

Joyce Nunes Bianchin

Otimização de novas metodologias para extração de compostos voláteis de matrizes alimentícias e contaminantes ambientais por microextração em fase sólida e cromatografia a gás

Tese submetida ao Programa de Pós Graduação em Química da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Eduardo Carasek

Florianópolis
2015

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

A ficha de identificação é elaborada pelo próprio autor
Maiores informações em:
<http://portalbu.ufsc.br/ficha>

Joyce Nunes Bianchin

Otimização de novas metodologias para extração de compostos voláteis de matrizes alimentícias e contaminantes ambientais por microextração em fase sólida e cromatografia a gás

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de Doutor, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós Graduação em Química.

Florianópolis, 13 de Abril de 2015.

Prof. Dr. Prof. Hugo O. Gallardo
Coordenador da Pós Graduação em Química

Banca Examinadora

Prof. Eduardo Carasek, Dr.
Orientador
Universidade Federal de
Santa Catarina

Prof.^a Dilma Budziak, Dr.^a
Universidade Federal de
Santa Catarina

Prof. Álvaro J. Santos Neto, Dr.
Universidade de São Paulo

Prof.^a Maria Eliana Queiroz, Dr.^a
Universidade Federal de Viçosa

Prof.^a Tatiane A. Maranhão, Dr.^a
Universidade Federal de
Santa Catarina

Prof. Gustavo A. Micke, Dr.
Universidade Federal de
Santa Catarina

Este trabalho é dedicado à minha mãe Neusa
e à minha avó Iracy (in memorian).

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela fé e pela perseverança.

A minha mãe, Neusa, pelo carinho e apoio incondicional.

As minhas irmãs Andreia e Natalia paciência e palavras de conforto.

Ao Ismael por estar ao meu lado prestando apoio incondicional.

As minhas amigas Simone, Priscila e Suellen pelo suporte emocional, carinho e paciência, dispensados durante todos esses anos.

Ao meu orientador, professor Eduardo Carasek, por suas ideias, amizade e apoio durante todos esses anos de convivência.

Ao meu grande amigo Edmar, pela coorientação, apoio e amizade.

Aos colegas do laboratório pelo parceria.

Aos professores e servidores do Departamento de Química da UFSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao CNPq pelo fomento deste trabalho.

E a todas aquelas pessoas que, de alguma forma, contribuíram para que fosse possível a realização de mais esta etapa da minha vida.

“Dê-me uma alavanca e um ponto
de apoio e moverei o mundo.”
(Arquimedes 287 A. C.)

RESUMO

Este estudo apresenta duas novas estratégias de otimização aplicadas à técnica de microextração em fase sólida. A primeira parte do trabalho consistiu em uma nova estratégia baseada no uso de duas temperaturas e dois modos de extração no mesmo procedimento de extração. Duas classes de compostos, HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos) e BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno), foram escolhidas para esse estudo, o qual tinha como objetivo maximizar a quantidade extraída de todos os compostos, com volatilidades bastante distintas, simultaneamente. A metodologia proposta foi utilizada para analisar outra classe de compostos, os ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato), a fim de verificar se a metodologia proposta funcionaria para outros analitos. Comparações foram realizadas entre a nova proposta e o procedimento convencional, o qual utiliza apenas um modo e uma temperatura de extração, sendo obtidos resultados bastante satisfatórios para ambas as classes de compostos investigadas. A segunda parte do trabalho consistiu em uma nova estratégia de otimização baseada no uso de três temperaturas diferentes de extração no mesmo procedimento para extração da fração volátil do mel de abelha por microextração em fase sólida no modo headspace, a fim de maximizar a quantidade extraída de compostos com volatilidades/polaridades distintas. O método proposto foi utilizado para análise dos compostos voláteis da pimenta vermelha a fim de demonstrar a eficácia da metodologia proposta. Em ambos os casos, uma comparação com a metodologia tradicional, usando apenas uma temperatura, foi realizada e mostrou-se ser uma ótima alternativa para extração simultânea de compostos com diferentes volatilidades de matrizes complexas.

Palavras-chave: SPME, preparo de amostras, HPAs, BTEX, ftalatos, mel abelha e pimenta vermelha.

ABSTRACT

This study presents two new optimization approaches, applied to the technique of solid phase microextraction, for analysis of volatile compounds from food matrices and environmental contaminants by gas chromatography. The first part of this work consisted in a new strategy based on the use of two temperatures and two modes in the same extraction procedure. Two classes of compounds, PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) and BTEX (benzene, toluene, ethylbenzene and xylene) were select for this study, which aimed to maximize the amount of all extracted compounds with different volatilities, simultaneously. The proposed methodology was used to analyze another class of compounds, phthalates (diethyl phthalate, benzylbutylphthalate, bis-2-ethylhexylphthalate, bis-2-ethylhexiadipate and dibutylphthalate) in order to verify whiter the proposed methodology could be used for other analytes. Comparisons between the proposed method and conventional method were carried obtaining excellent results for both classes of compounds. The second part of this study consisted of a new optimization strategy based on the use of three different temperatures of extraction in the same procedure for the extraction of the volatile fraction of the honey by solid phase microextraction in the headspace, in order to maximize the amount extracted from compounds which contains volatilities/polarities different. The proposed method was used for analysis of volatile compounds of red pepper to demonstrate the efficiency of the proposed methodology. In both cases, a comparison with the traditional method, using only a temperature, was made and was shown to be a great alternative to simultaneous extraction of compounds with different volatilities of complex samples.

Keywords: SPME, sample preparation, HPAs, BTEX, phthalates, honey and e red pepper.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura química dos compostos: dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexiftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato.	3
Figura 2. Estrutura química dos compostos: acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, criseno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, indeno-1,2,3-pireno, benzo(k)fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno.	5
Figura 3. Estrutura química dos compostos: Benzeno, tolueno, etilbenzeno, orto-xileno, meta-xileno e para-xileno.	6
Figura 4. Principais partes de um cromatógrafo a gás. ^[56]	12
Figura 5. Exemplos de colunas capilares.	13
Figura 6. Esquema da extração em fase sólida. ^[61]	15
Figura 7. Esquema da extração sortiva em barra magnética. ^[61]	16
Figura 8. Esquema da microextração líquido-líquido dispersiva. ^[61]	17
Figura 9. Esquema de uma fibra utilizada na técnica de SPME.	18
Figura 10. Esquema da microextração em fase sólida no modo direto (DI-SPME) e no modo headspace (HS-SPME).	19
Figura 11. Etapas de uma extração por SPME no modo direto: 1) Convecção dos analitos até as proximidades da fase extratora; 2) Difusão dos analitos pela camada estática que envolve a fibra; 3) Difusão dos analitos através da fase extratora.	23
Figura 12. Etapas de uma extração por SPME no modo headspace: 1) Evaporação dos analitos da amostra; 2) Convecção dos analitos até as proximidades da fase extratora; 3) Difusão dos analitos pela camada estática que envolve a fibra; 4) Difusão dos analitos através da fase extratora.	26
Figura 13. Esquema da extração de BTEX e HPAs de matrizes aquosas através da metodologia DI-HS-SPME.	34
Figura 14. Comparação das respostas obtidas na otimização das fibras: PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB para análise de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME. Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7-acenaftaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11-pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13-	

- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno..... 35
- Figura 15.** Superfície resposta (A) temperatura da amostra *versus* massa de sal e (B) tempo de extração *versus* massa sal; obtida na extração de BTEX e HPAs por DI-SPME..... 37
- Figura 16.** Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para (A) Grupo 1- benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-xileno, m-xileno, o-xileno. (B) Grupo 2 - acenaftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(K)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno-1-2-3-pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno; (Modo DI-SPME)..... 38
- Figura 17.** Superfície resposta (A) tempo de extração *versus* temperatura de extração e (B) temperatura de extração *versus* massa de sal, obtidas na extração de BTEX e HPAs por HS-SPME. 39
- Figura 18.** Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para (A) Grupo 1- benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-xileno, m-xileno, o-xileno. (B) Grupo 2 - acenaftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(K)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno-1-2-3-pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno; (Modo HS-SPME). 40
- Figura 19.** Superfície resposta (A) Tempo total *versus* % tempo no modo headspace e (B) massa sal *versus* % tempo no modo headspace, obtida na extração de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME..... 42
- Figura 20.** Respostas obtidas na comparação das metodologias: DI-HS-SPME, HS-SPME e DI-SPME. Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7-acenaftaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11-pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno..... 43
- Figura 21.** Esquema da extração de ftalatos de matrizes aquosas através da metodologia DI-HS-SPME..... 51
- Figura 22.** Superfície resposta (A) temperatura de extração *versus* tempo de extração e (B) tempo de extração *versus* massa sal obtida na

extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-SPME.....	53
Figura 23. Superfície resposta de temperatura de extração <i>versus</i> tempo de extração para composto (A) dietilftalato (B) bis-2-etilhexilftalato, por DI-SPME.....	53
Figura 24. Superfície resposta (A) massa de sal <i>versus</i> tempo de extração e (B) temperatura de extração <i>versus</i> massa de sal, obtidas na extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por HS-SPME....	55
Figura 25. Superfície resposta de temperatura de extração <i>versus</i> tempo de extração para composto (A) dietilftalato (B) bis-2-etilhexilftalato, por HS-SPME.....	56
Figura 26. Superfície resposta (A) Tempo total <i>versus</i> % tempo no modo headspace e (B) massa sal <i>versus</i> % tempo no modo <i>headspace</i> ; obtidas na extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME.	57
Figura 27. Respostas obtidas através da comparação das metodologias: DI-HS-SPME, HS-SPME e DI-SPME. Analitos: 1- dietilftalato, 2- dibutilftalato, 3- benzilbutilftalato, 4- bis-2-etilhexiadipate e 5- bis-2-etilhexilftalato.	59
Figura 28. Esquema da extração dos compostos voláteis do mel através da metodologia HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.....	65
Figura 29. Superfície resposta de (A) tempo de extração <i>versus</i> % Sal (B) tempo de extração <i>versus</i> volume de água, para determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.	67
Figura 30. Superfície resposta de tempo de extração <i>versus</i> temperatura de extração (A) grupo 1 (compostos mais voláteis) (B) grupo 2 (compostos volatilidade intermediária) e (C) grupo 3 (compostos menos voláteis), obtida na determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.	68
Figura 31. Superfície resposta triangular % de tempo em cada temperatura para determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.	70

Figura 32. Comparação entre o método proposto com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS. (G1- compostos mais voláteis, G2 compostos volatilidade intermediária e G3- compostos pouco voláteis).	71
Figura 33. Cromatogramas obtidos através da comparação do método com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.	71
Figura 34. Esquema da extração dos compostos voláteis da pimenta através do HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.	75
Figura 35. Superfície resposta de tempo de extração <i>versus</i> temperatura de extração, para determinação simultânea dos compostos voláteis da pimenta por HS-SPME e detecção por GC-MS	77
Figura 36. Superfície resposta de tempo de extração <i>versus</i> temperatura de extração (A) grupo 1 (compostos mais voláteis) (B) grupo 2 (compostos volatilidade intermediária) e (C) grupo 3 (compostos menos voláteis), obtida na determinação dos compostos voláteis da pimenta vermelha HS-SPME e detecção por GC-MS.	77
Figura 37. Superfície resposta triangular % de tempo em cada temperatura para determinação dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS.	79
Figura 38. Comparação entre o método proposto com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS. (G1- compostos mais voláteis, G2 compostos volatilidade intermediária e G3- compostos pouco voláteis).	80
Figura 39. Cromatogramas obtidos através da comparação do método com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS. .	80

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Constante de partição K dos compostos entre a fase estacionária e a fase gasosa. Onde: C_{fe} é a concentração do analito na fase estacionária e C_{fm} é a concentração dos analitos na fase móvel.	13
Equação 2. Conservação de massa para modo DI-SPME.....	20
Equação 3. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra.....	20
Equação 4. Balanço de massa dos analitos em um sistema bifásico.....	20
Equação 5. Relação entre n_f e concentração inicial do analito na amostra para modo DI-SPME.....	21
Equação 6. Relação resumida entre n_f e C_o , para modo DI-SPME.....	21
Equação 7. Relação Einstein-Stokes demonstrando D como função de r , T e μ	22
Equação 8. Conservação de massa para modo HS-SPME.....	24
Equação 9. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o headspace, modo HS-SPME.	24
Equação 10. Constante de partição dos analitos entre o headspace e o recobrimento da fibra, modo HS-SPME.	24
Equação 11. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra, modo HS-SPME.....	24
Equação 12. Balanço de massa dos analitos em um sistema trifásico modo HS-SPME.....	24
Equação 13. Relação entre n_f e C_o , modo HS-SPME.	25
Equação 14. Quantidade extraída pela fibra n_t em função do tempo de extração t	27
Equação 15. Constante de velocidade a quando a difusão dos analitos pela fibra é a etapa lenta.....	27
Equação 16. Constante de velocidade a quando evaporação dos analitos da matriz é a etapa lenta.....	27
Equação 17. N_f como função do tempo de extração quando o parâmetro a é dado pela Eq. 16.	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Principais Compostos voláteis presentes no mel.....	9
Tabela 2. Principais compostos voláteis presentes na pimenta vermelha.	10
Tabela 3. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo DI-SPME.....	36
Tabela 4. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo HS-SPME.....	39
Tabela 5. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo DI-HS-SPME.	41
Tabela 6. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de BTEX e HPAs de amostras aquosas por DI-HS-SPME e detecção GC-MS.....	44
Tabela 7. Concentrações determinadas nas amostras e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, para a determinação de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME e detecção por GC-MS, para amostras do Rio Araranguá e Rio Tubarão.	45
Tabela 8. Concentrações determinadas nas amostras e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, para a determinação de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME e detecção por GC-MS, para amostras da rede de abastecimento de Florianópolis e água mineral envasada.....	46
Tabela 9. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo DI-SPME.....	52
Tabela 10. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo HS-SPME.....	54
Tabela 11. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo DI-HS-SPME.	57
Tabela 12. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipato e dibutilftalato) de amostras aquosas por DI-HS-SPME e detecção GC-MS	60
Tabela 13. Concentrações determinadas nas amostras do Rio Araranguá e Rio Tubarão e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 μg	

L-1 de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME-GC-MS.....	60
Tabela 14. Concentrações determinadas nas amostras da rede de abastecimento de Florianópolis e água mineral envasada e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 µg L-1 de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME-GC-MS.	61
Tabela 15. Ensaios realizados, composto central fracionado, para extração dos compostos voláteis do mel utilizando a HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.	66
Tabela 16. Planejamento da porcentagem de tempo da amostra em cada uma das três temperaturas, para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME.....	69
Tabela 17. Ensaios realizados, matriz Doehlert, para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha utilizando a HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.....	76
Tabela 18. Planejamento da porcentagem de tempo da amostra em cada uma das três temperaturas, para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME.	78

LISTA DE ABREVIATURAS

VOCs	Volatile organic compounds- Compostos orgânicos voláteis
GC	<i>Gas chromatography</i> - cromatografia a gás
PVC	<i>Polyvinyl chloride</i> - cloreto de vinila
FE	Fase extratora
SPE	<i>Solid-phase extraction</i> - extração por fase sólida
SPME	<i>solid-phase microextraction</i> - microextração em fase sólida
PDMS	Polidimetilsiloxano
DVB/CAR/PDMS	divinilbenzeno/carboxen/polidimetilsiloxano
LLE	<i>Liquid-Liquid Extraction</i> - Extração líquido-líquido
SBSE	<i>Stir Bar Sorptive Extraction</i> - extração em barra sortiva
DLLM	<i>Dispersive Liquid-Liquid Microextraction</i> - Microextração líquido-líquido dispersivo
PA	Poliacrilato
PEG	Polietilenoglicol
FE	Fase extratora
K	Constante de partição K entre a fase estacionária e a fase gasosa
K_{hm}	Constante de partição dos analitos entre a matriz e o <i>headspace</i>
K_{fh}	Constante de partição dos analitos entre o <i>headspace</i> e o recobrimento da fibra
K_{fm}	Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra
C_h	Concentração do analito no <i>headspace</i> no equilíbrio
C_f	Concentração do analito no revestimento da fibra no equilíbrio
C_m	Concentração do analito na matriz da amostra no equilíbrio
n_o	Quantidade de analito inicialmente presente na amostra
n_{HS}	Quantidade de analito no <i>headspace</i> no equilíbrio
n_m	Quantidade de analito restante na matriz da amostra no equilíbrio
n_f	Quantidade de analito no recobrimento da fibra no equilíbrio
V_m	Volume ou massa de amostra
C_o	Concentração inicial do analito na amostra
V_f	Volume do recobrimento da fibra
V_h	Volume de <i>headspace</i>
k	Constante de Boltzmann
T	Temperatura absoluta
D	Coefficiente de difusão
Π	Pi
μ	Viscosidade

r	Raio molecular
n_t	Quantidade de analito extraída pelo recobrimento no tempo t
n_∞	Quantidade de analito extraída no equilíbrio (em $t = \infty$)
e	Base do logaritmo neperiano
a	Constante de velocidade do processo de transferência de massa
EF	Ésteres de ftalato
HPAs	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos
EPA	Agência de Proteção Ambiental dos estados unidos
OMS	Organização Mundial de Saúde
DBP	Dibutilftalato
BBP	Benzilbutilftalato
DEHP	Dietilhexilftalato
DMP	Dimetilftalato
DEP	Dietilftalato
BBzP	Benzilbutilftalato
DNBP	Di-butilftalato
DIBP	Diisobutilftalato
DEHP	Di(2-etil-hexil)ftalato
DINP	Di isononil ftalato
<i>DIDP</i>	Ftalato <i>de</i> diisodecilo
DPHP	Di Propil Heptil Ftalato
DEHA	Di (2-ethylhexil)adipato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 CONTAMINANTES AMBIENTAIS.....	3
2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS DE MATRIZES ALIMENTÍCIAS.....	7
2.3 CROMATOGRAFIA A GÁS.....	11
2.4 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA.....	14
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 OBJETIVO GERAL.....	29
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
4 CAPÍTULO 1.....	31
4.1 RESUMO.....	31
4.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	32
4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
4.4 CONCLUSÃO.....	47
5 CAPÍTULO 2.....	49
5.1 RESUMO.....	49
5.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	49
5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
5.4 CONCLUSÃO.....	61
6 CAPÍTULO 3.....	63
6.1 RESUMO.....	63
6.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	63
6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
6.4 CONCLUSÃO.....	72
7 CAPÍTULO 4.....	73
7.1 RESUMO.....	73
7.2 PARTE EXPERIMENTAL.....	73
7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
7.4 CONCLUSÃO.....	81
8 CONCLUSÕES FINAIS.....	83
9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	85

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de métodos analíticos para a análise de compostos orgânicos voláteis (VOCs) de matrizes alimentícias e contaminantes ambientais vem sendo, cada vez mais, foco de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo, como pode ser observado através de artigos científicos encontrados na literatura. ^[1-17]

A determinação de VOCs nessas matrizes pode ser considerada um desafio analítico devido à dificuldade de liberação de alguns desses analitos para o meio extrator. A extração com solventes foi utilizada durante muito tempo como uma alternativa para contornar este problema.

Contudo, a minimização da utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos tem se tornado uma tendência atual em Química, principalmente quando se trata da destinação dos resíduos gerados. Além do que, a redução no consumo de solventes contribui significativamente para a redução dos custos de análise.

Portanto, técnicas de preparo de amostras, livres de solventes, baseadas em extração por sorção têm ganhando a atenção de pesquisadores, podendo-se citar a extração em fase sólida (SPE), a extração sortiva em barra magnética (SBSE), microextração em fase sólida (SPME), dentre outras. Estas técnicas têm como vantagens: maior rapidez (levando a uma alta frequência analítica), pouca manipulação da amostra e menor consumo de solventes orgânicos. ^[18]

Diversos pesquisadores vêm desenvolvendo métodos, baseados em SPME, para determinação de VOCs em diversas matrizes complexas. ^[19-25] Farhadi e colaboradores ^[19] estudaram um novo sorvente para microextração em fase sólida a fim de determinar clorofenóis em matrizes aquosas e de mel. Outro estudo foi feito por Wang e colaboradores ^[20] que usaram a técnica de SPME para determinar contaminantes em peixes. Valenzuela e colaboradores ^[23] utilizaram desta técnica para determinar compostos orgânicos em amostras de urina humana.

Neste contexto pode-se perceber que a SPME é uma das técnicas mais utilizadas para determinação de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em nível de traço e tem sido aplicada por diversos pesquisadores, com sucesso, para amostras aquosas, biológicas, bem como para amostras de gêneros alimentícios. ^[26]

Uma das variáveis mais importantes em SPME é a temperatura de extração, pois ela influencia de maneira contrária à termodinâmica (negativamente) e cinética (positivamente) do processo, sendo escolhida uma temperatura a fim de compensar essas influências. Porém, mesmo alcançando um compromisso de temperatura, quando a matriz é muito complexa ou quando se tem grupos de analitos com polaridades muito diferentes na amostra essa temperatura ótima acaba prejudicando a extração de um ou outro grupo de analitos.

Por este motivo, esse estudo teve como objetivo propor novas estratégias de extração por SPME, as quais utilizam mais de uma temperatura de extração em um mesmo procedimento, a fim de maximizar a extração de compostos com volatilidades distintas simultaneamente.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 CONTAMINANTES AMBIENTAIS

Os compostos conhecidos como HPAs (hidrocarbonetos policíclicos aromáticos), BTEX (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) e ftalatos estão entre os contaminantes orgânicos voláteis mais cancerígenos, mutagênicos e tóxicos encontrados em sistemas aquáticos. [27,28]

Devido aos sérios problemas que estes contaminantes podem causar quando presentes no meio ambiente (mesmo em baixas concentrações) há uma crescente necessidade de se desenvolver técnicas analíticas capazes de determinar as quantidades traços desses compostos, a fim de atender as legislações ambientais que determinam as quantidades máximas permitidas para alguns destes contaminantes em amostras ambientais ou de consumo humano.

Ftalatos

O termo ftalato é usado para descrever uma classe de compostos químicos derivados do ácido ftálico, como se podem observar alguns exemplos na figura 1.

