podem interferir na análise e determinação. Além disso, para as instrumentações analíticas, por mais desenvolvidas e modernas que sejam, muitas vezes não se recomenda a injeção direta da amostra ou amostra diluída, pois os instrumentos podem ser danificados ou precisarem de manutenção mais frequente e onerosa nessas condições. É o caso deste trabalho, no qual se utiliza cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem, do inglês *Liquid Chromatography Coupled with Tandem Mass Spectrometry* (LC-MS/MS), um equipamento de alta tecnologia, mas que em muitos casos requer algum procedimento de limpeza da matriz da amostra antes das injeções. Essa limpeza, além de prevenir manutenções, também contribui para minimizar os efeitos da matriz, que quando presentes, impedem a quantificação por métodos mais simples, como a calibração externa.

A complexidade da matriz, além de interferir na sensibilidade do método analítico e na preservação da instrumentação, pode influenciar significativamente na frequência analítica do método proposto. Isso porque, caso o efeito de matriz seja pronunciado, a quantificação ocorrerá por calibração por adição de padrão, ou seja, para cada amostra que se deseja analisar, uma curva de calibração deverá ser confeccionada. Como consequência, o método torna-se laborioso e demorado, dificultando sua implementação quando houver um grande número de amostras. Alternativamente também pode ser empregada a calibração por semelhança de matriz ou calibração em matriz isenta, porém essas calibrações apresentam limitações no seu uso, devido à dificuldade de mimetizar a matriz das amostras complexas ou nos casos de não ter matriz isenta dos analitos.

Contudo, essa situação pode ser contornada com o desenvolvimento de métodos de preparo de amostra seletivos e eficientes na limpeza de matrizes complexas. Ao se utilizar um preparo de amostra que contemple essas características é possível adotar a calibração externa, procedimento que possibilita a confecção de uma única curva de calibração, independentemente do número de amostras, promovendo um ganho representativo em relação à frequência analítica do método.

Além de utilizar estratégias de calibração que promovem agilidade e facilidade na determinação de analitos, várias alternativas eficientes de preparo de amostra vêm sendo estudadas e desenvolvidas para permitir sua adaptação à dispositivos capazes

de preparar várias amostras ao mesmo tempo, conferindo uma alta frequência analítica à metodologia desenvolvida. É o caso, por exemplo, do *96 well plate*, que permite o preparo de 96 amostras simultaneamente. Alternativas como esta são interessantes, pois minimizam possíveis erros experimentais associados a experiência do analista no processamento de uma amostra pra outra, já que todas passam pelo mesmo procedimento ao mesmo tempo. É fundamental ressaltar também que ao utilizarmos esse tipo de dispositivo o método de preparo de amostra se torna extremamente vantajoso, pois mesmo que o método apresente várias etapas essa eventual desvantagem pode ser facilmente superada pela análise simultânea de um grande número de amostras no dispositivo.

Um dos métodos de preparo de amostras compatível com o *96 well plate* é a microextração em fase sólida por filme fino, do inglês *Thin Film Solid Phase Microextraction* (TF-SPME). Nesta técnica a fase extratora utilizada está disposta em formato de um filme fino sobre um suporte, e para sua confecção, uma gama de materiais pode ser utilizado. Entre eles, encontram-se polímeros sintéticos de uso já consolidado nesta área, mas também, ampliam-se ainda mais as possibilidades quando materiais naturais e renováveis podem ser aplicados tornando o método proposto sustentável. Por isso, no presente trabalho, utilizou-se o sal de quitosana quaternizado, um derivado do biopolímero quitina, que está presente na estrutura de animais como camarão e carangueijos. Além dessa característica, as técnicas de microextração configuram-se em métodos mais sensíveis, rápidos, menor consumo de reagentes, menor geração de resíduos, quando comparados aos métodos clássicos de extração líquido-líquido por exemplo.

A TF-SPME pode trazer soluções para métodos de preparo de amostras para extração de analitos de interesse de amostras consideradas de matrizes complexas, como é o caso do vinho. Essa bebida é rica em diversos compostos, incluindo polifenóis, vitaminas, sais minerais, e ácidos orgânicos. Contudo, os tipos e quantidades dos ácidos encontrados no vinho dependem de alguns fatores, desde aqueles relativos à espécie da uva, local e condições de cultivo, quanto aqueles relacionados aos processos fermentativos para obtenção da bebida e suas condições de armazenamento. Estas características influenciam no perfil de ácidos presentes no produto final, e por consequência, nas propriedades organolépticas da bebida. Por conta disso, os ácidos orgânicos estão relacionados aos padrões de qualidade e também de segurança do consumidor e seu monitoramento é de extrema importância.

Contemplando as questões acima, o presente trabalho teve como objetivo avaliar uma metodologia de preparo de amostra baseada nos princípios da TF-SPME, no qual o filme produzido será a base de quitosana quaternizada suportada em fibras de algodão utilizadas em conjunto com o *96 well plate* para determinação dos ácidos orgânicos alifáticos em amostra de vinho por LC-MS/MS. Buscou-se com este estudo,

otimizar os parâmetros inerentes ao método TF-SPME para extração dos ácidos orgânicos do vinho e avaliar se o método proposto será eficiente na limpeza da matriz da amostra a fim de eliminar o efeito de matriz observado na quantificação desses analitos por LC-MS/MS em um estudo preliminar que empregou apenas diluição da amostra antes da injeção.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PREPARO DE AMOSTRA

Uma das principais etapas durante uma análise química é o preparo de amostra, responsável por tornar as amostras que serão analisadas compatíveis com os instrumentos disponíveis. Esse é um passo crucial, pois é preciso considerar que amostras em sua forma bruta contém muitos outros compostos além daqueles que se pretende estudar, e que por sua vez, podem danificar os instrumentos e prejudicar os resultados. Nesse sentido, o preparo de amostra tem como objetivos promover uma etapa de limpeza (*clean up*), além de pré-concentração e extração dos analitos, eliminando possíveis interferências geradas pela matriz, e conseqüentemente, tornando a análise mais sensível, fazendo com que os resultados sejam confiáveis (BOYACI *et al.*, 2015; DUGHERI *et al.*, 2022).

Alguns métodos tradicionais adotados como preparo de amostra exigem bastante tempo, são trabalhosos, utilizam volumes significativos de solventes orgânicos, produzindo resíduos e prejudicando a saúde do analista, como é o caso da extração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Extraction* (LLE) e da extração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Extraction* (SPE) e do inglês, *Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged and Safe* (QuEChERS) por exemplo. Estes métodos, além das limitações citadas, podem não atender as exigências necessárias quanto à sensibilidade dos resultados. A partir dessas observações, constata-se a necessidade de novas metodologias de preparo de amostra (FILIPPOU *et al.*, 2017; ARMENTA *et al.*, 2019).

Técnicas alternativas, que apresentam diversas vantagens, como miniaturização e automação dos processos além de configurações simples, são ambientalmente amigáveis e seguras, estão baseadas nos princípios de microextração, e serão abordadas com mais detalhes em tópicos futuros (CARASEK *et al.*, 2021).

2.2 INJEÇÃO DE AMOSTRAS COM MATRIZES COMPLEXAS EM LC-MS/MS

A LC-MS/MS é um exemplo de instrumentação que, ao longo dos últimos anos, permitiu análises de compostos encontrados em matrizes consideradas complexas, com alto grau de sensibilidade e seletividade. Áreas como desenvolvimento de fármacos, segurança alimentar, estudos clínicos, toxicologia, análises ambientais, entre outras, foram significativamente beneficiadas (NASIRI *et al.*, 2021).

Em análises quantitativas usando LC-MS/MS podem ocorrer interferências associadas a composição da amostra injetada. Uma das possíveis causas para tal são as alterações produzidas pelo efeito de matriz que, em uma análise química, pode ser descrita como a combinação de impactos gerados pelos componentes da matriz no processo de ionização do analito, e conseqüentemente, sua quantificação (RUDZKI

et al., 2018).

Ao se utilizar detectores do tipo MS, a seletividade e especificidade obtidas podem ser afetadas pelo efeito de matriz de amostras complexas. Portanto, ao se utilizar metodologias em LC-MS/MS é possível que os maiores desafios estejam relacionados ao efeito de matriz e como superá-lo (RAPOSO; BARCELÓ, 2021).

Uma das consequências geradas pelo efeito de matriz é a utilização de estratégias de calibração pouco vantajosas, como a adição de padrão, por exemplo, que é laboriosa. Nesse sentido, alguns procedimentos podem ser adotados para reduzir e/ou corrigir problemas dessa natureza, e um preparo de amostra elaborado pode ser uma excelente alternativa, já que pode permitir o uso de calibração externa (MOOSAVI; GHASSABIAN, 2018).

O preparo de amostra depende do tipo de amostra estudada, pois atua na limpeza de amostras com matrizes complexas, por isso deve ser escolhido cuidadosamente a fim de evitar e/ou diminuir interferências da matriz e permitir o desenvolvimento de métodos simples, seletivos e precisos (NTRALLOU, 2020).

Dentre os objetivos principais da etapa de preparo de amostra, um deles é proporcionar a limpeza da matriz, demonstrando a eficiência do método proposto e permitindo ao analista adotar métodos de calibração vantajosos em relação à simplicidade e rapidez. Dentre os métodos de calibração, existem diferentes alternativas utilizadas para confecção das curvas. Porém, assim como no preparo de amostra, existem alternativas laboriosas e demoradas, que tornam sua aplicação pouco vantajosa, e praticamente inviável em situações em que o número de amostras é grande. É o caso, por exemplo, da calibração por adição de padrão. Nesse caso, para cada amostra analisada é necessária uma curva de calibração (FU *et al.*, 2022; NASIRI *et al.*, 2021).

Em casos em que o efeito de matriz é pronunciado e/ou não se consegue, por diferentes razões, corrigi-lo com o preparo de amostra, pode-se utilizar a adição de padrão como método para confecção da curva de calibração. Nesta metodologia, concentrações conhecidas de padrão são adicionadas em cada ponto que irá compor a curva. Apesar de ser útil para superar os efeitos gerados pela matriz, a calibração por adição de padrão é bastante trabalhosa, demandando muito tempo do analista e sendo inviável sua aplicação rotineira. Isso se deve ao fato de que, por se tratarem de amostras complexas cujo efeito de matriz é acentuado, é necessário que se faça uma curva de calibração para cada amostra que será analisada. Por ser uma alternativa de calibração que exige muito tempo, a frequência analítica do método é comprometida, e portanto, acaba sendo uma grande desvantagem (MOOSAVI; GHASSABIAN, 2018).

Portanto, é interessante que se adotem metodologias de preparo de amostra e técnicas de calibração que, além de eficientes, sejam de fácil execução e rápidas. Quando essas condições são contempladas, elas geram ganhos significativos em relação à frequência analítica do método. Isso por que, ao se adotar um preparo de

amostra eficiente para limpeza de amostras complexas, o efeito de matriz poderá ser superado com sucesso, visto que os impactos desse serão diminuídos e/ou corrigidos. Além de permitir a geração de resultados confiáveis para as análises realizadas, a eficiência no procedimento de *clean up* da amostra, fornecido pelo seu preparo adequado, permite também a utilização de procedimentos de calibração mais simples, como por exemplo, a calibração externa (SOLFRIZZO *et al.*, 2018).

A utilização da calibração externa permite que uma única curva seja confeccionada, independentemente do número de amostras. Isso traz uma grande vantagem ao método, especialmente em relação à frequência analítica, que tem um ganho significativo e permite a aplicação da metodologia de forma rotineira (SOLFRIZZO *et al.*, 2018).

Aumentar a frequência analítica do método é uma das características que pode ser explorada tanto nas estratégias de calibração, como no preparo de amostra. Nesse último, além de utilizar metodologias baseadas nos fundamentos de microextração, também é possível adotar metodologias que permitam seu uso em conjunto com dispositivos que permitam o preparo de várias amostras simultaneamente. Cabe ressaltar ainda que, nos casos em que é possível utilizar essas alternativas de preparo simultâneo de várias amostras, o método tem um ganho na frequência analítica muito significativo, mesmo quando o preparo emprega muitas etapas, pois essa, que seria uma desvantagem, é superada pela possibilidade de várias amostras serem preparadas ao mesmo tempo. Outra vantagem é que erros manuais são reduzidos já que o analista não precisa realizar o procedimento repetidas vezes, e sim uma única vez, para várias amostras (SHAO *et al.*, 2022).

Uma das alternativas que vai ao encontro das ideias mencionadas é o uso de dispositivos como o *96 well plate*, que permite o preparo de 96 amostras de forma simultânea (HUTCHINSON *et al.*, 2007). Mais detalhes sobre esse dispositivo serão apresentados em tópicos futuros.

2.3 TÉCNICAS DE MICROEXTRAÇÃO

2.3.1 Microextração em Fase Sólida

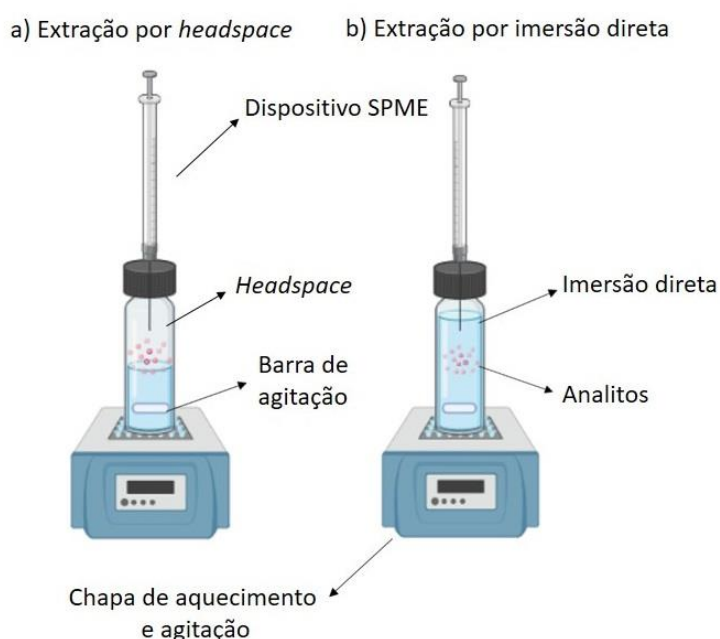
As técnicas de microextração foram desenvolvidas por Pawliszyn e colaboradores em 1990, e desde então, tem ganhado destaque. Com suas diversas aplicações e abordagens, corrigem vários dos problemas relacionados aos métodos clássicos, indo ao encontro de práticas ambientalmente amigáveis e desenvolvendo métodos com elevada sensibilidade. Procedimentos simples e com possibilidade de automação, redução no uso de solventes, utilização de pouca quantidade de amostra, e compatibilidade com sistemas cromatográficos são algumas das notáveis vantagens apresentadas pelas técnicas de microextração (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990; MIN

et al., 1994; JALILI *et al.*, 2020).

A microextração em fase sólida, do inglês *Solid Phase Microextraction* (SPME) baseia-se na distribuição dos analitos entre a matriz da amostra e a fase extratora, que neste caso é uma fibra de sílica fundida ou um suporte metálico revestido por um polímero. Durante a extração, a fibra pode estar exposta ao seu estado vaporizado (Figura 1a), sendo nesse caso uma extração por *headspace* (HS-SPME) ou em contato com a amostra (Figura 1b), tratando-se de imersão direta (DI-SPME, do inglês *direct immersion*) (SERESHTI *et al.*, 2020; MARÍN-SAN ROMÁN *et al.*, 2020).

Em se tratando de equilíbrio de extração em SPME, para fins matemáticos, considera-se um sistema trifásico ideal, composto por uma fibra exposta ao *headspace* de uma matriz aquosa.

Figura 1 – Representação dos modos de SPME: a) extração por *headspace*. b) Extração por imersão direta.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

Portanto, antes da extração (seja ela direta ou por *headspace*), tem-se uma quantidade de analito (n_0) em concentração (C_0) e volume (V_m) na matriz. Considerando o equilíbrio atingido após a extração, a quantidade de analito descrita por n_0 estará distribuída entre as três fases do sistema: matriz aquosa, fibra e *headspace*, identificadas respectivamente por n_m^e , n_f^e , n_h^e (Equação 1) (REYES-GARCÉS *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2020; BRUHEIM *et al.*, 2003).

$$n = n_m^e + n_f^e + n_h^e. \quad (1)$$

As constantes de distribuição fibra-*headspace* (Equação 2), *headspace*-matriz

(Equação 3) e da constante de partição fibra-matriz (Equação 4) determinam qual a concentração do analito em cada uma das fases, identificadas por C_f^e , C_h^e , C_m^e como sendo as concentrações de analito na fibra, no *headspace* e na matriz, respectivamente (REYES-GARCÉS *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2020; BRUHEIM *et al.*, 2003).

$$K_{fh} = \frac{C_f^e}{C_h^e} \quad (2)$$

$$K_{hm} = \frac{C_h^e}{C_m^e} \quad (3)$$

$$K_{fm} = \frac{C_f^e}{C_m^e} \quad (4)$$

As concentrações de analito em cada fase podem ser expressas através da razão entre o número de mols do analito e o volume da fase, sendo (V_m^e), (V_f^e), e (V_h^e) os volumes das fases matriz, fibra e *headspace*, respectivamente. Ao final da extração, a quantidade de analito extraído, n_f^e , é diretamente proporcional à concentração inicial do analito presente na amostra, C_0 , e pode ser determinado através de tratamentos matemáticos que resultam na Equação 5. Esta equação considera uma combinação entre variáveis operacionais (como volume da amostra, fase extratora e *headspace*) representadas por Q , e as constantes de distribuição do analito nas diferentes fases (matriz, fibra e *headspace*) (REYES-GARCÉS *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2020; BRUHEIM *et al.*, 2003).

$$n_f^e = \frac{K_{fm} V_f C_0 V_m}{K_{fm} V_f + K_{hm} V_h + V_m} = Q \times C_0 \quad (5)$$

Sendo assim, a quantificação dos analitos ocorre em condições de equilíbrio, e diferentemente das técnicas tradicionais citadas, LLE e SPE, a SPME é uma técnica de microextração não exaustiva, ou seja, apenas uma porção do analito é extraída da amostra (REYES-GARCÉS *et al.*, 2018; JALILI *et al.*, 2020).

De forma geral, a SPME foi a técnica precursora no contexto da microextração como alternativa de preparo de amostra, superando com sucesso várias limitações significativas das técnicas tradicionais e possibilitando diferentes abordagens, como por exemplo, a microextração em gota única, do inglês *Single Drop Microextraction* (SDME), a microextração líquido-líquido, do inglês *Liquid-Liquid Microextraction* (LLME), e a extração sortiva com barra de agitação, do inglês *Stir Bar Sorptive Extraction* (SBSE), entre outras (LUIZ *et al.*, 2015; RIGLING *et al.*, 2022; BOCELLI, 2022; WANG, Q. *et al.*, 2021).

A TF-SPME também é uma dessas abordagens, na qual a fase extratora que na SPME era apresentada em formato cilíndrico, na TF-SPME é apresentada em um novo formato, como um filme fino disposto sobre um suporte. Essa alteração gerou mudanças importantes que serão discutidas a seguir (MARÍN-SAN ROMÁN *et al.*, 2022).

2.3.2 Microextração em Filme Fino

Dentre a gama de técnicas de microextração que foram propostas a partir dos anos 90 baseando-se nos princípios da SPME, aquelas que utilizam filmes poliméricos sólidos são caracterizadas pela alta eficiência de extração. Porém, também são atribuídas a essas técnicas algumas desvantagens, que limitam sua aplicação, em decorrência do tipo de filme polimérico utilizado. Podemos citar como exemplo o fato de que, algumas vezes, o material adsorvente e os analitos interagem tão fortemente, que se faz necessário o uso de altas temperaturas para que ocorra a dessorção completa. Essa condição, por sua vez, pode resultar em degradação dos compostos. Outro ponto a ser considerado, é a capacidade limitada de material sólido adsorvente, que pode sofrer saturação em casos em que a amostra possui altas concentrações de analito ou interferentes. Neste caso, ao mesmo tempo em que a miniaturização permite o acoplamento direto das fibras de SPME em instrumentos como o cromatógrafo gasoso, resulta também na diminuição da área superficial e do volume de filme polimérico (GRANDY *et al.*, 2016; JIANG; PAWLISZYN, 2012).

Ainda em relação à capacidade limitada de material adsorvente, é preciso considerar que a quantidade de analito extraído é diretamente proporcional ao volume da fase extratora. Dessa forma, para que se tenham métodos mais sensíveis, é necessário um aumento de volume da fase extratora. Uma das alternativas para atender essa necessidade pode estar relacionada ao aumento da espessura da fase extratora, como demonstrado em alguns métodos que exploram a barra de agitação revestida, e outras alternativas derivadas da SPME (BRUHEIM *et al.*, 2003; JIANG; PAWLISZYN, 2012).

Entretanto, apesar do aumento da espessura da fase extratora gerar um aumento de volume, e por consequência, aumentar a quantidade de analito extraído, é preciso avaliar as condições de equilíbrio decorrentes desta alteração. Nesse caso, será necessário um tempo maior até que o equilíbrio seja alcançado, pois a extração está relacionada aos analitos alcançarem a fase extratora. Para isso, eles atravessam, através de difusão, a camada limite que, por sua vez, recobre a fase extratora. Por essa razão, é desejável que a camada limite não tenha uma espessura significativa, a fim de que o tempo necessário para se atingir o equilíbrio não seja longo. Soma-se a isso, o fato de que a área superficial também precisa ser considerada, visto que é diretamente proporcional à taxa de extração. A equação abaixo demonstra a relação entre o tempo para que se atinja o equilíbrio, ($t_{95\%}$), a espessura da fase extratora ($b-a$), o coeficiente

de distribuição (K_{es}), a espessura da camada limite (δ) e o coeficiente de difusão (D) (EMMONS *et al.*, 2019; JIANG; PAWLISZYN, 2012).

$$t_{95\%} = 3 \times \frac{\delta K_{es}(b-a)}{D} \quad (6)$$

Portanto, em 2003, Bruheim, Liu e Pawliszyn propuseram um estudo no qual foram comparadas as extrações realizadas por dispositivos de diferentes geometrias, ambos contendo polidimetilsiloxano (PDMS) como fase extratora. Os formatos testados foram de uma fibra comercial de SPME e uma membrana, disposta como uma “folha fina” e os autores concluíram que a mudança proposta resultou em uma alternativa que, além de aumentar a sensibilidade do método, não comprometeu o tempo de análise. Dessa forma, foi proposta TF-SPME, como uma alternativa que uniu, com sucesso, as vantagens de uma fase extratora com maior área superficial com pouca espessura (BRUHEIM *et al.*, 2003).

Figura 2 – Representação da extração através de TF-SPME.



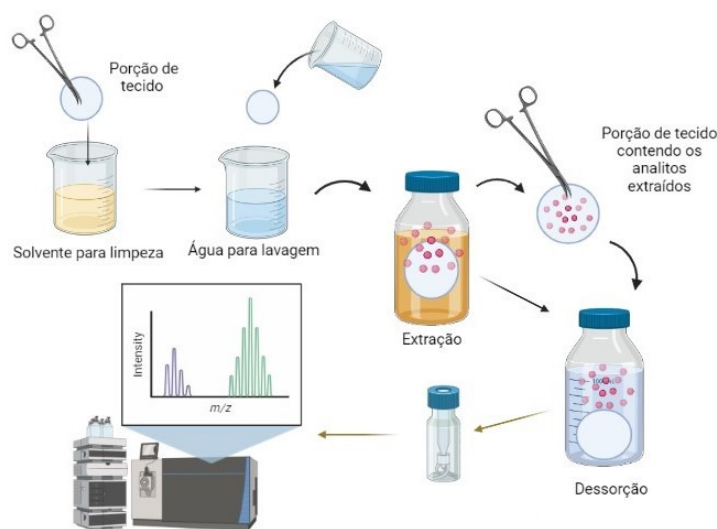
Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

Além da inovação quanto à geometria da fase extratora, a TF-SPME também inspirou o surgimento de novas técnicas, que preservaram a proposta da fase extratora estar disposta em forma de filme fino, porém inovaram nas possibilidades de suporte para este filme, como a extração sortiva em fase têxtil, do inglês *Fabric Phase Sorptive Extraction* (FPSE), proposta em 2014 por Kabir e Furton.