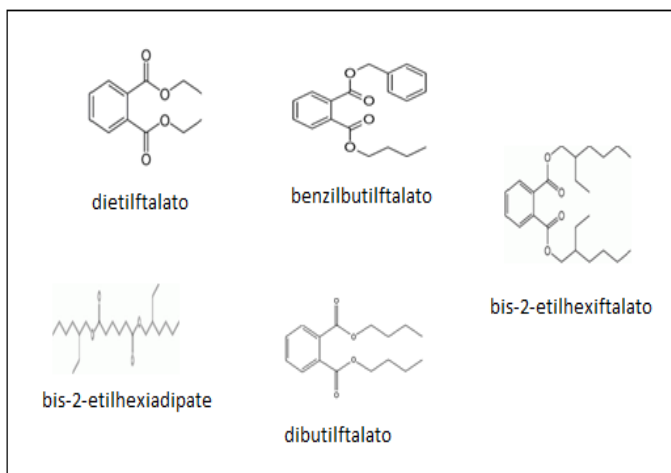


Figura 1. Estrutura química dos compostos: dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato.

Os ftalatos são produtos químicos líquidos, incolores e inodoros, geralmente usados como plastificantes (desde a década de 40) em diversos tipos de plásticos, especialmente em PVC (*Polyvinyl chloride*-cloreto de vinila). Sua produção aumenta proporcionalmente ao crescimento industrial uma vez que o uso de plásticos é uma realidade do mundo moderno e é sabido que o destino final destas substâncias e produtos finais, infelizmente, é sempre o meio ambiente.^[29,30]

As aplicações na indústria estão relacionadas com o comprimento da cadeia do éster. Os de cadeia longa (alta massa molecular) como, por exemplo, DEHP (Di-2-etil-hexilftalato), DINP (Di-isononilftalato), DIDP (*ftalato* de *diisodecilo*) e DPHP (Di-Propilheptilftalato) são usados como aditivos na fabricação de PVC. Podem ser encontrados em cabos, fios, pisos, roupas etc. Já os de cadeias curtas (baixa massa molecular) como DMP (Dimetilftalato), DEP (Dietilftalato), BBzP (Benzilbutilftalato), DBP (Di-butilftalato) e DIBP (Diisobutilftalato) são usados em produtos como tintas, adesivos, utensílios domésticos etc. Como estes compostos não estão ligados quimicamente ao PVC, podem migrar para a atmosfera, água ou alimentos quando estiverem em contato. Outro composto bastante utilizado como plastificante é o DEHA (Di-2-etilhexiladipato), o qual representa, também, uma preocupação toxicológica.^[29]

Os seres humanos são expostos aos ftalatos por ingestão, inalação e exposição cutânea durante a sua vida inteira, inclusive durante desenvolvimento intra-uterino^[31]. Esses compostos podem agir como desreguladores endócrinos e tem mostrado um efeito negativo sobre a função reprodutora em animais.^[31] Os principais órgãos atingidos pela toxicidade dos ftalatos são os rins e os testículos. Os efeitos testiculares produzidos por DEHP em ratos são caracterizados por mudanças histológicas e decréscimo do peso relativo do órgão; e também decréscimo de zinco nas gônadas e aumento de sua excreção via urina. Estes efeitos também podem ser produzidos por DBP, DPP, DHP e seus monoésteres correspondentes.^[30]

Agencia de proteção ambiental dos EUA - EPA estabeleceu uma concentração máxima permitida em água de $6 \mu\text{g L}^{-1}$ para DEHP. Os valores de DP, BBP e DEHP estão na faixa de 0,02 a $0,06 \mu\text{g L}^{-1}$ para água potável, 0,1 a $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para água de superfície, 0,2 a $110 \mu\text{g L}^{-1}$ para água residual tratada e 0,1 a $12 \mu\text{g L}^{-1}$ para água residual industrial tratada.^[32]

Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos- HPAs

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos são uma classe de compostos orgânicos formados por anéis benzênicos.

Alguns HPAs, conforme mostrado na figura 2, são indicados pela EPA como sendo poluentes prioritários e têm sido cuidadosamente estudados devido à sua toxicidade, persistência e predominância no meio ambiente, podendo-se citar: acenaftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, criseno, benzo(k)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno(1,2,3)pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno.^[33,34]

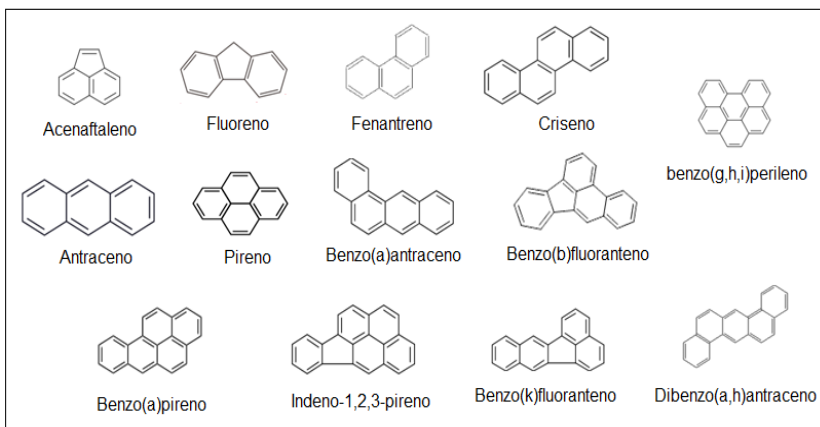


Figura 2. Estrutura química dos compostos: acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, criseno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, indeno-1,2,3-pireno, benzo(k)fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno.

As principais fontes de HPAs são provenientes da combustão incompleta de materiais orgânicos durante processos industriais, bem como durante o processamento de carvão para produção de energia, refinamento de petróleo, produção de alumínio, ferro e aço, aquecimento doméstico, incineração de rejeitos, tráfego de veículos motorizados e fumaça de cigarro. Em ambientes aquáticos, o petróleo também é uma conhecida fonte de HPAs, sendo estimado o derramamento anual de cinco milhões de toneladas de petróleo nos mares de todo o mundo. Além dos derramamentos de óleos, os HPAs provenientes de outras fontes também podem ser introduzidos em ambientes aquáticos através

do transporte atmosférico, lixiviação, deposição pluvial e lançamento de esgotos domésticos.^[35]

Em contato com o homem, os HPAs são lipossolúveis na membrana celular e prontamente absorvidos pelo organismo via inalação, exposição oral e dermal, com posterior acúmulo no tecido adiposo, trazendo diversos danos à saúde. Estudos utilizando animais mostraram que eles podem causar efeitos nocivos à pele, fluido corporal, e na habilidade de combater doenças após longo ou curto tempo de exposição. Algumas pessoas desenvolveram câncer após respirar ou manusear misturas de HPAs por longos períodos de tempo, o que ocorreu também com animais de laboratório que desenvolveram diversos tipos de câncer (câncer de pulmão, de estômago e de pele) quando em contato com estes compostos.^[36]

Até o presente momento não existe na legislação internacional limitação aceita universalmente para os teores de HPAs em água e alimentos. Na falta destes limites legais, alguns países passaram a adotar limites próprios. No Brasil, a Legislação determina para águas envasada teores de benzo(a)pireno inferiores a $0,7 \mu\text{g L}^{-1}$.^[37]

Benzeno, tolueno, etilbenzeno, orto-xileno, meta-xileno e para-xileno - BTEX

Os hidrocarbonetos aromáticos do grupo BTEX são compostos orgânicos voláteis que tem como característica possuir, pelo menos, um anel aromático, conforme mostrado na Figura 3.

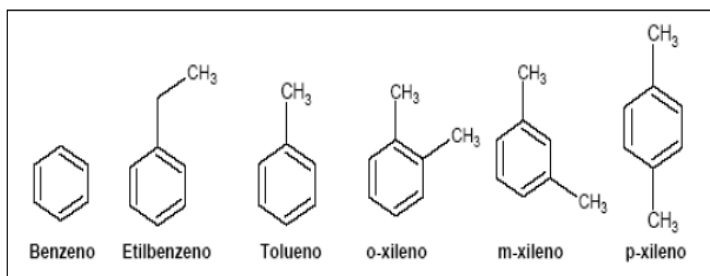


Figura 3. Estrutura química dos compostos: Benzeno, tolueno, etilbenzeno, orto-xileno, meta-xileno e para-xileno.

Os BTEX são compostos orgânicos voláteis, incolores e que possuem elevada pressão de vapor. Ocorrem naturalmente no petróleo e

são largamente utilizados na indústria como solventes e intermediários na fabricação de uma série de produtos químicos. A principal fonte artificial desses compostos para o meio ambiente são as emissões de motores a gasolina e a perda por volatilização durante os processos de abastecimento em postos de combustíveis.^[38]

Os BTEX são substâncias capazes de entrar no meio ambiente (solo e água subterrânea) e causar sérios problemas às pessoas, uma vez que todos eles apresentam efeitos tóxicos agudos e de longo prazo. Esses compostos são extremamente prejudiciais para a saúde humana, mesmo em pequenas concentrações, podendo danificar permanentemente o sistema nervoso central.^[39,40] Diversos são os efeitos causados pela exposição a estes compostos: desorientação, tremores, alterações de humor, irritações dos olhos e garganta, alucinações, convulsões e coma, sendo que a maioria desses compostos é considerada carcinogênica para os seres humanos.^[38]

A Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos classificou estes compostos como poluentes prioritários e as concentrações máximas permitidas para água e água residual diminuíram para um valor muito baixo. De acordo com a Organização Mundial de Saúde, as concentrações máximas permitidas de benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno na água potável são de 10, 700, 300 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente.^[41]

2.2 COMPOSTOS VOLÁTEIS DE MATRIZES ALIMENTÍCIAS

Diferente do gosto, atribuído aos componentes não voláteis (açúcares, sais, ácidos etc.) presentes nos alimentos, as substâncias de aroma são uma mistura complexa de dezenas ou até centenas de compostos voláteis presentes no alimento. Estes compostos estão relacionados à combinação do odor dos alimentos, ou seja, com seu *flavor*.^[42]

A determinação do perfil aromático de uma matriz vegetal ou de alimento é de grande importância para a indústria cosmética e alimentícia, uma vez que é fundamental conhecer a composição volátil e semi-volátil da matriz, a fim de melhorar a qualidade de produtos já existentes ou de inserir novos produtos no mercado.^[18]

O mel e a pimenta vermelha são muito utilizados comercialmente e definir seus perfis aromáticos vem sendo motivo de estudo para diversos autores como pode ser visto na literatura. ^[43-52]

Mel

Mel é o produto alimentício produzido pelas abelhas a partir do néctar das flores ou das secreções procedentes de partes vivas das plantas ou secreções de insetos sugadores de plantas que ficam sobre partes vivas de plantas, que as abelhas recolhem, transformam, combinam com substâncias específicas próprias, armazenam e deixam maturar nos favos da colmeia. É considerado uma mistura complexa de carboidratos, enzimas, ácidos aminados, ácidos, minerais, substâncias aromáticas, vitaminas, pigmentos, ceras e grãos de pólen. Sua composição, cor, aroma e sabor dependem, principalmente, das floradas, das regiões geográficas, do clima e da espécie de abelha. ^[53]

O mel de origem floral pode proceder do néctar das flores de uma única espécie vegetal (méis monoflorais) ou de várias (méis poliflorais). Métodos que permitam a identificação da origem botânica de méis monoflorais têm sido estudados, com ênfase na procura de “marcadores químicos”, ou seja, substâncias presentes no mel capazes de definir a sua florada de origem. ^[54]

No caso do mel, o aroma e o sabor característico são conferidos pela presença dos compostos voláteis com menor ponto de ebulição. Porém, o “envelhecimento” do mel leva a uma perda de seu aroma característico, devido ao aparecimento de compostos como álcoois superiores, quando ocorre contaminação microbiológica, e de compostos furânicos, relacionados à degradação de açúcares presentes no mel.

A tabela 1 mostra alguns dos principais compostos voláteis presentes no mel. ^[49]

Portanto, a análise dos compostos voláteis presentes em méis é de suma importância para seu uso industrial, levando os pesquisadores a desenvolverem inúmeras técnicas que permitam este tipo de análise. ^[54]

Tabela 1. Principais Compostos voláteis presentes no mel.

2-Metilbutanal	α -Linalol
3-Metilbutanal	5-Metilfurfural
Etanol	Aldeído Lilac
2-Pentanona	α -Isofurano
Tolueno	Hotrienol
Dimetildissulfeto	4-Dimetil-3-ciclohexeno-1-acetaldeido
2-Metilbutenal	fenilacetaldeido
2,3-Hexanodiona	1-Nonanol
Heptanal	p-Met-1-en-2-one
3-Metil-1-butanol	4-Dimetil-3-ciclohexano-1-acetaldeido
8-Hidroxilinalol	4-Oxoisofurano
3-Metil-3-buten-1-ol	Naftaleno
Octanal	p-Cimen-8-ol
3-Hidroxi-2-butanona	3-fenilfurano
2-Metil-2-buten-1-ol	Álcool benzílico
6-metil-5-Hepten-2-ona	6-Metil-6-(5-metilfurano-2)heptan-2-ona
Nonanal	2-fenilletanol
Oxido cis-Linalol	p-Menta-1,4(8)-dieno
2,6-Dimetil-1,3,5,7-octatetraeno	Acido heptanoico
1-Octen-3-ol	m-Anisaldeido
Furfural	Ácido Octanoico
Decanal	Ácido nonoico
3,6-Dimetil-2,3,3a,4,5,7	Timol
α -hexahidrobenzofurano	
Benzaldeido	Metil antranilato
Aldeido Lilac	

Pimenta

Pimentas são frutos de plantas pertencentes à família *Solanaceae* de gênero *Capsicum*.

Tabela 2. Principais compostos voláteis presentes na pimenta vermelha.

Pentano	α -pineno
Isooctano	Canfeno
2-metil-tridecano	Sabineno
Tetradecano	β -pineno
Pentadecano	β -mirceno
(E)2,3-metilpenta-2,4-dienol	α - felandreno
5-hexenol	α -terpineno
1-hexanol	p-ocimeno
2-metil-propanal	Limoneno
Butanal	Eucaliptol
3-metil-butanal	(E)-sabineno hidratado
2-metil-butanal	γ -terpineno
Pentanal	1,4(8)-p-mentadieno
3-metil-2-butenal	Linalol
Hexanal	β -terpineol
Heptanal	Terpinen-4-ol
Nonanal	Sesquiterpenos
(E)-2-dodecenal	<i>Patchulane</i>
Cetonas	δ -elemeno
1-penten-3-one	α -copaeno
Metilisopentanoato	β -cariofileno
Tiglato de metila	Humuleno
Hexil 2-metilbutirato	Germacreno
Hexilisovalerato	Cadineno
Alildecanoato	Pirazina
Monoterpenos	2-metoxi-3-isobutilpirazina
δ -3-careno	

Este gênero possui mais de 200 espécies cultivadas em vários locais do mundo, sendo um alimento rico em compostos voláteis, como pode ser observado na tabela 2.^[50]

O interesse em cultivar pimenta é devido sua utilização como temperos em preparações culinárias, principalmente por causa das suas características de aroma, pungência e cor.^[50]

Industrialmente elas são utilizadas como corantes e aromatizantes em molhos, sopas, carnes processadas, bebidas alcoólicas, podendo ser consumidas frescas, secas, em conserva ou na forma de molhos de pimenta. Também tem utilidades terapêuticas podendo ser aproveitadas na medicina devido as suas propriedades anti-microbianas, anti-convulsivas e sedativas.^[55]

Dentre as características sensoriais das pimentas, a pungência tem grande destaque por ser um dos motivos para a aceitação ou rejeição de alimentos flavorizados com esta especiaria. Por este motivo, diversos grupos de pesquisas tem se interessado em desenvolver técnicas a fim de analisar os compostos voláteis desse alimento.^[45,46,50,51,55]

2.3 CROMATOGRAFIA A GÁS

A cromatografia é um método físico-químico de separação e se fundamenta na diferente migração dos analitos de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações entre duas fases: uma fase móvel e uma fase estacionária.

Nesta técnica, a amostra é introduzida no equipamento e arrastada através da fase estacionária (líquida ou sólida) pela fase móvel (líquida ou gasosa). Nesta etapa, os componentes presentes na amostra são distribuídos entre as duas fases, sendo cada um deles retido seletivamente pela fase estacionária, promovendo assim a separação deles.^[56]

Quando a fase móvel utilizada for um gás a técnica é chamada de cromatografia gasosa (CG). Na CG a amostra é vaporizada e introduzida em um fluxo de um gás denominado de fase móvel. Este fluxo de gás com a amostra vaporizada passa por um tubo contendo a fase estacionária na coluna cromatográfica, onde ocorre a separação da mistura.^[57]

A Figura 4 representa um esquema com as principais partes de um cromatógrafo a gás.

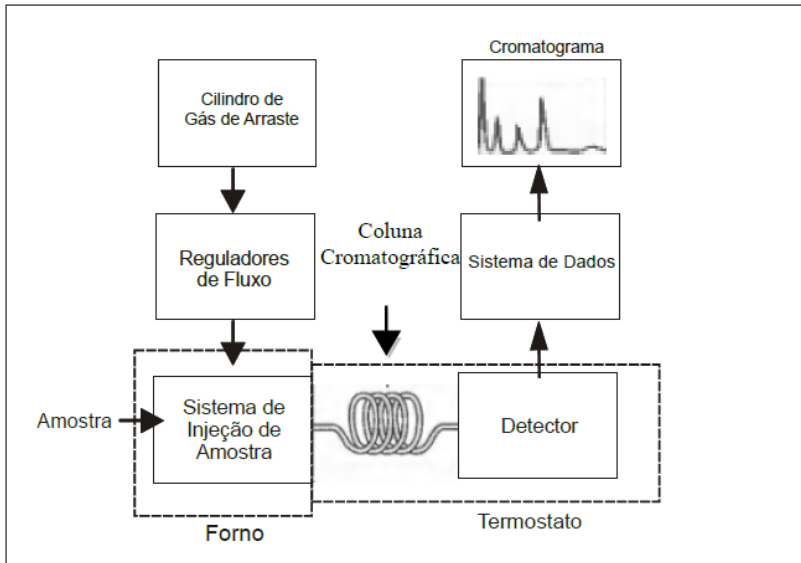


Figura 4. Principais partes de um cromatógrafo a gás. ^[56]

A separação efetiva dos componentes da amostra é efetuada na fase estacionária, ou seja, na coluna cromatográfica. De acordo com o tipo de fase estacionária utilizada na coluna cromatográfica, a cromatografia gasosa pode ser classificada em: gás-sólido ou gás-líquido.

Na cromatografia gás-sólido, a fase estacionária é um sólido com grande área superficial e a separação é baseada nos mecanismos de adsorção das substâncias neste sólido. Já na cromatografia gás-líquido, a fase estacionária é um líquido pouco volátil, podendo estar espalhado ou imobilizado em um suporte sólido ou nas paredes de colunas capilares e a separação é baseada em mecanismos de partição das substância entre a fase gasosa e líquida. ^[57]

Na cromatografia gás-líquido as colunas de enchimento são feitas de vidro ou metal e possuem no seu interior um sólido poroso com grande área superficial que vai servir de suporte à fase estacionária (filme líquido). Já as colunas capilares, mais usadas atualmente, podem ser feitas de sílica fundida, aço inoxidável, vidro ou teflon, conforme pode ser visto na Figura 5. Ao contrário das colunas de enchimento elas não possuem suporte sólido, mas sim um filme líquido que está depositado sobre a superfície interna desta. As fases estacionárias tanto

para colunas empacotadas como para colunas capilares são as mesmas, devendo ser escolhidas conforme a aplicação. ^[58]



Figura 5. Exemplos de colunas capilares: aço inoxidável e sílica fundida.

As colunas capilares são muito mais eficientes do que as colunas de enchimento devido ao seu maior comprimento, ou seja, possui mais pratos teóricos aumentando a sua eficiência, fato este que permite que sejam separações de misturas complexas como frações de petróleo, essências, amostras biológicas, etc. ^[58]

Em cromatografia gás-líquido a fase móvel, é um gás inerte, geralmente nitrogênio, hidrogênio ou hélio, a qual percola desde o injetor até o detector. A fase móvel tem função apenas de arrastar a fração dos analitos que estão na fase gasosa, não interagindo quimicamente com estes. ^[57]

A interação de cada componente da mistura com a fase estacionária pode ser medida através da constante de partição dos analitos entre a fase estacionária e a fase móvel, conforme a Equação 1:

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

Equação 1. Constante de partição K dos compostos entre a fase estacionária e a fase gasosa. Onde: C_{fe} é a concentração do analito na fase estacionária e C_{fm} é a concentração dos analitos na fase móvel.

Portanto, analitos com diferentes constantes de partição K podem ser separados por cromatografia a gás.

A amostra a ser analisada por GC deve conter componentes que sejam vaporizáveis a uma temperatura inferior a 300 °C e que sejam termicamente estáveis. Portanto, substâncias como polímeros, proteínas, materiais particulados não podem ser injetados. Amostras aquosas também não devem ser injetadas diretamente no CG, uma vez que a água hidrolisa a fase estacionária diminuindo sua vida útil.^[18,59]

Portanto, a cromatografia gasosa, como técnica analítica, depende da qualidade da etapa de preparo da amostra, pois praticamente nenhuma matriz pode ser diretamente injetada em um cromatógrafo a gás. A fim de contornar estes problemas, procedimentos de preparo de amostra são necessários, buscando-se isolar e concentrar os analitos em níveis adequados e se obter um nível de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química.

2.4 TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRA

Uma técnica ideal de preparo de amostras deve apresentar características como: facilidade no manuseio, rapidez, baixo custo, ser compatível com a faixa de instrumento de análise e apresentar boa eficiência analítica. As diversas técnicas de extração, usadas no preparo de amostra, se baseiam na partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora.^[60]

Alguns métodos tradicionais de preparo de amostra, como por exemplo, extração líquido-líquido (LLE - Liquid-Liquid Extraction), requerem grandes volumes de solventes orgânicos, têm custo elevado e geralmente são trabalhosos^[61]. Por estes motivos, novas técnicas de preparo de amostra vêm sendo desenvolvidas ao longo dos anos, dentre as quais se podem citar: a extração em fase sólida (SPE- Solid Phase Extraction)^[62], a extração sortiva em barra magnética (SBSE - Stir Bar Sorptive Extraction)^[63], microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME - Dispersive Liquid-Liquid Microextraction)^[64], microextração em fase sólida (SPME - Solid Phase Microextraction)^[61] etc.

Extração em fase sólida

A extração em fase sólida, introduzida no início dos anos 70, é uma técnica de separação líquido-sólido empregada com o propósito de isolar analitos presentes em matrizes complexas.^[61]

A SPE se baseia na partição dos analitos na matriz e no adsorvente sólido. Dentre os adsorventes mais utilizados estão: a sílica modificada quimicamente com os grupos octil e octadecil (C_8 , C_{18}), e copolímeros como o estireno-divinilbenzeno.^[60]

As etapas da extração, conforme mostra a Figura 6, resumem-se basicamente na ativação do sorvente, percolação da amostra para sorção dos analitos, lavagem para eliminação de interferentes e eluição dos analitos para determinação.

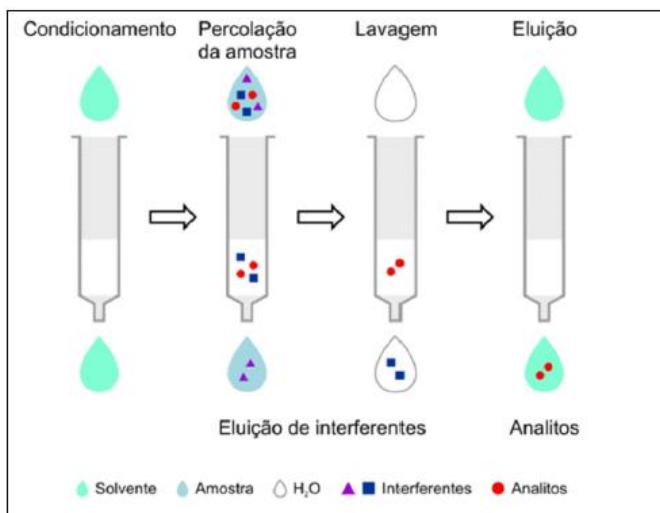


Figura 6. Esquema da extração em fase sólida.^[61]

O uso de solventes específicos, bem como adsorventes específicos, pode proporcionar vantagens à SPE como a extração seletiva.^[60] Porém, esta técnica apresenta algumas limitações como o bloqueio dos poros da fase extratora pelos componentes de matriz complexa, utilização de solventes orgânicos na etapa de eluição, cartuchos extratores com variações analíticas e várias etapas operacionais para sua execução.^[65]

Extração sortiva em barra magnética

A fim de extrair e pré-concentrar compostos orgânicos de amostras aquosas, Baltussen e colaboradores^[70] propuseram a técnica de extração sortiva em barra magnética para o preparo de amostra livre de solvente. O princípio desta técnica baseia-se no equilíbrio de partição dos analitos entre a fase extratora e a amostra, sendo os analitos absorvidos sobre uma camada polimérica que reveste uma barra magnética envolta em uma camada de vidro, conforme mostra a Figura 7.^[61]

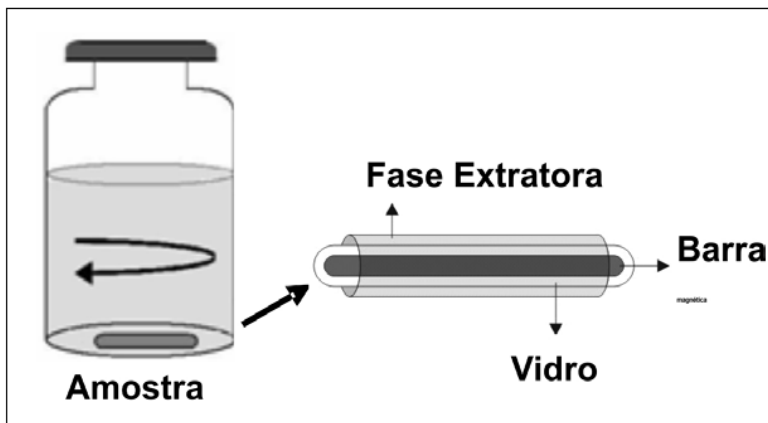


Figura 7. Esquema da extração sortiva em barra magnética.^[61]

Nas extrações por SBSE, a barra de agitação magnética revestida com PDMS pode ser inserida diretamente na amostra ou no *headspace* e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos analitos entre a amostra e a fase extratora. Após a sorção dos analitos na fase extratora, estes podem ser termicamente dessorvidos no injetor de um cromatógrafo a gás.^[61]

Uma desvantagem de se utilizar a técnica da SBSE em relação à SPME é que o seu processo de dessorção é mais lento devido ao fato de se ter um volume maior de fase PDMS (aproximadamente 25 μL) quando comparado com o volume de PDMS (aproximadamente 0,5 μL) das fibras.^[66]

Microextração líquido-líquido dispersiva

A técnica de microextração líquido-líquido dispersiva foi desenvolvida em 2006 por Rezaee e colaboradores^[67]. O conceito fundamental desta técnica é a mistura de uma fase aquosa (5 a 10 mL) contendo os analitos, com alguns microlitros do solvente de extração (apolar, imiscível com água e tipicamente mais denso que a água), e um pequeno volume (0,25 a 1 mL) do solvente de dispersão (um solvente orgânico miscível com água). A função do solvente de dispersão é modificar as densidades da fase aquosa e da fase orgânica permitindo a dispersão do solvente de extração na fase aquosa de modo eficaz e persistente. Ao dividir o volume de solvente de extração num grande número de pequenas gotículas, maximiza-se a interface de contato entre as fases o que facilita a partição dos analitos entre as fases, acelerando o processo de extração.^[67] O processo está representado na Figura 8.

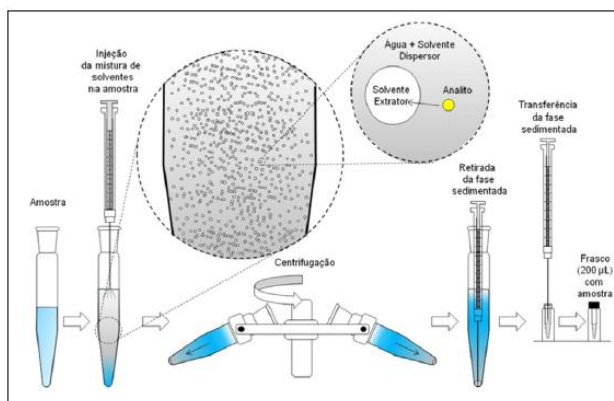


Figura 8. Esquema da microextração líquido-líquido dispersiva.^[61]

As vantagens da DLLME em relação aos métodos convencionais de extração são simplicidade de operação, rapidez, baixo custo, fácil manipulação, alta recuperação, alto fator de enriquecimento, dentre outros.^[61]

Porém esta técnica tem como desvantagem certas limitações quando se trata de matrizes biológicas, devido à interação de componentes da matriz com os solventes orgânicos, não sendo possível, muitas vezes, a obtenção de uma fase sedimentada “limpa” o bastante para ser introduzida no cromatógrafo.^[68]

Microextração em fase sólida

A microextração em fase sólida foi desenvolvida por Pawliszyn e Arthur^[71] no início da década de 90 e tem como princípio a partição do analito entre a amostra e um microcomponente extrator, o qual consiste de uma fase polimérica líquida ou sólida que recobre uma fibra de sílica fundida.^[69]

Esta técnica apresenta inúmeras vantagens em relação aos métodos de extração anteriormente citados, pois ela não requer instrumentação analítica sofisticada, não utiliza solventes orgânicos, permite automação das análises, a reutilização das fibras extratoras, e integra em um único sistema a extração, concentração e introdução da amostra no cromatógrafo.^[65]

A SPME consiste de um amostrador (parecido com uma seringa) com uma fibra de sílica fundida revestida com um fino filme de um polímero ou de um sólido adsorvente (fase extratora), conforme pode ser observado na figura 9.^[65]

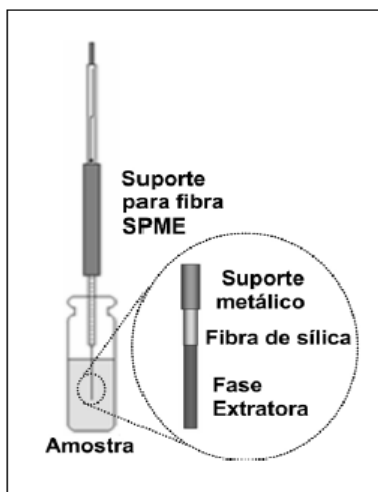


Figura 9. Esquema de uma fibra utilizada na técnica de SPME.

Existem diversas fases extratoras disponíveis, sendo que estas podem conter um polímero orgânico com características de líquido (polidimetilsiloxano, poliacrilato ou polietilenoglicol) ou uma suspensão de um sólido (carvão ativo ou divinilbenzeno) em um dos polímeros líquidos acima citados.

As fibras comerciais têm espessuras dos recobrimentos que variam de 7 a 100 μm e seus volumes de 0,03 a 0,7 μL . Uma vez que o volume de amostra tipicamente utilizado é de 1 a 20 mL, a razão de fases fica geralmente na faixa de 1000 a 20000, caracterizando a SPME como uma microtécnica^[18].

Em SPME dois modos de extração podem ser usados: direto e *headspace*, conforme pode ser observado na Figura 10.

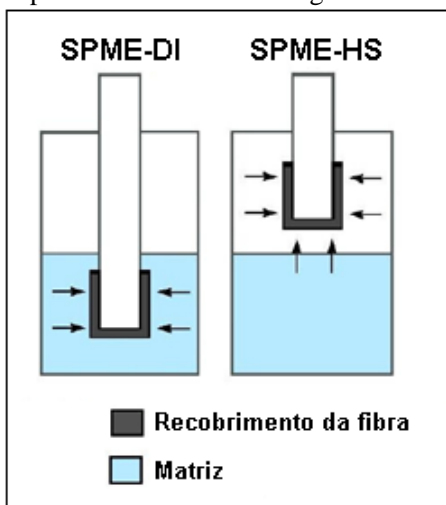


Figura 10. Esquema da microextração em fase sólida no modo direto (DI-SPME) e no modo headspace (HS-SPME).

A escolha do modo vai depender da matriz da amostra e da volatilidade dos analitos presente nela. Na extração direta, o recobrimento da fibra é exposto diretamente na amostra e os analitos são transferidos para o recobrimento da fase extratora. Já no modo *headspace*, a fibra é inserida acima da superfície da amostra e os analitos são, também, transferidos para o recobrimento da fibra.^[72]

Diversos são os fatores que podem influenciar na velocidade e/ou a quantidade de analito extraído pela fibra em SPME. Dentre esses fatores podem ser citados: o tipo de recobrimento da fibra, modo de extração, velocidade de agitação da amostra, massa ou volume de amostra, tempo e temperatura de extração, pH da amostra, dentre outros.

Em uma extração por SPME as moléculas do analito têm que se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento da fibra e, para isto, resistências a transferências de massa devem ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição do analito, entre a fase extratora e o

meio que a envolve. ^[72] Portanto, esta técnica se baseia na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre elas. ^[18] Estes aspectos serão tratados separadamente, para cada um dos modos.

Aspectos termodinâmicos modo DI-SPME

Um exemplo de um sistema bifásico ideal simples é o de uma fibra mergulhada em uma matriz aquosa. Na SPME no modo direto (sistema bifásico) ocorre a partição do analito entre a fase estacionária (revestimento da fibra) e o meio no qual o analito se encontra (fase aquosa).

Teoricamente, antes da extração o sistema consiste de n_0 moles do analito, com uma concentração C_0 , em um volume V_m da matriz. Após a extração os n_0 moles do analito se distribuem entre as fases: n_m^e na matriz aquosa no equilíbrio e n_f^e na fibra no equilíbrio. A conservação de massa no processo é dada por:

$$n_0 = n_m^e + n_f^e \quad (2)$$

Equação 2. Conservação de massa para modo DI-SPME.

Pode-se observar, através do esquema abaixo, a distribuição dos analitos pelas duas fases e a constante de partição:



Equação 3. Constante de partição do analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra.

O balanço de massa para esse sistema bifásico pode ser visto através da Equação 4:

$$n_0 = n_m^e + n_f^e = C_0 V_m \quad (4)$$

Equação 4. Balanço de massa dos analitos em um sistema bifásico.

Onde: n_o = quantidade inicial de analito presente na matriz da amostra; n_m^e = quantidade de analito restante na matriz da amostra no equilíbrio; n_f^e = quantidade de analito no recobrimento da fibra no equilíbrio; C_o = concentração de analito na amostra; V_m = volume ou massa de amostra.

Utilizando as equações 3 e isolando n_f^e em função de C_o , chega-se a seguinte relação:

$$N_f^e = \frac{K_{fm} V_f C_o V_m}{K_{fm} V_f + V_m} \quad (5)$$

Equação 5. Relação entre n_f e concentração inicial do analito na amostra para modo DI-SPME.

Considerando que o volume da amostra V_m tem um valor muito superior ao volume da fase extratora V_f e ao valor da constante de partição K_{fm} a equação 5 pode ser resumida a:

$$N_f^e = K_{fm} V_f C_o \quad (6)$$

Equação 6. Relação resumida entre n_f e C_o , para modo DI-SPME.

Como se pode observar na equação 6, a quantidade extraída pela fibra (n_f^e) é diretamente proporcional à concentração inicial do analito na matriz da amostra (C_o), fato este que possibilita análises quantitativas. Pode-se observar, também, que a quantidade extraída depende diretamente da afinidade do analito pela fase extratora (K_{fm}).

A constante de partição K_{fm} esta relacionada com a difusão do analito através da fibra. Uma vez que a sorção é um processo exotérmico, um aumento na temperatura leva a uma diminuição da quantidade de analito extraída. Porém, esse aumento na temperatura leva a um aumento no coeficiente de difusão do meio, uma vez que a viscosidade diminui com o aumento da temperatura (como pode ser visto através da relação de Einstein-Stokes, equação 7) o que levaria a uma quantidade maior de analito extraída.

$$D = \frac{kT}{6\pi \mu r} \quad (7)$$

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

Onde: D é o coeficiente de difusão; r é raio molecular de uma substância; μ viscosidade do meio difusor; T é temperatura absoluta, k é a constante de Boltzmann ($1,3806503 \times 10^{-23} \text{m}^2 \text{kg s}^{-2} \text{K}^{-1}$).

Portanto, pode-se observar que a temperatura afeta de maneira complicada o equilíbrio. Outro fator importante a se levar em consideração diz respeito à velocidade de extração, a qual não foi relacionada em nenhuma das equações anteriores, mas que também precisa ser avaliada.

Aspectos cinéticos modo DI-SPME

A quantidade máxima de analito extraída em SPME ocorre no tempo de equilíbrio e esse tempo depende do modo com que a SPME é utilizada. A extração via SPME com a amostra mantida em condição estática requer longos tempos de exposição, enquanto que tempos de equilíbrio relativamente curtos são alcançados quando a amostra aquosa está sujeita à agitação, uma vez que com a agitação o tempo necessário para atingir o equilíbrio diminui, pois se aumenta a difusão dos analitos em direção à fibra.

Como um dos principais objetivos da SPME, assim como de todos os outros procedimentos de preparo de amostras, é realizar extrações do modo mais rápido possível, o conhecimento dos aspectos cinéticos da técnica pode sugerir modos de melhorar a eficiência da extração.

Em uma extração com SPME no modo direto, Figura 11, as seguintes etapas ocorrem:

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

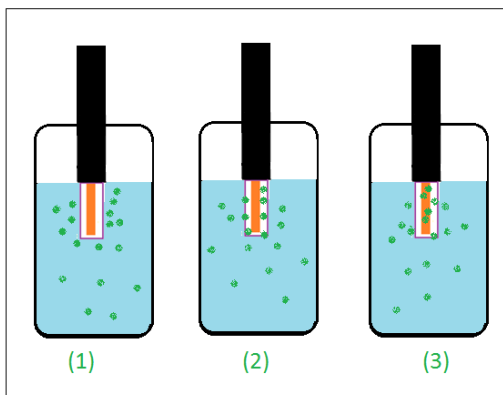


Figura 11. Etapas de uma extração por SPME no modo direto: 1) Convecção dos analitos até as proximidades da fase extratora; 2) Difusão dos analitos pela camada estática que envolve a fibra; 3) Difusão dos analitos através da fase extratora.

As etapas 1 e 2 podem ser rápidas, se amostra estiver sendo agitada. Já a etapa 3 pode ser lenta e o tempo de extração ser dependente dela. Os fatores que afetam esta etapa são a temperatura e a viscosidade do meio difusor.

Uma vez que o aumento de temperatura favorece o aumento do valor do coeficiente de difusão, segundo a relação de Einstein-Stokes (Equação 7), pode-se concluir que se a etapa de evaporação dos analitos da matriz da amostra ou a difusão desses pelo recobrimento da fibra for a etapa lenta, um aumento na temperatura favorece um aumento na velocidade de transferência de massa da matriz da amostra em direção ao recobrimento da fibra. Porém, esse aumento na temperatura leva a uma perda do analito sorvido, uma vez que o processo de sorção é exotérmico.

Percebe-se então que a temperatura de extração influencia de maneira contrária à termodinâmica (negativamente) e cinética do processo (positivamente). Por este motivo a temperatura de extração precisa ser cuidadosamente estudada e otimizada de maneira a se conseguir um compromisso entre velocidade de extração e quantidade extraída pela fibra.

Aspectos termodinâmicos modo HS-SPME

Um exemplo de um sistema trifásico ideal simples é o de uma fibra mergulhada numa matriz aquosa com um *headspace*. Teoricamente, antes da extração o sistema consiste de n_0 moles do analito, com uma concentração C_0 , em um volume V_m da matriz. Após a extração os n_0 moles do analito se distribuem entre as fases, isto é, n_m^e na matriz aquosa no equilíbrio, n_h^e no *headspace* no equilíbrio e n_f^e na fibra no equilíbrio. A conservação de massa no processo é dada por:

$$n_0 = n_m^e + n_h^e + n_f^e \quad (8)$$

Equação 8. Conservação de massa para modo HS-SPME.

Pode-se observar, através do esquema abaixo, a distribuição dos analitos pelas três fases e as respectivas constantes de partição:



Equação 9. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o headspace, modo HS-SPME.

Equação 10. Constante de partição dos analitos entre o headspace e o recobrimento da fibra, modo HS-SPME.

Equação 11. Constante de partição dos analitos entre a matriz e o recobrimento líquido da fibra, modo HS-SPME.

O balanço de massa para esse sistema trifásico pode ser visto na Equação 12:

$$n_0 = n_m^e + n_h^e + n_f^e = C_0 V_m \quad (12)$$

Equação 12. Balanço de massa dos analitos em um sistema trifásico modo HS-SPME.

Onde: n_0 = quantidade inicial de analito presente na matriz da amostra;
 n_m^e = quantidade de analito restante na matriz da amostra no equilíbrio;

n_h^e = quantidade de analito em fase gasosa (no *headspace*) no equilíbrio;
 n_f^e = quantidade de analito no recobrimento da fibra no equilíbrio; C_o =
 concentração de analito na amostra; V_m = volume ou massa de amostra.

Utilizando as equações 9, 10 e 11 e isolando n_f^e em função de C_o , e sendo V_f o volume do recobrimento da fibra e V_h o volume de *headspace* chega-se a seguinte relação:

$$n_f^e = \frac{C_o V_m V_f K_{fh} K_{hm}}{V_m + V_h K_{hm} + V_f K_{fh} K_{hm}} \quad (13)$$

Equação 13. Relação entre n_f e C_o , modo HS-SPME.

Como se pode observar na Equação 13, a quantidade extraída pelo recobrimento da fibra (n_f^e) é diretamente proporcional à concentração inicial do analito na matriz da amostra (C_o), fato este que possibilita análises quantitativas. Pode-se observar, também, que fatores como o volume de amostra, do *headspace* e da fase extratora interferem na quantidade extraída pela fibra.

Um fator importante a ser levado em consideração é de que as constantes de equilíbrio K_{fh} e K_{hm} , as quais são dependentes da temperatura. A constante K_{hm} diz respeito à evaporação do analito da matriz da amostra, e, portanto, o equilíbrio pode ser deslocado para a direita pelo aumento da temperatura de extração (processo endotérmico). Já o equilíbrio de sorção do analito pela fibra é um processo exotérmico, e um aumento da temperatura leva a uma diminuição da quantidade extraída em condições de equilíbrio. Ou seja, a temperatura afeta de maneira complicada o equilíbrio final.

Outro fator importante a ser considerado é o intervalo de tempo necessário para atingir o equilíbrio que não está relacionado na equação 13. Este intervalo de tempo, fundamental do ponto de vista experimental, depende das dificuldades de transferência de massa no sistema. Portanto, além dos aspectos termodinâmicos, os aspectos cinéticos da extração por HS- SPME devem ser avaliados.

Aspectos cinéticos modo HS-SPME

Em uma extração com SPME a partir do *headspace*, conforme Figura 12, as seguintes etapas ocorrem:

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

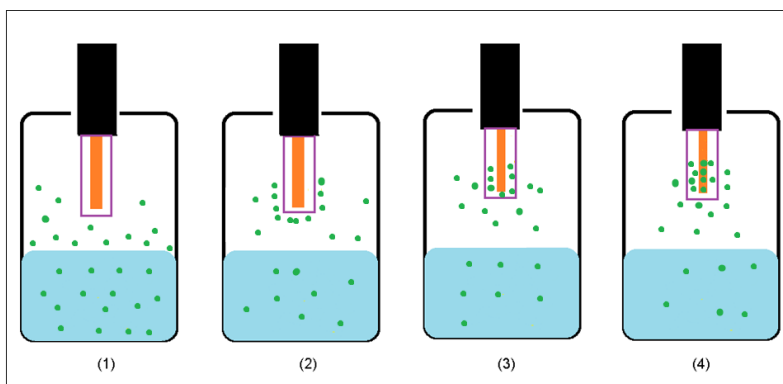


Figura 12. Etapas de uma extração por SPME no modo headspace: 1) Evaporação dos analitos da amostra; 2) Convecção dos analitos até as proximidades da fase extratora; 3) Difusão dos analitos pela camada estática que envolve a fibra; 4) Difusão dos analitos através da fase extratora.

As etapas 2 e 3 são rápidas e possuem coeficientes de difusão cerca de três ordens de grandeza maiores do que os coeficientes de difusão das fases condensadas, uma vez a difusão ocorre em fase gasosa.

As etapas 1 ou 4 podem ser etapas lentas, e aí o tempo de extração ser dependente delas. Os fatores que afetam a etapa 1 são: volatilidade dos analitos (depende da temperatura), complexidade da amostra (efeito de matriz) e velocidade de agitação. Já os fatores que influenciam a etapa 4 são: temperatura e viscosidade do meio difusor.

Uma vez que o aumento de temperatura favorece o aumento do valor do coeficiente de difusão, segundo a relação de Einstein-Stokes (Equação 7), pode-se concluir que se a etapa de evaporação dos analitos da matriz da amostra ou a difusão desses pelo recobrimento da fibra for a etapa lenta, um aumento na temperatura favorece um aumento na

velocidade de transferência de massa da matriz da amostra em direção ao recobrimento da fibra.