Essa nova abordagem integra, com sucesso, as vantagens dos filmes poliméricos obtidos via sol-gel e a diversidade de fibras têxteis, que podem ser utilizadas como substratos, resultando em uma alternativa de preparo de amostra eficiente e sustentável. Normalmente, utiliza-se uma porção de tecido contendo a fibra, como suporte para o filme polimérico, em forma de filme, que contém a fase extratora. Primeiramente, essa porção de tecido passa por uma etapa de limpeza com solventes orgânicos, seguida

de lavagem com água para remoção de eventuais resíduos. Na etapa de extração, esta porção é imersa na solução contendo os analitos por determinado período de tempo e, em seguida, é transferida para outro frasco contendo os solventes apropriados para que ocorra a dessorção dos analitos. Então, o eluente é submetido a filtração e centrifugação, para remoção de eventuais materiais particulados, e ocorre a injeção no sistema cromatográfico. Na Figura 3, encontra-se uma representação das etapas de limpeza, lavagem, extração e dessorção, citadas anteriormente (KABIR; FURTON, 2014; KAZANTZI; ANTHEMIDIS, 2017).

Figura 3 – Representação das etapas de limpeza, lavagem, extração e dessorção da porção de tecido utilizada como substrato para fase extratora, como proposto pela FPSE.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

Grande parte das metodologias propostas com base em FPSE utiliza a celulose como suporte têxtil para a fase extratora, sendo que poliéster e poliamida (conhecida comercialmente como Nylon®) são utilizados também, porém com menos frequência. Já em relação ao filme polimérico, o processo via sol-gel é amplamente utilizado para a formação de um filme, que contém a fase extratora escolhida e será disposto na superfície do tecido. Exemplos de fases extratoras frequentemente utilizadas em FPSE são polietilenoglicol (PEG), politetrahidrofurano (PTHF), PDMS entre outros. De forma geral, o processo sol-gel ocorre a partir da hidrólise de um composto precursor da reação e em seguida, a reação de policondensação do precursor já hidrolisado. Observa-se então a transição entre uma suspensão coloidal (“sol”) para uma matriz sólida (“gel”). Além do composto precursor, o processo sol-gel requer um catalisador, e um composto responsável pela extração, que normalmente é um polímero, como citado anteriormente. A reação ocorre em uma mistura determinada de solventes e o resultado é um filme contendo a fase extratora polimérica aderido à superfície fibrosa

do tecido escolhido como substrato (KABIR *et al.*, 2017; KAZANTZI; ANTHEMIDIS, 2017).

As vantagens dessa técnica podem ser atribuídas a porosidade da superfície do tecido escolhido como substrato e a forte interação do filme formado pela reação sol-gel e seus respectivos componentes. Como resultado, obtêm-se um filme polimérico com seletividade e porosidade ajustável conforme necessidade. O dispositivo já pronto consiste em grande quantidade de material sorvente disperso como um filme fino e aderido na matriz do substrato, com alta capacidade de retenção do analito e atingindo o equilíbrio rapidamente. (KABIR *et al.*, 2017; KAZANTZI; ANTHEMIDIS, 2017).

Além das diversas abordagens das técnicas de microextração em relação aos dispositivos utilizados, buscou-se também inovar quanto ao material sorvente utilizado. Nesse sentido, fases extratoras alternativas vêm sendo exploradas, por exemplo, materiais provenientes de fontes naturais ou resíduos sem um aproveitamento específico, que podem ter suas propriedades exploradas para novas metodologias de preparo de amostra ambientalmente amigáveis. Alguns exemplos de materiais alternativos já aplicados com sucesso em técnicas de microextração são cortiça, bractéa, terra diatomácea e quitosana (PACHECO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020; MAFRA *et al.*, 2020; CARASEK *et al.*, 2019).

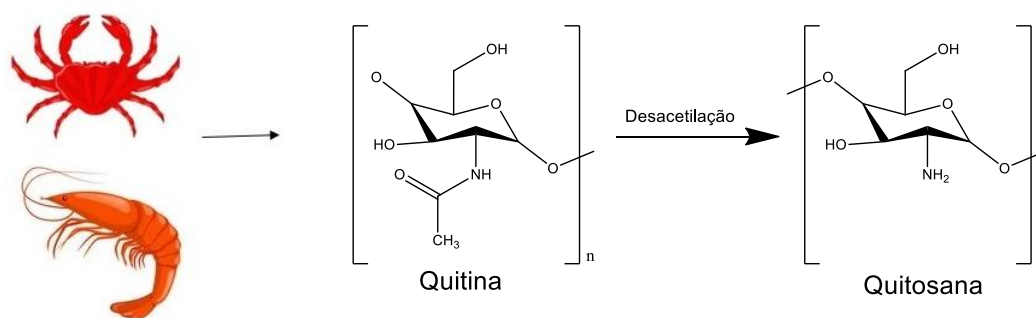
2.3.2.1 Filmes poliméricos

Normalmente, os polímeros utilizados para formação dos filmes de fase extratora em FPSE são polímeros sintéticos, como PEG e PDMS. No presente trabalho optou-se pela utilização de um biopolímero como precursor da fase extratora. Biopolímeros são recursos materiais renováveis e biodegradáveis. De forma geral, podem ser classificados em dois grupos, de acordo com a sua origem, sendo o primeiro grupo constituído pelos biopolímeros provenientes de organismos vivos, e o segundo, contemplando aqueles que são provenientes de fontes naturais mas que ainda necessitam de polimerização. Como exemplo, podemos citar polissacarídeos, proteínas e lipídeos derivados de animais e plantas. Destes, os polissacarídeos são os mais utilizados devido a solubilidade em água e também por suas propriedades emulsificantes e de gelificação. Os polissacarídeos quitosana, celulose, alginato e agarose são os mais explorados, e seu uso, especialmente quando em conjunto com as técnicas de microextração, vai ao encontro da Química Analítica Verde (PACHECO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020; ILYAS; SAPUAN, 2020; KAZANTZI; ANTHEMIDIS, 2017).

A quitina é um polissacarídeo natural presente em vários animais e plantas, sendo encontrada principalmente na casca de camarões, siris e caranguejos. Porém, apesar de ser abundante na natureza, possui aplicações limitadas devido a suas propriedades físico-químicas. Em condições alcalinas, a quitina sofre desacetilação, dando origem a um copolímero formado por unidades de N-acetil-D- glucosamina e D-

glucosamina, denominado quitosana, conforme a Figura 4 (KOU *et al.*, 2021; BAKSHI *et al.*, 2020).

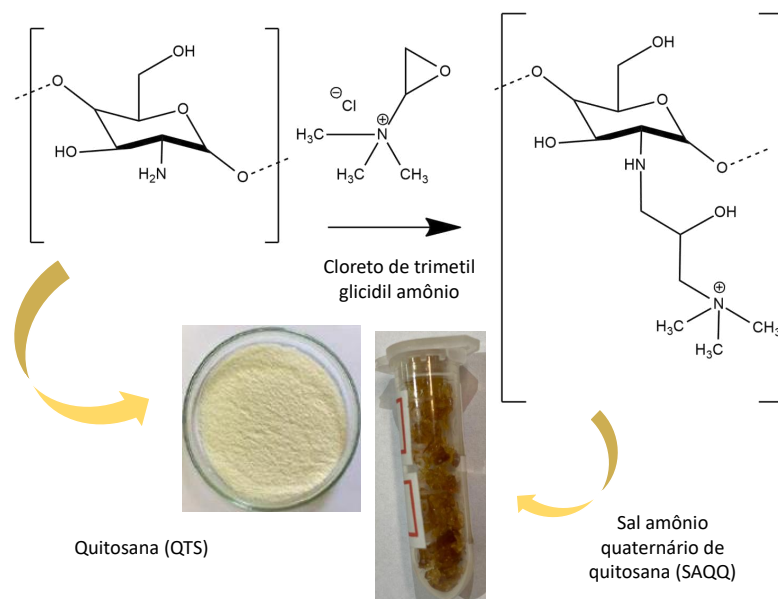
Figura 4 – Representação das estruturas da quitina e do produto da sua desacetilação, a quitosana.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

A quitosana, por sua vez, possui propriedades interessantes por ser biodegradável, biocompatível e não tóxica, além de apresentar atividades antimicrobianas e ser um material de baixo custo. Por conta dessas vantagens, possui aplicações em diversos campos. Porém, possui algumas limitações em relação a sua solubilidade e um curto tempo de vida útil, o que limita sua aplicação. Contudo, essas desvantagens podem ser corrigidas através de uma reação que consiste na substituição dos grupos amino por grupos amônioquaternários, inserindo grupos funcionais catiônicos na estrutura. Essa modificação melhora sua solubilidade e também suas características antimicrobianas. Uma das rotas mais estudadas para a inserção de grupos quaternários na estrutura da quitosana é através da reação de alquilação, que frequentemente ocorre entre a quitosana e cloreto de trimetil glicidil amônio, tendo como produto sal amônio quaternário de quitosana (SAQQ). A característica principal desse produto é devido a inserção de grupos amônio quaternário na cadeia do polímero, a partir do qual adquire carga positiva, e com isso, torna-se solúvel em toda a faixa de pH. Essa nova propriedade proporciona versatilidade em sua utilização, já que elimina os problemas referentes à desprotonação observados com a quitosana. A Figura 5 apresenta um esquema da reação comentada. (WANG, B. *et al.*, 2018; VITALI, 2012; NEGM *et al.*, 2020; FREITAS *et al.*, 2020).

Figura 5 – Esquema da reação entre a quitosana e cloreto de trimetil glicidil amônio.



Fonte: Autor (2022).

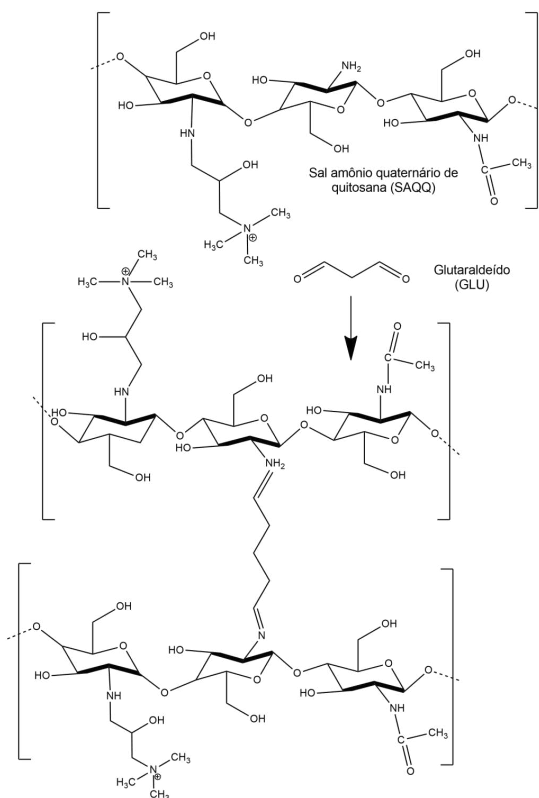
A quitosana, além de seus derivados, permite várias modificações com o intuito de tornar suas propriedades mais interessantes para o fim a qual se destina. Modificações com ácidos orgânicos e aldeídos por exemplo já foram reportadas para atingir características específicas. Uma das estratégias utilizadas para modificar suas propriedades é a reticulação, um processo no qual cadeias poliméricas são interligadas, conhecido como *crosslinking* (NEGM *et al.*, 2020).

Para isso, se utiliza um reticulante, que são moléculas cujo peso molecular é muito menor em relação à cadeia principal, e que apresentam, no mínimo, dois grupos funcionais que permitam a formação a ligação entre as cadeias poliméricas (BERGER *et al.*, 2004).

Um exemplo que se enquadra na descrição acima é o Glutaraldeído (GLU) que já teve seu uso como reticulante relatado na literatura. Sua utilização permite a formação de multicamadas poliméricas, o que pode proporcionar um ganho na estabilidade física e química do filme formado (COSTA JR, E. S.; MANSUR, 2008; BERGER *et al.*, 2004; NEGM *et al.*, 2020).

Na Figura 6 está a representação da interação entre o SAQQ e o GLU, e as camadas poliméricas reticuladas.

Figura 6 – Esquema da reação de reticulação entre o biopolímero SAQQ e o reticulante GLU.



Fonte: Autor (2022).

Portanto, no presente trabalho, o SAQQ e o GLU foram utilizados para a composição de um filme polimérico multicamadas.

2.3.2.2 Suportes sólidos para TF-SPME

Quando a TF-SPME foi descrita pela primeira vez, em 2003, os autores mencionaram que o filme fino de PDMS utilizado como fase extratora estaria sobre uma haste de aço inoxidável desativado, e o estudo já mencionado tinha como objetivo avaliar a mudança de geometria da fase extratora (BRUHEIM *et al.*, 2003).

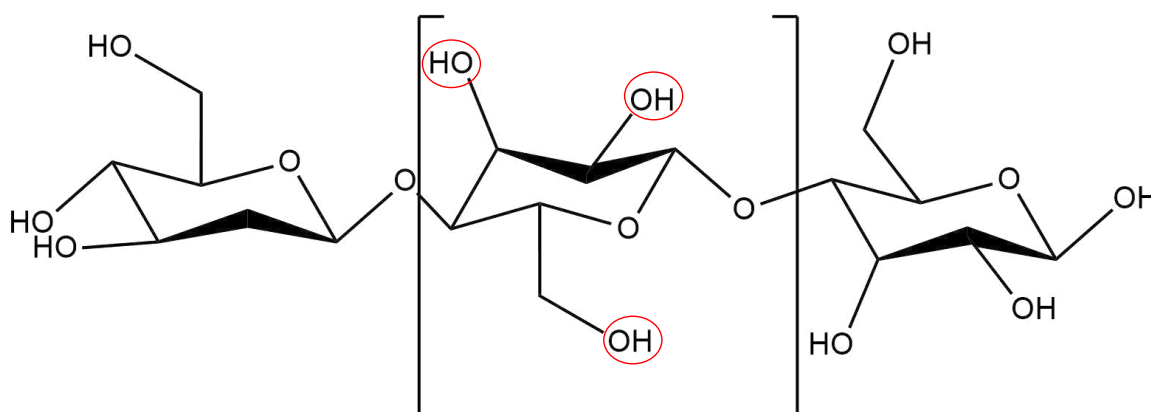
Mais tarde, em 2012, foi reportada uma modificação, na qual o filme da TF-SPME estaria espalhado sobre um suporte de tecido de lã de vidro como substrato. Essa modificação proporcionou uma interação devido a incorporação do substrato à estrutura do filme, que por sua vez, resultou em uma melhora na estabilidade do dispositivo (KERMANI; PAWLISZYN, 2012).

Logo depois, foi proposta a FPSE, já mencionada, que explorou alternativas de substrato utilizando fibra têxtil. As fibras utilizadas com mais frequência nas metodologias de FPSE são provenientes do biopolímero celulose (KAZANTZI; ANTHEMIDIS, 2017; KABIR *et al.*, 2017).

A celulose também é um material de origem natural com propriedades interes-

santes. É formada por unidade de glicose que são unidas por ligações β -1,4 glicosídicas. É o biopolímero com maior abundância na natureza e pode ser encontrado tanto em plantas como em organismos vivos. Na Figura 7 está representada sua estrutura, sendo possível observar a presença de grupos hidroxilas, no carbonos C2, C3 e C6, que conferem caráter hidrofílico à superfície e também permitem diversas modificações químicas (TU *et al.*, 2021; PACHECO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021).

Figura 7 – Estrutura do biopolímero celulose com grupos hidroxilas destacados.



Fonte: Autor (2022).

Algumas das vantagens da celulose incluem baixo custo, ser biodegradável, inerte e ter grande área superficial. Suas vantagens e características permitem sua aplicação em diversas áreas, incluindo em metodologias analíticas empregando microextração baseada em sorvente, área na qual tem se destacado devido a sua alta capacidade de absorção (PACHECO-FERNÁNDEZ *et al.*, 2020; LIU *et al.*, 2021).

A Tabela 1 traz alguns exemplos de aplicações da FPSE, todos explorando a interação da celulose como suporte para o filme polimérico contendo a fase extratora. A variedade de amostras também pode ser destacada pela complexidade de suas matrizes, como urina humana, águas naturais, águas de piscina, leite, chás e sucos de frutas.

Tabela 1 – Exemplos de aplicação da técnica FPSE como preparo de amostra utilizada com diferentes técnicas cromatográficas, para analitos e matrizes diversas.

| Técnica Analítica | Analitos e matriz | Polímero e suporte | LOD (ng mL ⁻¹) | Referências |
|-------------------|--|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| UHPLC- MS/MS | Beta-bloqueadores em urina | CW Celulose | 0,2 - 3 | Mazaraki <i>et al.</i> (2021) |
| UHPLC- MS/MS | Drogas antivirais em urina | PEG-PPG-PEG Celulose | 0,2 - 0,8 | Sidiropoulou <i>et al.</i> (2022) |
| GC-MS | Poluentes emergentes em águas naturais e de piscinas | PDMS Celulose | 0,12 - 12 | Celeiro <i>et al.</i> (2020a) |
| GC-MS/MS | Fungicidas em águas naturais | CW Celulose | 0,001 - 0,05 | Celeiro <i>et al.</i> (2020b) |
| GC-MS | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em chás | C18 Celulose | 0,08- 0,17 | Manousi <i>et al.</i> (2022) |
| GC-MS | Pesticidas organoclorados em suco de fruta e água | PEG-PPG-PEG Celulose | 0,007 - 0,032 | Kaur <i>et al.</i> (2019) |
| HPLC-UV | Antibióticos em leite | C18 Celulose | 0,015 | Agadellis <i>et al.</i> (2020) |
| HPLC-PDA | Micotoxinas em alimentos | PTHF Celulose | 0,49 | Esmati <i>et al.</i> (2022) |
| HPLC-FLD | Estrogênios em urina | PTHF Celulose | 0,020 - 0,042 | Kumar <i>et al.</i> (2014) |
| HPLC-PDA | Disruptores endócrinos em urina | PEG Celulose | 0,26 - 0,62 | Alampanos <i>et al.</i> (2021) |

Fonte: Autor (2022).

Observando a tabela, é possível verificar que a FPSE foi aplicada em metodologias envolvendo tanto cromatografia líquida como gasosa, indicando que analitos com diferentes propriedades foram contemplados, além da versatilidade ao permitir seu uso com diferentes técnicas cromatográficas. Também pode ser destacado o uso de diferentes detectores, especialmente de alta sensibilidade em diversas amostras com matrizes de diferentes complexidades. Inclusive nessas condições, resultados de limites de detecção com valores na ordem de ng mL⁻¹ foram obtidos, o que sugere que o preparo de amostra através de FPSE foi eficiente para limpeza da matriz, mesmo no caso de amostras complexas.

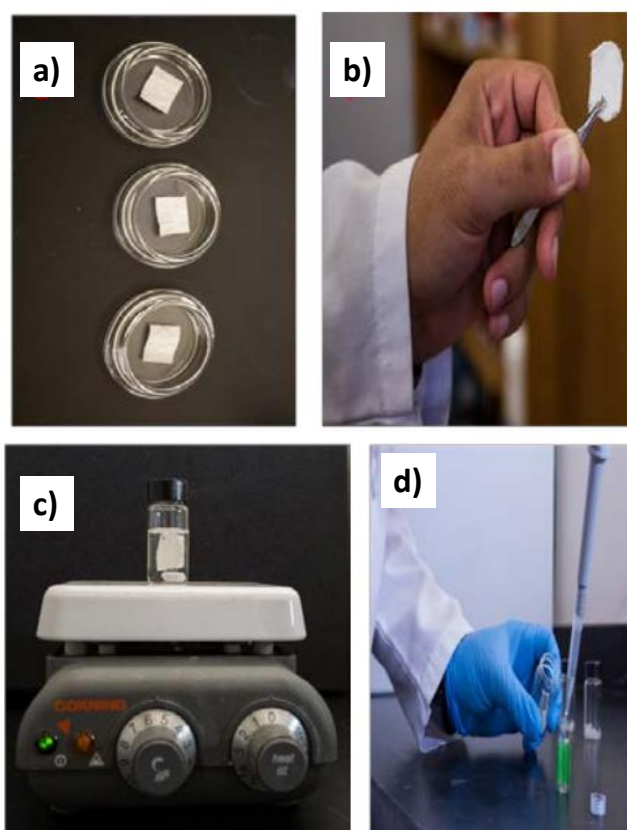
Outra consideração a ser feita é em relação ao substrato escolhido, percebe-se o predomínio da celulose nos exemplos citados, compreensível pelas vantagens citadas anteriormente. Nesses casos, a fonte de celulose consiste em porções de tecido de algodão, denominadas fase têxtil. Além de ser um polímero natural e abundante, sua estrutura química possui grupos funcionais que permitem diversas modificações. Já em relação à fase extratora, todos os polímeros utilizados são de origem sintética, o que pode sugerir que ainda há uma lacuna na utilização de recursos naturais como

componente da fase extratora.

Dessa forma, pode-se concluir que a técnica de preparo de amostra FPSE pode ser aplicada com sucesso para limpeza e *clean up* da matriz no caso de amostras complexas, proporcionando resultados sensíveis para grupos diversos de analitos. Devido a sua configuração, é possível que se explorem diferentes materiais tanto na porção têxtil quanto na fase extratora, a fim de que a extração seja seletiva levando em consideração determinadas características dos analitos mas também avaliando a possibilidade de se utilizarem alternativas naturais, provenientes de fontes renováveis e que muitas vezes fornecem resultados semelhantes àqueles materiais de origem sintética.

Também é possível encontrar na literatura sobre FPSE algumas imagens demonstrando o procedimento realizado para a extração, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 8 – Procedimento da FPSE reportado na literatura: a) FPSE armazenado em vidro relógio; b) FPSE em uma pinça; c) Extração sortiva em fase têxtil; d) Transferência do eluente para o frasco de injeção.



Fonte: Adaptado de Kabir *et al.* (2017)

É possível observar que, apesar da simplicidade de execução da técnica, caso seja necessário a análise de um número considerável de amostras, a utilização da

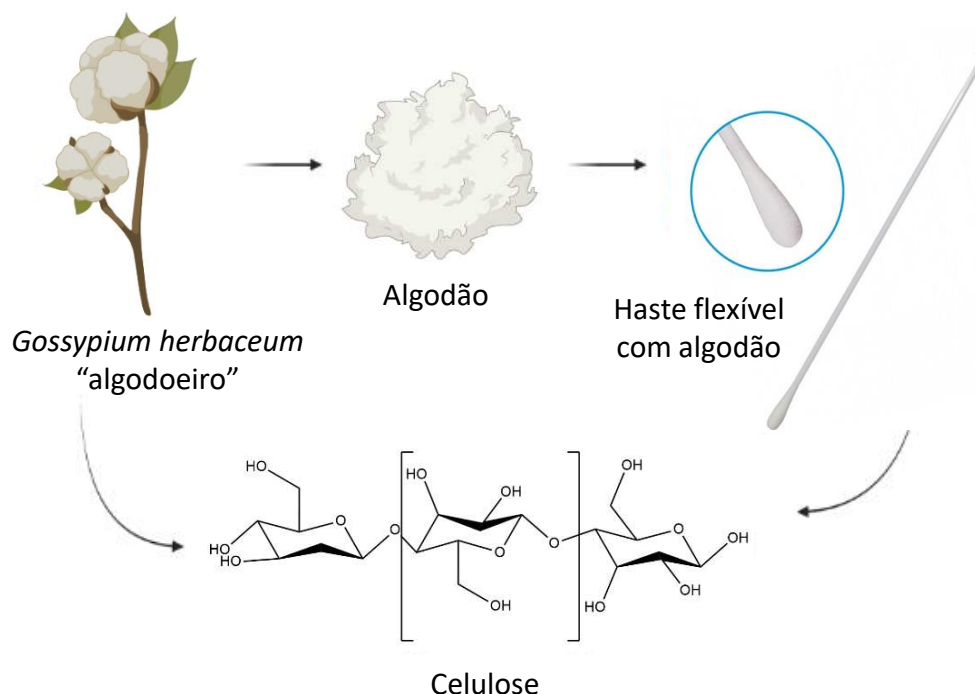
FPSE torna-se trabalhosa e demorada, e por isso possivelmente inviável em determinadas situações.