O processo de transferência de massa da amostra para o recobrimento da fibra, em HS-SPME, segue uma cinética de primeira ordem, conforme Equação 14, sendo que o parâmetro a é uma função do coeficiente de transferência de massa no recobrimento da fibra m_f , da área superficial do recobrimento da fibra A_f , da taxa de evaporação dos analitos da amostra para o *headspace* k , das constantes de partição K_{fh} e K_{hm} , e dos volumes de fase extratora, de *headspace* e de matriz V_f , V_h e V_m .

$$n_t = n_\infty [1 - e^{-at}] \quad (14)$$

Equação 14. Quantidade extraída pela fibra n_t em função do tempo de extração t .

Onde: n_t é a quantidade de analito extraída pelo recobrimento no tempo t , n_∞ é a quantidade de analito extraído pela fibra no equilíbrio (em $t=\infty$) e a é a constante de velocidade do processo de transferência de massa (em min^{-1}).

O parâmetro a pode ser definido pela Equação 15 (quando a etapa lenta é a difusão pelo recobrimento líquido da fibra) ou pela Equação 16 (quando a etapa lenta é a evaporação dos analitos da matriz).

$$a = \frac{2A_fm_f (K_{hf}K_{hm}V_f + K_{hm}V_h + V_m)}{K_{hm}V_fV_h + V_fV_m} \quad (15)$$

Equação 15. Constante de velocidade a quando a difusão dos analitos pela fibra é a etapa lenta.

$$a = \frac{kV_h (K_{hf}K_{hm}V_f + K_{hm}V_h + V_m)}{K_{hf}V_fV_m} \quad (16)$$

Equação 16. Constante de velocidade a quando evaporação dos analitos da matriz é a etapa lenta.

Para analitos bastante voláteis, onde o equilíbrio é atingido mais rapidamente, utiliza-se a Equação 15. Já a Equação 16 aplica-se a analitos semi-voláteis e pouco voláteis, e a quantidade extraída pelo recobrimento n_f em função do tempo pode ser simplificada pela Eq. 17.

$$n_t = k K_{hm} V_h C_o t \quad (17)$$

Equação 17. N_f como função do tempo de extração quando o parâmetro a é dado pela Eq. 16.

Uma vez que a quantidade de analito extraída é linearmente proporcional ao tempo de extração, a extração no equilíbrio se torna uma tarefa demorada para analitos pouco voláteis. Uma alternativa é aumentar a temperatura de extração, o que aumenta a volatilidade dos analitos, e com isso a etapa lenta passa a ser a difusão do analito pela fibra permitindo que o equilíbrio seja atingido mais rapidamente. Porém, uma menor quantidade de analito vai ser extraída, pois ocorre a dessorção de analitos já sorvidos, visto que a sorção dos analitos pelo recobrimento é um processo exotérmico.

Percebe-se então que a temperatura de extração influencia de maneira contrária à termodinâmica (negativamente) e cinética do processo (positivamente). Por este motivo, em SPME, a temperatura de extração precisa ser cuidadosamente estudada e otimizada de maneira a se conseguir um compromisso entre velocidade de extração e quantidade extraída pela fibra.

Porém, quando a matriz é muito complexa ou quando se tem grupos de analitos com polaridades muito diferentes o uso de apenas uma temperatura compromisso, bem como o uso de apenas um modo de extração (direto ou *headspace*) acaba prejudicando a extração de um ou outro grupo de analito.

A fim de contornar estes problemas sugeriu-se, pela primeira vez, a utilização de dois modos e duas temperaturas diferentes no mesmo procedimento de extração, onde a fibra seria exposta, primeiramente, no modo direto a uma temperatura mais elevada durante certo tempo (onde os analitos menos voláteis seriam preferencialmente extraídos) e em seguida, a fibra seria exposta no *headspace* em uma temperatura mais baixa (onde os analitos mais voláteis seriam preferencialmente extraídos), até o tempo total de extração.

Já para matrizes muito complexas, onde somente o modo *headspace* fosse utilizado, sugeriu-se pela primeira o uso de três temperaturas diferentes no mesmo procedimento de extração para análise simultânea de compostos com volatilidades bastante distintas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Propor novas abordagens de otimização com objetivo melhorar o desempenho da técnica de SPME em relação à quantidade extraída de analito comparativamente aos procedimentos convencionalmente adotados, representando assim novidades metodológicas no campo da Química Analítica voltada ao preparo de amostras.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Desenvolver uma nova metodologia de extração para determinação de HPAs, BTEX e ftalatos em matrizes aquosas utilizando SPME no modo direto e *headspace*, utilizando duas temperaturas no mesmo procedimento de extração, de maneira a maximizar a quantidade extraída de compostos com volatilidades distintas.

Desenvolver um método de extração de compostos voláteis em matrizes complexas como mel e pimenta vermelha utilizando o dispositivo comercial de SPME, avaliando o uso de três diferentes temperaturas de extração no mesmo procedimento por HS-SPME, de maneira a maximizar a quantidade extraída dos compostos que possuem volatilidades bastante diferentes.

4 CAPITULO 1

Determinação de HPAs e BTEX por DI-HS-SPME utilizando uma nova estratégia de otimização com diferentes temperaturas de extração no mesmo procedimento

4.1 RESUMO

Este estudo propõe uma nova abordagem de otimização para a extração simultânea de BTEX e HPAs de matrizes aquosas utilizando a microextração em fase sólida e detecção por GC-MS. A otimização da metodologia proposta foi feita através de planejamentos multivariados e foi dividida em etapas: a primeira focada na escolha do tipo de fibra: polidimetilsiloxano (PDMS), Polodimetilsiloxano/Divinilbenzeno (PDMS/DVB) e carboxen/ Divinilbenzeno/ Polodimetilsiloxano (CAR/DVB/PDMS). Na segunda e terceira etapa as técnicas DI-SPME e HS-SPME, as quais são baseadas em apenas uma temperatura de extração, foram otimizadas separadamente. As variáveis escolhidas neste estudo foram: quantidade de sal (0 a 9 g), tempo total (30 a 120 min) e temperatura de extração (10 a 80 °C), para ambas metodologias. As respostas obtidas nos planejamentos foram divididas em dois grupos levando-se em consideração à diferença de polaridade/volatilidade dos compostos analisados. Tendo em vista as diferentes condições ótimas de tempo e temperatura para cada grupo, uma nova metodologia baseada no uso de duas temperaturas e dois modos de extração no mesmo procedimento foi proposta. Nesta etapa uma otimização da porcentagem de tempo no *headspace* (0 a 100 %), quantidade de sal (0 a 9 g) e tempo total (10 a 120 min) foi realizada. As condições ótimas de extração obtidas foram 48 min à uma temperatura da amostra de 80 °C seguido por mais 32 min à 10 °C. O método proposto foi comparado com os dois métodos convencionais otimizados com base em uma única temperatura de extração (modo HS-SPME 80 min de extração a 60 °C) e (modo DI-SPME 80 min de extração a 50 °C).

4.2 PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

As etapas de otimização foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-14B da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com detector por ionização em chama e coluna Rtx-5(30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm f.e.) da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA). A programação do forno da coluna foi: 40 °C (10 min), 20 °C min^{-1} até 80 °C (0 min), 6 °C min^{-1} até 300 °C (10 min). As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas em 260 e 310 °C, respectivamente. Para validação da metodologia, utilizou-se um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 plus da Shimadzu, coluna Rtx-5MS(30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm f.e.) da Restek. A programação do forno da coluna foi: 35 °C (10 min), 20 °C min^{-1} até 80 °C (0 min), 6 °C min^{-1} até 300 °C (10 min) e temperatura do injetor 260 °C. Dois banhos de água (Microquímica, Florianópolis, Brazil) foram utilizados para controlar as diferentes temperaturas da amostra.

Reagentes e soluções

A Solução estoque de BTEX 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (benzeno, tolueno, etilbenzeno e xileno) da Sigma-Aldrich (Milwaukee, WI, USA) foi preparada pela diluição da ampola em metanol. A solução estoque de HPA 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (acenaftaleno, fluoreno, fenantreno, criseno, antraceno, pireno, benzo(a)antraceno, benzo(b)fluoranteno, benzo(g,h,i)perileno, benzo(a)pireno, indeno-1,2,3-pireno, benzo(k)fluoranteno e dibenzo(a,h)antraceno) da Supelco (Bellefonte, PA, USA) foi preparada pela diluição da ampola em acetona. Uma solução estoque contendo as duas classes de compostos foi preparada na concentração de 66,66 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O cloreto de sódio utilizado foi obtido da Nuclear (Diadema, São Paulo, Brazil).

Otimização das fibras

As extrações para a otimização das diferentes fibras (PDMS 100 μm , PDMS/DVB 65 μm e DVB/CAR/PDMS 50/30 μm) foram realizadas no modo DI-HS-SPME, com 25 mL de solução com concentração dos analitos de 8 $\mu\text{g L}^{-1}$ e 2 g de NaCl. A temperatura de extração foi de 70 °C durante 45 min no modo direto, seguido de 10 °C

durante 15 min em *headspace*, com agitação constante. As determinações foram feitas por GC-MS.

Otimização modo HS-SPME

As variáveis temperatura (10-80 °C), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas apenas no modo *headspace*, com 25 mL de solução, concentração dos analitos de 200 µg L⁻¹, com agitação constante e detecção por GC-FID.

Otimização modo DI-SPME

As variáveis temperatura (10-80 °C), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas apenas no modo direto, com 25 mL de solução, com agitação constante, concentração dos analitos de 200 µg L⁻¹ e detecção por GC-FID.

Otimização modo DI-HS-SPME

As variáveis porcentagem de tempo no *headspace* (0-100 %), tempo total de extração (10-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas no modo direto (80 °C) e *headspace* (10 °C) no mesmo procedimento de extração, com 25 mL de solução, concentração dos analitos de 200 µg L⁻¹, com agitação constante e detecção por GC-FID.

Comparação das metodologias

Para a comparação das metodologias utilizou-se 25 mL de solução, concentração dos analitos de 200 µg L⁻¹, com agitação constante e um tempo total de 80 min para cada um dos modos: DI-SPME: 80 min no modo direto à 50 °C e 6 g de sal; HS-SPME: 80 min no *headspace* à 60 °C e 4 g sal; DI-HS-SPME: 48 min à 80 °C no modo direto, seguido de 32 min à 10 °C no modo *headspace*, com 6 g de sal (conforme Figura 13). A detecção foi feita por GC-FID.

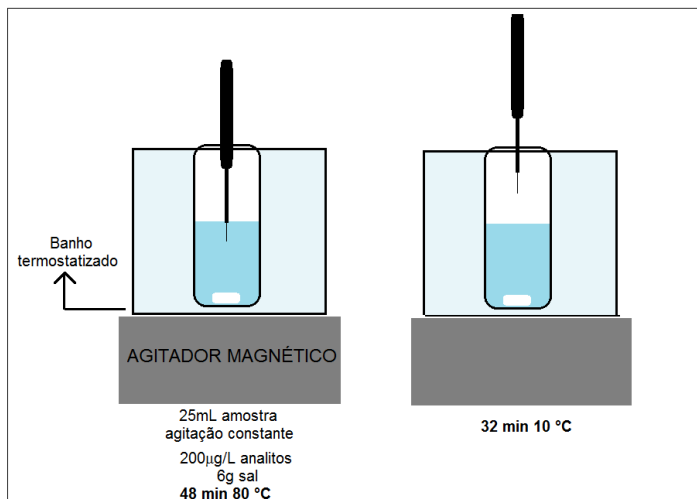


Figura 13. Esquema da extração de BTEX e HPAs de matrizes aquosas através da metodologia DI-HS-SPME.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho foi realizado em 5 etapas: a primeira focada na otimização do tipo de fibra. Na segunda e terceira etapa foram otimizadas as variáveis tempo de extração, temperatura e quantidade de sal para os modos convencionais DI-SPME e HS-SPME separadamente. Na quarta etapa uma nova estratégia foi proposta utilizando simultaneamente DI-HS-SPME com diferentes temperaturas de extração em cada modo. E como ultima etapa, uma comparação entre o método proposto e as metodologias convencionais foi realizada.

Otimização da fibra

A sensibilidade de um método de SPME depende de diversos fatores, sendo um deles a escolha correta do revestimento da fibra de acordo com o composto de interesse. Devido ao fato dos analitos estudados (HPA e BTEX) possuírem polaridades bastante distintas, a otimização do tipo de fibra foi de extrema importância para que todos os compostos, sendo eles polares ou apolares, fossem extraídos sem que nenhuma das classes acabasse sendo prejudicada.

As fibras escolhidas para este estudo foram PDMS 100 µm, PDMS/DVB 65 µm e DVB/CAR/PDMS 50/30 µm. Na Figura 14 estão

representados os comportamentos dos diferentes tipos de fibras em relação à extração dos analitos.

Como pode ser visto, os compostos mais voláteis (do 1 ao 5) foram melhores extraídos pela fibra de DVB/CAR/PDMS. Uma possível explicação seria devido à porosidade do *Carboxen*, uma vez que os analitos mais voláteis se difundem mais facilmente pela fibra, o que proporciona uma extração mais eficiente. O caso contrário se observa para os compostos menos voláteis (do 11 ao 16), os quais são melhores retidos pela fibra de PDMS devido à sua baixa polaridade e afinidade por este tipo de analito. Por fim, como um compromisso entre os analitos mais voláteis e menos voláteis, a fibra de PDMS/DVB foi a que apresentou o resultado mais satisfatório.

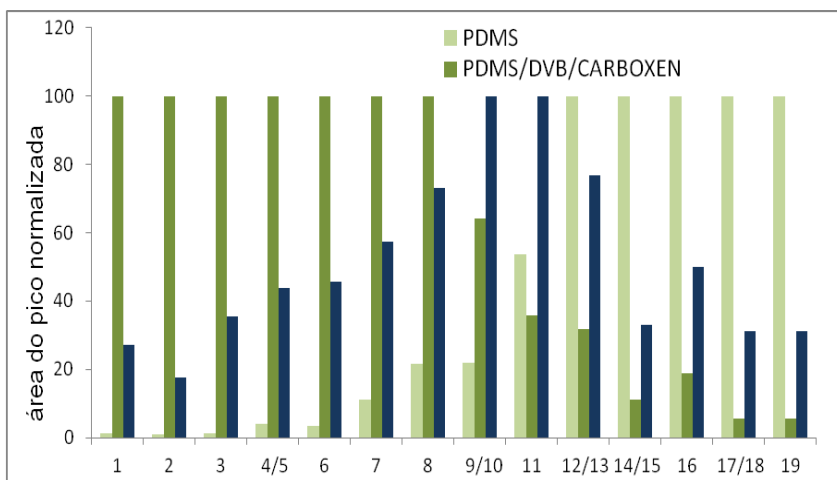


Figura 14. Comparação das respostas obtidas na otimização das fibras: PDMS, DVB/CAR/PDMS, PDMS/DVB para análise de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME. Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7-acenaftaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11-pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno.

Pode-se concluir que o sendo o DVB menos poroso que o *Carboxen*, ele acaba conferindo melhores resultados aos analitos menos voláteis. Já os analitos mais voláteis são preferencialmente extraídos

pela fibra de PDMS/DVB quando comparado à que contem apenas PDMS, devido a certa porosidade do DVB.

Por fim, como um compromisso entre os HPAs e BTEX, a fibra de PDMS/DVB foi selecionada para o desenvolvimento da metodologia.

Otimização do tempo de extração, temperatura de extração e quantidade de sal para o modo DI-SPME

O estudo da temperatura da amostra, do tempo de extração e da quantidade de sal é de grande importância devido ao fato de que esses parâmetros podem influenciar na difusão dos analitos através do recobrimento da fibra. Por este motivo uma otimização multivariada, Planejamento fatorial fracionado, foi realizada para o estudo das variáveis e suas interações.

Na otimização, as variáveis estudadas e suas faixas foram: temperatura de extração (10-80 °C), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g). O planejamento dos experimentos pode ser visto através da Tabela 3.

Tabela 3. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo DI-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	Temperatura extração (°C)	Massa sal (g)
1	30	10	0
2	30	45	9
3	30	80	4,5
4	75	10	9
5	75	45	4,5
6	75	80	0
7	120	10	4,5
8	120	45	0
9	120	80	9

A Figura 15 ilustra as respostas obtidas para o conjunto de analitos. Pode-se observar que um tempo maior que 60 minutos, 50 °C de temperatura e 6 g de sal devem ser utilizados como parâmetros para extração compromisso dos compostos por DI-SPME, uma vez que todos os analitos do mais volátil ao menos volátil são extraídos no mesmo modo com a mesma temperatura.

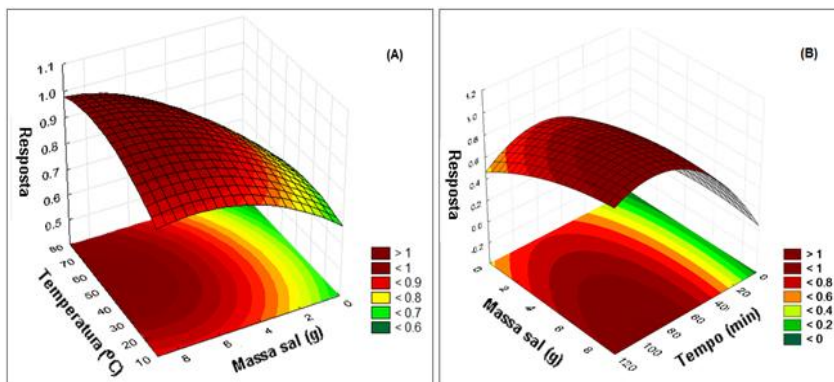


Figura 15. Superfície resposta (A) temperatura da amostra *versus* massa de sal e (B) tempo de extração *versus* massa sal; obtida na extração de BTEX e HPAs por DI-SPME.

Porém, no intuito de demonstrar o diferente comportamento dos analitos frente à temperatura de extração os resultados foram divididos em dois grupos distintos: o primeiro grupo contendo os compostos mais voláteis BTEX (Figura 16A) e o segundo grupo contendo os compostos menos voláteis HPAS (Figura 16B). Através da Figura 16 é possível observar que as condições ótimas de tempo e temperatura de extração são uma função da volatilidade/polaridade dos analitos. Para o grupo 1 observa-se que temperaturas mais baixas (em torno de 10 °C) levam a melhores respostas quando comparado a temperaturas mais altas (em torno de 80 °C). Já para os analitos do grupo 2, temperaturas mais elevadas acarretam em um aumento do sinal analítico.

De maneira geral, observa-se que as condições ótimas de extração (principalmente a temperatura) são bastante diferentes e que qualquer condição compromisso compromete a eficiência de extração para um ou outro grupo de analitos.

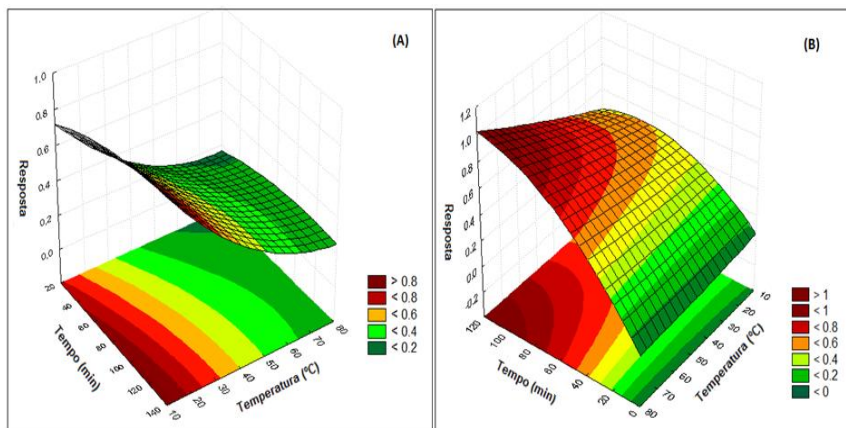


Figura 16. Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para (A) Grupo 1- benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-xileno, m-xileno, o-xileno. (B) Grupo 2 - acenaftaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, cr criseno, benzo(K)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno-1-2-3-pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno; (Modo DI-SPME).

Com base nestes resultados, percebeu-se a necessidade do uso de mais de uma temperatura no mesmo procedimento de extração, a fim de que todos os analitos fossem extraídos com a maior eficiência possível.

Otimização do tempo de extração, temperatura de extração e quantidade de sal para o modo HS-SPME

O estudo da temperatura e tempo de extração e da quantidade de sal por HS-SPME foi realizado através uma otimização multivariada, Planejamento fatorial fracionado, sendo que as variáveis e suas faixas estudadas foram: temperatura de extração (10- 80 °C), tempo de extração (30- 120 min) e quantidade de sal (0- 9 g). O planejamento dos experimentos pode ser visto através da Tabela 4.

Tabela 4. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo HS-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	Temperatura extração (°C)	Massa sal (g)
1	30	10	0
2	30	45	9
3	30	80	4,5
4	75	10	9
5	75	45	4,5
6	75	80	0
7	120	10	4,5
8	120	45	0
9	120	80	9

A Figura 17 ilustra as respostas obtidas para o conjunto de analitos. Pode-se observar que um tempo maior que 60 minutos, temperatura de 60 °C e 4 g de sal devem ser utilizados como parâmetros para extração simultânea dos compostos por HS-SPME.

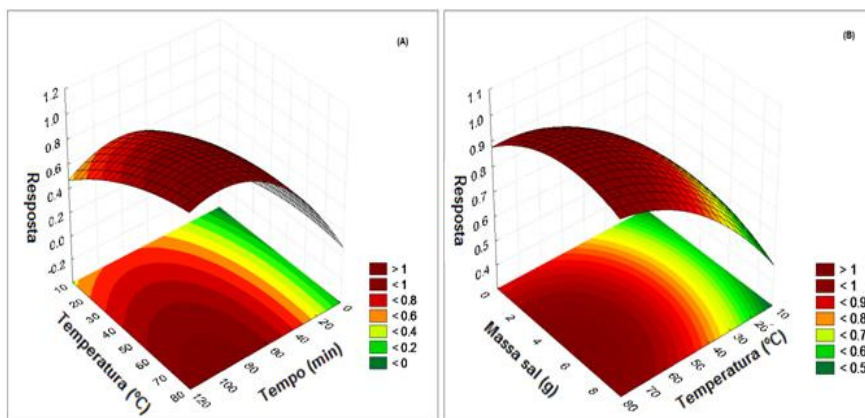


Figura 17. Superfície resposta (A) tempo de extração *versus* temperatura de extração e (B) temperatura de extração *versus* massa de sal, obtidas na extração de BTEX e HPAs por HS-SPME.