Portanto, percebe-se que ainda há necessidade de se estudar alternativas que permitam a realização dessa técnica de forma mais rápida, de modo a aumentar a frequência analítica do preparo de amostra, e quando possível, de forma automatizada, diminuindo erros manuais por exemplo.

Outro ponto a ser ressaltado é de que, nas aplicações da metodologia FPSE, a celulose utilizada como substrato provém de uma fibra têxtil, no caso uma porção de tecido de algodão. O algodoeiro, nome popular dado à planta do algodão, possui celulose em sua composição, e dentre as diferentes espécies pode representar até 95% de sua composição, junto de gorduras e ácidos graxos. As plumas do algodão são utilizadas em vários setores, como a indústria têxtil, de papel e celulose, e também em produtos de enfermagem, como curativos, algodão hidrófilo e hastes flexíveis, popularmente conhecidas como cotonetes (BELTRÃO; ARAÚJO, 2004).

A Figura 9 apresenta um esquema relacionando a presença de celulose em fibras de algodão provenientes de hastes flexíveis.

Figura 9 – Esquema relacionando a utilização de fibras de algodão provenientes de hastes flexíveis.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

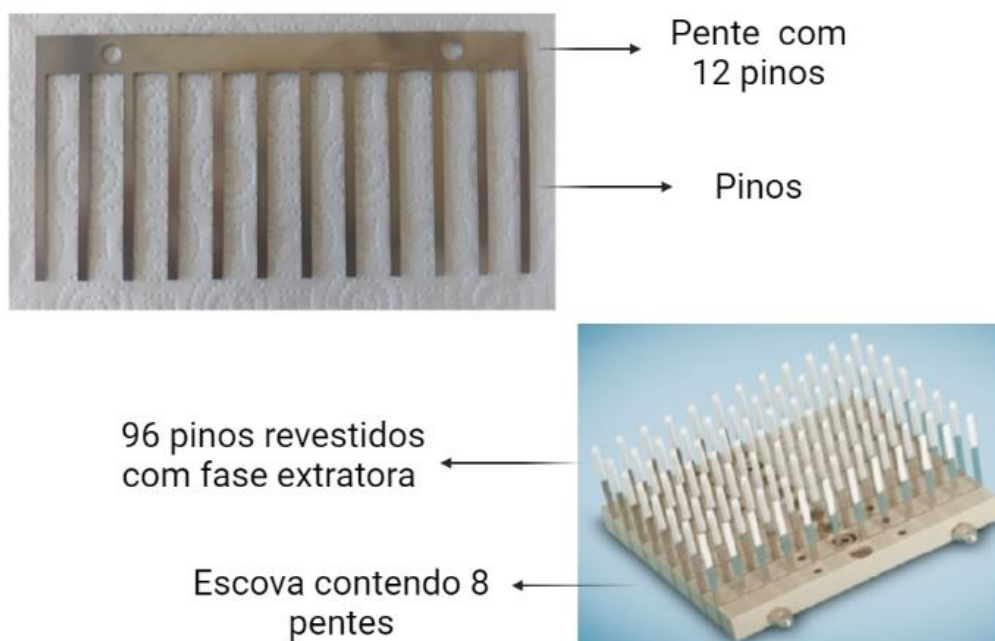
Pensando nisso, foram utilizadas hastes flexíveis do tipo *swab*, a porção de algodão na ponta da haste serviu como fonte de celulose e foi utilizada como substrato

para a fase extratora. O uso desse material também se mostrou interessante pela possibilidade de ser acoplado a dispositivos de alta frequência analítica. Além dessa vantagem, também é possível mencionar o custo relativamente baixo e a facilidade de aquisição do material.

2.3.2.3 Dispositivo de alta frequência analítica

A fim de melhorar a estabilidade e reprodutibilidade foi proposta por Cudjoe e colaboradores uma configuração chamada *96-blade TF-SPME*, na qual se utilizou o dispositivo *96 well plate*, composto por uma placa de 96 poços e por 8 pentes com 12 pinos em cada. Esse sistema possibilita que os pinos sejam revestidos com uma película da fase extratora desejada, além de permitir que sejam realizadas 96 extrações e/ou dessorções simultaneamente, de modo automático ou manual. Na Figura 10, encontra-se a imagem de um pente com 12 pinos e uma representação de uma escova contendo os 8 pentes fixados a ela, e com todos os 96 pinos revestidos de um filme de fase extratora, como proposto na TF-SPME, já que frequentemente são utilizadas em conjunto e representam uma excelente alternativa para aumento da frequência analítica do método (CUDJOE *et al.*, 2009).

Figura 10 – Pente com 12 pinos e representação da escova contendo 8 pentes e 96 pinos revestidos com fase extratora.

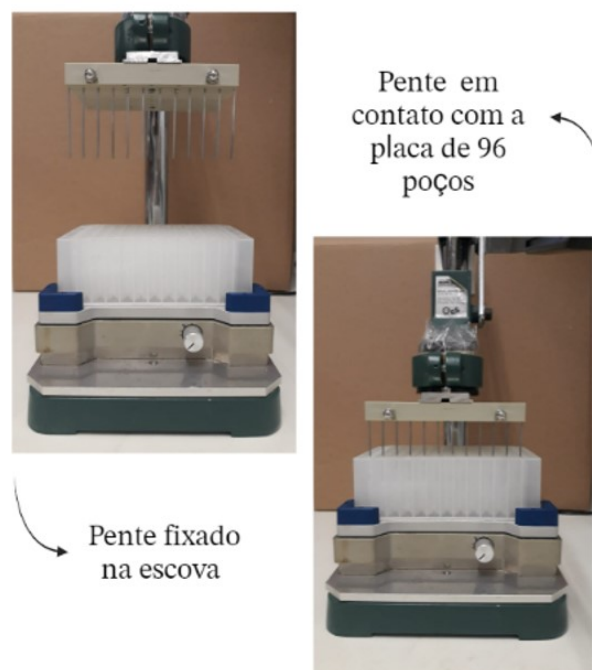


Fonte: Adaptado de Cudjoe *et al.* (2009) .

Uma outra alternativa de pente, no qual os pinos são mais finos, também é usada com frequência. A Figura 11 contém as principais partes de um sistema *96 well*

plate: o pente individual, já acoplado ao dispositivo e em contato com a placa de 96 poços para realização da extração, sobre um suporte de agitação com ajuste manual.

Figura 11 – Dispositivo 96 well plate com pente fixado na escova e em contato com a placa de 96 poços sobre um suporte de agitação com ajuste manual.



Fonte: Autor (2022).

Essa foi a opção utilizada no presente trabalho para aumentar a frequência analítica do método, e será detalhadamente explicada na seção de Metodologia.

2.3.3 Ácidos orgânicos em amostras de vinho

A alimentação adequada é uma das formas de cuidado e prevenção para uma série de doenças e, nos últimos anos, muitas produções científicas contemplam a relação entre o consumo de determinados alimentos e propriedades benéficas para a saúde. Dentre os vários compostos estudados, um dos grupos de destaque é o dos antioxidantes, que podem ser encontrados naturalmente em plantas, tecidos animais e microorganismos. Nos alimentos, estes compostos estão presentes em frutas, vegetais, cereais, grãos, oleaginosas e chás e podem ser classificados como vitaminas, polifenóis, carotenoides, enzimas e ácidos orgânicos. Esse último grupo abrange diversos compostos, e no presente trabalho serão contemplados alguns ácidos orgânicos alifáticos contendo no máximo 4 átomos de carbono (ROBLES *et al.*, 2019; SHAHIDI *et al.*, 2012; TANG *et al.*, 2013).

Os ácidos orgânicos podem ocorrer naturalmente em alguns alimentos, além de frequentemente estarem relacionados a processos como amadurecimento, enve-

lhecimento, fermentação, entre outros. Em alguns casos, sua determinação pode ser de grande interesse por diferentes motivos, desde questões sanitárias, relacionadas à segurança e higiene, até características sensoriais que interferem na qualidade do produto (PARK *et al.*, 2017; ZERAVIK *et al.*, 2016).

O vinho pode ser um bom exemplo, pois se trata de uma bebida derivada de fontes vegetais que possui vários ácidos orgânicos, alguns provenientes da uva (ácidos málico, tartárico, cítrico, por exemplo) e outros gerados a partir dos processos fermentativos (ácidos succínico, acético, láctico entre outros) que contribuem para a transformação, aparecimento e desaparecimento desses compostos. A presença dos ácidos orgânicos está relacionada a propriedades físicas, microbiológicas, de pH, estabilidade química, entre outros, além de contribuir para as propriedades sensoriais da bebida, como aroma, sabor e cor. O perfil de ácidos orgânicos presentes no vinho pode variar, e está associado à região e ao clima no qual a uva é cultivada, e pode estar associado ao controle de qualidade, já que podem atuar como indicadores de deterioração, devido ao armazenamento e envelhecimento, bem como da autenticidade da bebida e segurança ao consumi-la (ZERAVIK *et al.*, 2016; ROBLES *et al.*, 2019; COELHO *et al.*, 2018).

Em relação ao vinho, e outros tipos de bebidas derivadas de fontes vegetais, existem diversas orientações a serem respeitadas pelos produtores quando há a necessidade de se utilizar esses compostos como aditivos, a fim de corrigir alguma característica do produto final, desde que respeitadas as normas vigentes. Nesse sentido, as orientações da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) e do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) estão contempladas como anexo à norma interna Nº 1/2019 do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Vegetal (DIPOV), intitulado “Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho”. Este documento tem por objetivo consolidar as normas brasileiras relativas aos Padrões de Identidade e Qualidade (PIQs), do registro, importação e exportação de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, bem como estabelecer parâmetros analíticos exigíveis de acordo com a finalidade das análises a serem realizadas (DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL, 2020).

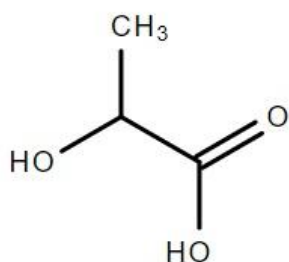
Em relação aos derivados da uva e do vinho constantes no documento citado, eles ainda são classificados como: não fermentados e não alcóolicos, fermentados e não alcóolicos, fermentados alcóolicos, destilados alcóolicos, vinagre e alcóolicos por mistura. Na classe dos fermentados alcóolicos encontram-se, entre outros, o vinho composto, vinho de mesa, vinho espumante (ou espumante natural ou champanha), vinho fino, vinho frisante, vinho gaseificado, vinho licoroso, vinho moscato (ou moscatel) espumante e vinho nobre. Para este trabalho, foram analisadas amostras de vinho de mesa (DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL,

2020).

Os compostos estudados neste trabalho são ácidos orgânicos alifáticos de cadeia curta. Na Figura 12 estão representadas as estruturas do analitos.

Figura 12 – Estrutura e propriedades dos analitos

Ácido Láctico



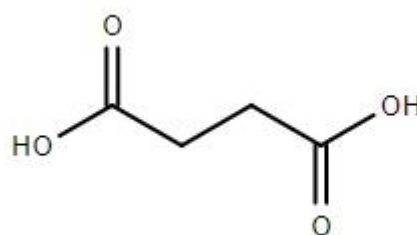
Fórmula molecular: $C_3H_6O_3$

Massa molar ($g\ mol^{-1}$): 90,08

pKa (a 25°C): 4,32

Log P: -0,72

Ácido Succínico



Fórmula molecular: $C_4H_6O_4$

Massa molar ($g\ mol^{-1}$): 118,09

pKa (a 25°C): 4,21; 5,64

Log P: -0,59

Fonte: Autor (2022). Dados obtidos de PubChem Database

De acordo com a Figura 12, conclui-se que os analitos são compostos de carbono, hidrogênio e oxigênio e com massas molares relativamente baixas. Os valores referentes aos pka's dos analitos mostra que possuem propriedades semelhantes em relação à acidez.

São mencionados também os valores relativos ao coeficiente de partição octanol-água, Kow (usualmente tratado como logP). Esse parâmetro é utilizado para estimar a hidrofobicidade de um composto, já que relaciona sua concentração em meio pouco polar (octanol) em relação à sua concentração em um meio polar (água). Quando este valor for positivo, verifica-se o caráter hidrofóbico, pois apresenta maior afinidade com a fase pouco polar. Já nos casos em que o valor for negativo, conclui-se que o composto apresenta maior afinidade com a água do que com octanol, sendo assim, possui caráter hidrofílico. Observa-se que os valores de logP dos analitos estudados neste trabalho são além de similares, negativos, e por essa razão, são considerados

polares (HODGES *et al.*, 2019; ZHU *et al.*, 2022).

Esses analitos já foram estudados anteriormente, inclusive em amostras como vinho, vinagre, iogurte, cerveja e suco de laranja. Porém, apesar da eficiência e sensibilidade da instrumentação utilizada, os autores concluíram que, devido à complexidade das amostras estudadas, o efeito de matriz foi significativo. Por conta disso, foi necessário recorrer à estratégias de calibração trabalhosas e pouco vantajosas, como a adição de padrão (NARDINI *et al.*, 2021).

Verifica-se, portanto, a necessidade de se avaliar metodologias de preparo de amostra eficientes e sensíveis para os analitos em questão, para promover a limpeza de matrizes complexas, de modo a permitir a utilização de técnicas menos laboriosas de calibração. Além disso, é importante considerar que, um preparo de amostra adequado protege o instrumento cromatográfico, já que a injeção desse tipo de amostra sem um tratamento prévio e eficiente pode causar danos à instrumentação, levando a prejuízos. Essas e outras características desejáveis para um adequado preparo de amostra, são contempladas pelas técnicas de microextração, comentadas anteriormente.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar uma metodologia de preparo de amostra por TF-SPME a base de SAQQ suportada em fibras de algodão de hastes flexíveis fixadas no *96 well plate* para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em amostras de vinho por LC-MS/MS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Preparar o sistema de TF-SPME a base de SAQQ e realizar análises de caracterização para confirmação da modificação.

II. Otimizar os parâmetros da técnica de microextração, como pH de extração, tempo de extração, solução de dessorção, tempo de dessorção e adição de sal.

III. Adaptar o método de separação já descrito na literatura para os ácidos orgânicos alvo por LC-MS/MS em coluna HILIC reavaliando a coluna, fluxo e composição de fase móvel e volume de injeção.

IV. Avaliar o efeito de matriz na determinação dos ácidos orgânicos em vinho usando o método de preparo de amostras otimizado.

V. Avaliar parâmetros de mérito da metodologia proposta incluindo limite de quantificação, limite de detecção, faixa linear, coeficiente de correlação, recuperação e precisão do método proposto.

VI. Aplicar o método proposto em amostras de vinho.

4 METODOLOGIA

4.1 SOLUÇÕES E REAGENTES

Foram utilizados padrões de grau analítico dos ácidos láctico e succínico (Vetec e Sigma Aldrich ®respectivamente). Foi utilizada acetonitrila grau HPLC (J. T. Baker, Estados Unidos) e água ultrapura para a fase móvel. A força iônica foi avaliada com padrão analítico de cloreto de sódio (Synth ®). Foi utilizado ácido clorídrico em concentração 0,1 mol L⁻¹ (Vetec®), hidróxido de amônio 2,57 mol L⁻¹ Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil). Para o filme biopolimérico foi usado SAQQ para preparo da solução estoque 1% em água ultrapura e posterior diluição para 0,2% em ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹. O SAQQ utilizado foi sintetizado em um trabalho anterior (VITALI, 2012) usando quitosana (QTS) com grau de desacetilação de 90% e massa molar média 122,74 kDa adquirida da Companhia Purifarma (São Paulo, SP, Brasil) e cloreto de trimetil glicidil amônio (CTGA, teor ≥ 90% m/m) adquirido da Fluka Chemica (São Paulo, SP, Brasil). O GLU 25% (v/v) em água foi adquirido da Vetec (Duque de Caxias, RJ, Brasil) e foi utilizada uma diluição com água ultrapura para 2,5%. A água ultrapura utilizada foi preparada em sistema Milli-Q (Millipore®, Bedford, MA, USA).

4.2 MATERIAIS

Os materiais utilizados para o procedimento de extração e dessorção foram os componentes do sistema *96 well plate* (amostrador manual, pinos, escova e poços). Foram adquiridas hastes flexíveis descartáveis da marca Absorve®e modelo *swab* para coleta de amostras estéril. Também foram utilizados frascos de vidro com tampa, pipetas semiautomáticas, ponteiras de diversos volumes, frascos de vidro de diversos volumes e água ultrapura produzida por um aparelho Mega purity modelo MEGA RO/UP.

4.3 CARACTERIZAÇÕES DO FILME BIOPOLIMÉRICO SUPOSTADO EM ALGODÃO

As caracterizações foram feitas através da espectroscopia de infravermelho por transformada de Fourier, do inglês *Fourier Transform Infrared Spectroscopy* (FT-IR), em um espectrofotômetro de infravermelho Perkin-Elmer Spectrum 100, localizado no Laboratório de Bioinorgânica e Cristalografia (LABINC). As análises foram realizadas por reflectância total atenuada, utilizando o módulo UATR em uma faixa de 4000-600 cm⁻¹.

A análise microscopia eletrônica de varredura, do inglês *Scanning Electron Microscopy* (SEM) também foi realizada a fim de avaliar a morfologia dos materiais.

As análises foram feitas em um equipamento *Tescan Scanning Electron Microscope*, Vega 3 LMU da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). As amostras foram colocadas em *stubs* com fita de carbono, metalizadas com ouro/paládio por 120 segundos. As imagens foram feitas com detector SE, nos aumentos de de 50, 100, 200, 500, e 1000 X. E análise pontual em determinadas regiões (4 regiões) com aumento de 1000x.

4.4 INSTRUMENTAÇÃO LC-MS/MS, MÉTODO E CONDIÇÕES DA EXTRAÇÃO POR TF-SPME

Foi utilizado um HPLC obtido da Agilent Technologies 1200 Series (Waldbronn, Alemanha) equipado com degaseificador online (G1322A), bomba quaternária (G1311A), compartimento de colunas com controle de temperatura independente (G1316A), auto-amostrador (G1367B). O sistema cromatográfico foi acoplado a um espectrômetro de massas híbrido constituído de um triploquadrupolo e íon trap linear, modelo Q Trap 3200 da Applied Biosystems (Concord, Canada). O software utilizado foi Analyst versão 1.6.2 para controlar o LC-MS/MS e tratamento dos dados obtidos nas análises. A fonte utilizada foi TurbolonSprayTM (electrospray-ESI) no modo íon negativo. A agulha do capilar mantida a 5500 V. As separações foram feitas utilizando coluna LARIHC-CF6-P (150 mm de comprimento; 4,6 mm de diâmetro interno; 5 µm de tamanho de partícula) fabricada pela empresa AZYP (Texas, Estados Unidos). A temperatura foi fixada em 30 °Ce o volume de injeção foi 5 µL. A fase móvel foi acetoneitrila:água, e utilizada no modo gradiente (Tabela 2).

Tabela 2 – Gradiente de fase móvel utilizado na separação cromatográfica dos analitos.

| Tempo (min.) | Acetonirila (%) | Água Ultrapura (%) |
|--------------|-----------------|--------------------|
| 0 - 2 | 85 | 15 |
| 2 - 6 | 50 | 50 |
| 6 - 12 | 85 | 15 |

Fonte: Autor (2022).

Considerando as condições cromatográficas especificadas o número de pratos (N) foi calculado através da equação abaixo, através da relação entre e o tempo de retenção do analito (t_i) e a largura do pico (whi). Considera-se aceitável valores maiores do que 2000 (RIBANI *et al.*, 2004).

$$N = 16 \times \left(\frac{t_i}{whi} \right)^2 \quad (7)$$

Os valores obtidos para os pratos teóricos foram de 4154 (ácido láctico) e 8169 (ácido succínico), portanto, foram considerados adequados.

A resolução também foi calculada, utilizando-se a equação apresentada a seguir, que relaciona o tempo de retenção (t_n), largura do pico (w_n), tempo de retenção do analito anterior (t_{n-1}) e largura do pico do analito anterior (w_{n-1}). Valores considerados adequados são maiores do que 2 (RIBANI *et al.*, 2004).

$$Rs = 2 \times \frac{(t_n - t_{n-1})}{(w_n + w_{n-1})} \quad (8)$$

Esse parâmetro apresentou valor de 6,48 e portanto, também foi considerado adequado para o método proposto.

Para o espectrômetro de massas, os parâmetros foram: + gás de cortina 10 psi; temperatura da fonte 350 °C; gás nebulizador 1,45 psi; gás de secagem 2,45 psi; gás da dissociação induzida por colisão médio. Os ácidos orgânicos foram monitorados e quantificados usando monitoramento de reações múltiplas (MRM). Na Tabela 3 estão os valores dos íons precursores, íons quantitativos, bem como os valores de potencial de desagregação, do inglês *declustering potential* (DP), potencial de entrada na célula de colisão, do inglês *collision cell entrance potential* (CEP), potencial de entrada, do inglês *entrance potential* (EP), energia de colisão, do inglês *collision energy* (CE) e potencial da célula de saída, do inglês *collision cell exit potential* (CXP).