Novamente, no intuito de demonstrar o diferente comportamento dos analitos frente à temperatura de extração os resultados foram divididos em dois grupos distintos: o primeiro grupo contendo os compostos mais voláteis e o segundo grupo contendo os compostos

menos voláteis, gerando-se duas superfícies respostas conforme pode ser visto na Figura 18.

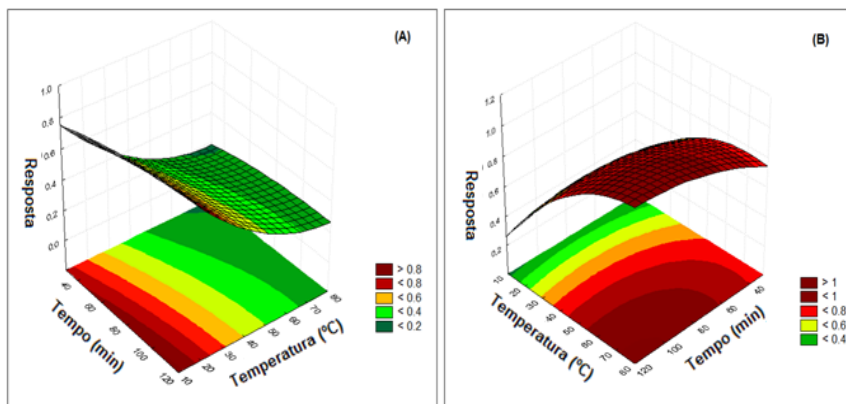


Figura 18. Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para (A) Grupo 1- benzeno, tolueno, etilbenzeno, p-xileno, m-xileno, o-xileno. (B) Grupo 2 - acenafthaleno, fluoreno, antraceno, fenantreno, pireno, benzo(a)antraceno, , criseno, benzo(K)fluoranteno, benzo(a)pireno, benzo(b)fluoranteno, indeno-1-2-3-pireno, dibenzo(a,h)antraceno, benzo(g,h,i)perileno; (Modo HS-SPME).

Através da Figura 18 é possível observar que para os analitos do grupo 1 (Figura 18A) temperaturas mais baixas (em torno de 10 °C) levam a melhores respostas quando comparado a temperaturas mais altas (em torno de 80 °C). Já para os analitos do grupo 2 (Figura 18B) temperaturas mais elevadas acarretam em um aumento do sinal analítico.

De maneira geral, observa-se que as condições ótimas (principalmente a temperatura) são bastante diferentes para cada um dos grupos, e que qualquer condição compromisso, novamente, compromete a eficiência de extração para um ou outro grupo de analito. Essa tendência foi comprovada ao se comparar as duas metodologias convencionais, as quais são baseadas em apenas uma temperatura de extração. Tanto para o modo HS-SPME quanto para o modo DI-SPME os analitos mais voláteis (grupo 1) são melhores extraídos quando uma temperatura baixa é usada. Porém, ao se utilizar a temperatura compromisso, a extração de uma ou outra classe da analitos acaba sendo prejudicada.

Com o objetivo de contornar os problemas relacionados às diferenças de temperatura de extração ótima para cada grupo de analitos e os diferentes modos de extração HS-SPME e DI-SPME, propôs-se o uso de duas temperaturas e dois modos de extração no mesmo procedimento, onde em temperatura mais alta no modo DI-SPME (80 °C) os compostos menos voláteis seriam extraídos preferencialmente, e na temperatura mais baixa em HS-SPME (10 °C), os compostos mais voláteis seriam mais facilmente extraídos.

Otimização da porcentagem de tempo headspace, tempo total e quantidade de sal para o modo proposto DI-HS-SPME

O estudo da porcentagem de tempo no *headspace*, tempo total e da quantidade de sal foi realizado através de um planejamento multivariado, Planejamento fatorial fracionado. As temperaturas em cada modo foram selecionadas com base nos resultados das otimizações anteriores: temperatura de 80 °C modo DI-SPME e temperatura de 10 °C modo HS-SPME. O tempo total foi estudado na faixa de 10 a 120 min, porcentagem de tempo no modo *headspace* (0 a 100 %) e quantidade de sal de 0 a 9 g. O planejamento dos experimentos pode ser visto através da Tabela 5.

Tabela 5. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de BTEX e HPAs no modo DI-HS-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	% Tempo no modo HS	Massa sal (g)
1	10	0	0
2	10	50	9
3	10	100	4,5
4	65	0	9
5	65	50	4,5
6	65	100	0
7	120	0	4,5
8	120	50	0
9	120	100	9

Nesta abordagem, a extração inicia com o recobrimento da fibra exposto diretamente na amostra e, após o tempo planejado, o recobrimento da fibra é exposto no *headspace* da amostra até o tempo de extração. Os resultados obtidos podem ser encontrados na Figura 19.

Como pode ser visto, na Figura 19A, um tempo de 80 minutos deve ser usado como tempo total de extração. Destes 80 minutos, aproximadamente 60 % (48 min) o sistema deve permanecer no modo direto, seguido de 40 % do tempo (32 min) no modo *headspace*. Uma possível explicação para o tempo requerido no modo direto ser maior do que no *headspace* é que os analitos menos voláteis demoram mais tempo para se difundirem pela fibra, sendo que *headspace* o equilíbrio analito-*headspace*-fibra é atingido mais rapidamente.

Através da Figura 19B percebe-se que a quantidade de sal pode variar em toda a faixa estudada sem que haja perda significativa do sinal analítico. Considerando todos os compostos, um valor intermediário entre a não adição (a melhor condição para os compostos menos voláteis) e a saturação (valor ideal para os compostos mais voláteis), foi fixada a massa de 6 g de NaCl como condição ótima.

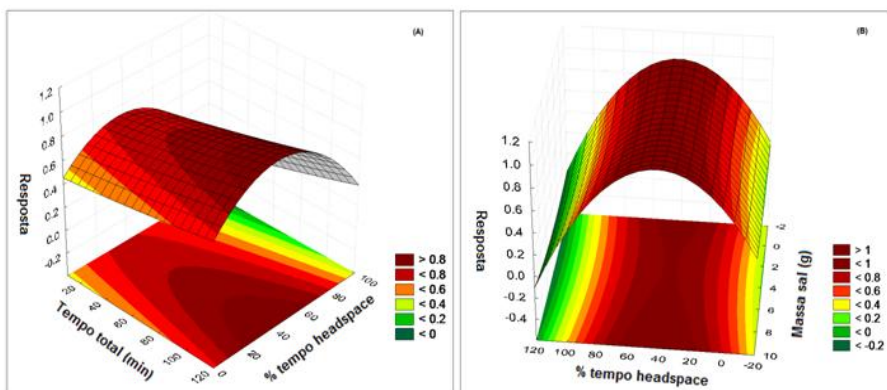


Figura 19. Superfície resposta (A) Tempo total *versus* % tempo no modo headspace e (B) massa sal *versus* % tempo no modo headspace, obtida na extração de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME.

A razão pela qual a proposta deste trabalho é mais eficiente se mostra clara pois enquanto a extração dos compostos menos voláteis no modo direto a 80 °C ocorre, os compostos mais voláteis tendem a ser concentrados no *headspace* da amostra. Quando o tempo de extração no modo direto é concluído, a fibra é posicionada no *headspace* e a temperatura da amostra é alterada para 10 °C, extraindo os compostos mais voláteis. Deve-se enfatizar que os compostos já retidos pelo recobrimento da fibra, na extração direta, não são perdidos durante a extração no *headspace*, pois a amostra é submetida a uma temperatura

bem mais baixa do que estava, o que dificulta a saída destes compostos do recobrimento da fibra para o *headspace*.

Comparação da metodologia proposta DI-HS-SPME com as metodologias convencionais DI-SPME e HS-SPME

De maneira a melhor visualizar as diferenças entre os resultados obtidos na metodologia proposta, baseada no uso de dois modos de extração direto e no *headspace* no mesmo procedimento, com os resultados obtidos na metodologia convencional, usando somente um ou outro modo de extração, fizeram-se algumas comparações, como pode ser observado na Figura 20.

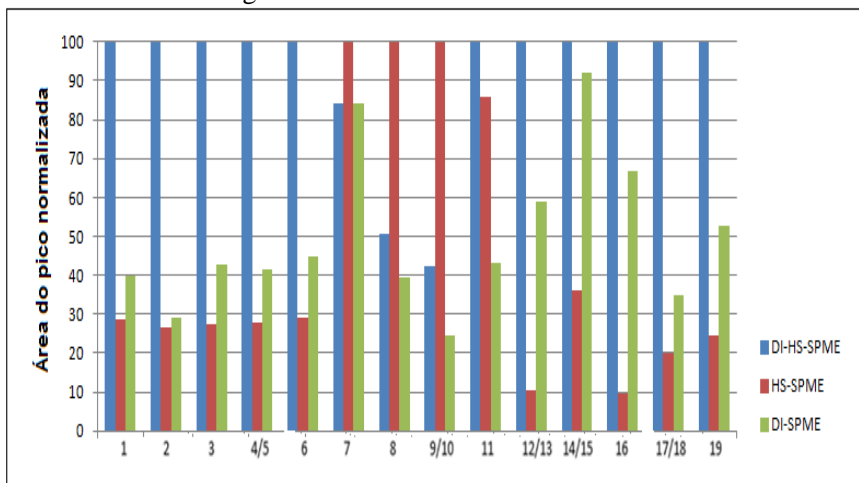


Figura 20. Respostas obtidas na comparação das metodologias: DI-HS-SPME, HS-SPME e DI-SPME. Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7-acenaftaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11-pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno.

O tempo total de extração ótimo foi atribuído como 80 min. Para o modo DI-HS-SPME a fração ótima dos 80 min de extração realizada no modo *headspace* à 10 °C foi de 40 %. Assim, a condição ótima para a metodologia proposta foi: 48 min de extração à 80 °C no modo direto, seguida de 32 min de extração na temperatura de 10 °C no modo *headspace*, com 6 g de sal. Para o modo DI-SPME o tempo total de

extração foi de 80 min à 50 °C e 6 g de sal e para o modo HS-SPME foi 80 min à 60°C e 4 g sal.

De uma maneira geral, pode-se observar, na Figura 20, que nenhum dos modos de extração sozinho mostrou-se útil para a análise de todos os compostos simultaneamente. Porém, a condição proposta neste trabalho levou a uma extração satisfatória para todos os analitos, pois ele integra, no mesmo processo, dois modos de extração, ou seja, o método proposto mostrou-se adequado para a extração simultânea de compostos de alta e baixa volatilidades.

Parâmetros analíticos de mérito e aplicação da metodologia proposta

Após as variáveis otimizadas, os principais parâmetros analíticos de mérito foram obtidos utilizando a metodologia proposta DI-HS-SPME para a análise de BTEX e HPA em matrizes aquosas e detecção por GC-MS (cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas). Os resultados estão dispostos na Tabela 6.

Tabela 6. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de BTEX e HPAs de amostras aquosas por DI-HS-SPME e detecção GC-MS.

Análitos	LD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	R	RSD ^A %	RSD ^B %
Benzeno	0,15	0,6-10	0,99975	1,7	6,5
Tolueno	0,10	0,3-10	0,99986	1,9	10,3
Etilbenzeno	0,07	0,3-10	0,99987	16,1	11,3
p-xileno/m-xileno	0,08	0,3-10	0,99988	16,2	11,5
o-xileno	0,30	1-10	0,99961	11,6	3,2
Acenaftaleno	0,27	1-10	0,99886	1,5	3,8
Fluoreno	0,20	0,6-10	0,99909	12,9	2,5
Antraceno/ Fenantreno	0,28	1-10	0,99862	18,8	1,6
Pireno	0,27	1-10	0,99958	24,9	3,2
Benzo(a)antraceno/ Criseno	0,17	0,6-10	0,99972	17,2	11,2
Benzo(K)fluoranteno o/ Benzo(a)pireno	0,20	0,6-10	0,99030	14,9	10,1
Benzo(b)fluoranteno	0,24	0,9-10	0,99613	15,1	11,1
Indeno-1-2-3- pireno/ Dibenzo(a,h)antraceno	0,31	1-10	0,99914	0,6	4,7
Benzo(g,h,i)perileno	0,30	1-10	0,99904	6,8	12,6

^a (RSD 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=5) e ^b (RSD 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=5)

Os limites de detecção encontrados foram satisfatórios e ficaram na faixa de 0,07 a 0,31 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão do método também foi avaliada e os desvios padrão relativos variaram na faixa de 0,6 a 25%.

A metodologia proposta foi utilizada para analisar amostras de água do rio Araranguá e do rio Tubarão, bem como amostra de água da Rede de Abastecimento da cidade de Florianópolis e água mineral envasada. Testes de recuperação foram feitos nas concentrações de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$. As respostas obtidas estão dispostas na Tabela 7 e 8.

Tabela 7. Concentrações determinadas nas amostras e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, para a determinação de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME e detecção por GC-MS, para amostras do Rio Araranguá e Rio Tubarão.

*Analitos	Rio Araranguá			Rio Tubarão		
	Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)	Amostra ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)
1	ND	81	63	DE	77	60
2	DE	115	98	ND	108	85
3	DE	70	85	DE	66	60
4/5	DE	71	83	DE	65	61
6	ND	90	60	ND	102	70
7	ND	88	61	ND	68	60
8	ND	78	60	ND	78	83
9/10	ND	81	61	ND	99	101
11	DE	60	99	DE	110	120
12/13	ND	83	104	ND	99	104
14/15	ND	75	83	ND	84	68
16	DE	70	120	DE	91	101
17/18	DE	110	115	DE	120	116
19	DE	109	115	DE	117	117

1- (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 2- (5 $\mu\text{g L}^{-1}$); ND (não detectado), DE (detectado); *Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7- acenafaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11- pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno.

Tabela 8. Concentrações determinadas nas amostras e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos, para a determinação de BTEX e HPAs por DI-HS-SPME e detecção por GC-MS, para amostras da rede de abastecimento de Florianópolis e água mineral envasada.

*Analitos	Abastecimento Florianópolis			Água mineral envasada		
	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)
1	ND	110	120	ND	103	110
2	ND	94	98	ND	89	93
3	ND	110	74	ND	120	99
4/5	ND	111	73	ND	113	100
6	ND	99	101	ND	111	74
7	ND	96	97	ND	81	82
8	ND	65	69	ND	60	71
9/10	ND	98	99	ND	60	66
11	ND	61	78	ND	72	90
12/13	ND	109	108	ND	90	93
14/15	ND	85	68	ND	89	111
16	ND	92	101	ND	97	106
17/18	ND	76	84	ND	68	77
19	ND	77	83	ND	68	78

1- (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 2- (5 $\mu\text{g L}^{-1}$); ND (não detectado), DE (detectado); *Analitos: 1- benzeno, 2- tolueno, 3- etilbenzeno, 4- p-xileno, 5- m-xileno, 6- o-xileno, 7- acenaftaleno, 8- fluoreno, 9- antraceno, 10- fenantreno, 11- pireno, 12- benzo(a)antraceno, 13- criseno, 14- benzo(K)fluoranteno, 15- benzo(a)pireno, 16- benzo(b)fluoranteno, 17- indeno-1-2-3-pireno, 18- dibenzo(a,h)antraceno, 19- benzo(g,h,i)perileno.

Como pode ser visto através das tabelas não foram encontradas concentrações dos analitos acima do limite de quantificação da técnica, e excelentes recuperações foram obtidas para o conjunto de compostos, demonstrando o grande potencial da metodologia desenvolvida.

4.4 CONCLUSÃO

A nova abordagem proposta neste trabalho baseada no uso de dois modos e duas temperaturas de extração no mesmo procedimento para análise simultânea de BTEX e HPA mostrou-se uma alternativa bastante interessante em relação ao procedimento convencional, uma vez que o método proposto extraiu com maior eficiência os compostos com volatilidades diferentes, sendo uma alternativa aos métodos tradicionais propostos na literatura, nos quais a análise de BTEX e HPA é feita separadamente.

5 CAPITULO 2

Determinação de ftalatos por DI-HS-SPME utilizando diferentes temperaturas de extração no mesmo procedimento

5.1 RESUMO

Neste trabalho, a nova estratégia de otimização utilizando diferentes modos e temperaturas de extração no mesmo procedimento foi utilizada para a determinação de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) em matrizes aquosas. A otimização das variáveis foi feita através de planejamentos multivariados onde primeiramente as técnicas DI-SPME e HS-SPME foram otimizadas separadamente. As variáveis investigadas foram: quantidade de sal (0 a 9 g), tempo total (30 a 120 min) e temperatura de extração (10 a 80 °C), para ambas metodologias. A fibra escolhida para este estudo foi a PDMS/DVB 65 μ m. Tendo em vista as diferentes condições ótimas de tempo e temperatura para cada composto, a metodologia baseada no uso de duas temperaturas e dois modos de extração no mesmo procedimento foi utilizada. Nesta etapa uma otimização da porcentagem de tempo no *headspace* (0 a 100 %), quantidade de sal (0 a 9 g) e tempo total (10 a 120 min) foi realizada. As condições ótimas de extração obtidas foram 40 min a uma temperatura da amostra de 80 °C seguido por mais 40 min a 10 °C. O método proposto foi comparado com os dois métodos convencionais com base em uma única temperatura de extração (modo HS-SPME 80 min de extração a 60 °C) e (modo DI-SPME 80 min de extração a 50 °C).

5.2 PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

As etapas de otimização foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC-14B da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com detector por ionização em chama e coluna Rtx-5(30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m f.e.) da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA). A programação do forno da coluna foi: 40 °C (10 min), 20 °C min^{-1} até 80 °C (0 min), 6 °C min^{-1} até 300 °C (10 min). As temperaturas do injetor e detector foram ajustadas em 260 e 310 °C, respectivamente. Para validação da metodologia, utilizou-se um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 plus da

Shimadzu, coluna Rtx-5MS(30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm f.e.) da Restek. A programação do forno da coluna foi: 35 $^{\circ}\text{C}$ (10 min), 20 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1} até 80 $^{\circ}\text{C}$ (0 min), 6 $^{\circ}\text{C}$ min^{-1} até 300 $^{\circ}\text{C}$ (10 min) e temperatura do injetor 260 $^{\circ}\text{C}$. Dois banhos de água (Microquímica, Florianópolis, Brazil) foram utilizados para controlar as diferentes temperaturas da amostra.

Reagentes e soluções

A solução estoque de ftalatos 1000 μg mL^{-1} (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) Supelco (Bellefonte, PA, USA) foi preparada pela diluição da ampola em acetona. Uma solução diluída foi preparada na concentração de 66,66 μg mL^{-1} . O cloreto de sódio utilizado foi obtido da Nuclear (Diadema, São Paulo, Brazil).

Otimização modo DI-SPME

As variáveis temperatura (10-80 $^{\circ}\text{C}$), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas apenas no modo direto, com 25 mL de solução, com agitação constante, concentração dos analitos de 200 μg L^{-1} e detecção por GC-FID.

Otimização modo HS-SPME

As variáveis temperatura (10-80 $^{\circ}\text{C}$), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas apenas no modo *headspace*, com 25 mL de solução, concentração dos analitos de 200 μg L^{-1} , com agitação constante e detecção por GC-FID.

Otimização modo DI-HS-SPME

As variáveis porcentagem de tempo no *headspace* (0-100 %), tempo total de extração (10-120 min) e quantidade de sal (0-9 g) foram otimizadas simultaneamente. As extrações foram feitas no modo direto (80 $^{\circ}\text{C}$) e *headspace* (10 $^{\circ}\text{C}$) no mesmo procedimento de extração, com 25 mL de solução, concentração dos analitos de 200 μg L^{-1} , com agitação constante e detecção por GC-FID.

Comparação metodologias

Para a comparação das metodologias utilizou-se 25 mL de solução, concentração dos analitos de $200 \mu\text{g L}^{-1}$, com agitação constante e um tempo total de 80 min para cada um dos modos: DI-SPME: 80 min no modo direto à $50 \text{ }^\circ\text{C}$ e 4 g de sal; HS-SPME: 80 min no *headspace* à $60 \text{ }^\circ\text{C}$ e 6 g de sal; DI-HS-SPME: 40 min à $80 \text{ }^\circ\text{C}$ no modo direto, seguido de 40 min à $10 \text{ }^\circ\text{C}$ no modo *headspace*, com 6 g de sal, conforme pode-se observar na Figura 21. A detecção foi feita por GC-FID

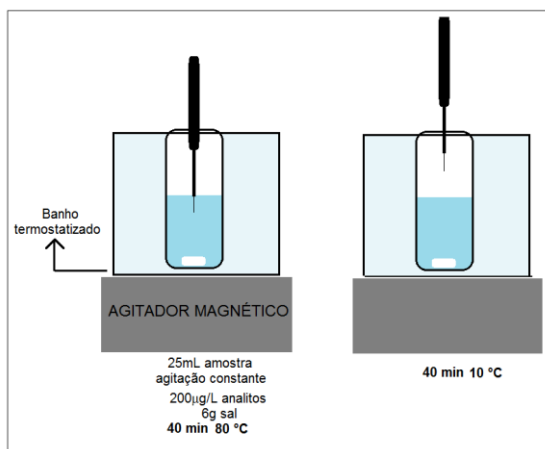


Figura 21. Esquema da extração de ftalatos de matrizes aquosas através da metodologia DI-HS-SPME.

5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intenção deste trabalho foi avaliar se a nova metodologia proposta, a qual utiliza duas temperaturas e dois modos no mesmo procedimento de extração, poderia ser utilizada para outras classes de compostos, a fim de maximizar a quantidade de analitos extraída quando comparada a metodologia tradicional, que utiliza apenas uma temperatura e um modo de extração. Para este estudo escolheu-se como analito um mix de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipato e dibutilftalato).

Na primeira e segunda etapa do trabalho foram otimizadas as variáveis tempo de extração, temperatura e quantidade de sal para os

modos convencionais DI-SPME e HS-SPME separadamente. Na terceira etapa a estratégia de extração utilizando simultaneamente DI-HS-SPME com diferentes temperaturas de extração em cada modo foi utilizada. Na última etapa do trabalho, assim como foi feito no estudo anterior, uma comparação entre o novo método e a metodologia convencional foi realizada.

Otimização do tempo e temperatura de extração e quantidade de sal para o modo DI-SPME

Na primeira parte da otimização, as variáveis estudadas foram: temperatura de extração (10-80 °C), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g). O planejamento dos experimentos foi feito através de uma otimização multivariada, planejamento fatorial fracionado, como pode ser visto na Tabela 9.

Tabela 9. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo DI-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	Temperatura extração (°C)	Massa sal (g)
1	30	10	0
2	30	45	9
3	30	80	4,5
4	75	10	9
5	75	45	4,5
6	75	80	0
7	120	10	4,5
8	120	45	0
9	120	80	9

Após os resultados obtidos para o conjunto de analitos, as superfícies resposta foram geradas, conforme Figura 22.

Através da figura é possível observar que a região de melhor resposta foi obtida com um tempo de 80 minutos, 50 °C e 4 g de sal. Portanto esses valores devem ser usados como parâmetros para extração compromisso dos compostos por DI-SPME.

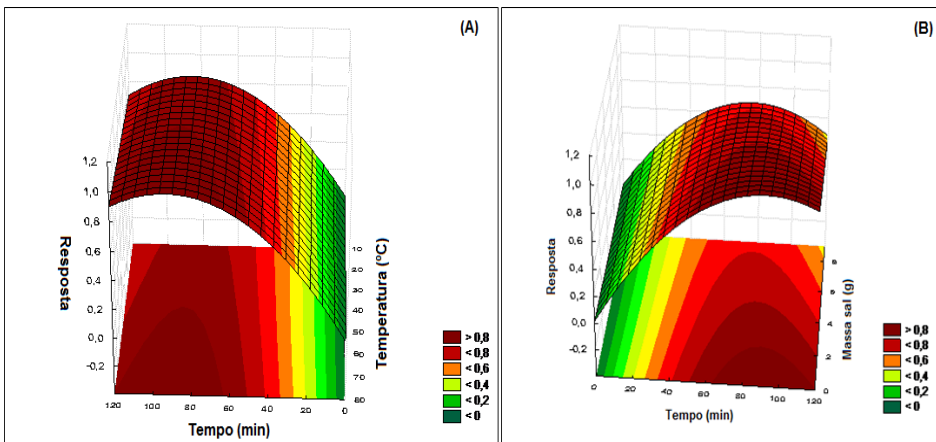


Figura 22. Superfície resposta (A) temperatura de extração *versus* tempo de extração e (B) tempo de extração *versus* massa sal obtida na extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-SPME.

No intuito de avaliar como os analitos se comportaram frente à temperatura de extração foi feita uma comparação entre o perfil do composto mais volátil (dietilftalato) e o perfil do composto menos volátil (bis-2-etilhexilftalato) e o resultado pode ser visto na Figura 23.

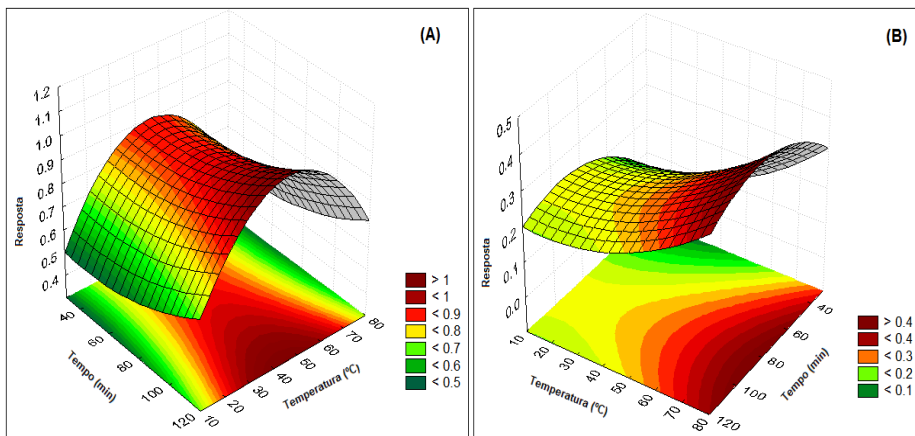


Figura 23. Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para composto (A) dietilftalato (B) bis-2-etilhexilftalato, por DI-SPME.

Como pode ser visto na Figura 23, a condição ótima de temperatura de extração foi diferente para cada um dos compostos. Este perfil reafirma os resultados obtidos no primeiro trabalho (BTEX e HPAs), pois o perfil de temperatura de extração se repetiu: para compostos mais leves, como dietilftalato, temperaturas mais baixas levaram a melhores respostas. Já para os analitos menos voláteis, como bis-2-etilhexilftalato, temperaturas mais elevadas levaram a um aumento do sinal analítico. Desta maneira confirma-se o fato de que a temperatura ótima de extração é diferente para os diferentes compostos e que uma condição compromisso compromete a eficiência de extração para um ou outro analito.

Otimização do tempo e temperatura de extração e quantidade de sal para o modo HS-SPME

Nesta etapa uma otimização multivariada, Planejamento fatorial fracionado, foi realizada e as variáveis estudadas e suas faixas foram: temperatura de extração (10-80 °C), tempo de extração (30-120 min) e quantidade de sal (0-9 g). O planejamento dos experimentos pode ser visto através da Tabela 10.

Tabela 10. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo HS-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	Temperatura extração (°C)	Massa sal (g)
1	30	10	0
2	30	45	9
3	30	80	4,5
4	75	10	9
5	75	45	4,5
6	75	80	0
7	120	10	4,5
8	120	45	0
9	120	80	9

A Figura 24 ilustra as respostas obtidas para o conjunto de analitos.

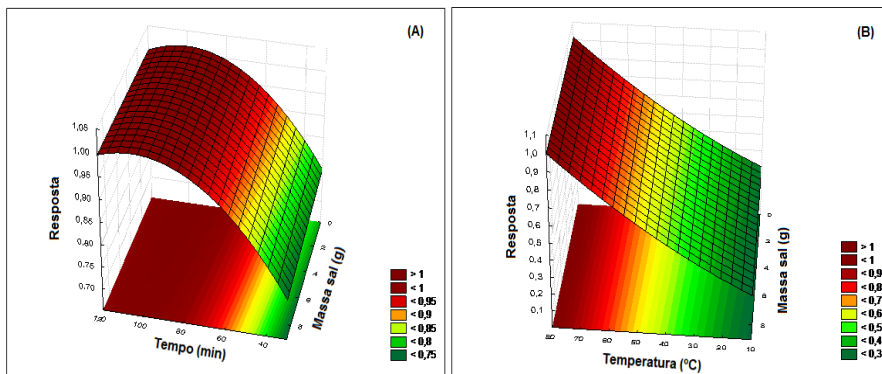


Figura 24. Superfície resposta (A) massa de sal *versus* tempo de extração e (B) temperatura de extração *versus* massa de sal, obtidas na extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por HS-SPME.

Ao observar a Figura 24, pode-se perceber que as regiões de melhores respostas analíticas foram obtidas com um tempo de 80 minutos e temperatura maior que 60 °C, sendo estes resultados utilizados como parâmetros para extração simultânea dos compostos por HS-SPME. Por outro lado, a quantidade de sal não afetou significativamente as respostas obtidas em toda a faixa analisada. Por este motivo, um valor intermediário, entre a não adição (que seria a melhor condição para os compostos mais pesados) e a saturação (que seria ideal para os compostos mais leves), 6 g de NaCl foi fixado como condição ótima.

A fim de demonstrar o diferente comportamento dos analitos frente à temperatura de extração, comparou-se o resultado obtido para o composto dietilftalato (composto mais volátil) e o resultado obtido para o composto bis-2-etilhexilftalato (composto menos volátil), como pode ser visto na Figura 25.

Através dos gráficos da Figura 25 pode-se observar que os analitos se comportam diferentemente com relação à temperatura. O composto mais volátil, dietilftalato (Figura 25A), apresentou melhores resultados quando submetido a temperaturas mais baixas, em torno de 10 °C. Já o analito menos volátil, etilhexilftalato (Figura 25B), apresentou melhor resultado quando submetido a temperatura mais elevada, em torno 80 °C. Ou seja, o uso de uma temperatura

compromisso para todos os compostos comprometeria a eficiência de extração para um ou outro analito.

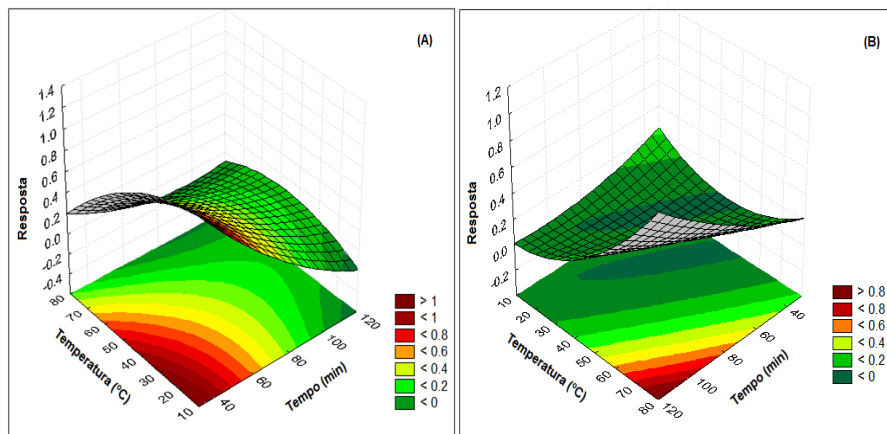


Figura 25. Superfície resposta de temperatura de extração *versus* tempo de extração para composto (A) dietilfthalato (B) bis-2-etilhexilfthalato, por HS-SPME.

Por este motivo, a nova técnica, desenvolvida no trabalho anterior, a qual utiliza duas temperaturas e dois modos de extração no mesmo procedimento, foi usada para análise simultânea do mix de ftalatos, a fim de que na temperatura mais alta no modo DI-SPME (80°C) os compostos mais pesados fossem extraídos e na temperatura mais baixa em HS-SPME (10°C), os compostos mais leves fossem mais facilmente extraídos.

A fim de otimizar a metodologia para a classe de analitos escolhidos (ftalatos), as variáveis foram novamente avaliadas através de uma otimização multivariada.

Otimização da porcentagem de tempo headspace, tempo total e quantidade de sal para o modo proposto DI-HS-SPME

O estudo da porcentagem de tempo no *headspace*, tempo total e da quantidade de sal foi realizado através de uma otimização multivariada, planejamento fatorial fracionado, conforme demonstrado na Tabela 11.

Tabela 11. Ensaios realizados, planejamento fatorial fracionado, para extração de ftalatos no modo DI-HS-SPME.

Ensaio	Tempo extração (min)	% Tempo no modo HS	Massa sal (g)
1	10	0	0
2	10	50	9
3	10	100	4,5
4	65	0	9
5	65	50	4,5
6	65	100	0
7	120	0	4,5
8	120	50	0
9	120	100	9

As temperaturas em cada modo foram selecionadas com base nos resultados das otimizações anteriores: temperatura de 80 °C modo DI-SPME e temperatura de 10 °C modo HS-SPME. O tempo total foi estudado na faixa de 10 a 120 min e quantidade de sal de 0 a 9 g. Os resultados podem ser encontrados na Figura 26.

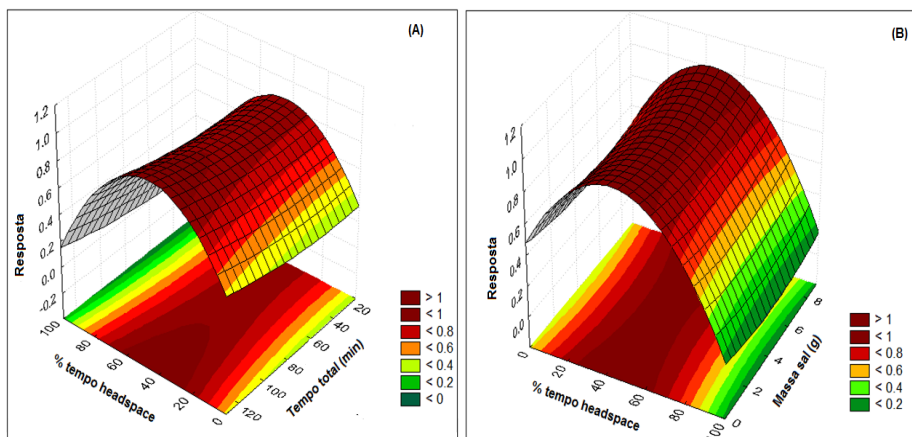


Figura 26. Superfície resposta (A) Tempo total versus % tempo no modo headspace e (B) massa sal versus % tempo no modo headspace; obtidas na extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME.

Através da Figura 26A, tempo total *versus* % tempo no modo *headspace* é possível perceber que um tempo de 80 minutos deve ser usado como tempo total de extração, a fim de maximizar a quantidade dos compostos extraídos. Destes 80 minutos, a fibra deve ficar exposta aproximadamente 50% tempo (40 min) no modo direto, seguidos de mais 50% do tempo (40 min) no modo *headspace*.

Já na Figura 26B, observa-se que a quantidade de sal pode variar em toda a faixa estudada sem que haja perda do sinal analítico. Considerando todos os compostos, um valor intermediário entre a não adição (a melhor condição para os compostos menos voláteis) e a saturação (valor ideal para os compostos mais voláteis), foi fixada a massa de sal em 6 g de NaCl como condição ótima.

Como era esperado, enquanto a extração dos compostos mais pesados no modo direto a 80 °C ocorre, os compostos voláteis tendem a ser concentrados no *headspace* da amostra. Quando o tempo de extração no modo direto é concluído, a fibra é posicionada no *headspace* e a temperatura da amostra é alterada para 10 °C, extraíndo os compostos mais voláteis. Os compostos já retidos pelo recobrimento da fibra, na extração direta, não são perdidos durante a extração no *headspace*, pois a amostra é submetida a uma temperatura bem mais baixa do que estava, o que dificulta a saída destes compostos do recobrimento da fibra para o *headspace*.

Comparação da metodologia DI-HS-SPME com as metodologias convencionais HS-SPME E DI-SPME

A fim de comparar as metodologias o tempo total de extração ótimo foi atribuído como 80 min para todas as metodologias. Para o modo DI-HS-SPME a fração ótima dos 80 min de extração realizada no modo *headspace* à 10 °C foi de 50 %. Assim, a condição ótima de extração foi: 40 min de extração à 80 °C no modo direto, seguida de 40 min de extração na temperatura de 10 °C no modo *headspace*, com 6 g de sal. Para o modo DI-SPME o tempo total de extração foi de 80 min à 50 °C e 4 g de sal e para o modo HS-SPME foi 80 min à 60 °C e 6 g sal. Os resultados obtidos nesta comparação podem ser vistos através da Figura 27.

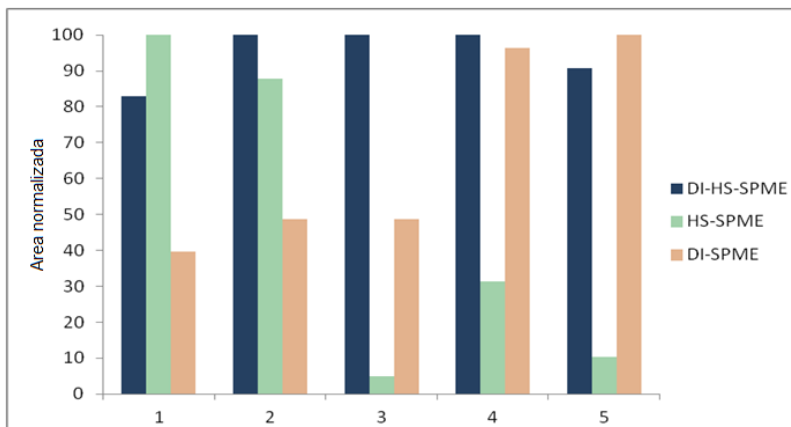


Figura 27. Respostas obtidas através da comparação das metodologias: DI-HS-SPME, HS-SPME e DI-SPME. Analitos: 1- dietilftalato, 2- dibutilftalato, 3- benzilbutilftalato, 4- bis-2-etilhexiadipate e 5- bis-2-etilhexilftalato.

Como se pode perceber, o emprego dos métodos convencionais não foi adequado à determinação do mix de ftalatos simultaneamente. Já a utilização da nova metodologia DI-HS-SPME mostrou os melhores resultados para todos os analitos, pois integra no mesmo processo dois modos de extração, conseguindo extrair simultaneamente compostos de alta e baixa volatilidade.

Parâmetros analíticos de mérito e aplicação da metodologia proposta

Após as variáveis otimizadas, os principais parâmetros analíticos de mérito foram obtidos utilizando a metodologia proposta DI-HS-SPME para a determinação de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) em matrizes aquosas e detecção por GC-MS. Os resultados estão demonstrados na Tabela 12.

Os limites de detecção encontrados foram satisfatórios e ficaram na faixa de 0,07 à 0,30 $\mu\text{g L}^{-1}$. A precisão do método também foi avaliada e os desvios padrão relativos variaram na faixa de 0,8 a 13,5 %.

Tabela 12. Principais parâmetros analíticos de mérito para extração de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipato e dibutilftalato) de amostras aquosas por DI-HS-SPME e detecção GC-MS .

Analitos	LD (μgL^{-1})	Faixa linear (μgL^{-1})	R	RSD ^a %	RSD ^b %
Dietilftalato	0,07	0,2-10	0,9943	1,2	6,5
Dibutilftalato	0,70	2,1-10	0,9990	5,0	13,5
Benzilbutilftalato	0,30	1,0-10	0,9992	0,8	8,3
Bis-2-etilhexiadipato	0,70	2,0-10	0,9919	12,4	2,5
Bis-2-etilhexilftalato	0,30	1,0-10	0,9961	12,3	9,4

^a (RSD 1 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=5) e ^b (RSD 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ n=5)

A metodologia proposta foi utilizada para analisar amostras de água do rio Araranguá e do rio Tubarão, bem como amostra de água da Rede de Abastecimento da cidade de Florianópolis e água mineral envasada. Testes de recuperação foram feitos nas concentrações de 1 e 5 μgL^{-1} . As respostas estão dispostas nas tabelas 13 e 14.

Tabela 13. Concentrações determinadas nas amostras do Rio Araranguá e Rio Tubarão e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME-GC-MS.

*Analitos	Rio Araranguá			Rio Tubarão		
	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)
1	ND	103	112	DE	96	101
2	ND	80	78	ND	79	85
3	ND	73	85	ND	81	83
4	DE	78	80	ND	76	61
5	ND	64	79	ND	68	80

1- (1 $\mu\text{g L}^{-1}$) e 2- (5 $\mu\text{g L}^{-1}$); ND (não detectado), DE (detectado); *Analitos: 1- dietilftalato, 2- dibutilftalato, 3- benzilbutilftalato, 4- bis-2-etilhexiadipate e 5- bis-2-etilhexilftalato.

Tabela 14. Concentrações determinadas nas amostras da rede de abastecimento de Florianópolis e água mineral envasada e recuperações das concentrações adicionadas de 1 e 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) por DI-HS-SPME-GC-MS.

*Analitos	Abast. Florianópolis			Água mineral envasada		
	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)	Amostra (μgL^{-1})	Rec ^{1*} (%)	Rec ^{2*} (%)
1	ND	63	124	ND	75	106
2	ND	94	96	ND	74	96
3	ND	110	77	ND	89	109
4	ND	111	89	ND	96	101
5	ND	77	81	ND	72	78

1- ($1 \mu\text{g L}^{-1}$) e 2- ($5 \mu\text{g L}^{-1}$); ND (não detectado), DE (detectado); *Analitos: 1- dietilftalato, 2- dibutilftalato, 3- benzilbutilftalato, 4- bis-2-etilhexiadipate e 5- bis-2-etilhexilftalato.

Como pode ser visto através da tabela não foram encontradas concentrações dos analitos acima do limite de quantificação da técnica, e excelentes recuperações foram obtidas para o conjunto de compostos, demonstrando que a metodologia proposta serve para analisar outros compostos, diferentes de BTEX e HPAs, com resultados bastante satisfatórios.

5.4 CONCLUSÃO

A metodologia proposta no trabalho anterior, baseada no uso de dois modos e duas temperaturas de extração no mesmo procedimento, foi utilizada com sucesso para determinação de ftalatos (dietilftalato, benzilbutilftalato, bis-2-etilhexilftalato, bis-2-etilhexiadipate e dibutilftalato) em matrizes aquosas. Os resultados obtidos demonstraram que ao utilizar a nova metodologia os compostos foram extraídos com maior eficiência do que quando se utilizou a metodologia convencional, a qual utiliza apenas uma temperatura de extração durante todo o procedimento.

Portanto, a DI-HS-SPME demonstrou ser uma alternativa bastante promissora para determinação de compostos com volatilidades distintas, podendo, possivelmente, ser utilizada para determinação simultânea de outras classes de analitos.

6 CAPITULO 3

Determinação dos compostos voláteis do mel através de uma nova estratégia de otimização combinando diferentes temperaturas de extração em um único procedimento por HS-SPME-GC-MS

6.1 RESUMO

Este estudo propõe uma nova estratégia de otimização para a extração dos compostos voláteis do mel utilizando a técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* e detecção por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. As variáveis tempo de extração (10-80 min), temperatura (0-60 °C), volume de água (0,5-5 mL) e porcentagem de sal (0-100 %) foram otimizadas através de uma otimização multivariada. A fibra escolhida neste estudo foi a CAR/DVB/PDMS. As respostas obtidas foram divididas em três grupos diferentes baseados na polaridade/volatilidade dos compostos que estão presentes na matriz do mel. Tendo em vista as diferentes condições obtidas de tempo e temperatura de extração para cada grupo, uma nova metodologia baseada no uso de três temperaturas de extração no mesmo procedimento foi proposta. As condições ótimas foram obtidas pela extração durante 36 min a temperatura da amostra de 60 °C, 18 min em 40 °C seguido por mais 6 min a 0 °C. O método proposto foi comparado com o método convencional otimizado com base em uma única temperatura de extração (60 min de extração a 60 °C). Uma segunda comparação, utilizando duas temperaturas de extração (30 min a 60 °C seguido de 30 min a 0°C) foi feita a fim de avaliar se o uso de apenas duas temperaturas diferentes seriam suficiente para se obter as mesmas respostas encontradas no uso de três temperaturas.

6.2 PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm f.e.) da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA) foi usado durante o estudo. Hélio ultrapuro a 1 mL min⁻¹ foi usado como gás

carreador. A programação do forno da coluna foi: 40 °C (10 min), 5 °C min⁻¹ até 300 °C (20 min). A temperatura do injetor foi ajustada em 260°C. O tempo de dessorção dos analitos da fibra de SPME foi fixado em 10 minutos. A injeção foi realizada no modo *splitless* por 2 minutos. Após este tempo a taxa *split* foi fixada em 1:20. Dois banhos de água (Microquímica, Florianópolis, Brazil) foram utilizados para controlar as diferentes temperaturas da amostra. Fibra de CAR/PDMS/DVB foi obtida da Supelco.

Procedimento experimental

Todos os experimentos de otimização foram realizados com a fibra comercial CAR/DVB/PDMS, expondo a fibra ao headspace da amostra, em frascos de 15 mL para SPME com 0,5 g de mel (obtido comercialmente), agitação magnética constante, com adição de água e NaCl.