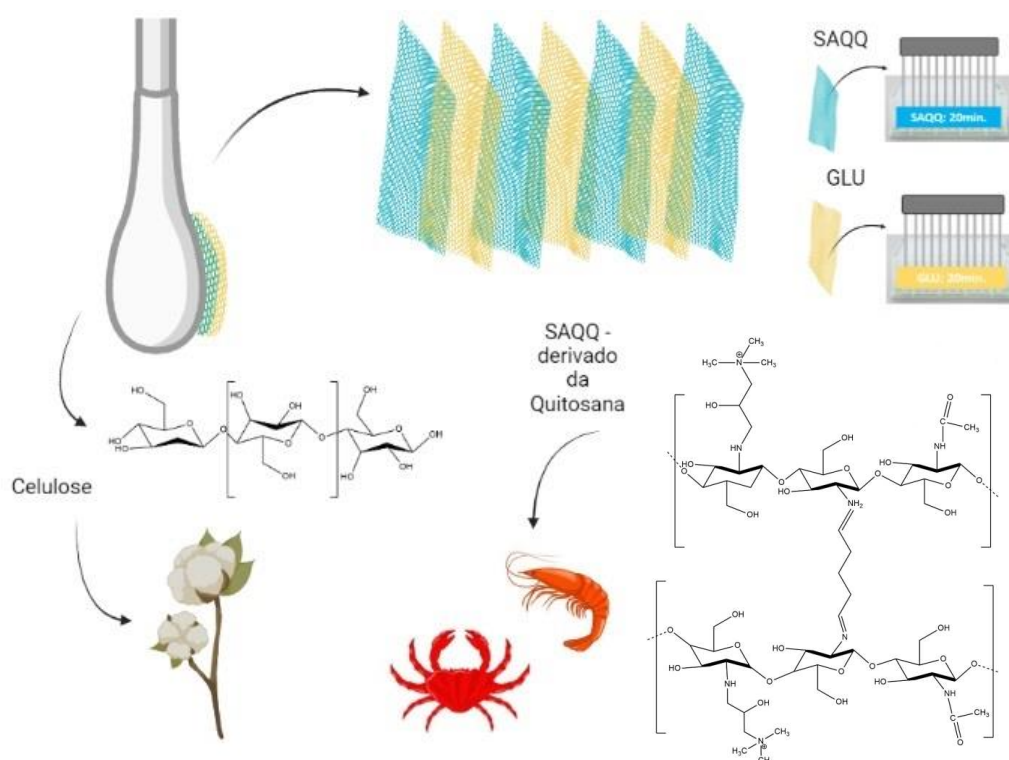
Tabela 3 – Parâmetros de cada ácido orgânico analisado no LC-MS/MS (modo negativo). Otimização do espectrômetro de massas feito através de infusões diretas de soluções aquosas contendo os analitos.

| Analito | Íon precursor | Íons produto | DP | CEP | EP | CE | CXP |
|------------------------|---------------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|
| | m/z (Q1) | m/z (Q3) | | | | | |
| Ácido Láctico | 88,8 | 43,1* | -25 | -18 | -10 | -16 | -4 |
| | 88,8 | 45,0 | -25 | -18 | -10 | -16 | -4 |
| | 88,8 | 40,9 | -25 | -18 | -10 | -16 | -4 |
| Ácido succínico | 116,8 | 73,0* | -30 | -10 | -10 | -14 | 0 |
| | 116,8 | 99,1 | -30 | -10 | -10 | -14 | -2 |
| | 116,8 | 55,1 | -30 | -10 | -10 | -18 | 0 |

Fonte: Adaptado de Nardini *et al.* (2021). Obs.: * corresponde ao íon quantitativo.

As extrações foram feitas utilizando o dispositivo proposto para TF-SPME, que consistiu em hastes flexíveis cuja porção de algodão serviu como substrato para um filme fino formado por 7 camadas, sendo 4 de SAQQ e 3 de GLU, de forma intercalada, conforme demonstrado na Figura 13.

Figura 13 – Esquema representativo da haste flexível com filme polimérico multicamadas disposto sobre a porção de algodão da haste.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

Foram usadas placas de *96 well plate* com capacidade para 2 mL para os procedimentos de extração, secagem e dessorção. A extração durou 30 min e foi utilizado 1 mL de solução, sendo 500 μL de solução de NaCl 20%, 300 μL de água ultrapura, 100 μL de padrões concentrações (50 mg L^{-1} , 100 mg L^{-1} , 150 mg L^{-1} , 200 mg L^{-1} e 250 mg L^{-1}) e 100 μL amostra quando aplicável. Para as curvas em solvente (água ultrapura) o volume de amostra foi substituído por água, de modo que o volume final nos dois casos fosse de 1 mL. Para a secagem, utilizou-se uma placa com os poços vazios nas quais os dispositivos para TF-SPME ficaram sob agitação por 20 min. Em seguida, a dessorção foi feita também pelo período de 20 min com 500 μL de solução composta por HCl 0,1 mol L^{-1} e 20% de ACN. Ao final da dessorção, foi coletado 200 μL do eluente e transferidos para um frasco de vidro de vidro com capacidade para 1,5 mL. Ao mesmo frasco de vidro, foram adicionados 500 μL de ACN e 100 μL de NH_3 em concentração 0,05 mol L^{-1} . Essa solução, com volume final de 800 μL , foi injetada no LC-MS/MS cuja instrumentação e condições de separação e detecção estão descritas em tópicos específicos.

4.5 PREPARO DOS FILMES COM SAQQ NO SUPORTE DE HASTE FLEXÍVEL SWAB E 96 WELL PLATE

As hastes flexíveis utilizadas foram adquiridas em estabelecimentos comerciais de insumos para laboratório na cidade de Florianópolis, SC. Tendo em vista que os materiais são estéreis e embalados individualmente, não foi feita etapa de limpeza. Para a utilização dos *swab*, cada unidade foi aberta e uma parte da sua haste foi cortada até 5 cm, aproximadamente, sendo descartado o excedente. Em seguida, a porção da haste com o algodão foi encaixada no pente do dispositivo *96 well plate* e, para melhor fixação, utilizou-se cola lavável do tipo escolar. Na Figura 14 encontra-se o esquema da confecção dos materiais.

Figura 14 – Materiais utilizados para fixação das hastes flexíveis no pente.



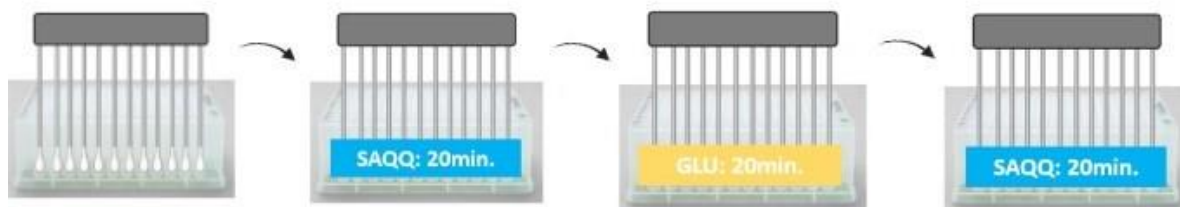
Fonte: Autor (2022).

Após preencher os 12 pinos de cada pente a porção contendo o algodão foi mergulhada em soluções de biopolímero e agente reticulante para formação do filme polimérico.

Primeiramente, mergulhou-se o swab na solução de SAQQ 0,2%, na qual ficou por 20 min. Decorrido este tempo, retirou-se o swab da solução e com toalhas de papel descartável removeu-se o excesso de solução. Então, mergulhou-se o swab em solução do reticulante GLU 2,5% também por 20 min. O contato do swab com as soluções de SAQQ e reticulante ocorreu de forma intercalada e sempre em períodos fixos de 20 min.

Foram avaliadas duas alternativas para o procedimento descrito, sendo a primeira delas com três camadas no total, sendo duas de SAQQ e uma de reticulante. Esse processo levou 60 min (Figura 15) e, ao longo do texto, será identificado como filme polimérico multicamadas com 2 camadas de SAQQ (FM-2C).

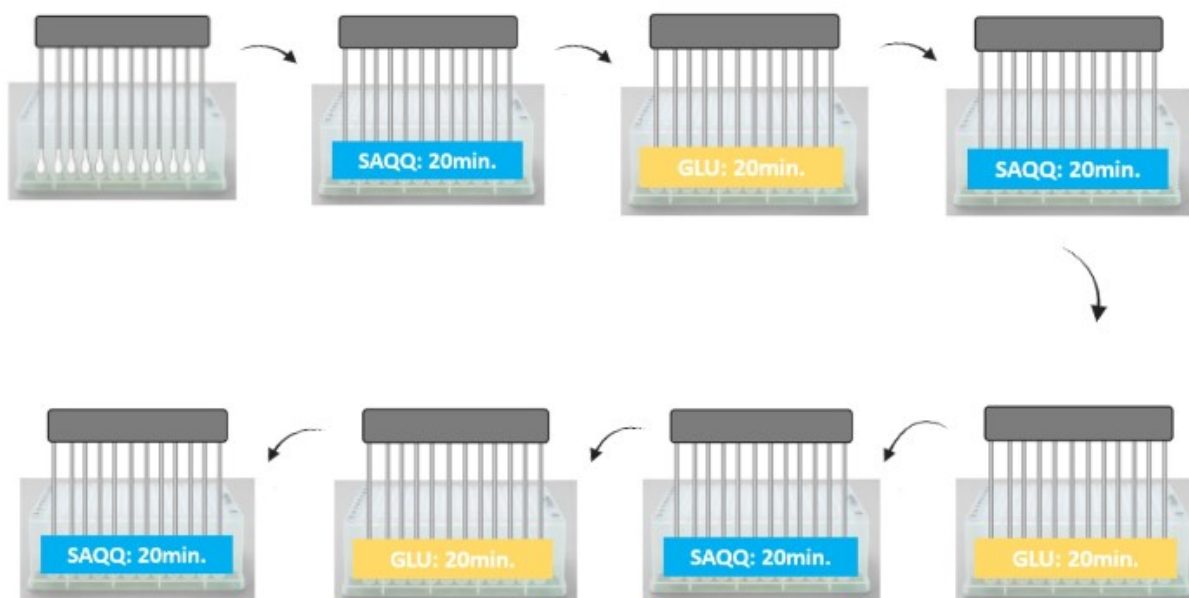
Figura 15 – Demonstração da produção do swab revestido com duas camadas de polímero (SAQQ) e uma de reticulante (GLU).



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

A outra alternativa de filme polimérico avaliado foi com sete camadas no total, sendo quatro de SAQQ e três de agente reticulante. Esse processo levou 2 horas e 20 min, (Figura 16) e, ao longo do texto será identificado como filme polimérico multicamadas com 4 camadas de SAQQ (FM-4C).

Figura 16 – Demonstração da produção do swab revestido com quatro camadas de polímero (SAQQ) e três de reticulante (GLU).

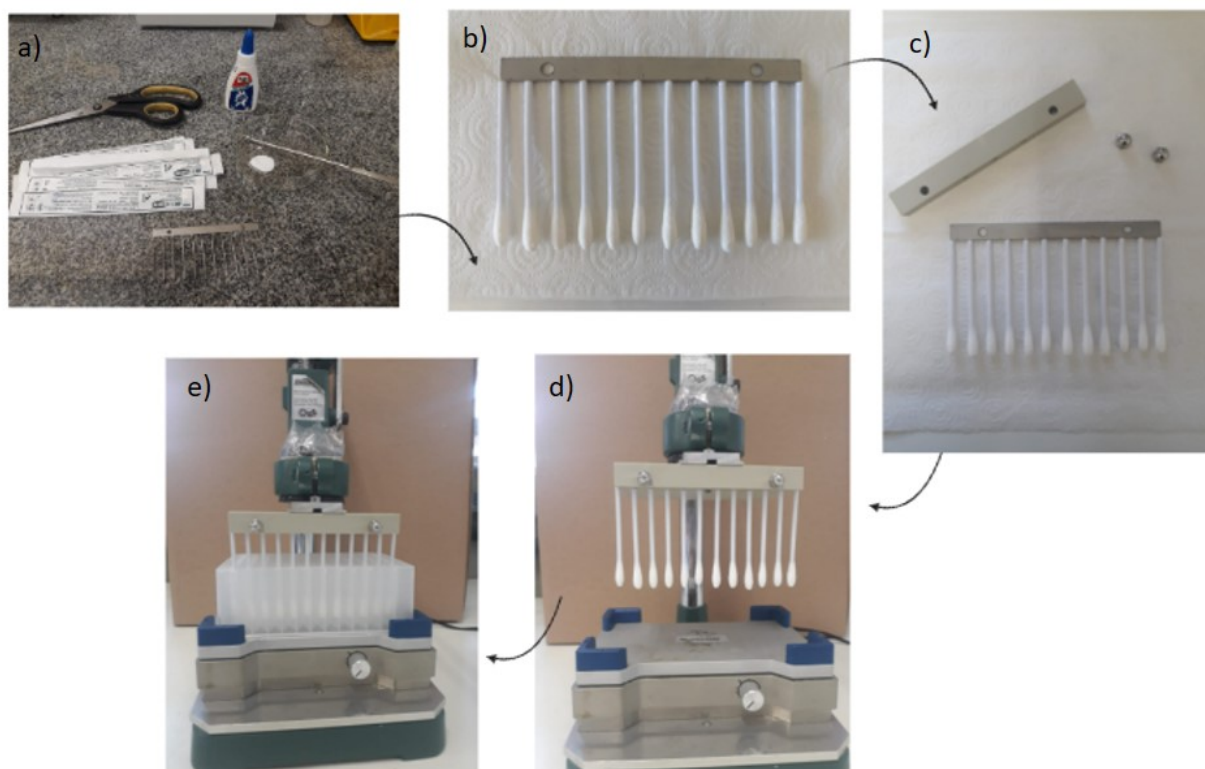


Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

Depois de finalizada a formação das camadas, os swabs revestidos foram secos em temperatura ambiente por 12 horas e em seguida, foram acoplados no dispositivo para realização da extração. A Figura 17 apresenta um esquema contemplando os

materiais utilizados para fixação das hastes nos pentes, bem como as hastes já fixadas no pente e também acopladas ao dispositivo *96 well plate* para extração.

Figura 17 – Demonstração da utilização das hastes flexíveis utilizadas acopladas ao *96 well plate*: a) materiais utilizados; b) hastes fixadas no pente; c) utensílios para fixação do pente na escova; d) pente fixado à escova; e) dispositivo pronto para ser utilizado com a placa de 96 poços com capacidade de 2 mL cada.



Fonte: Autor (2022).

A reprodutibilidade da produção do filme sobre a porção de algodão da haste flexível foi avaliada utilizando 8 hastes flexíveis diferentes e os resultados foram expressos como o desvio padrão relativo, do inglês *Relative Standard Deviation* (RSD) obtido ao se avaliarem os valores de massa das 8 hastes sem o filme e com o filme aderido.

4.6 AVALIAÇÃO PRELIMINAR DA EXTRAÇÃO E DESSORÇÃO DOS ANALITOS POR TF-SPME

Nos primeiros experimentos avaliou-se, de forma simultânea, o número de camadas de polímero e de reticulante utilizados para formação do filme fino, a solução utilizada para dessorção dos analitos, e por fim, a composição de uma solução no qual os analitos já eluídos seriam diluídos e injetados. Os experimentos realizados estão na Tabela 4. Para avaliação destes parâmetros foi utilizada solução padrão dos analitos

em concentração 5 mg L^{-1} . A extração ocorreu por 30 minutos e a dessorção por 20 minutos.

Tabela 4 – Relação de experimentos para avaliação do filme polimérico, número de camadas de polímero e solução de dessorção.

| Experimento | Filme polimérico | Solução de dessorção |
|-------------|------------------|--|
| 1 | FM-2C | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 2 | FM-2C | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 3 | FM-2C | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| 4 | FM-2C | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| 5 | FM-4C | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 6 | FM-4C | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 7 | FM-4C | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| 8 | FM-4C | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| 9 | Sem filme | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 10 | Sem filme | HCl $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ e 20% ACN |
| 11 | Sem filme | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |
| 12 | Sem filme | HCl $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ |

Fonte: Autor (2022).

Os resultados foram avaliados através da média geométrica das áreas obtidas para o sinal de ambos os analitos.

4.7 OTIMIZAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO E DESSORÇÃO POR TF-SPME

As demais variáveis envolvidas no processo de extração e dessorção foram avaliadas através de planejamento fatorial fracionário. Utilizou-se soluções de água ultrapura e padrões analíticos em concentração de 5 mg L^{-1} . Foram avaliados os parâmetros tempo de extração, tempo de secagem, tempo de dessorção, pH da amostra e adição de sal para força iônica. Os procedimentos de extração foram realizados em poços de 2 mL para o sistema de *96 well plate*, utilizando o volume de 1 mL, sendo a amostra com pH e força iônica ajustados de acordo com as propriedades dos analitos. O processo de dessorção foi realizado também em poços de 1 mL e o volume de solvente de dessorção foi de 0,5 mL.

A Tabela 5 traz a relação dos experimentos realizados e suas respectivas condições.

Tabela 5 – Relação de experimentos para o Gráfico de Pareto.

| Experimento | Tempo de extração (min.) | % de NaCl | pH da extração | Tempo de secagem (min.) | Tempo de dessorção (min.) |
|-------------|--------------------------|-----------|----------------|-------------------------|---------------------------|
| 1 | 10 | 0 | 4,5 | 00 | 20 |
| 2 | 10 | 0 | 4,5 | 20 | 10 |
| 3 | 10 | 0 | 5,5 | 00 | 10 |
| 4 | 10 | 0 | 5,5 | 20 | 20 |
| 5 | 10 | 25 | 4,5 | 00 | 10 |
| 6 | 10 | 25 | 4,5 | 20 | 10 |
| 7 | 10 | 25 | 5,5 | 00 | 20 |
| 8 | 10 | 25 | 5,5 | 20 | 10 |
| 9 | 30 | 0 | 4,5 | 00 | 10 |
| 10 | 30 | 0 | 4,5 | 20 | 20 |
| 11 | 30 | 0 | 5,5 | 00 | 10 |
| 12 | 30 | 0 | 5,5 | 20 | 10 |
| 13 | 30 | 25 | 4,5 | 00 | 20 |
| 14 | 30 | 25 | 4,5 | 20 | 10 |
| 15 | 30 | 25 | 5,5 | 00 | 10 |
| 16 | 30 | 25 | 5,5 | 20 | 20 |

Fonte: Autor (2022).

A média geométrica das áreas dos picos cromatográficos dos analitos em cada experimento foi utilizada para a geração do Gráfico de Pareto.

4.8 ENSAIOS DE REUTILIZAÇÃO DOS DISPOSITIVOS TF-SPME E AVALIAÇÃO DO USO DE HASTES FLEXÍVEIS CONVENCIONAIS COMO ALTERATIVAS DE SUPORTE SÓLIDO

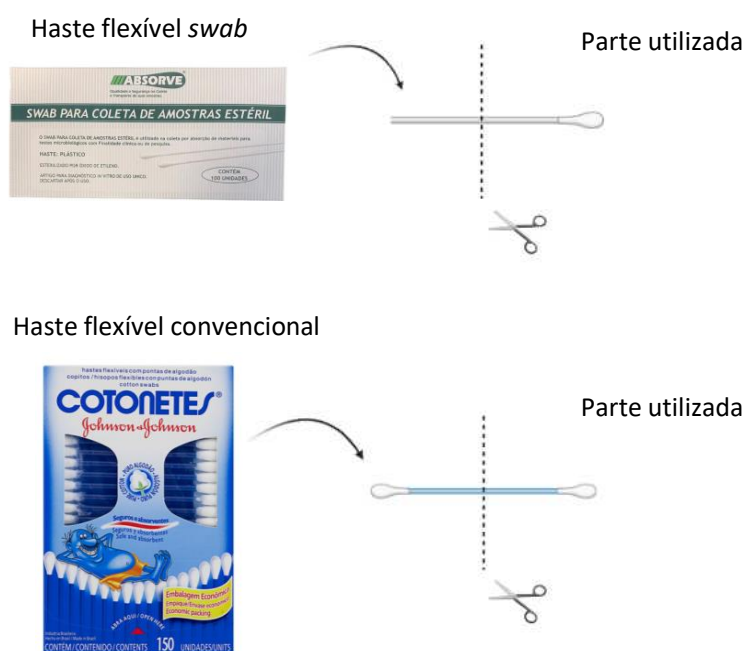
Os experimentos foram realizados com o objetivo de verificar se as hastes flexíveis *swab* contendo o filme polimérico poderiam ser utilizadas por mais de um ciclo completo (extração e dessorção) e se possível, quantas vezes, sem perder a eficiência de extração. O experimento foi feito em duplicata, utilizando água ultrapura e os analitos na concentração de 5 mg L⁻¹. O filme polimérico foi produzido uma única vez, conforme o apresentado na Figura 16. Foram feitos 3 ciclos utilizando a mesma haste flexível *swab*, e entre eles, as mesmas foram lavadas com água ultrapura corrente e colocadas para secar em estufa (aprox. 45 °C) por 30 min, até que se percebesse que a porção de algodão estivesse seca. Os experimentos foram conduzidos conforme descrito na Seção 4.4 e a avaliação dos resultados foi feita com a injeção dos extratos da primeira e terceira utilização, identificadas respectivamente como ciclo 1 e ciclo 3. Os resultados foram expressos através da média geométrica dos analitos e comparados através do teste t de Student.

Com exceção destes experimentos, em todos os demais foram utilizadas hastes flexíveis novas com filme polimérico produzido e utilizado uma única vez.

Para fins comparativos, em relação à eficiência do procedimento de extração proposto no presente trabalho, optou-se por avaliar as repostas geradas ao se utilizarem hastes flexíveis convencionais, adquiridas em farmácias de Florianópolis, SC. Para os experimentos dessa seção foram utilizadas no total 4 hastes flexíveis, 2 do tipo *swab* e 2 do tipo convencional, para que suas repostas fossem comparadas. A fixação das hastes flexíveis comerciais nos pentes do *96 well plate* seguiu o mesmo procedimento já descrito, bem como o processo de produção do filme polimérico, foi o mesmo utilizado para as hastes *swab* usados nos demais experimentos. O processo de extração e todos os seus parâmetros foram também mantidos iguais. As extrações foram feitas em água ultrapura e a concentração utilizada dos analitos foi de 5 mg L^{-1} . Os resultados foram expressos através da média geométrica dos analitos e comparados através do teste t de Student.

As hastes flexíveis convencionais apresentam nas duas extremidades a porção de algodão, enquanto que as hastes flexíveis *swab* possuem algodão apenas em uma extremidade. Dessa forma, para avaliação das duas unidades de hastes convencionais foram utilizadas apenas a porção de algodão de uma extremidade, e a outra foi descartada, conforme sugere a Figura 18

Figura 18 – Demonstração da utilização das hastes flexíveis convencionais e *swab*.



Fonte: Autor (2022). Criado em BioRender.

4.9 PARÂMETROS DE MÉRITO

As curvas de calibração foram obtidas em cinco níveis de concentração (5, 10, 15, 20 e 25 mg L⁻¹ para ambos os analitos) realizados em duplicata (n=2). Uma das curvas foi realizada em água ultrapura e a outra utilizando amostra de vinho branco diluída 1000 vezes e fortificada com padrões. Os dados obtidos foram utilizados para verificar o efeito de matriz através do teste t de Student, para determinar a faixa linear de trabalho e coeficiente de determinação (R²). Os valores de limite de detecção, do inglês *Limit of Detection* (LOD), e limite de quantificação, do inglês *Limit of quantification* (LOQ) foram obtidos pelo método relação sinal/ ruído. A precisão do método foi realizada em água ultrapura e avaliada com base no RSD das áreas dos analitos e a recuperação relativa do método foi avaliada por meio de três níveis de concentração (5, 15 e 25 mg L⁻¹) da curva de adição de padrão utilizando amostra de vinho branco.

4.10 APLICAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO EM AMOSTRAS DE VINHO

As amostras de vinho foram adquiridas de comércios locais de Florianópolis, SC. O armazenamento foi feito em frascos de vidro âmbar, os quais foram mantidos sob refrigeração no laboratório de pesquisa.