Otimização do tempo e temperatura de extração, porcentagem de sal e volume de água

Nesta etapa foi realizado um planejamento composto central fracionado e as variáveis e suas faixas estudadas foram: temperatura de extração (0-60 °C), tempo de extração (10-80 min), porcentagem de sal (0-100 %) e volume de água (0,5 a 5 mL). O cromatograma obtido foi dividido em três regiões (3 grupos). Com base nos resultados de temperatura ótima obtida para cada grupo, escolheram-se como temperaturas ótimas 0 °C, 40 °C e 60 °C.

Otimização da porcentagem de tempo em cada temperatura

O processo de extração iniciou com o frasco no banho com temperatura superior (60 °C), permanecendo por um tempo de acordo com o planejamento, em seguida o frasco foi retirado e transferido para o banho na temperatura intermediária (40 °C), no qual permaneceu pelo tempo planejado e por fim o frasco foi transferido para um banho de gelo (0 °C) e lá permaneceu até que o tempo de 60 minutos fosse alcançado. As variáveis fixadas nesta etapa foram: 60 minutos de tempo total e 2 mL de solução NaCl saturada. A Figura 28 mostra como foram realizados os experimentos.

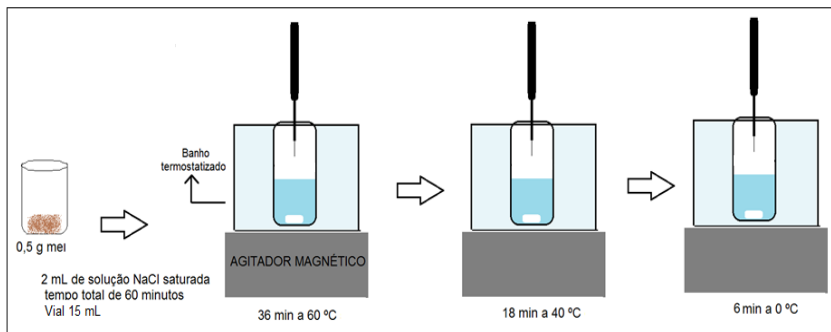


Figura 28. Esquema da extração dos compostos voláteis do mel através da metodologia HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.

Comparação das metodologias com uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento

A comparação das metodologias com uma, duas ou três temperaturas foi realizada através de 3 ensaios : 1) 60 min a 60 °C; 2) 30 min a 60 °C e 30 min a 0 °C; 3) 36 min a 60 °C seguido de 18 min a 40 °C e por fim 6 min a 0 °C. Nesta etapa fixou-se 2 mL de solução NaCl saturada e tempo total de 60 minutos.

6.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na primeira parte deste estudo foi feita uma otimização da metodologia HS-SPME para análise dos compostos voláteis do mel utilizando apenas uma temperatura durante todo o procedimento de extração. As variáveis estudadas foram: tempo e temperatura de extração, porcentagem de sal e volume de água. Na etapa posterior, utilizando a metodologia proposta, foram utilizadas três temperaturas diferentes no mesmo processo de extração e avaliou-se a porcentagem de tempo que a fibra deveria ficar exposta em cada uma delas. Por fim comparou-se o uso de uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento, a fim de definir qual metodologia seria melhor para análise dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.

Otimização do tempo de extração, temperatura, porcentagem de sal e volume de água

O estudo da temperatura da amostra, do tempo de extração, da quantidade de sal e volume de água é de grande importância devido ao fato de que esses parâmetros podem influenciar na difusão dos analitos através do recobrimento da fibra. Por este motivo uma otimização multivariada, composto central fracionado, foi realizada a fim de avaliar as variáveis e suas interações, sendo selecionadas para este estudo: temperatura de extração (0-60°C), tempo de extração (10-80 min), porcentagem de sal (0-100%) e volume de água (0,5 a 5 mL). A fibra comercial de CAR/DVB/PDMS foi escolhida para este estudo devido ao fato de ser bastante porosa e ter grande afinidade por analitos voláteis, como é o caso dos analitos presentes na matriz do mel. O planejamento dos experimentos pode ser visto na Tabela 15.

Tabela 15. Ensaios realizados, composto central fracionado, para extração dos compostos voláteis do mel utilizando a HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.

Ensaio	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)	Volume de água (mL)	% sal
1	27,5	45	1,6	75
2	62,5	15	1,6	75
3	45	30	2,8	100
4	27,5	45	3,9	75
5	45	30	0,5	50
6	45	30	2,8	50
7	45	60	2,8	50
8	45	30	5,0	50
9	62,5	45	1,6	25
10	27,5	15	1,6	25
11	45	30	2,8	50
12	10	30	2,8	50
13	62,5	15	3,9	75
14	27,5	15	3,9	25
15	80	30	2,8	50
16	62,5	45	3,9	25
17	45	30	2,8	0
18	45	0	2,8	50

A partir dos resultados obtidos as superfícies respostas foram geradas. Pode-se observar através da Figura 29A, porcentagem de sal *versus* tempo, que 60 minutos de extração é suficiente para que o equilíbrio seja atingido e que uma porcentagem de sal maior que 80b%

deve ser utilizada. Como a extração é feita no *headspace* e a quantidade extraída depende do equilíbrio do analito entre amostra/headspace/fibra, o uso de uma quantidade maior de sal favorece a saída do analito para o *headspace*. Portanto a solução saturada de sal foi escolhida como melhor condição. Já a quantidade de água, como pode ser visto na Figura 29B, foi fixada em 2 mL para o tempo de 60 minutos, que foi escolhido como ótimo.

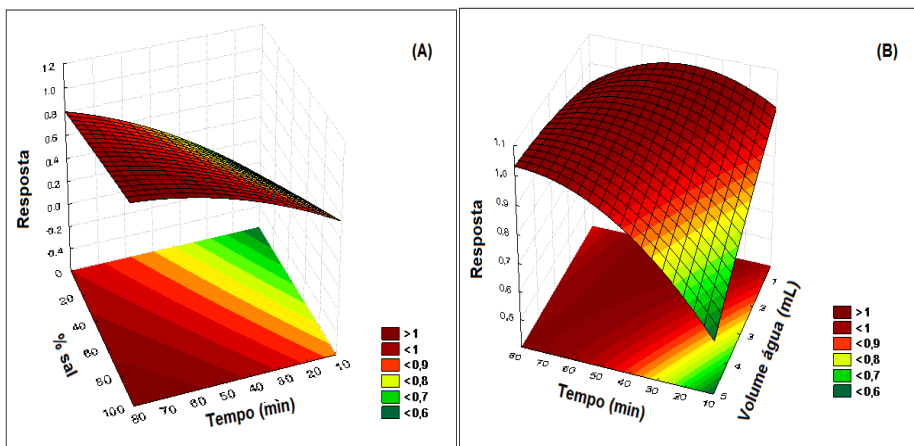


Figura 29. Superfície resposta de (A) tempo de extração *versus* % Sal (B) tempo de extração *versus* volume de água, para determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.

A partir da Figura 30 é possível observar que para o grupo 1 temperaturas mais baixas (em torno de 0 °C) levam a melhores respostas quando comparadas a temperaturas mais altas (em torno de 60 °C). Já para os analitos do grupo 2 temperaturas medianas (em torno de 40 °C) apresentam melhores resultados e por fim, para o grupo 3, onde os compostos são menos voláteis, temperaturas mais elevadas (em torno de 60 °C) acarretam em um aumento do sinal analítico.

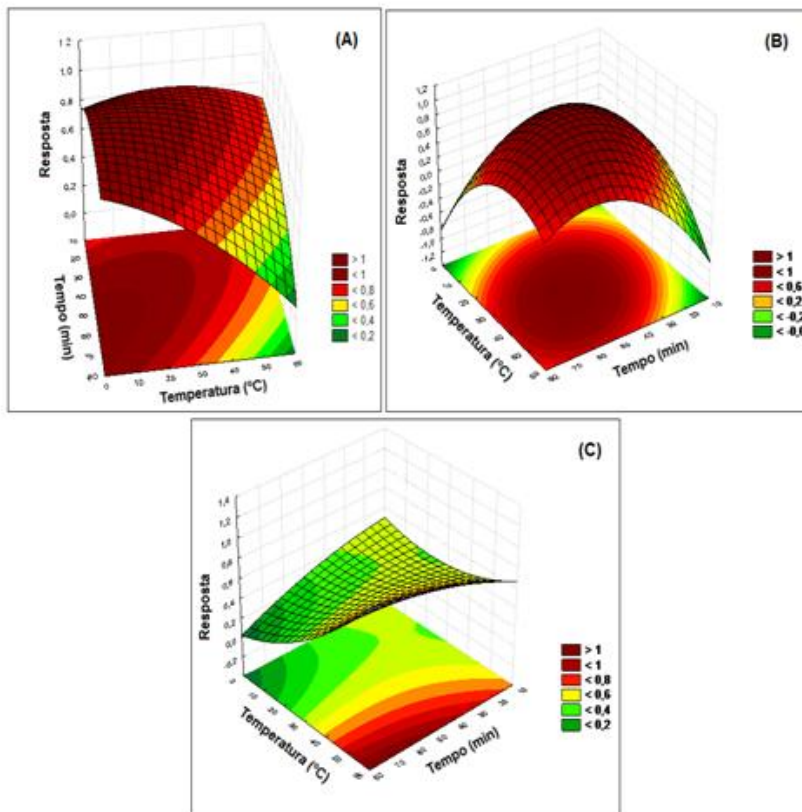


Figura 30. Superfície resposta de tempo de extração *versus* temperatura de extração (A) grupo 1 (compostos mais voláteis) (B) grupo 2 (compostos volatilidade intermediária) e (C) grupo 3 (compostos menos voláteis), obtida na determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.

Através deste estudo foi possível observar que as condições ótimas de temperatura de extração são bastante diferentes para cada grupo de compostos e que ao se utilizar uma única temperatura, compromisso, poderia comprometer a eficiência de extração. Com base nestes resultados, percebeu-se a necessidade do uso de mais de uma temperatura no mesmo procedimento de extração, a fim de que todos os analitos fossem extraídos com a maior eficiência possível, sem que um ou outro composto fosse prejudicado.

Com o objetivo de contornar os problemas relacionados às diferenças de temperatura de extração ótima para cada grupo de analitos, avaliou-se a possibilidade do uso de três temperaturas no mesmo procedimento de extração, onde na temperatura mais alta os compostos menos voláteis seriam extraídos preferencialmente, na temperatura intermediária os compostos de média volatilidade e, na temperatura mais baixa, os mais voláteis.

Otimização da variável porcentagem de tempo na nova metodologia proposta utilizando três temperaturas de extração no mesmo procedimento

As temperaturas alta, média e baixa foram selecionadas com base nos resultados da Figura 25: temperatura alta 60 °C, temperatura média 40 °C e temperatura baixa de 0 °C. Este estudo foi realizado variando-se a porcentagem de tempo que a fibra ficaria exposta em cada uma das temperaturas, conforme Tabela 16.

Tabela 16. Planejamento da porcentagem de tempo da amostra em cada uma das três temperaturas, para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME.

Ensaio	% Tempo extração à 60 °C	% Tempo extração à 40 °C	% Tempo extração à 0 °C
1	50	0	50
2	50	50	0
3	0	50	50
4	33	33	33
5	33	33	33
6	33	33	33
7	34	50	16
8	60	30	10
9	100	0	0

A partir dos resultados obtidos, gerou-se a superfície triangular, Figura 31. Como pode ser visto, os melhores resultados foram obtidos com 10 % do tempo (6 minutos) a 0 °C, 30 % do tempo (18 minutos) a 40 °C e 60 % do tempo (36 minutos) a 60 °C.

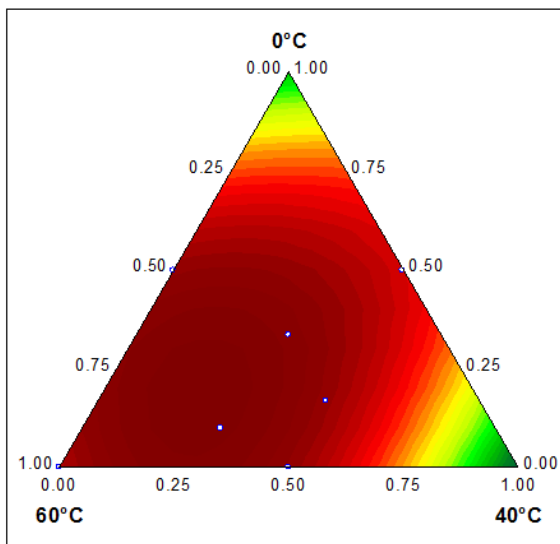


Figura 31. Superfície resposta triangular % de tempo em cada temperatura para determinação dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.

A maior porcentagem de tempo requerida foi na temperatura de 60 °C, provavelmente devido ao fato de que nesta temperatura ocorra a extração dos compostos menos voláteis (menos voláteis), os quais demoram mais tempo para atingir o equilíbrio analito/headspace/fibra, do que quando comparado aos mais voláteis, os quais precisaram de apenas 6 minutos a 0 °C.

Comparação das metodologias com uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento

De maneira a comparar a nova metodologia usando três temperaturas com a metodologia de duas temperaturas e a metodologia convencional, uma amostra de mel foi submetida aos três procedimentos: 1) 60 min a 60 °C (método convencional com uma única temperatura da amostra), 2) 30 min a 60 °C e 30 min a 0 °C (método com duas temperaturas da amostra) e o método proposto nesse trabalho, que compreende 36 min de extração a 60 °C seguido de 18 min de extração a 40 °C e por fim 6 min de extração a 0 °C. Os resultados podem ser vistos através da Figura 32, e os cromatogramas obtidos através da Figura 33.

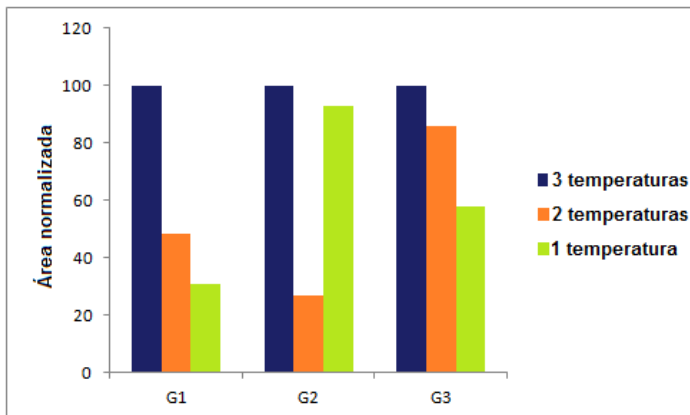


Figura 32. Comparação entre o método proposto com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS. (G1- compostos mais voláteis, G2 compostos volatilidade intermediária e G3- compostos pouco voláteis).

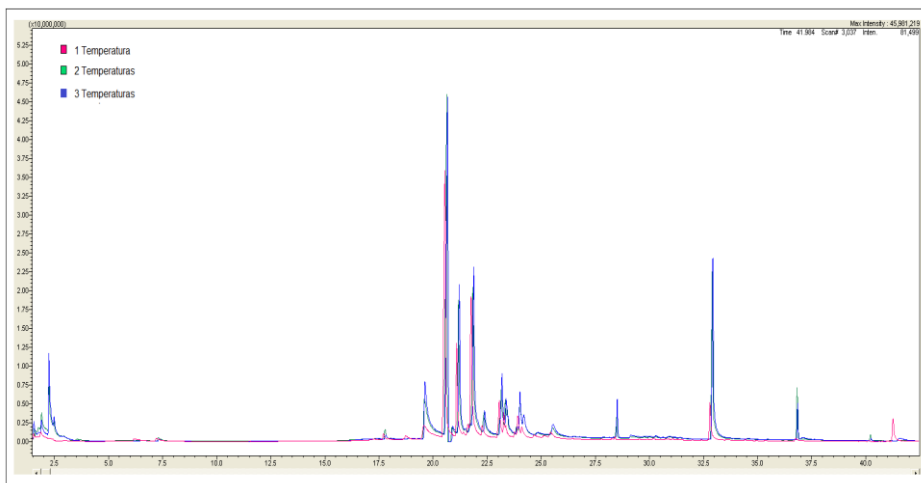


Figura 33. Cromatogramas obtidos através da comparação do método com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis do mel por HS-SPME e detecção por GC-MS.

Como pode ser observado na Figura 32, para o método convencional, onde apenas uma temperatura de extração é utilizada em todo o experimento, ocorre um favorecimento na extração dos compostos de média e alta volatilidade, ficando os compostos mais

voláteis prejudicados. Já no método que utiliza duas temperaturas de extração no mesmo procedimento, ocorre um favorecimento dos compostos mais voláteis, que serão extraídos a 0 °C e dos compostos mais pesados que serão extraídos a 60 °C. Já no método proposto, que utiliza três temperaturas no mesmo procedimento de extração, ocorre a extração de todos os grupos de analitos com uma maior eficiência. No período em que a extração é realizada em temperaturas mais altas (60 e 40 °C), os compostos mais pesados e os semi-voláteis são preferencialmente extraídos, enquanto o *headspace* da amostra é enriquecido pelos mais voláteis. Por fim, quando a temperatura da amostra é diminuída (0 °C), cria-se uma condição favorável para extração dos compostos mais voláteis.

6.4 CONCLUSÃO

A nova abordagem, proposta neste trabalho, para análise dos compostos voláteis do mel mostrou-se uma alternativa bastante interessante em relação ao procedimento convencional (com uma temperatura de extração) e até mesmo ao procedimento que utiliza duas temperaturas de extração no mesmo procedimento, pois ao se utilizar três temperaturas diferentes, houve o favorecimento de todos os grupos de compostos, de baixa, media e alta volatilidade, impedindo que as respostas obtidas para qualquer uma das classes fosse prejudicada pela temperatura de extração.

7 CAPITULO 4

Determinação dos compostos voláteis da pimenta vermelha através da nova estratégia de otimização combinando diferentes temperaturas de extração em um único procedimento por SPME-GC-MS

7.1 RESUMO

Este estudo propõe o uso da nova estratégia de otimização utilizando três temperaturas diferentes no mesmo procedimento para a extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha utilizando a técnica de microextração em fase sólida no modo *headspace* e detecção por cromatografia gasosa com detecção por espectrometria de massas. As variáveis tempo de extração (10-60 min) e temperatura (0-60 °C) foram otimizadas através do planejamento fatorial fracionado. Foram utilizados em todos os experimentos 2 mL de uma solução saturada de NaCl e a fibra de CAR/DVB/PDMS foi escolhida como fase extratora. As respostas obtidas foram divididas em três grupos diferentes baseados na polaridade/volatilidade dos compostos que estão presentes na matriz da pimenta vermelha. Tendo em vista as diferentes condições obtidas de tempo e temperatura de extração para cada grupo, a nova metodologia baseada no uso de três temperaturas de extração no mesmo procedimento foi utilizada. As condições ótimas foram: 6 min a 10 °C, 18 min a 30 °C e 36 min a 60 °C. O método proposto foi comparado com o método convencional otimizado com base em uma única temperatura de extração (60 min de extração a 60 °C). Uma segunda comparação, utilizando duas temperaturas de extração (30 min a 60°C seguido de 30 min a 10 °C) foi feita a fim de avaliar se o uso de apenas duas temperaturas diferentes seriam suficiente para obter a obtenção das mesmas respostas encontradas no uso de três temperaturas.

7.2 PARTE EXPERIMENTAL

Instrumentação

Um cromatógrafo a gás GCMS-QP2010 Plus da Shimadzu (Kyoto, Japão), equipado com coluna Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 µm f.e.) da Restek (Benner Circle, Bellefonte, PA, EUA) foi usado

durante o estudo. Hélio ultrapuro a 1 mL min⁻¹ foi usado como gás carreador. A programação do forno da coluna foi: 40 °C (6 min), 4 °C min⁻¹ até 230 °C (6 min). A temperatura do injetor foi ajustada em 260°C. O tempo de dessorção dos analitos da fibra de SPME foi fixado em 10 minutos. A injeção foi realizada no modo *splitless* por 2 minutos. Após este tempo a taxa *split* foi fixada em 1:20. Dois banhos de água (Microquímica, Florianópolis, Brazil) foram utilizados para controlar as diferentes temperaturas da amostra. Fibra de CAR/PDMS/DVB foi obtida da Supelco.

Procedimento experimental

Todos os experimentos de otimização foram realizados com a fibra comercial CAR/DVB/PDMS, expondo a fibra ao *headspace* da amostra, em frascos de 15 mL para SPME com 0,3 g de pimenta vermelha (obtida comercialmente), 2 mL de solução saturada de NaCl e agitação magnética constante.

Otimização do tempo e temperatura de extração

Nesta etapa foi realizado um planejamento fatorial fracionado e as variáveis e suas faixas estudadas foram: temperatura de extração (0-60 °C) e tempo de extração (10-60 min). O cromatograma obtido foi dividido em três regiões (3 grupos), e com base nos resultados de temperatura ótima obtida para cada grupo, escolheram-se como temperaturas ótimas 10 °C, 30 °C e 60 °C.

Otimização da porcentagem de tempo

O processo de extração iniciou com o frasco no banho com temperatura superior (60 °C), permanecendo por um tempo de acordo com o planejamento, em seguida o frasco foi retirado e transferido para o banho na temperatura intermediária (30 °C), no qual permaneceu pelo tempo planejado e por fim o frasco foi transferido para um banho a 10 °C e lá permaneceu até que o tempo de 60 minutos fosse alcançado, conforme procedimento mostrado na Figura 34.

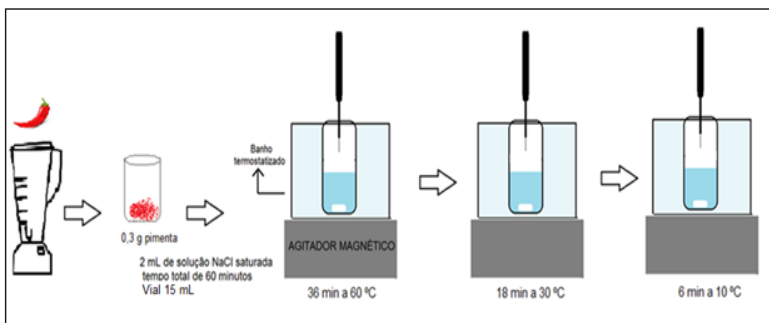


Figura 34. Esquema da extração dos compostos voláteis da pimenta através do HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.