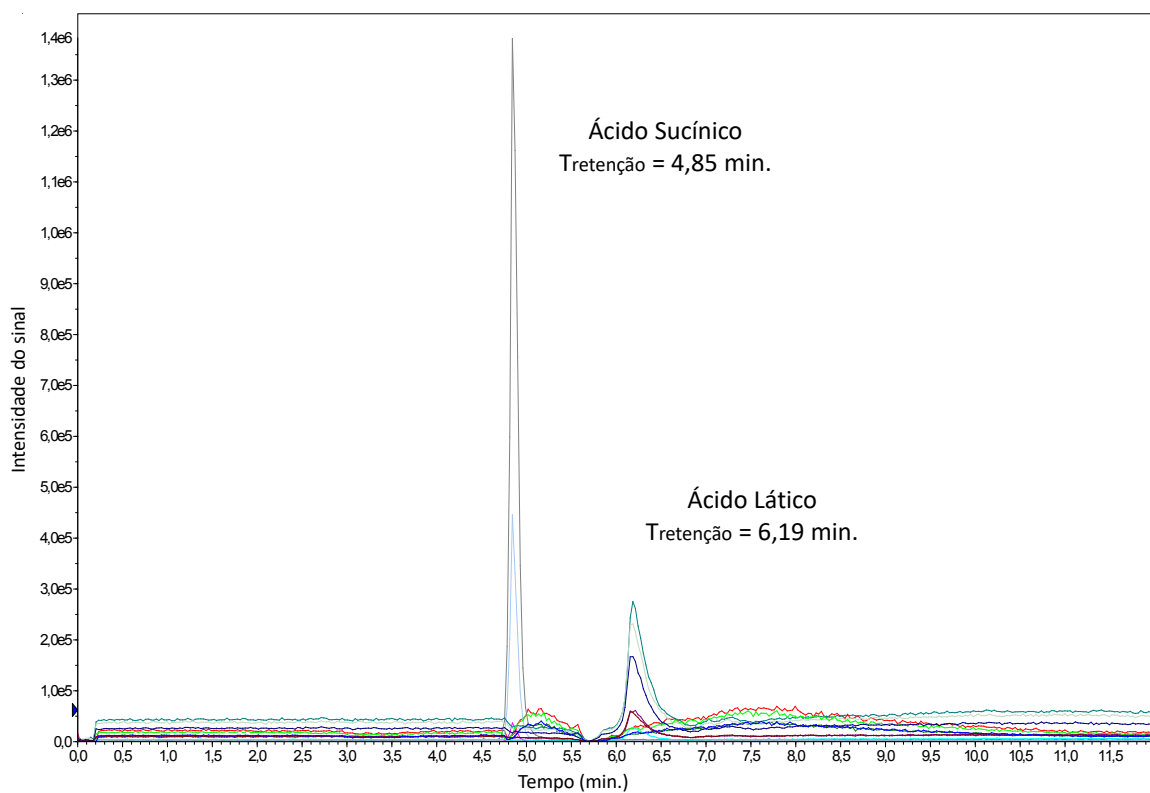
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 SEPARAÇÃO E DETECÇÃO DOS ANALITOS POR LC-MS MS

Para separação e detecção dos analitos utilizou-se um método já descrito na literatura, porém com algumas adaptações.(NARDINI *et al.*, 2021)

A seguir, a Figura 19 mostra um cromatograma com solução padrão dos analitos em concentração 5 mg L^{-1} e seus respectivos tempos de retenção, depois das adaptações feitas. As condições cromatográficas estão descritas em tópico anterior.

Figura 19 – Cromatograma contendo os analitos e seus respectivos tempos de retenção. Condições experimentais: vide metodologia



Fonte: Autor (2022).

O método no qual este trabalho é baseado utilizou uma coluna SeQuant®ZIC®-HILIC e fase móvel no modo isocrático, composta por acetonitrila e tampão formiato de amônio na proporção 75:25 (v/v) e o volume de injeção utilizado foi de ($15 \mu\text{L}$). Nessas condições, os tempos de retenção para os analitos foram 5, 17 min. para o ácido súcínico e 5,19 min, para o ácido láctico. (NARDINI *et al.*, 2021)

As principais alterações feitas no método descrito no parágrafo anterior consistem na troca da coluna, fase móvel e volume de injeção. Para esse estudo, a coluna utilizada foi LARIHC- CF6-P, para a fase móvel utilizou-se um gradiente de água e acetonitrila especificado na Tabela 2 e volume de injeção reduzido para $5 \mu\text{L}$. Após as

modificações propostas, o tempo de retenção do ácido succínico foi de 4,85 min. e o para o ácido láctico, 6,19 min.

As colunas utilizadas em ambos os trabalhos apresentam o mecanismo de separação cromatografia líquida de interação hidrofílica, do inglês *hydrophilic interaction liquid chromatography* (HILIC), sendo a fase estacionária da SeQuant®ZIC®-HILIC a base de compostos zwitteriônicos e na coluna LARIHC- CF6-P a base da fase estacionária quiral foi ciclofrutano nativo (CF-6) desenvolvida pelo grupo do professor Dr. Daniel Armstrong e comercializada pela empresa AZYP (Texas, Estados Unidos).

Métodos analíticos utilizando HILIC são eficientes para separação de compostos polares e ionizáveis, e combinam características das diferentes abordagens utilizadas em cromatografia líquida, pois utiliza fases estacionárias semelhantes a cromatografia líquida de fase normal, do inglês *normal phase liquid chromatography* (NPLC) e fases móveis similares a cromatografia líquida de fase reversa, do inglês *reverse phase liquid chromatography* (RPLC), e ainda, interações eletrostáticas entre os analitos e a fase estacionária. (ERKMEN *et al.*, 2020)

A utilização de HILIC tem crescido ao longo dos anos, e se destacou por várias razões, dentre elas a alta frequência analítica dos métodos propostos, as diferentes classes de compostos contemplados e os níveis de sensibilidade atingidos. (WANG, D. *et al.*, 2022)

Além das vantagens citadas, alguns autores reportam a utilização de HILIC junto de LC-MS/MS e cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, do inglês *Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry* (LC-MS) para análise de amostras complexas. A sensibilidade atingida quando métodos simples de preparo de amostra são adotados demonstra a eficiência de separação verificada nas colunas HILIC. (LI *et al.*, 2022; HEFNI *et al.*, 2021)

5.2 ANÁLISES QUÍMICAS DO FILME POLIMÉRICO PARA UTILIZAÇÃO EM TF-SPME

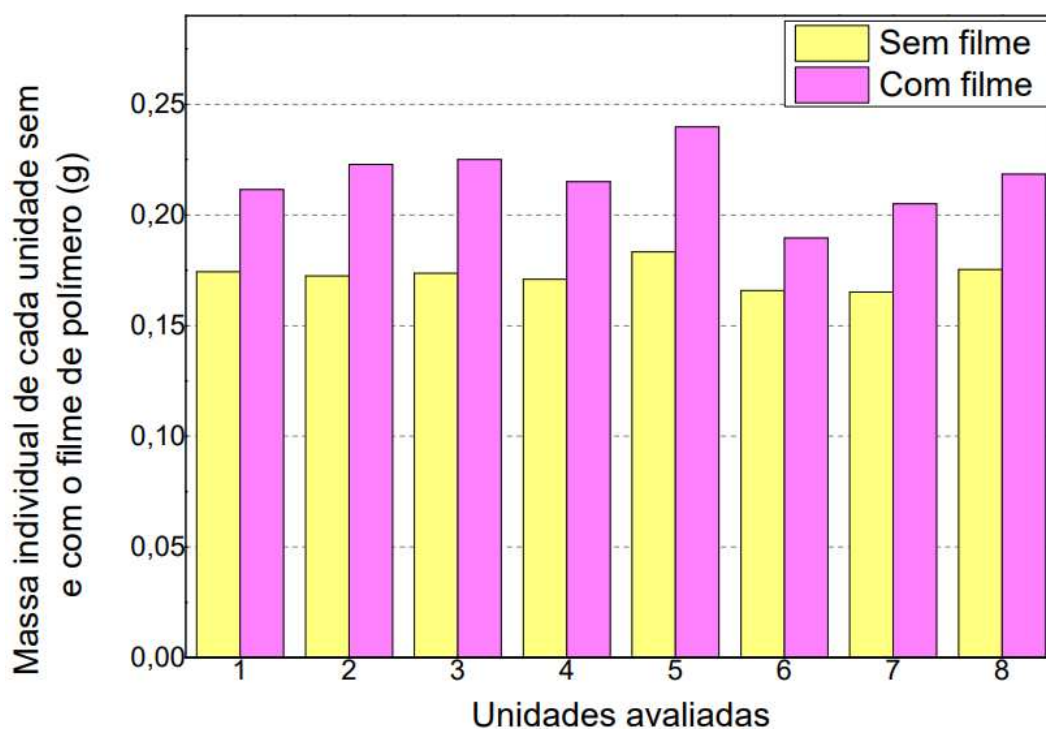
As análises expostas a seguir foram feitas com FM-4C, detalhado na seção anterior, pois essa foi a condição escolhida como ideal para produção do filme polimérico. Essa escolha será discutida com mais detalhes ao longo desta seção.

5.2.1 Massa das hastes flexíveis utilizadas para TF-SPME

Neste tópico será apresentada uma avaliação da massa obtida pela pesagem das hastes flexíveis. Essa etapa permite a verificação da adesão do polímero e do agente reticulante na superfície do algodão. Para isso, 8 unidades de hastes flexíveis foram pesadas antes e depois de passar pelo procedimento de produção do filme polimérico. Os resultados obtidos foram utilizados para confecção de um gráfico de

barras, exposto na Figura 20, onde são apresentados os dados de massa de 8 hastes flexíveis avaliadas individualmente sem e com o filme de SAQQ.

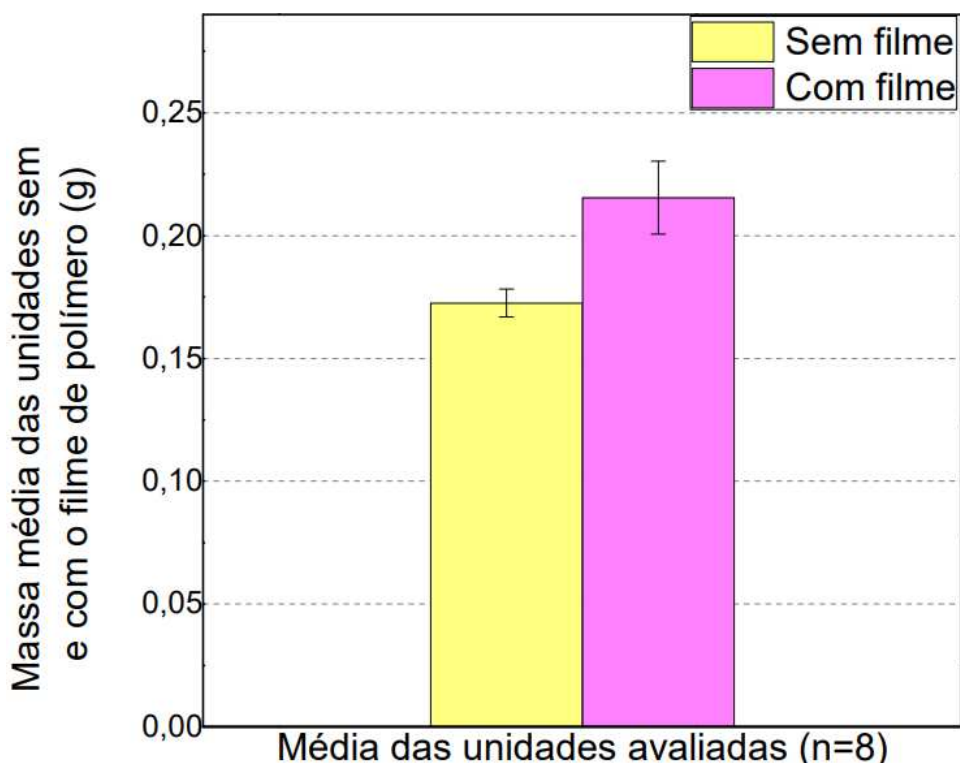
Figura 20 – Gráfico de barras para avaliação da variação da massa das hastes flexíveis sem e com o filme de SAQQ. Dados de massa de 8 hastes flexíveis avaliadas individualmente sem e com o filme de SAQQ.



Fonte: Autor (2022).

Na Figura 21 são apresentados os dados de massa através da média das 8 unidades avaliadas sem e com o filme de SAQQ.

Figura 21 – Gráfico de barras para avaliação da variação da massa das hastes flexíveis sem e com o filme de SAQQ. Dados de massa média das 8 unidades avaliadas sem e com o filme de SAQQ.



Fonte: Autor (2022).

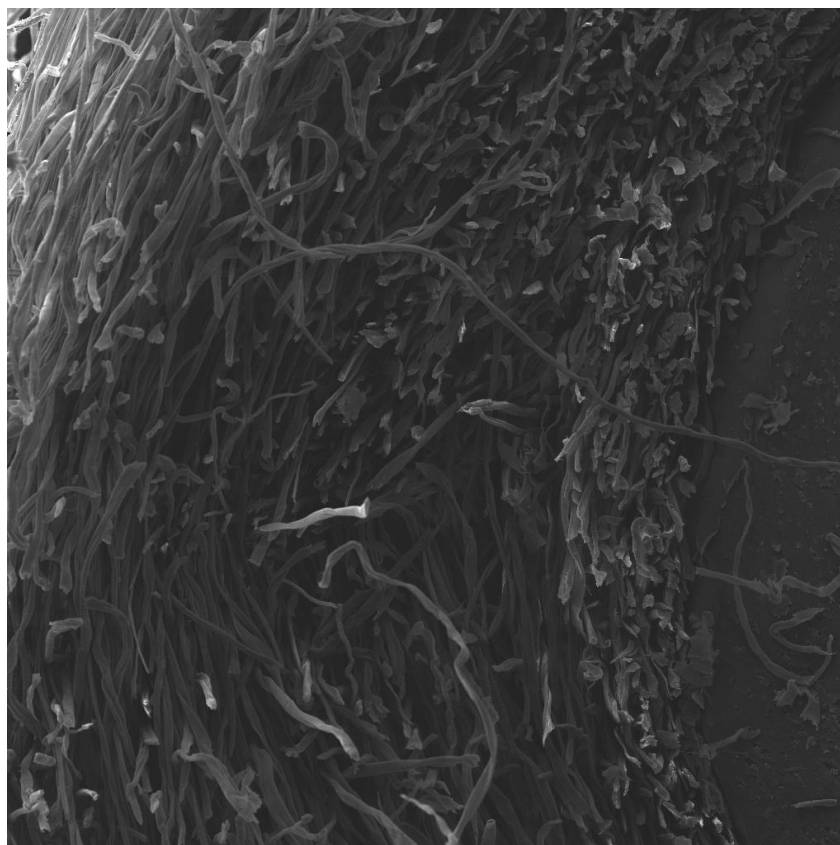
A partir do gráfico exposto é possível perceber um aumento de massa em relação à haste flexível sem filme polimérico para a haste flexível com filme polimérico. A média, em gramas, obtida para as hastes flexíveis sem filme polimérico foi de 0,172 g e a média obtida para as hastes flexíveis com filme polimérico foi de 0,215 g. Verificou-se, portanto, que o filme polimérico proporcionou um aumento médio de 25% na massa.

A precisão e a reprodutibilidade podem ser estimadas pela análise dos valores de massa pesados das 8 unidades avaliadas. O RSD obtido entre as hastes flexíveis sem filme polimérico foi de 3,3%, e entre as hastes flexíveis com o filme foi de 6,8%. O RSD baixo das hastes flexíveis com filme indica que, durante a formação desse, houve uniformidade adequada entre as hastes flexíveis preparadas. Pode-se indicar que as hastes flexíveis possuem quantidades muito semelhantes do filme polimérico, e isso contribui para a precisão do método de extração dos analitos por TF-SPME.

5.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

A análise foi realizada com o objetivo de avaliar a morfologia da porção de algodão com filme polimérico, conforme a Figura 22.

Figura 22 – Imagem obtida por MEV da porção de algodão com filme polimérico (FM-4C) com aproximação de 200x.

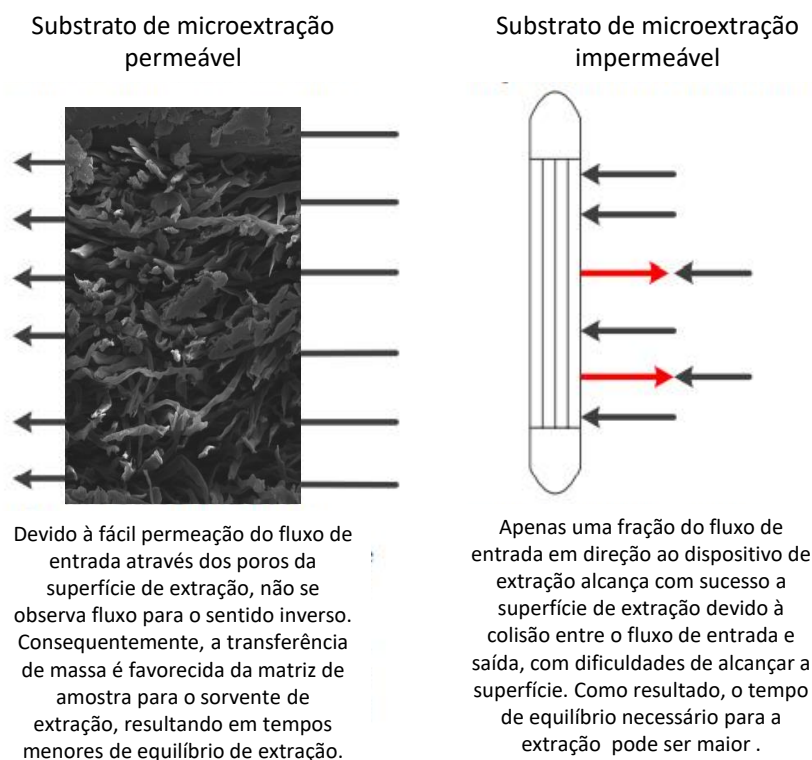


Fonte: Autor (2022).

Os resultados obtidos permitem observar que a mudança proposta com SAQQ não produziu alteração na morfologia do suporte utilizado mantendo a característica de permeabilidade do material. A presença de fibras numerosas no substrato contribuem para a interação desse com a fase extratora e proporcionam vantagens em relação a um suporte que não apresenta essa característica.

Nesse sentido, o uso de um substrato permeável em técnicas de microextração pode desempenhar um papel fundamental na taxa de transferência de massa da matriz para o sorvente. A Figura 23 traz uma demonstração de como um substrato permeável e impermeável pode afetar a extração. (KABIR *et al.*, 2017)

Figura 23 – Comparação entre o fluxo de líquido através de um substrato de microextração permeável e impermeável.



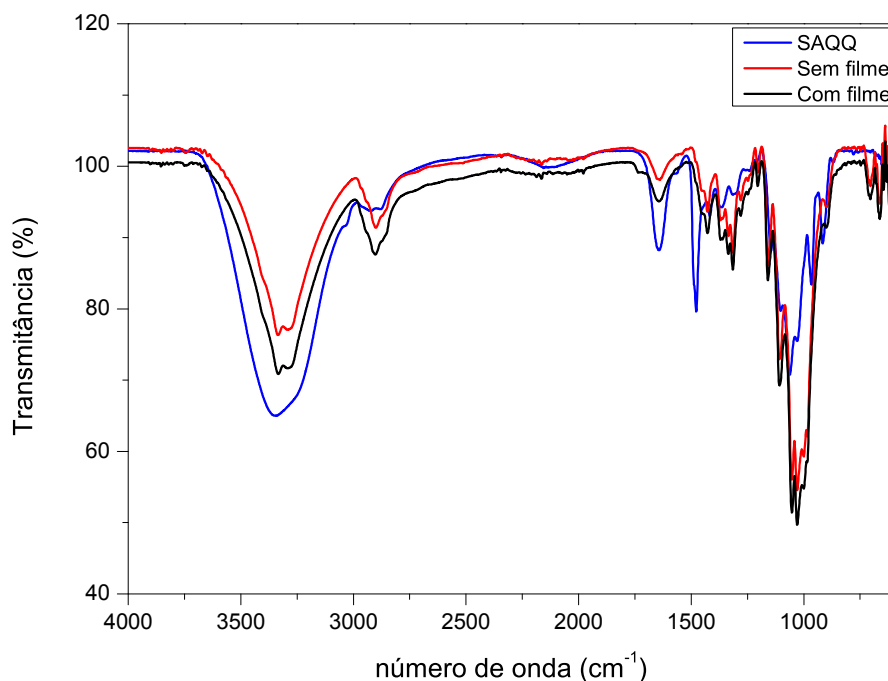
Fonte: Adaptado e traduzido de (KABIR *et al.*, 2017)

A demonstração representada na Figura 23 apresenta uma comparação entre o fluxo de amostra da matriz para o substrato contendo o sorvente, quando esse é permeável e impermeável. É possível observar que, no segundo caso, uma fração do fluxo colide com a superfície e assume o sentido inverso. Como consequência, apenas uma fração dos analitos interage com o sorvente. Ou seja, ocorre maior difusão no interior do substrato permeável, proporcionando tempos menores de equilíbrio de extração quando comparados a dispositivos sem essa característica. (ALCUDIA-LEÓN *et al.*, 2009; KABIR *et al.*, 2017)

5.2.3 Análise de infravermelho por transformada de Fourier

A Figura 24 é o espectro de IV obtido para comparação entre a haste flexível em branco, a haste flexível com o filme biopolimérico e apenas o biopolímero SAQQ.

Figura 24 – Espectro de IV para as hastes flexíveis sem o filme polimérico, com filme polimérico e polímero SAQQ



Fonte: Autor (2022).

Em azul, as bandas relativas ao SAQQ podem ser atribuídas aos estiramentos de O-H e N-H na região próxima a 3300 cm^{-1} dos grupos álcool e aminos característicos da quitosana. É possível observar uma banda mais fraca, correspondente ao estiramento das ligações C-H na região entre 2900 cm^{-1} e 2875 cm^{-1} presentes na estrutura. Bandas características do grupo amida, referente as ligações C-O podem ser vistas na região próxima a 1640 cm^{-1} e 1375 cm^{-1} (SAJOMSANG *et al.*, 2009; ABUEVA *et al.*, 2021). Próximo a 1580 cm^{-1} aparece a banda relativa à ligação N-H, do grupo amino, essa banda não é tão intensa pois refere-se à amina primária, que estava na quitosana e foi parcialmente substituída para dar origem ao SAQQ. Contudo, na região próxima a 1490 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} observa-se dois picos de absorção, confirmando a alteração estrutural da quitosana para SAQQ, pois este sinal é referente as ligações C-H do grupo metil, presentes no substituinte amônio quaternário e da ligação C=O da amida secundária, respectivamente. E em regiões próximas à 1150 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} e 1030 cm^{-1} podem ser relacionadas à ligações do tipo C-O-C e C-O (SAJOMSANG *et al.*, 2009; ABUEVA *et al.*, 2021).

As linhas em vermelho e preto apresentam perfil mais semelhante, pois se tratam da amostra de algodão e do algodão com filme polimérico, respectivamente. Na amostra de algodão, as características da celulose irão predominar no espectro, e no algodão com filme polimérico, essa tendência se mantém, porém com diferenças sutis, que podem estar relacionadas ao SAQQ (HOSPODAROVA *et al.*, 2018). Para essas amostras, observa-se picos na região de 3600 cm^{-1} e 2900 cm^{-1} , característicos dos

polissacarídeos, sendo próximo a 3300 cm^{-1} relativo as ligações O-H e próximo a 2900 cm^{-1} relativo a ligações C-H. Bandas típicas também relacionadas a celulose podem ser observadas, em regiões como 1430 cm^{-1} , 1370 cm^{-1} , 1335 cm^{-1} , 1025 cm^{-1} e 900 cm^{-1} são referentes aos grupos $-\text{CH}_2$ e $-\text{CH}$, $-\text{OH}$ e C-O (HOSPODAROVA *et al.*, 2018).

Foram observadas pequenas diferenças entre os espectros de IV da haste modificada para a não modificada, o que pode ser um indício da presença do filme polimérico: as sobreposição das bandas características do SAQQ foram sobrepostas as bandas da celulose.

5.3 OTIMIZAÇÕES DO PROCEDIMENTO DE EXTRAÇÃO

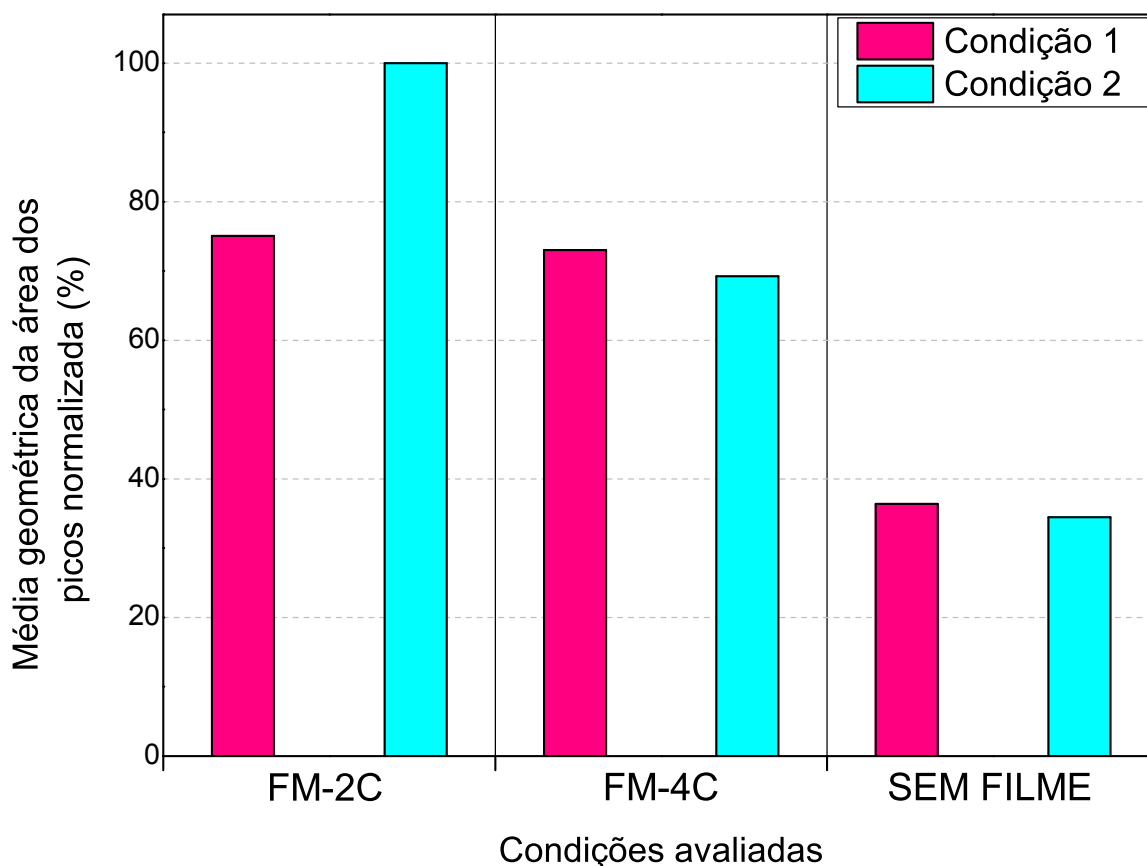
5.3.1 Avaliação preliminar do filme polimérico, condições de dessorção e diluição pré-injeção

Em uma primeira etapa, foram avaliados simultaneamente o número de camadas do filme polimérico e duas condições de dessorção. Em relação ao número de camadas, foram avaliadas as opções de quatro camadas de polímero com três de agente reticulante (FM-4C) e duas camadas de polímero com uma de agente reticulante (FM-2C) .

Para a dessorção dos analitos, avaliaram-se duas alternativas, identificadas como Condição 1 (solução de ácido clorídrico $0,1\text{ mol L}^{-1}$ com 20% de acetonitrila) e Condição 2 (solução de solução de ácido clorídrico $0,01\text{ mol L}^{-1}$) . Para avaliar a diluição dos analitos antes da injeção no sistema cromatográfico, foram feitos testes com água ultrapura e com amônia em concentração $0,05\text{ mol L}^{-1}$. A amônia utilizada na diluição melhorou o perfil dos sinais dos analitos no cromatograma quando comparado com a água. Por isso, foi utilizada como um dos componentes da diluição final.

A Figura 25 apresenta o gráfico de barras obtido para avaliação simultânea das camadas do filme polimérico e condição de dessorção.

Figura 25 – Gráfico de barras para avaliação simultânea do número de camadas de filme e solução de dessorção. Filmes poliméricos: FM-2C (filme multicamadas com 2 camadas de SAQQ); FM-4C (filme multicamadas com 4 camadas de SAQQ). Condição 1: 0,1 mol L⁻¹ de HCl e 20% ACN; Condição 2: 0,01 mol L⁻¹ de HCl.



Fonte: Autor (2022).

Primeiramente, o gráfico nos permite concluir que, dentre todas as condições avaliadas, as barras de menor intensidade são relativas aos resultados da utilização das hastes sem modificação. Já as hastes flexíveis modificadas, com ambas as alternativas propostas para o filme polimérico, apresentaram barras de maior intensidade. Verifica-se, portanto, que a modificação melhorou a eficiência da extração e possivelmente é um indício da presença do SAQQ na haste.

A partir dos resultados expostos no gráfico, buscou-se por uma condição compromisso, na qual se obtivesse a melhor resposta para os analitos. Essa condição pode ser considerada como duas camadas de biopolímero e uma de agente reticulante (FM-2C) e condição 2 de dessorção (ácido clorídrico 0,01 mol L⁻¹).

Porém, o filme formado com apenas 2 camadas de polímero provavelmente apresentaria menor estabilidade, quando comparado a um filme com 4 camadas de polímero, e essa é uma característica importante ao se considerar a possibilidade de reutilização do mesmo filme. A resposta obtida com quatro camadas de SAQQ, dessorção em solução de ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ com 20% de acetonitrila foi

ligeiramente menos eficiente, porém ainda assim, apresentou melhora considerável em relação ao suporte sem modificação. Por essa razão, foi escolhido o FM-4C na condição 1 de dessorção.

Os demais experimentos foram conduzidos a partir das condições previamente definidas e discutidas nesse tópico, sendo portanto, o filme composto por 4 camadas de SAQQ e 3 camadas de GLU, dessorção em solução ácido clorídrico 0,1 mol L⁻¹ com 20% de acetonitrila.

5.3.2 Efeito de secagem

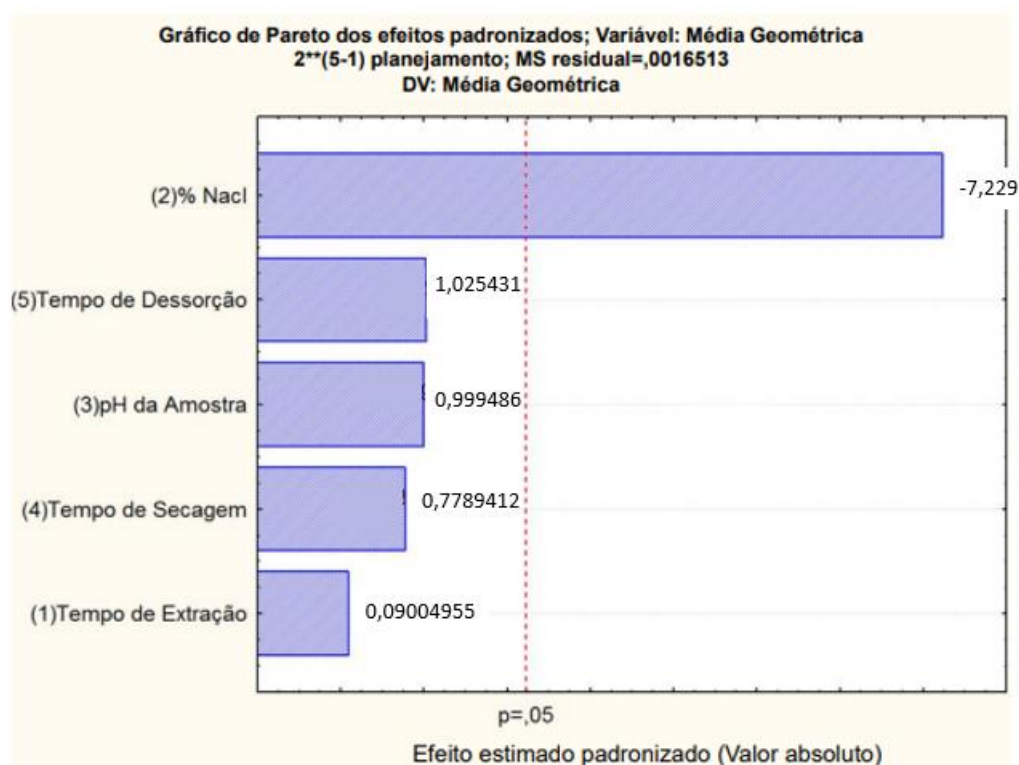
O algodão/celulose apresenta notável hidrofiliabilidade. Por essa razão, estudou-se a possibilidade de inclusão de uma etapa de secagem da haste flexível entre a extração e a dessorção, cujo objetivo foi verificar se na dessorção, os analitos estavam de fato sendo dessorvidos para a solução a ser injetada, ou se o algodão da haste flexível, por estar umedecido com as soluções dos padrões, acabava apenas transferindo este excesso de solução contendo os analitos para a solução de dessorção.

O efeito de secagem foi avaliado no próprio dispositivo *96 well plate*, no qual as hastes flexíveis permaneceram fixadas no pente após a extração, sob agitação em um poço vazio por 20 min. Ao final deste tempo, percebeu-se a presença de solução no poço, e concluiu-se que o excesso de solução de extração presente na haste havia sido retirado. Essa etapa de secagem foi incluída no planejamento fatorial fracionário, para interpretação do seu resultado através do gráfico de Pareto, discutida a seguir.

5.3.3 Adição de sal, tempo de extração, pH da extração, tempo de secagem e tempo de dessorção

Essa otimização foi realizada pelo planejamento fatorial fracionário, através de 16 experimentos, (Tabela 5). Os resultados obtidos podem ser observados na Figura 26, através de um gráfico de Pareto. Esse modelo de gráfico nos permite identificar, a partir de um conjunto de variáveis, quais são significativas no contexto avaliado, sendo as barras que ultrapassam a linha vertical vermelha os fatores estatisticamente significativos (GHANI *et al.*, 2018).

Figura 26 – Gráfico de Pareto gerado pelos experimentos de planejamento fatorial fracionário relacionados na Tabela 5, seção Metodologia.

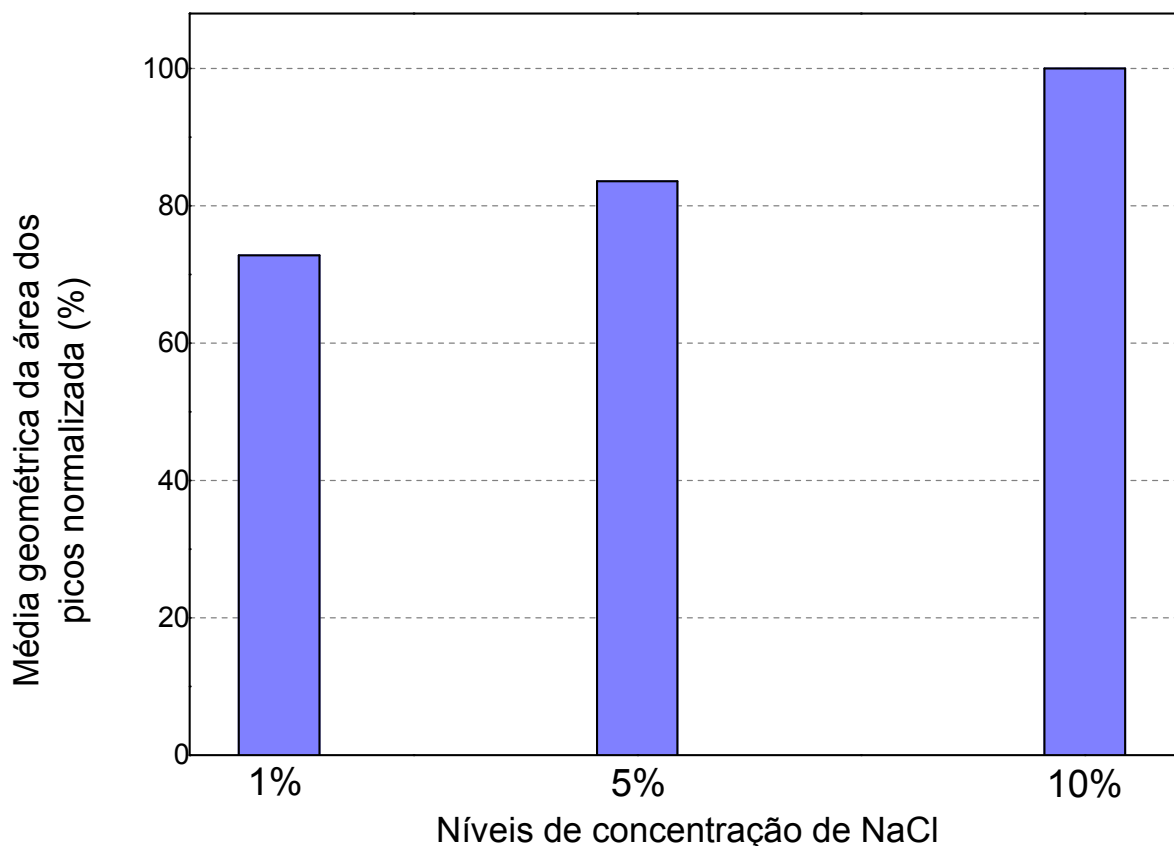


Fonte: Autor (2022).

Através do gráfico apresentado é possível concluir que, apenas uma das variáveis testadas é significativa, pois verifica-se apenas uma barra ultrapassando a linha tracejada vertical. Essa barra representa os resultados gerados pela avaliação da porcentagem de NaCl adicionado à solução durante a extração. O valor negativo expresso próximo a barra indica que valores menores, em relação ao intervalo testado (0 e 20%), seriam mais adequados.

Dessa forma, foram feitas novas extrações mantendo-se os demais parâmetros fixados, e variando-se a quantidade de NaCl. Foram testados níveis de NaCl em concentrações de 1%, 5% e 10%. Os resultados gerados são expressos Figura 27 em um gráfico de barras. Os três níveis foram avaliados em duplicata e os valores utilizados para confecção do gráfico são referentes a média geométrica das áreas dos sinais.

Figura 27 – Gráfico de barras para avaliação da resposta dos analitos em relação à quantidade de NaCl em 3 níveis de concentração: 1%, 5% e 10%.



Fonte: Autor (2022).

A partir do gráfico, é possível concluir que as melhores respostas foram geradas com 10% de NaCl. Portanto, essa foi a condição escolhida.

A contribuição da adição de sal pode ser justificada pelo efeito *salting out*, que reduz a solubilidade dos analitos na solução e facilita a extração por esse motivo. Esse fenômeno ocorre em casos em que os analitos presentes em soluções aquosas são hidrofílicos, então, ao adicionarmos um sal, o mesmo irá se dissociar e existirá uma forma de "competição" em relação a afinidade com as moléculas de água, entre o sal e os analitos. Devido as interações eletrostáticas serem fortes, os íons gerados pela dissociação do sal e a água apresentarão maior interação, dessa forma, os analitos ficariam mais suscetíveis a migrar da água para a fase extratora, facilitando assim a extração dos mesmos (WANG, M. *et al.*, 2021; OTOUKESH *et al.*, 2019).

Neste trabalho, utilizou-se como suporte para a fase extratora fibras de celulose, através de uma porção de algodão, disposta na ponta de uma haste flexível. Sobre o algodão, foi formado um filme polimérico, identificado como FM-4C (4 camadas de SAQQ intercaladas com 3 camadas de GLU).

A dessorção em solução de ácido clorídrico $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ com 20%ACN. O pH da amostra para extração foi mantido por volta de 5, e a extração durou 30 min. A

secagem durou 20 min e a dessorção também. Ao todo, o procedimento levou 70 min.

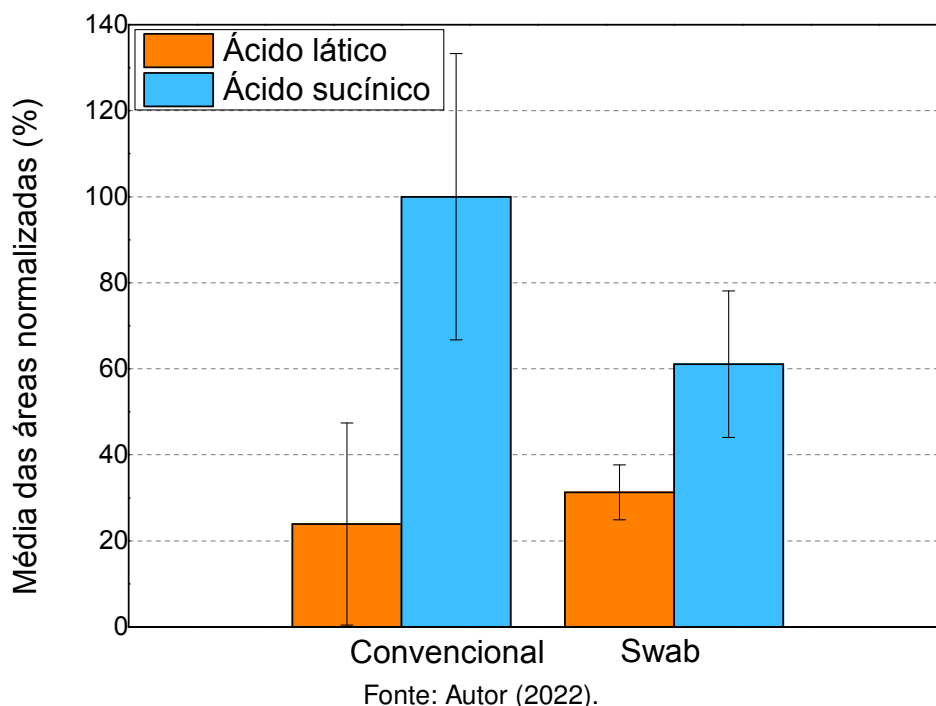
Considerando que o presente trabalho busca propor um método com alta frequência analítica, utilizou-se o dispositivo *96 well plate*, e dessa forma, considerando situações em que for necessário o uso de sua máxima capacidade, tem-se uma razão entre o número de amostras por minuto igual à 1,37 amostra/min.

Pelo gráfico de Pareto, o pH da extração não foi sinalizado como uma variável significativa, porém sugere-se que o valor seja maior em relação ao intervalo estudado, que foi entre 4,5 e 5,5. Devido ao fato dos analitos serem ácidos, essa faixa de pH para a extração contempla todos os valores de pKa dos ácidos estudados, indicando que, o pH é maior do que o pKa, e por isso, esses ácidos estão ionizados. Nessa situação, os ácidos estão ionizados, e assumem carga negativa. Essa condição é fundamental para que ocorra a interação eletrostática entre os analitos, carregados negativamente, e a fase extratora, formada pelo filme polimérico de SAQQ, carregado positivamente. Na etapa de dessorção, a solução está ácida, com pH de 1 e 20% de ACN em sua composição. Nessa condição, os analitos estarão neutros, visto que nessa etapa os valores de pKa são maiores do que o valor de pH da solução.

5.4 AVALIAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE HASTES FLEXÍVEIS CONVENCIONAIS E TESTES DE REUTILIZAÇÃO

Os dados obtidos para a comparação entre a utilização das hastes flexíveis convencionais e *swab* estão apresentados na Figura 28, na qual são apresentados os dados normalizados da média obtida para as áreas dos dois analitos. Pode-se perceber que o desempenho das hastes convencionais e *swab* são semelhantes, e que possivelmente a substituição das hastes *swab* pelas hastes convencionais pode ser uma alternativa para tornar o método ainda mais acessível, porém mais estudos precisam se feitos para este fim.

Figura 28 – Gráfico de barras para comparativo da utilização das hastes flexíveis convencionais e *swab* com filme polimérico.



A partir do gráfico, observa-se que há uma diferença maior entre os dados gerados pelas hastes flexíveis convencionais do que pelas hastes flexíveis *swab*. Essa diferença também pode ser percebida em relação aos valores de RSD obtidos para os analitos sendo 33% para o ácido succínico e de 23% para o ácido láctico quando extraídos com hastes flexíveis convencionais, e 17% para o ácido succínico e 6% para o ácido láctico quando extraídos com hastes flexíveis *swab*.

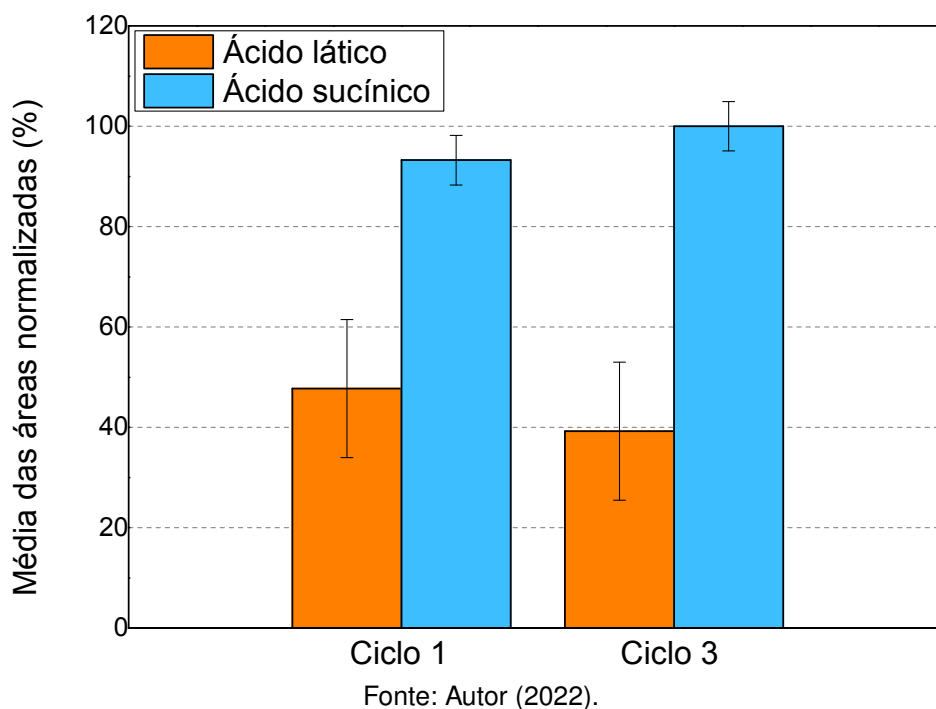
Uma das possíveis justificativas para os resultados citados pode estar relacionada a quantidade de algodão fixado na ponta das hastes. Durante o processo de produção das hastes flexíveis convencionais, que utilizamos no nosso dia-a-dia, é possível que a quantidade de algodão em cada haste não seja controlada de forma muito rígida, em relação à uniformidade, quando comparado as hastes do tipo *swab*, utilizadas em estudos clínicos e pesquisas, inclusive para o desenvolvimento do presente trabalho.

Portanto, o uso de hastes flexíveis convencionais pode ser uma opção para simplificação e redução de custos para o preparo do material sorvente, porém, estudos deveriam ser feitos com diferentes marcas, a fim de verificar a reprodutibilidade em relação a quantidade de algodão presente em cada haste, e que fosse utilizada aquela com maior uniformidade entres as unidades.

A reutilização das hastes flexíveis *swab* com filme polimérico FM-4C foi considerando os valores de áreas geradas para os dois analitos estudados quando a mesma haste flexível foi utilizada uma única vez e três vezes consecutivas, sendo identificadas

respectivamente como Ciclo 1 e Ciclo 3. Os resultados obtidos para essa avaliação estão apresentados na Figura 29.

Figura 29 – Gráfico de barras para comparativo da reutilização das hastes flexíveis *swab* com filme polimérico.



Primeiramente, é possível perceber que cada um dos analitos responde de uma maneira diferente para a reutilização do dispositivo. Para o ácido succínico, conforme aumentam-se o número de ciclos utilizando a mesma haste, aumenta a resposta gerada.

Já para o ácido láctico, percebe-se um decréscimo nos valores obtidos, conforme aumentam-se os ciclos de reutilização, sugerindo uma possível perda da eficiência do dispositivo. Entretanto, estudos mais robustos são necessários para conclusões mais assertivas sobre a reutilização.

De forma geral, para as metodologias com FPSE, alguns autores sugerem que a reutilização do dispositivo é possível, desde que seguidos procedimentos específicos de condicionamento e secagem (CELEIRO *et al.*, 2020a). Já outros, devido a simplicidade de confecção do dispositivo entendem que seu uso por uma única vez é viável. (PÉREZ-MAYÁN *et al.*, 2019)

Nessa avaliação também foi utilizado o teste de T de Student, com o objetivo de avaliar estatisticamente os valores obtidos para cada analito. Foi utilizado o teste t de Student, para valores homogêneos nas seguintes condições: tTabelado (2; 0,05) bicaudal. Assumiu-se as hipóteses H_0 = não há diferença significativa entre as variáveis e H_1 = há diferença significativa entre as variáveis. Segundo os dados obtidos na Tabela 6, tTab apresenta valores menores do que TCalc, e por isso assume-se que

não houve diferença significativa para ambos os analitos, entre os resultados obtidos para a reutilização da haste entre o Ciclo 1 e Ciclo 3.

Tabela 6 – Resultados do teste t de Student para comparação das áreas obtidas para os analitos para avaliação da reutilização da haste flexível com filme polimérico por 3 ciclos de extração.

| Analito | tTab | tCalc |
|------------------------|-------------|--------------|
| Ácido succínico | -0,93 | 4,30 |
| Ácido Láctico | 1,92 | 4,30 |

Fonte: Autor 2022.

É possível concluir que, ao menos por 3 ciclos, o mesmo filme polimérico pode ser utilizado.

5.5 AVALIAÇÃO DO EFEITO DE MATRIZ E PARÂMETROS DE MÉRITO DA METODOLOGIA PROPOSTA

A partir das condições previamente fixadas, foram construídas duas curvas de calibração, externa e por adição de padrão, com o objetivo de comparar os coeficientes angulares gerados em cada uma delas e avaliar o efeito de matriz. Para avaliar se as médias dos coeficientes angulares obtidos eram significativamente distintas foi utilizado o teste t de Student, para valores homogêneos nas seguintes condições: tTabelado (2; 0,05) bicaudal. Assumiu-se as hipóteses H_0 = não há diferença significativa entre as variáveis e H_1 = há diferença significativa entre as variáveis. Os resultados estão na tabela Tabela 7

Tabela 7 – Resultados do teste t de Student para comparação das inclinações das curvas com padronização por adição de padrão e por calibração externa para os dois analitos.

| Analito | tCalc | tTab | Inclinação curva externa | Inclinação curva por adição de padrão |
|------------------------|--------------|-------------|---------------------------------|--|
| Ácido succínico | 3,33 | 4,30 | 1385000,0 | 1195000,0 |
| Ácido Láctico | 0,41 | 4,30 | 264760,0 | 295331,5 |

Fonte: Autor 2022.

Os resultados do teste t indicaram que não houve efeito de matriz para ambos os analitos, pois os valores de tCalculado são menores do que os valores de tTabelado. Portanto, a quantificação destes analitos em amostras diversas pode ser realizada

utilizando uma única curva de calibração externa, assim como os parâmetros de mérito, que são apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 – Parâmetros analíticos de mérito para o método proposto.

| Parâmetro | Ácido succínico | Ácido Lático |
|---|----------------------------|-------------------------|
| Faixa linear de trabalho (mg L ⁻¹) | 5 - 25 | 5 - 25 |
| Equação da reta | $y = 1,43E+06x - 3,00E+06$ | $y = 2,32E+05x + 4E+06$ |
| Coefficiente de determinação (R ²) | 0,9696 | 0,9749 |
| Limite de detecção (LOD) (mg L ⁻¹) | 0,11 | 0,99 |
| Limite de quantificação (LOQ) (mg L ⁻¹) | 0,38 | 3,27 |

Fonte: Autor (2022).

Os valores obtidos para coeficiente de determinação devem estar próximos a 1. Os coeficientes obtidos para o método estão relativamente próximos. A faixa de trabalho avaliada compreendeu valores entre 5 mg L⁻¹ e 25 mg L⁻¹ e assim como LOD e LOQ obtidos, foram considerados adequados visto que os analitos estão em quantidades consideráveis nas amostras estudadas.

A recuperação relativa foi avaliada em três níveis de fortificação. Os ensaios foram realizados em duplicata e os resultados estão na Tabela 9.

Tabela 9 – Resultados da recuperação relativa e respectivos desvios para o método proposto.

| Analito | Concentração adicionada (mg L ⁻¹) | Concentração determinada (mg L ⁻¹) | Recuperação relativa (%) |
|-----------------|---|--|--------------------------|
| Ácido succínico | 5 | 3,01 ± 0,08 | 59 |
| | 15 | 15,42 ± 0,25 | 102 |
| | 25 | 25,72 ± 0,66 | 102 |
| Ácido Lático | 5 | 5,32 ± 0,48 | 104 |
| | 15 | 17,29 ± 1,70 | 114 |
| | 25 | 27,64 ± 3,11 | 110 |

Fonte: Autor (2022).

Para analitos presentes em níveis de mg L⁻¹ os valores obtidos para recuperação são considerados adequados pela AOAC se estiverem entre 80% e 110% (AOAC INTERNATIONAL, 2016). Os valores obtidos para o succínico e para o lático, em sua maioria, estão contemplados no intervalo mencionado. O resultado do primeiro nível de fortificação obtido para o ácido succínico apresentou valor fora do intervalo aceitável,

e uma das razões pode estar relacionada ao efeito de matriz, devido a complexidade da amostra em níveis mais baixos de concentração adicionada.

A precisão do método foi avaliada a partir do RSD obtido, também em três níveis de concentração dos analitos. Foram realizadas uma duplicata autêntica e duplicata de injeção em cada um dos níveis. Os resultados estão na Tabela 10.

Tabela 10 – Resultados da precisão para o método proposto.

| Analito | Concentração adicionada (mg L⁻¹) | RSD (%) |
|------------------------|--|----------------|
| Ácido succínico | 5 | 14 |
| | 15 | 10 |
| | 25 | 14 |
| Ácido Láctico | 5 | 46 |
| | 15 | 26 |
| | 25 | 20 |

Fonte: Autor (2022).

Para os analitos presentes em níveis de mg L⁻¹ os valores considerados adequados de RSD são até 11% (AOAC INTERNATIONAL, 2016). Os valores obtidos para os analitos deste trabalho, no geral, ficaram ligeiramente superiores ao limite. Possivelmente, o número de etapas e a complexidade do método pode ter contribuído para esse resultado. Novos estudos visando a automatização do processo de extração ou melhor controle das etapas envolvidas pode melhorar esse resultado.

5.6 APLICAÇÃO DA METODOLOGIA PROPOSTA EM AMOSTRA DE VINHO

Para análise das amostras, utilizou-se a curva de calibração externa pois não foi verificado o efeito de matriz. Os resultados estão na Tabela 11.

Tabela 11 – Resultados da aplicação do método em amostras de vinho tinto e branco.

| Analito | Amostra de vinho branco (g L⁻¹) | Amostra de vinho tinto (g L⁻¹) |
|------------------------|---|--|
| Ácido succínico | 3,52 ± 0,30 | 3,73 ± 0,33 |
| Ácido Láctico | 23,17 ± 0,80 | 14,44 ± 1,78 |

Fonte: Autor (2022).

De forma geral, a presença de ácido succínico em vinhos confere um sabor amargo/salgado. Em relação aos valores encontrados, normalmente são menores em

relação aos outros ácidos presentes no vinho. Isso por que trata-se de um subproduto das reações envolvidas na fermentação. (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2020).

Em relação ao ácido láctico, os valores relativamente maiores obtidos nas amostras podem ser indicativos da fermentação malolática, processo no qual há uma diminuição na quantidade de ácido málico e aumenta a quantidade de ácido láctico. (IVANOVA-PETROPULOS *et al.*, 2020; COELHO *et al.*, 2018)

5.7 COMPARAÇÃO DO MÉTODO PROPOSTO COM MÉTODOS DA LITERATURA

A metodologia proposta nesse trabalho contempla determinação de analitos em amostras complexas, preparo de amostra baseado nos conceitos de microextração e explorando materiais de fácil aquisição e bem como de origem natural, utilização de dispositivo de alta frequência analítica e instrumentação com alta sensibilidade.

Conforme discutido anteriormente, a etapa de preparo de amostra é essencial para a preservação instrumental, pois proporciona o *clean up* de amostras complexas. Preparos pouco elaborados, como diluição e filtração, nesses casos podem prejudicar o instrumento.

Outras metodologias de preparo de amostra reportadas na literatura também discutem a utilização da TF-SPME em conjunto com dispositivos de alta frequência, como o *96 well plate* para diferentes aplicações, porém ainda assim são alternativas demoradas, chegando até 160 min. Para esse trabalho, o tempo total foi 70 min. totalizando menos de 1 minuto por amostra. (MIRNAGHI *et al.*, 2011)

Em relação aos componentes da fase extratora e do substrato, observa-se que algumas metodologias ainda não exploram alternativas com materiais sustentáveis em seus métodos, tanto em abordagens com TF-SPME como FPSE, muitos estudos ainda utilizam polímeros sintéticos como recobrimento. E, para formação desse, frequentemente são adotados procedimentos com várias etapas e consumo de diversos reagentes, como a reação sol-gel, por exemplo, que envolve hidrólise de um precursor, uso de catalisador, etc. A quitosana, apesar de já ter sido explorada em métodos de microextração, foi utilizada também em metodologias do tipo sol-gel. Por muitas vezes essas questões dificultam a implementação do método por questões de custo, dificuldade de aquisição de reagentes e materiais, além de estarem pouco alinhados com práticas ambientalmente amigáveis (WERNER *et al.*, 2022; MESA *et al.*, 2019; OTOUKESH *et al.*, 2019).

A interação entre derivados da quitosana e fibras de celulose também já foi explorada em outros estudos, porém com o objetivo de verificar sua atividade antibacteriana em superfícies têxteis, explorando essas e outras de suas vantagens, como a reticulação e modificação de suas propriedades (ZHANG *et al.*, 2017).

Já no âmbito de preparo de amostra, matrizes complexas, tal qual o vinho, já foram estudadas em trabalhos com FPSE. Um estudo reportou a determinação

de fungicidas e inseticidas em vinhos branco e tinto, porém, cabe ressaltar o grande volume de amostra utilizada para a extração (10 mL de vinho e 10 mL de água ultrapura) e a necessidade de utilização de acessórios como filtro de seringa antes da injeção na instrumentação. (PÉREZ-MAYÁN *et al.*, 2019) Nesse trabalho, o volume de amostra foi muito inferior, e o volume total da solução de extração foi de 1 mL.

A quitosana e derivados como o SAQQ são materiais de origem natural, cujas vantagens foram exploradas em diferentes metodologias, demonstrando seu potencial e versatilidade. Foram desenvolvidos métodos para cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC) e eletroforese capilar, do inglês *Capillary zone electrophoresis* (CZE) por exemplo (VITALI *et al.*, 2014; CARDOSO; VITALI, 2021; SILVA *et al.*, 2020)

Na literatura, foram encontrados diversos trabalhos baseados nos princípios de FPSE, alguns deles estão indicados na Tabela 1 e como já discutido, percebeu-se que são utilizados apenas materiais de origem sintética para compor o filme de fase extratora, demonstrando que alternativas naturais ainda são pouco exploradas nesse tipo de metodologia. Em relação ao substrato utilizado, os trabalhos relatam que as fibras de celulose foram provenientes da indústria têxtil e são todas confeccionadas de forma manual e individual, o que torna o processo trabalhoso. Por isso, como alternativa, foram utilizadas hastes flexíveis do tipo *swab* no qual a porção de algodão serviu como fonte de celulose para o substrato. Esse material é de fácil aquisição e permitiu sua fixação a dispositivos de alta frequência analítica, como o *96 well plate*. Também é possível concluir que é possível aplicar os conceitos de técnicas como FPSE para análises das mais diversas matrizes, como uma alternativa eficiente inclusive para determinação de analitos em baixas quantidades em amostras complexas. Por essa razão, nesse trabalho, foi explorada sua eficiência para o processo de *clean up* em amostras complexas.

Portanto, no presente trabalho foram necessários apenas três reagentes para recobrimento do substrato utilizado (solução 0,1% de SAQQ em HCl 0,01 mol L⁻¹ e GLU 2,5% em água ultrapura), sendo que cada haste necessitou de 1 mL, ao todo, para produção do filme. O SAQQ já sintetizado, assim como o GLU foram utilizados em trabalhos anteriores, para outras aplicações. Reforçando sua versatilidade, esse estudo propôs a utilização do SAQQ como fase extratora para TF-SPME para limpeza de amostra complexa e superação do efeito de matriz na determinação de ácidos orgânicos em vinho e separação e detecção por LC-MS/MS.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSÕES

No presente trabalho foi proposta uma metodologia de preparo de amostra por microextração em filme fino a base de quitosana quaternizada suportada em fibras de algodão de hastes flexíveis fixadas no 96 well plate para determinação de ácidos orgânicos alifáticos em amostras de vinho por LC-MS/MS.

Após preparado o sistema de microextração, foram realizadas algumas análises para verificar a composição química e características morfológicas da porção de algodão contendo o filme a fim de confirmar a modificação proposta.

Os parâmetros da técnica de microextração, como solução de extração, solução de dessorção, tempo de extração, adição de sal, entre outros, foram otimizados com auxílio de ferramentas estatísticas.

O método de separação utilizado foi adaptado de outro estudo, já descrito na literatura para os ácidos orgânicos alvo por LC-MS/MS.

A separação cromatográfica foi realizada em coluna HILIC, que são eficientes para separação de compostos polares e ionizáveis. Combinam características das diferentes abordagens utilizadas em cromatografia líquida, além de agregar sensibilidade ao método, inclusive quando utilizada para amostras complexas. Por essas razões, e também pela possibilidade de uso com diferentes detectores, seu uso tem crescido e ganhado destaque ao longo dos anos.

O efeito de matriz foi avaliado na determinação dos ácidos orgânicos em vinho, e usando o método de preparo de amostras otimizado, o efeito de matriz não foi verificado quando avaliados estatisticamente os coeficientes angulares das curvas de calibração externa e por adição de padrão.

Então, foram avaliados os parâmetros de mérito da metodologia proposta incluindo limite de quantificação, limite de detecção, faixa linear, coeficiente de correlação, recuperação e precisão do método proposto. O método proposto foi aplicado em amostras de bebidas alcoólicas fermentadas, como o vinho.

6.2 PERSPECTIVAS

- Avaliar diferentes concentrações de biopolímero e agente reticulante durante o processo de produção do filme multicamadas a fim de diminuir o tempo demandado nessa etapa.

- Avaliar de forma mais rigorosa a possibilidade de reutilização do dispositivo e substituição das hastes flexíveis swab pelas hastes flexíveis comerciais, a fim de tornar o método mais acessível.

- Verificar os valores obtidos para os parâmetros de mérito da metodologia e

refazer os ensaios necessários.

- Aplicar o método em outras amostras com matrizes complexas.

REFERÊNCIAS

ABUEVA, Celine; RYU, Hyun Seok; MIN, Jun Won; CHUNG, Phil Sang; YOU, Hyeon Sook; YANG, Myung Suk; WOO, Seung Hoon. Quaternary ammonium N,N,N-trimethyl chitosan derivative and povidone-iodine complex as a potent antiseptic with enhanced wound healing property. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier B.V., v. 182, p. 1713–1723, 2021. ISSN 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2021.05.153. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.05.153>.

AGAPELLIS, Efstratios; TARTAGLIA, Angela; LOCATELLI, Marcello; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; SAMANIDOU, Victoria. Mixed-mode fabric phase sorptive extraction of multiple tetracycline residues from milk samples prior to high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis. **Microchemical Journal**, Elsevier, v. 159, August, p. 105437, 2020. ISSN 0026265X. DOI: 10.1016/j.microc.2020.105437. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.105437>.

ALAMPANOS, V.; KABIR, A.; FURTON, K. G.; SAMANIDOU, V. Rapid exposure monitoring of six bisphenols and diethylstilbestrol in human urine using fabric phase sorptive extraction followed by high performance liquid chromatography – photodiode array analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Elsevier B.V., v. 1177, February, p. 122760, 2021. ISSN 1873376X. DOI: 10.1016/j.jchromb.2021.122760. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jchromb.2021.122760>.

ALCUDIA-LEÓN, M. C.; LUCENA, R.; CÁRDENAS, S.; VALCÁRCEL, M. Stir membrane extraction: A useful approach for liquid sample pretreatment. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 21, p. 8957–8961, 2009. ISSN 00032700. DOI: 10.1021/ac9016192.

AOAC INTERNATIONAL. Appendix F: Guidelines for Standard Method Performance Requirements. **AOAC International and Official Method of Analysis**, p. 1–18, 2016.

ARMENTA, Sergio; GARRIGUES, Salvador; ESTEVE-TURRILLAS, Francesc A.; GUARDIA, Miguel de la. Green extraction techniques in green analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier Ltd, v. 116, p. 248–253, 2019. ISSN 18793142. DOI: 10.1016/j.trac.2019.03.016. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2019.03.016>.

ARTHUR, Catherine L.; PAWLISZYN, Janusz. Solid Phase Microextraction with Thermal Desorption Using Fused Silica Optical Fibers. **Analytical Chemistry**, v. 62, n. 19, p. 2145–2148, 1990. ISSN 15206882. DOI: 10.1021/ac00218a019.

BAKSHI, Prasanna S.; SELVAKUMAR, D.; KADIRVELU, K.; KUMAR, N. S. Chitosan as an environment friendly biomaterial – a review on recent modifications and applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier B.V.,

v. 150, p. 1072–1083, 2020. ISSN 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.113>.

BELTRÃO, Napoleão Esberard de Macêdo; ARAÚJO, Alderi Emídio de. Algodão : o produtor pergunta, a Embrapa responde. **Embrapa Informação Tecnológica**, <https://news.ge/anakliis-porti-aris-qveynis-momava>, 2004. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac301861z>.

BERGER, J.; REIST, M.; MAYER, J. M.; FELT, O.; PEPPAS, N. A.; GURNY, R. Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 19–34, 2004. ISSN 09396411. DOI: 10.1016/S0939-6411(03)00161-9.

BOCELLI, Marcio David. Determination of parabens in wastewater samples via robot-assisted dynamic single-drop microextraction and liquid chromatography – tandem mass spectrometry. April, p. 1–11, 2022. DOI: 10.1002/elps.202100390.

BOYACI, Ezel; RODRÍGUEZ-LAFUENTE, Ángel; GORYNSKI, Krzysztof; MIRNAGHI, Fatemeh; SOUZA-SILVA, Érica A.; HEIN, Dietmar; PAWLISZYN, Janusz. **Sample preparation with solid phase microextraction and exhaustive extraction approaches: Comparison for challenging cases**. v. 873. [S.l.: s.n.], 2015. P. 14–30. DOI: 10.1016/j.aca.2014.12.051.

BRUHEIM, Inge; LIU, Xiaochuan; PAWLISZYN, Janusz. Thin-Film Microextraction. v. 75, n. 4, p. 1002–1010, 2003.

CARASEK, Eduardo; BERNARDI, Gabrieli; CARMO, N; VIEIRA, Camila M S. Alternative Green Extraction Phases Applied to Microextraction Techniques for Organic Compound Determination, 2019.

CARASEK, Eduardo; BERNARDI, Gabrieli; MORELLI, Diogo; MERIB, Josias. Sustainable green solvents for microextraction techniques: Recent developments and applications. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V., v. 1640, p. 461944, 2021. ISSN 18733778. DOI: 10.1016/j.chroma.2021.461944. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2021.461944>.

CARDOSO, Carolina dos Santos; VITALI, Luciano. Chitosan Versus Chitosan-Vanillin Modified: An Evaluation of the Competitive Adsorption of Five Emerging Contaminants. **Water Air Soil Pollut**, v. 232, p. 179–191, 2021.

CELEIRO, Maria; ACERBI, Ruben; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; LLOMPART, Maria. Development of an analytical methodology based on fabric phase sorptive extraction followed by gas chromatography-tandem mass spectrometry to determine UV filters in environmental and recreational waters. **Analytica Chimica Acta: X**, Elsevier Ltd, v. 4, p. 100038, 2020a. ISSN 25901346. DOI:

10.1016/j.acax.2019.100038. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.acax.2019.100038>.

CELEIRO, Maria; VAZQUEZ, Lua; NURERK, Piyaluk; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; DAGNAC, Thierry; LLOMPART, Maria. Fabric phase sorptive extraction for the determination of 17 multiclass fungicides in environmental water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. **Journal of Separation Science**, v. 43, n. 9-10, p. 1817–1829, 2020b. ISSN 16159314. DOI: 10.1002/jssc.201901232.

COELHO, Emanuela Monteiro; DA SILVA PADILHA, Carla Valéria; MISKINIS, Gabriela Aquino; SÁ, Antônio Gomes Barroso de; PEREIRA, Giuliano Elias; AZEVÊDO, Luciana Cavalcanti de; DOS SANTOS LIMA, Marcos. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, Elsevier, v. 66, May 2016, p. 160–167, 2018. ISSN 08891575. DOI: 10.1016/j.jfca.2017.12.017.

COSTA JR, E. S.; MANSUR, H. S. Preparação E Caracterização De Blendas De Quitosana / Poli (Álcool Vinílico) Reticulados Quimicamente Com Glutaraldeído Para. **Congresso Brasileiro de Polímeros**, p. 1–9, 2008. Disponível em:
<http://www.mdpi.com/2079-9284/3/2/18>.

CUDJOE, Erasmus; VUCKOVIC, Dajana; HEIN, Dietmar; PAWLISZYN, Janusz. Investigation of the effect of the extraction phase geometry on the performance of automated solid-phase microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 81, n. 11, p. 4226–4232, 2009. ISSN 00032700. DOI: 10.1021/ac802524w.

DEPARTAMENTO DE INSPEÇÃO DE PRODUTOS DE ORIGEM VEGETAL. Consolidação das Normas de Bebidas, Fermentado Acético, Vinho e Derivados da Uva e do Vinho, 2020.

DUGHERI, Stefano; MUCCI, Nicola; CAPPELLI, Giovanni; TREVISANI, Lucia; BONARI, Alessandro; BUCALETTI, Elisabetta; SQUILLACI, Donato; ARCANGELI, Giulio. Advanced Solid-Phase Microextraction Techniques and Related Automation: A Review of Commercially Available Technologies. **Journal of Analytical Methods in Chemistry**, v. 2022, 2022. ISSN 20908873. DOI: 10.1155/2022/8690569.

EMMONS, Ronald V.; TAJALI, Ramin; GIONFRIDDO, Emanuela. Development, optimization and applications of thin film solid phase microextraction (TF-SPME) devices for thermal desorption: A comprehensive review. **Separations**, v. 6, n. 3, 2019. ISSN 22978739. DOI: 10.3390/separations6030039.

ERKMEN, Cem; GEBREHIWOT, Weldejeworgis Hndeya; USLU, Bengi. Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC): Latest Applications in the Pharmaceutical Researches. **Current Pharmaceutical Analysis**, v. 17, n. 3, p. 316–345, 2020. ISSN 15734129. DOI: 10.2174/1573412916666200402101501.

ESMATI, Aida; OLIA, Arze; MOHADESI, Alireza; FEIZY, Javad. Ochratoxin Determination in Food Samples by Fabric Phase Sorptive Extraction Coupled with High-Performance Liquid Chromatography Technique. **Research Square**, p. 1–17, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-1478781/v1>.

FILIPPOU, Olga; BITAS, Dimitrios; SAMANIDOU, Victoria. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. **Journal of Chromatography B: Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, Elsevier B.V., v. 1043, p. 44–62, 2017. ISSN 1873376X. DOI: 10.1016/j.jchromb.2016.08.040. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jchromb.2016.08.040>.

FREITAS, Emanuelle Dantas; MOURA, Celso Fidelis; KERWALD, Jonas; BEPPU, Marisa Masumi. An overview of current knowledge on the properties, synthesis and applications of quaternary chitosan derivatives. **Polymers**, v. 12, n. 12, p. 1–41, 2020. ISSN 20734360. DOI: 10.3390/polym12122878.

FU, Yanwei; ZHANG, Jing; QIN, Jiaan; DOU, Xiaowen; LUO, Jiaoyang; YANG, Meihua. Representative matrices for use in matrix-matched calibration in gas chromatography-mass spectrometry for the analysis of pesticide residues in different types of food-medicine plants. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 111, January, p. 104617, 2022. ISSN 08891575. DOI: 10.1016/j.jfca.2022.104617.

GHANI, Milad; GHOREISHI, Sayed Mehdi; AZAMATI, Mostafa. Magnesium-aluminum-layered double hydroxide-graphene oxide composite mixed-matrix membrane for the thin-film microextraction of diclofenac in biological fluids. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V., v. 1575, p. 11–17, 2018. ISSN 18733778. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.09.024. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.09.024>.

GRANDY, Jonathan J.; BOYACI, Ezel; PAWLISZYN, Janusz. Development of a Carbon Mesh Supported Thin Film Microextraction Membrane As a Means to Lower the Detection Limits of Benchtop and Portable GC/MS Instrumentation. **Analytical Chemistry**, v. 88, n. 3, p. 1760–1767, 2016. ISSN 15206882. DOI: 10.1021/acs.analchem.5b04008.

HEFNI, Mohammed E.; BERGSTRÖM, Maria; LENNQVIST, Torbjörn; FAGERSTRÖM, Cecilia; WITTHÖFT, Cornelia M. Simultaneous quantification of trimethylamine N-oxide, trimethylamine, choline, betaine, creatinine, and propionyl-, acetyl-, and l-carnitine in clinical and food samples using HILIC-LC-MS. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Analytical e Bioanalytical Chemistry, v. 413, n. 21, p. 5349–5360, 2021. ISSN 16182650. DOI: 10.1007/s00216-021-03509-y.

HODGES, Geoff *et al.* A comparison of log K_{ow} (n-octanol–water partition coefficient) values for non-ionic, anionic, cationic and amphoteric surfactants determined using predictions and experimental methods. **Environmental Sciences Europe**, Springer Berlin Heidelberg, v. 31, n. 1, p. 1–18, 2019. ISSN 21904715. DOI:

10.1186/s12302-018-0176-7. Disponível em:
<https://doi.org/10.1186/s12302-018-0176-7>.

HOSPODAROVA, Viola; SINGOVSKA, Eva; STEVULOVA, Nadezda. Characterization of Cellulosic Fibers by FTIR Spectroscopy for Their Further Implementation to Building Materials. **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 09, n. 06, p. 303–310, 2018. ISSN 2156-8251. DOI: 10.4236/ajac.2018.96023.

HUTCHINSON, Joseph P.; SETKOVA, Lucie; PAWLISZYN, Janusz. Automation of solid-phase microextraction on a 96-well plate format. **Journal of Chromatography A**, v. 1149, n. 2, p. 127–137, 2007. ISSN 00219673. DOI: 10.1016/j.chroma.2007.02.117.

ILYAS, R.A.; SAPUAN, S.M. Biopolymers and Biocomposites: Chemistry and Technology. **Current Analytical Chemistry**, v. 16, n. 5, p. 500–503, 2020. ISSN 15734110. DOI: 10.2174/157341101605200603095311.

IVANOVA-PETROPULOS, Violeta; PETRUŠEVA, Dragana; MITREV, Sasa. Rapid and Simple Method for Determination of Target Organic Acids in Wine Using HPLC-DAD Analysis. **Food Analytical Methods**, v. 13, n. 5, p. 1078–1087, 2020. ISSN 1936976X. DOI: 10.1007/s12161-020-01724-4.

JALILI, Vahid; BARKHORDARI, Abdullah; GHIASVAND, Alireza. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. **Microchemical Journal**, Elsevier, v. 152, October 2019, p. 104319, 2020. ISSN 0026265X. DOI: 10.1016/j.microc.2019.104319. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2019.104319>.

JIANG, Ruifen; PAWLISZYN, Janusz. Thin-film microextraction offers another geometry for solid-phase microextraction. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier Ltd, v. 39, p. 245–253, 2012. ISSN 01659936. DOI: 10.1016/j.trac.2012.07.005. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2012.07.005>.

KABIR, Abuzar; FURTON, G. **FABRIC PHASE SORPTIVE EXTRACTORS (FPSE)**. v. 1. [S.l.: s.n.], 2014.

KABIR, Abuzar; MESA, Rodolfo; JURMAIN, Jessica; FURTON, Kenneth G. Fabric phase sorptive extraction explained. **Separations**, v. 4, n. 2, 2017. ISSN 22978739. DOI: 10.3390/separations4020021.

KAUR, Ramandeep; KAUR, Ripneel; RAN, Susheela; MALIK, Ashok Kumar; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; SAMANIDOU, Victoria F. Rapid Monitoring of Organochlorine Pesticide Residues in Various Fruit Juices and Water Samples Using Fabric Phase Sorptive Extraction and Gas Chromatography-Mass Spectrometry.

Molecules, v. 24, p. 1013–1026, 2019. Disponível em:

<http://dx.doi.org/10.3390/molecules24061013>.

KAZANTZI, Viktoria; ANTHEMIDIS, Aristidis. Fabric sol–gel phase sorptive extraction technique: A review. **Separations**, v. 4, n. 2, 2017. ISSN 22978739. DOI:

10.3390/separations4020020.

KERMANI, Farhad Riazi; PAWLISZYN, Janusz. Sorbent Coated Glass Wool Fabric as a Thin Film Microextraction Device. **Analytical Chemistry**, v. 84, n. 21, p. 8990–8995, 2012. ISSN 0027-8424. Disponível em: <https://doi.org/10.1021/ac301861z>.

KOU, Shijie (Gabriel); PETERS, Linda M.; MUCALO, Michael R. Chitosan: A review of sources and preparation methods. **International Journal of Biological**

Macromolecules, Elsevier B.V., v. 169, p. 85–94, 2021. ISSN 18790003. DOI:

10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.12.005>.

KUMAR, Rajesh; GAURAV; HEENA; MALIK, Ashok Kumar; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G. Efficient analysis of selected estrogens using fabric phase sorptive extraction and high performance liquid chromatography-fluorescence detection. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V., v. 1359, p. 16–25, 2014. ISSN 18733778. DOI: 10.1016/j.chroma.2014.07.013.

LI, Haonan *et al.* Development and validation of a simple and rapid HILIC-MS/MS method for the quantification of low-abundant lysoglycerophospholipids in human plasma. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, Springer Berlin Heidelberg, 2022. ISSN 1618-2642. DOI: 10.1007/s00216-022-04421-9. Disponível em:

<https://doi.org/10.1007/s00216-022-04421-9>.

LIU, Kun *et al.* Recent advances in cellulose and its derivatives for oilfield applications.

Carbohydrate Polymers, Elsevier Ltd, v. 259, January, p. 117740, 2021. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2021.117740. Disponível em:

<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2021.117740>.

LUIZ, Anderson Luigi; MACIEL, Edvaldo Vasconcelos Soares;

LANÇAS, Fernando Mauro. Técnicas Miniaturizadas No Preparo De Amostra.

Scientia Chromatographica, v. 7, n. 3, p. 157–18, 2015.

MAFRA, Gabriela; MILL, Jaime; CARASEK, Eduardo; LUCENA, Rafael; SOLEDAD, C. Returning to Nature for the Design of Sorptive Phases in Solid-Phase Microextraction, p. 1–22, 2020.

MANOUSHI, Natalia; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; ROSENBERG, Erwin; ZACHARIADIS, George A. Fabric phase sorptive extraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as an innovative analytical technique for the determination of selected polycyclic aromatic hydrocarbons in herbal infusions and tea

samples. **RSC Advances**, Royal Society of Chemistry, v. 12, n. 12, p. 7149–7156, 2022. ISSN 20462069. DOI: 10.1039/d2ra00408a.

MARÍN-SAN ROMÁN, Sandra; CAROT, José Miguel; SÁENZ DE URTURI, Itziar; RUBIO-BRETÓN, Pilar; PÉREZ-ÁLVAREZ, Eva P.; GARDE-CERDÁN, Teresa. Optimization of thin film-microextraction (TF-SPME) method in order to determine musts volatile compounds. **Analytica Chimica Acta**, v. 1226, July, 2022. ISSN 18734324. DOI: 10.1016/j.aca.2022.340254.

MARÍN-SAN ROMÁN, Sandra; RUBIO-BRETÓN, Pilar; PÉREZ-ÁLVAREZ, Eva P.; GARDE-CERDÁN, Teresa. Advancement in analytical techniques for the extraction of grape and wine volatile compounds. **Food Research International**, v. 137, September, 2020. ISSN 18737145. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109712.

MAZARAKI, Konstantina; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; FYTIANOS, Konstantinos; SAMANIDOU, Victoria F.; ZACHARIS, Constantinos K. Fast fabric phase sorptive extraction of selected β -blockers from human serum and urine followed by UHPLC-ESI-MS/MS analysis. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Elsevier B.V., v. 199, p. 114053, 2021. ISSN 1873264X. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114053. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114053>.

MESA, Rodolfo; KABIR, Abuzar; SAMANIDOU, Victoria; FURTON, Kenneth G. Simultaneous determination of selected estrogenic endocrine disrupting chemicals and bisphenol A residues in whole milk using fabric phase sorptive extraction coupled to HPLC-UV detection and LC-MS/MS. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 2, p. 598–608, 2019. ISSN 16159314. DOI: 10.1002/jssc.201800901.

MIN, J. Yang; ZHOUYAO, Zhang; PAWLISZYN, Janusz. Solid-Phase Microextraction. **Analytical Chemistry**, v. 66, n. 17, 1994.

MIRNAGHI, Fatemeh S.; CHEN, Yong; SIDISKY, Leonard M.; PAWLISZYN, Janusz. Optimization of the coating procedure for a high-throughput 96-blade solid phase microextraction system coupled with LC-MS/MS for analysis of complex samples. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 15, p. 6018–6025, 2011. ISSN 00032700. DOI: 10.1021/ac2010185.

MOOSAVI, Seyed Mojtaba; GHASSABIAN, Sussan. **Linearity of calibration curves for analytical methods: A review of criteria for assessment of method reliability**. [S.l.]: IntechOpen Limited London, UK, 2018. v. 109.

NARDINI, Giuliana Stael; DOLZAN, Maressa Danielli; MICKE, Gustavo Amadeu; VITALI, Luciano. A new high-throughput method based on hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry to determine 18 short-chain carboxylic acids in foods. **Food Control**, Elsevier Ltd, v. 126, February, p. 108042, 2021. ISSN 09567135. DOI: 10.1016/j.foodcont.2021.108042. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108042>.

NASIRI, Azadeh; JAHANI, Reza; MOKHTARI, Shaya; YAZDANPANA, Hassan; DARAEI, Bahram; FAIZI, Mehrdad; KOBARFARD, Farzad. Overview, consequences, and strategies for overcoming matrix effects in LC-MS analysis: A critical review. **Analyst**, Royal Society of Chemistry, v. 146, n. 20, p. 6049–6063, 2021. ISSN 13645528. DOI: 10.1039/d1an01047f. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1039/d1an01047f>.

NEGM, Nabel A.; HEFNI, Hassan H.H.; ABD-ELAAL, Ali A.A.; BADR, Emad A.; ABOU KANA, Maram T.H. Advancement on modification of chitosan biopolymer and its potential applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, Elsevier B.V., v. 152, p. 681–702, 2020. ISSN 18790003. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.02.196>.

NTRALLOU, Konstantina. foods 2020.pdf. **Foods**, v. 9, n. 1, p. 58, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/foods9010058>.

OTOUKESH, Mahdiyeh; NERÍN, Cristina; AZNAR, Margarita; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; ES'HAGHI, Zarrin. Determination of adhesive acrylates in recycled polyethylene terephthalate by fabric phase sorptive extraction coupled to ultra performance liquid chromatography - mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V., v. 1602, p. 56–63, 2019. ISSN 18733778. DOI: 10.1016/j.chroma.2019.05.044. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2019.05.044>.

PACHECO-FERNÁNDEZ, Idaira; ALLGAIER-DÍAZ, Diego W.; MASTELLONE, Giulia; CAGLIERO, Cecilia; DÍAZ, David Díaz; PINO, Verónica. Biopolymers in sorbent-based microextraction methods. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 125, 2020. ISSN 18793142. DOI: 10.1016/j.trac.2020.115839.

PARK, Jong Min; SHIN, Jung Ah; LEE, Jeung Hee; LEE, Ki Teak. Development of a quantitative method for organic acid in wine and beer using high performance liquid chromatography. **Food Science and Biotechnology**, v. 26, n. 2, p. 349–355, 2017. ISSN 12267708. DOI: 10.1007/s10068-017-0047-9.

PÉREZ-MAYÁN, L.; RODRÍGUEZ, I.; RAMIL, M.; KABIR, A.; FURTON, K. G.; CELA, R. Fabric phase sorptive extraction followed by ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the determination of fungicides and insecticides in wine. **Journal of Chromatography A**, Elsevier B.V., v. 1584, p. 13–23, 2019. ISSN 18733778. DOI: 10.1016/j.chroma.2018.11.025. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2018.11.025>.

RAPOSO, Francisco; BARCELÓ, Damià. Challenges and strategies of matrix effects using chromatography-mass spectrometry: An overview from research versus regulatory viewpoints. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, Elsevier B.V., v. 134, p. 116068, 2021. ISSN 18793142. DOI: 10.1016/j.trac.2020.116068. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.116068>.

REYES-GARCÉS, Nathaly; GIONFRIDDO, Emanuela; GÓMEZ-RÍOS, German Augusto; ALAM, Md Nazmul; BOYACL, Ezel; BOJKO, Barbara; SINGH, Varoon; GRANDY, Jonathan; PAWLISZYN, Janusz. Advances in Solid Phase Microextraction and Perspective on Future Directions. **Analytical Chemistry**, v. 90, n. 1, p. 302–360, 2018. ISSN 15206882. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b04502.

RIBANI, Marcelo; GRESPAN BOTTOLI, Carla Beatriz; COLLINS, Carol H.; FONTES JARDIM, Isabel Cristina Sales; COSTA MELO, Lúcio Flávio. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, n. 5, p. 771–780, 2004. ISSN 01004042. DOI: 10.1590/S0100-40422004000500017.

RIGLING, Marina; KANTER, Jean Philippe; ZHANG, Yanyan. Application of a direct immersion—stir bar sorptive extraction (DI-SBSE) combined GC–MS method for fingerprinting alkylpyrazines in tea and tea-like infusions. **European Food Research and Technology**, Springer Berlin Heidelberg, v. 248, n. 4, p. 1179–1189, 2022. ISSN 14382385. DOI: 10.1007/s00217-021-03954-0. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03954-0>.

ROBLES, Alicia D.; FABJANOWICZ, Magdalena; PLOTKA-WASYLKA, Justyna; KONIECZKA, Piotr. Organic acids and polyphenols determination in polish wines by ultrasound-assisted solvent extraction of porous membrane-packed liquid samples. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 1–20, 2019. ISSN 14203049. DOI: 10.3390/molecules24234376.

RUDZKI, Piotr J.; GNIAZDOWSKA, Elżbieta; BUŚ-KWAŚNIK, Katarzyna. Quantitative evaluation of the matrix effect in bioanalytical methods based on LC–MS: A comparison of two approaches. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 155, p. 314–319, 2018. ISSN 1873264X. DOI: 10.1016/j.jpba.2018.03.052.

SAJOMSANG, Warayuth; GONIL, Pattarapond; TANTAYANON, Supawan. Antibacterial activity of quaternary ammonium chitosan containing mono or disaccharide moieties: Preparation and characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 44, n. 5, p. 419–427, 2009. ISSN 01418130. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2009.03.003.

SERESHTI, Hassan; DUMAN, Osman; TUNÇ, Sibel; NOURI, Nina; KHORRAM, Parisa. Nanosorbent-based solid phase microextraction techniques for the monitoring of emerging organic contaminants in water and wastewater samples. **Microchimica Acta**, Microchimica Acta, v. 187, n. 9, 2020. ISSN 14365073. DOI: 10.1007/s00604-020-04527-w.

SHAHIDI, Fereidoon; ZHONG, Ying; CHANDRASEKARA, Anoma. Antioxidants and Human Health. **Cereals and Pulses: Nutraceutical Properties and Health Benefits**, p. 273–308, 2012. DOI: 10.1002/9781118229415.ch19.

SHAO, Simeng *et al.* 96-Well Plate Format in Conjunction With Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Coupled To Orbitrap Mass Spectrometry for High-Throughput Screening Protein Binders From Ginseng. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Elsevier, v. 209, p. 114498, 2022. ISSN 1873264X. DOI: 10.1016/j.jpba.2021.114498. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2021.114498>.

SIDIROPOULOU, Georgia; KABIR, Abuzar; FURTON, Kenneth G.; KIKA, Fotini S.; FYTIANOS, Konstantinos; TZANAVARAS, Paraskevas D.; ZACHARIS, Constantinos K. Combination of fabric phase sorptive extraction with UHPLC-ESI-MS/MS for the determination of adamantane analogues in human urine. **Microchemical Journal**, Elsevier B.V., v. 176, February, p. 107250, 2022. ISSN 0026265X. DOI: 10.1016/j.microc.2022.107250. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.microc.2022.107250>.

SILVA, Mayara da; FERNANDES SAKO, Alysson Vasques; MICKE, Gustavo Amadeu; VITALI, Luciano. A rapid method for simultaneous determination of nitrate, nitrite and thiocyanate in milk by CZE-UV using quaternary ammonium chitosan as electroosmotic flow inverter. **Journal of Food Composition and Analysis**, Elsevier, v. 88, February, p. 103455, 2020. ISSN 08891575. DOI: 10.1016/j.jfca.2020.103455. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103455>.

SOLFRIZZO, Michele; GAMBACORTA, Lucia; BIBI, Rita; CIRIACI, Martina; PAOLONI, Angela; PECORELLI, Ivan. Multimycotoxin analysis by LC-MS/MS in cereal food and feed: Comparison of different approaches for extraction, purification, and calibration. **Journal of AOAC International**, v. 101, n. 3, p. 647–657, 2018. ISSN 10603271. DOI: 10.5740/jaoacint.17-0339.

TANG, Xilan; LIU, Jianxun; DONG, Wei; LI, Peng; LI, Lei; LIN, Chengren; ZHENG, Yongqiu; HOU, Jincui; LI, Dan. The cardioprotective effects of citric acid and L-malic acid on myocardial ischemia/reperfusion injury. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013. ISSN 1741427X. DOI: 10.1155/2013/820695.

TU, Hu; ZHU, Mengxiang; DUAN, Bo; ZHANG, Lina. Recent Progress in High-Strength and Robust Regenerated Cellulose Materials. **Advanced Materials**, v. 33, n. 28, p. 1–22, 2021. ISSN 15214095. DOI: 10.1002/adma.202000682.

VITALI, Luciano. **Preparação, caracterização e aplicação de capilares modificados com quitosana e sal de quitosana quaternizada em eletroforese capilar**. 2012. F. 2013–2015. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Santa Catarina.

VITALI, Luciano; DELLA BETTA, Fabiana; COSTA, Ana Carolina O.; VAZ, Fernando Antonio Simas; OLIVEIRA, Marcione Augusto Leal; PEREIRA VISTUBA, Jacqueline; FÁVERE, Valfredo T.; MICKE, Gustavo A. New multilayer coating using quaternary ammonium chitosan and κ -carrageenan in capillary electrophoresis: Application in fast analysis of betaine and methionine. **Talanta**,

Elsevier, v. 123, p. 45–53, 2014. ISSN 00399140. DOI: 10.1016/j.talanta.2014.01.047. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2014.01.047>.

WANG, Beibei; YANG, Xiaodeng; QIAO, Congde; LI, Yan; LI, Tianduo; XU, Chunlin. Effects of chitosan quaternary ammonium salt on the physicochemical properties of sodium carboxymethyl cellulose-based films. **Carbohydrate Polymers**, Elsevier, v. 184, February 2017, p. 37–46, 2018. ISSN 01448617. DOI: 10.1016/j.carbpol.2017.12.030. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.12.030>.

WANG, Dan; SHI, Lijuan; FAN, Xiaowei; LOU, Huaqiao; LI, Wenting; LI, Yonglin; REN, Dabing; YI, Lunzhao. Development and validation of an efficient HILIC-QQQ-MS/MS method for quantitative and comparative profiling of 45 hydrophilic compounds in four types of tea (Camellia sentences). **Food Chemistry**, Elsevier Ltd, v. 371, June 2021, p. 131201, 2022. ISSN 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2021.131201. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131201>.

WANG, Mengfan; LIU, Sisi; JI, Haoqing; YANG, Tingzhou; QIAN, Tao; YAN, Chenglin. Salting-out effect promoting highly efficient ambient ammonia synthesis. **Nature Communications**, Springer US, v. 12, n. 1, 2021. ISSN 20411723. DOI: 10.1038/s41467-021-23360-0. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23360-0>.

WANG, Qi; LIU, Kunyi; LIU, Linlin; ZHENG, Jia; CHEN, Tao; CHEN, Fei; LI, Pingping; ZHANG, Meng; SHEN, Xiaojing. Correlation analysis between aroma components and microbial communities in Wuliangye-flavor raw liquor based on HS-SPME/LLME-GC-MS and PLFA. **Food Research International**, Elsevier Ltd, v. 140, December 2020, p. 109995, 2021. ISSN 18737145. DOI: 10.1016/j.foodres.2020.109995. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109995>.

WERNER, Justyna; GRZEŚKOWIAK, Tomasz; ZGOŁA-GRZEŚKOWIAK, Agnieszka. A polydimethylsiloxane/deep eutectic solvent sol-gel thin film sorbent and its application to solid-phase microextraction of parabens. **Analytica Chimica Acta**, v. 1202, 2022. ISSN 18734324. DOI: 10.1016/j.aca.2022.339666.

ZERAVIK, Jiri; FOHLEROVA, Zdenka; MILOVANOVIC, Miodrag; KUBESA, Ondrej; ZEISBERGEROVA, Marta; LACINA, Karel; PETROVIC, Aleksandar; GLATZ, Zdenek; SKLADAL, Petr. Various instrumental approaches for determination of organic acids in wines. **Food Chemistry**, Elsevier Ltd, v. 194, p. 432–440, 2016. ISSN 18737072. DOI: 10.1016/j.foodchem.2015.08.013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.013>.

ZHANG, W.; ZHOU, J. J.; DAI, X. L. Preparation and characterization of reactive chitosan quaternary ammonium salt and its application in antibacterial finishing of

cotton fabric. **Textile Research Journal**, v. 87, n. 6, p. 759–765, 2017. ISSN 17467748. DOI: 10.1177/0040517516639818.

ZHU, Ming; SU, Huijun; BAO, Yurong; LI, Jianhua; SU, Guanyong. Experimental determination of octanol-water partition coefficient (KOW) of 39 liquid crystal monomers (LCMs) by use of the shake-flask method. **Chemosphere**, Elsevier Ltd, v. 287, P4, p. 132407, 2022. ISSN 18791298. DOI:

10.1016/j.chemosphere.2021.132407. Disponível em:
<https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132407>.