Comparação das metodologias com uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento

A comparação das metodologias com uma, duas ou três temperaturas foi realizada através de 3 ensaios : 1) 60 min a 60 °C; 2) 30 min a 60 °C e 30 min a 10 °C; 3) 36 min a 60 °C seguido de 18 min a 30 °C e por fim 6 min a 10 °C.

7.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A intenção deste estudo foi avaliar se a metodologia proposta no trabalho anterior funcionaria para análise de compostos voláteis de uma matriz diferente do mel. A matriz escolhida foi a pimenta vermelha.

Primeiramente uma otimização envolvendo o método convencional (apenas uma temperatura) foi realizada e as variáveis estudadas foram: tempo e temperatura de extração. Na etapa seguinte, foi realizada uma otimização utilizando três temperaturas diferentes no mesmo processo de extração, avaliando-se a porcentagem de tempo que a fibra deveria ficar exposta em cada uma delas. Por fim foi feita uma comparação das metodologias uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento.

Otimização do tempo e temperatura de extração

Uma otimização multivariada, Matriz Doehlert, foi realizada para o estudo das variáveis e suas interações sendo avaliadas: temperatura de extração (0-60 °C) e tempo de extração (10-60 min). O planejamento dos experimentos pode ser visto na Tabela 17.

Tabela 17. Ensaios realizados, matriz Doehlert, para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha utilizando a HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento.

Ensaio	Tempo de extração (min)	Temperatura de extração (°C)
1	35	0
2	10	15
3	60	15
4	35	30
5	10	45
6	60	45
7	35	60
8	35	30
9	60	0

A partir dos resultados obtidos gerou-se a superfície resposta tempo de extração *versus* temperatura de extração, conforme pode ser visto na Figura 35.

Pode-se observar que um tempo de 60 minutos e temperatura de 60 °C devem ser selecionados como tempo e temperatura compromisso para análise simultânea dos compostos voláteis presentes na pimenta.

Contudo, no intuito de demonstrar o diferente comportamento dos analitos frente à temperatura de extração, os resultados obtidos foram divididos em três grupos distintos: o primeiro contendo os compostos mais leves (Figura 36A), o segundo contendo os compostos intermediários (Figura 36B) e o último grupo contendo os compostos mais pesados (Figura 36C).

Através da Figura 36 é possível observar que para o grupo 1 os melhores resultados foram obtidos utilizando-se temperaturas mais baixas (em torno de 10 °C). Já para os analitos do grupo 2 temperaturas medianas (em torno de 30 °C) apresentam melhores resultados. Por fim, os compostos menos voláteis apresentaram os melhores resultados quando uma temperatura mais elevada foi utilizada (em torno de 60 °C).

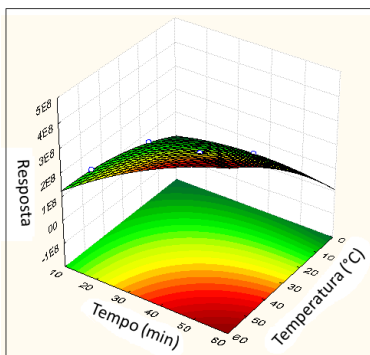


Figura 35. Superfície resposta de tempo de extração *versus* temperatura de extração, para determinação simultânea dos compostos voláteis da pimenta por HS-SPME e detecção por GC-MS

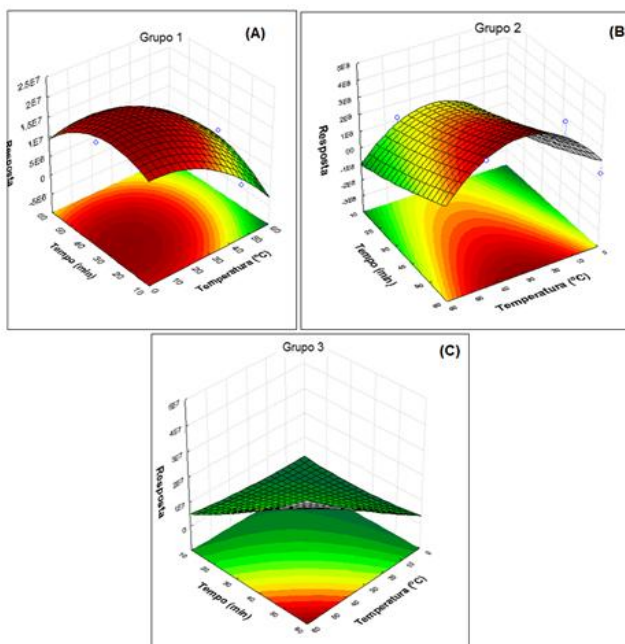


Figura 36. Superfície resposta de tempo de extração *versus* temperatura de extração (A) grupo 1 (compostos mais voláteis) (B) grupo 2 (compostos volatilidade intermediária) e (C) grupo 3 (compostos menos voláteis), obtida na determinação dos compostos voláteis da pimenta vermelha HS-SPME e detecção por GC-MS.

Percebeu-se então que a temperatura de extração realmente foi bastante diferente para cada um dos grupos e que ao se utilizar uma única temperatura compromisso comprometeria a eficiência de extração para um ou outro grupo de analitos. Por este motivo, a metodologia de HS-SPME com três temperaturas diferentes no mesmo procedimento de extração, foi selecionada a fim de contornar este problema.

Otimização da variável porcentagem de tempo em cada uma das três temperaturas escolhidas

As temperaturas alta, média e baixa foram selecionadas com base nos resultados da Figura 36: temperatura alta 60 °C, temperatura média 30 °C e temperatura baixa de 10 °C. Este estudo foi realizado variando-se a porcentagem de tempo que a fibra ficaria exposta em cada uma das temperaturas, conforme Tabela 18.

Tabela 18. Planejamento da porcentagem de tempo da amostra em cada uma das três temperaturas, para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME.

Ensaio	% Tempo extração à 60 °C	% Tempo extração à 30 °C	% Tempo extração à 10 °C
1	0	0	60
2	0	60	0
3	60	0	0
4	0	30	30
5	30	0	30
6	30	30	0
7	20	20	16
8	20	20	20
9	36	18	6

A partir dos resultados obtidos gerou-se a superfície triangular, Figura 37.

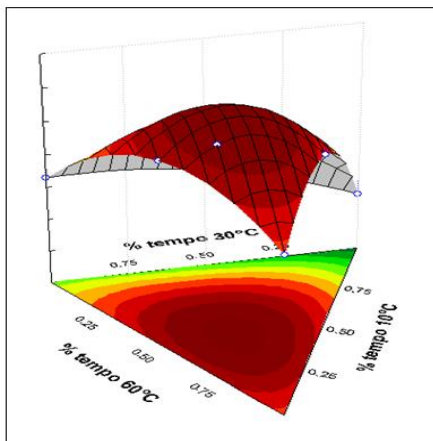


Figura 37. Superfície resposta triangular % de tempo em cada temperatura para determinação dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS.

Como pode ser visto na Figura 37, os melhores resultados foram obtidos com 10 % do tempo (6 minutos) a 10 °C, 30 % do tempo (18 minutos) a 30 °C e 60 % do tempo (36 minutos) a 60 °C. Novamente, a maior porcentagem de tempo requerida foi na temperatura de 60 °C, provavelmente devido ao fato de que nesta temperatura ocorra a extração dos compostos menos voláteis, os quais demoram mais tempo para atingir o equilíbrio analito/*headspace*/fibra, do que quando comparado aos mais voláteis, os quais precisaram de apenas 6 minutos a 10 °C.

Comparação das metodologias com uma, duas e três temperaturas de extração no mesmo procedimento

De maneira a comparar a nova metodologia usando três temperaturas com a metodologia de duas temperaturas e a metodologia convencional, uma amostra de pimenta vermelha foi submetida aos três procedimentos: 1) 60 min a 60 °C (método convencional com uma única temperatura da amostra), 2) 30 min a 60 °C e 30 min a 10 °C (método com duas temperaturas da amostra) e o método proposto nesse trabalho, que compreende 36 min de extração a 60 °C seguido de 18 min de extração a 30 °C e por fim 6 min de extração a 10 °C. Os resultados podem ser vistos através da Figura 38 e os cromatogramas obtidos através da Figura 39.

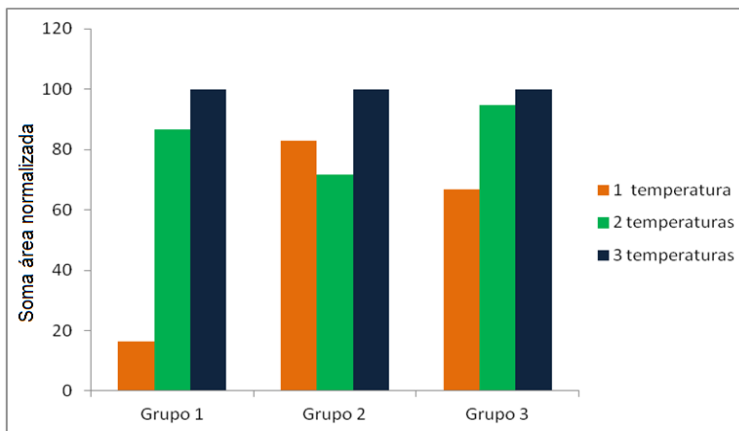


Figura 38. Comparação entre o método proposto com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS. (G1- compostos mais voláteis, G2 compostos volatilidade intermediária e G3- compostos pouco voláteis).

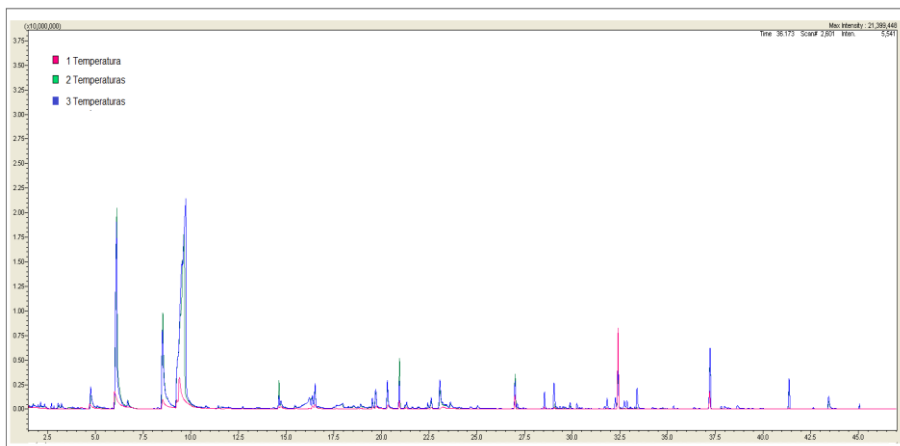


Figura 39. Cromatogramas obtidos através da comparação do método com três temperaturas, método com duas temperaturas e o método convencional com apenas uma temperatura para extração dos compostos voláteis da pimenta vermelha por HS-SPME e detecção por GC-MS.

A partir da Figura 38 pode-se perceber que a metodologia que utiliza 3 temperaturas diferentes no mesmo procedimento de extração obteve melhores resultados do que as outras metodologias, uma vez que

ela favorece todos os grupos de analitos (baixa, média e alta volatilidade) não deixando que nenhum grupo fosse prejudicado pelo uso de uma temperatura compromisso.

7.4 CONCLUSÃO

A técnica de HS-SPME utilizando três temperaturas diferentes no mesmo procedimento de extração foi utilizada com sucesso para análise dos compostos voláteis da pimenta vermelha, demonstrando ser uma alternativa bastante promissora para determinação de diferentes grupos compostos presentes em uma mesma matriz.

8 CONCLUSÕES FINAIS

Com o método desenvolvido, utilizando dois modos e duas temperaturas de extração no mesmo procedimento, foi possível observar como a temperatura afeta de maneira antagônica a termodinâmica e cinética de extração. Termodinamicamente, há uma melhora na quantidade de analito extraída pela fibra com a diminuição da temperatura da amostra, porém a cinética de extração fica prejudicada em temperaturas baixas. O modo de exposição do recobrimento da fibra também é uma variável que afeta a extração, uma vez que a fibra exposta diretamente na amostra favorece a extração dos analitos de massa molar maior (menos voláteis), enquanto que os analitos mais voláteis são extraídos preferencialmente no *headspace* da amostra. Portanto, o método proposto nesse trabalho mostrou-se interessante e eficiente, pois proporciona que analitos de diferentes volatilidades possam ser eficientemente extraídos em um único procedimento de extração, sem que um ou outro grupo de analitos seja favorecido.

O outro método proposto para extração dos compostos voláteis de matrizes alimentícias, o qual utiliza três temperaturas de extração no mesmo procedimento, foi de grande importância, pois permitiu extrair, de maneira mais eficiente, compostos de diferentes volatilidades de matrizes complexas como o mel e a pimenta vermelha. Pôde-se observar que ao utilizar uma temperatura compromisso, uma classe ou outra de analitos acabava sendo prejudicada. Porém com o uso de três temperaturas no mesmo procedimento de extração, foi possível observar que para todos os analitos (baixa, média e alta volatilidade) a extração se tornou mais eficiente, demonstrando ser uma técnica simples e promissora para extração de compostos voláteis de matrizes complexas.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Wang, P.; Li, Z.; Qi, T.; Li, X. & Pan, S.; **Development of a method for identification and accurate quantization of aroma compounds in Chinese Daohuaxiang liquors based on SPME using a sol-gel fiber.** *Food Chemistry*, 169 (2015) 130-240
- [2] Vichi, S.; Jerí, Y.; Cortés-Francisco, N.; Palacios, O. & Caixach, J.; **Determination of volatile thiols in roasted coffee by derivatization and liquid chromatography-high resolution mass spectrometric analysis.** *Food Research International*, 64 (2014) 610–617.
- [3] Li, Y.; Qiao, L.; Li, F.; Ding, Y.; Yang, Z.; & Wang, M.; **Determination of multiple pesticides in fruits and vegetables using a modified quick, easy, cheap, effective, rugged and safe method with magnetic nanoparticles and gas chromatography tandem mass spectrometry.** *Journal of Chromatography A*, 1361 (2014) 77-87.
- [4] Zhang, W.; Asiri, A. M.; Liu, D.; Du, D. & Lin, Y.; **Nanomaterial-based biosensors for environmental and biological monitoring of organophosphorus pesticides and nerve agents.** *Trends in Analytical Chemistry*, 54 (2014) 1-10.
- [5] Song, J.; Forney, C. F. & Jordan, M. A.; **A method to detect diphenylamine contamination of apple fruit and storages using headspace solid phase micro-extraction and gas chromatography/mass spectroscopy.** *Food Chemistry*, 160 (2014) 255-259.
- [6] Benedé, J. L.; Chisvert, A.; Giokas, D. L. & Salvador, A. **Development of stir bar sorbitive-dispersive microextraction mediated by magnetic nanoparticles and its analytical application to the determination of hydrophobic organic compounds in aqueous media.** *Journal of Chromatography A.*, 1362 (2014) 25-33.
- [7] *Moreira, N., Meireles, S., Brandão, T. & Pinho, P. G. Optimization of the HS-SPME–GC–IT/MS method using a central composite*

design for volatile carbonyl compounds determination in beers. *Talanta*, 117 (2013) 523-531.

[8] Barros, E. P., Moreira, N., Pereira, G. E., Leite, S. G. F., Rezende, C. M. & Pinho, P. G. **Development and validation of automatic HS-SPME with a gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines.** *Talanta*, 101 (2012) 177-186.

[9] Cirlini, M., Caligiani, A., Palla, L. & Palla, G. **HS-SPME/GC-MS and chemometrics for the classification of Balsamic Vinegars of Modena of different maturation and ageing.** *Food Chemistry*, 124 (2011) 1678-1683.

[10] Filho, A. M., Santos, F. N. & Pereira, P. A. P. **Development, validation and application of a methodology based on solid-phase micro extraction followed by gas chromatography coupled to mass spectrometry (SPME/GC-MS) for the determination of pesticide residues in mangoes.** *Talanta*, 81 (2010) 346-354.

[11] Kim, T. K.; Kim, S. & Lee, K. G.; **Analysis of furan in heat-processed foods consumed in Korea using solid phase microextraction-gas chromatography/mass spectrometry (SPME-GC/MS).** *Food Chemistry*, 123 (2010) 1328-1333.

[12] Kujawski M. W. & Namiesnik J. **Challenges in preparing honey samples for chromatographic determination of contaminants and trace residues.** *Analytical Chemistry*, 27 (2008) 785-793.

[13] Wang, S.; Oakes, K. D.; Bragg, L. M.; Pawliszyn, J.; Dixon, G.; Mark & Servos, R. **Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish.** *Chemosphere*, 85 (2011) 1472-1480.

[14] Avila, M. A. S.; Breiter, R. & Mott, H.; **Development of a simple, accurate SPME-based method for assay of VOCs in column breakthrough experiments.** *Chemosphere*, 66 (2007) 18-29.

[15] Nardini, G. S.; Merib, J. O.; Dias, A. N.; Dutra, J. N. B.; Silveira, C. D. S.; Budziak, D.; Martendal, E. & Carasek, E.; **Determination of**

volatile profile of citrus fruit by HS-SPME/GC-MS with oxidized NiTi fibers using two temperatures in the same extraction procedure. *Microchemical Journal*, 109 (2013) 128-133.

[16] Tankiewicz, M.; Morrison, C. & Biziuk, M.; **Multi-residue method for the determination of 16 recently used pesticides from various chemical groups in aqueous samples by using DI – SPME coupled with GC–MS.** *Talanta*, 107 (2013) 1-10.

[17] Delgado, F. J., González-Crespo, J., Cava, R., García-Parra, J. & Ramírez, R. **Characterisation by SPME–GC–MS of the volatile profile of a Spanish soft cheese P.D.O. Torta del Casar during ripening.** *Food Chemistry*, 118 (2010) 182-189.

[18] Martendal, E.; **Novas estratégias de otimização para a técnica de SPME e SPME com recobrimento internamente refrigerado.** Tese de doutorado (2011) Universidade Federal de Santa Catarina.

[19] Farhadi, K.; Matin, A. A.; Amanzadeh, H.; Biparva, P.; Tajik, H.; Farshid, A. A. & Pirkharrati, H.; **A novel dispersive micro solid phase extraction using zein nanoparticles as the sorbent combined with headspace solid phase micro-extraction to determine chlorophenols in water and honey samples by GC–ECD.** *Talanta*, 128 (2014) 493-499.

[20] Wang, S.; Oakes, K. D.; Bragg, L. M.; Pawliszyn, J.; Dixon, G. & Servos, M. R.; **Validation and use of in vivo solid phase micro-extraction (SPME) for the detection of emerging contaminants in fish.** *Chemosphere*, 85 (2011) 1472-1480.

[21] Roldán-Pijuán, M.; Lucena, R.; Cárdenas, S. & Valcárcel, M.; **Micro-solid phase extraction based on oxidized single-walled carbon nanohorns immobilized on a stir borosilicate disk: Application to the preconcentration of the endocrine disruptor benzophenone-3.** *Microchemical Journal*, 115 (2014) 87-94.

[22] Ghaemi, F.; Amiri, A. & Yunus, R.; **Methods for coating solid phase microextraction fibers with carbon nanotubes.** *Trends in Analytical Chemistry*, 59 (2014) 133-143.

- [23] Valenzuela, A.; Lespes, G.; Quiroz, W.; Aguilar, L. F. & Bravo, M. A.; **Speciation analysis of organotin compounds in human urine by headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography with pulsed flame photometric detection.** *Talanta*, 125 (2014) 196-203.
- [24] He, J.; Lv, R.; Zhan, H.; Wang, H.; Cheng, J.; Lu, K. & Wang, F.; **Preparation and evaluation of molecularly imprinted solid-phase micro-extraction fibers for selective extraction of phthalates in an aqueous sample.** *Analytica Chimica Acta*, 674 (2010) 53-58.
- [25] Dalby, O. & Birkett, J. W.; **The evaluation of solid phase micro-extraction fibre types for the analysis of organic components in unburned propellant powders.** *Journal of Chromatography A*, 1217 (2010) 7183-7188.
- [26] Rocha, S. M. ; Salvador A.C.; Martins, C.; Barbosa, C.; Santos, M. & Petronilho, S.; **Microextração em fase sólida e cromatografia de gás: Uma combinação de elevado potencial.** *Scientia Chromatographica*, 5 (2013) 284-300
- [27] Coast, A.; El Nemr, E. A. & Abd-Allah, A. M. A.; **Contamination of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in microlayer and subsurface waters along.** *Chemosphere*, 52 (2003) 1711-1716.
- [28] Hosseinzadeha, R.; Tahmasebib, R.; Farhadic, K.; Moosavi-Movahedia, A. A.; Jouyband, A. A. & Badraghie, A.; **Novel cationic surfactant ion pair based solid phase microextraction fiber for nano-level analysis of BTEX.** *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84 (2011) 13-17.
- [29] Yen, T.; Lin-Tan, D. & Lin, J.; **Food safety involving ingestion of foods and beverages prepared with phthalate-plasticizer containing clouding agents.** *Journal of the Formosan Medical Association*, 110 (2011) 671- 684.
- [30] Loureiro, I. R.; **A importância e ocorrência de ftalatos em água potável e no ecossistema da Baía de Guanabara.** Tese de Doutorado (2002) PUC-Rio.

- [31] Kim, S. H.; Chun, S.; Jang, J. Y.; Chae, H. D.; Kim, C. & Kang, B. M.; **Increased plasma levels of phthalate esters in women with advanced-stage endometriosis: a prospective case-control study.** 95 (2011) 357-359.
- [32] Mtibe, A.; Msagati, T. A. M.; Mishra, K. A. & Mamba, B. B.; **Determination of phthalate ester plasticizers in the aquatic environment using hollow fibre supported liquid membranes.** *Physics and Chemistry of the Earth*, 52 (2012) 239–242.
- [33] Disponível em: <<http://www.cetesb.sp.gov.br>>. Acesso em 18 novembro de 2014.
- [34] Khalili-Fard, V.; Ghanemi, K.; Nikpour, Y. & Mehdi Fallah-Mehrjardi, M.; **Application of sulfur microparticles for solid-phase extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from sea water and wastewater samples.** *Analytica Chimica Acta*, 714 (2012) 89–97.
- [35] Pinto, J. I. A.; **Estudo dos níveis de Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos em Nodipecten nodosus (Coquilles Saint-Jacques) de Fazendas Marinhas da Bahia da Ilha Grande-RJ.** Dissertação de mestrado (2008) Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca/FIOCRUZ.
- [36] Mesquita, A. C.; **Uso das técnicas de oxidação química e biodegradação na remoção de alguns compostos recalcitrantes.** Tese apresentada a UFRJ para obtenção do grau de doutor (2004).
- [37] Galinaro, C. A. & Franco, D. W.; **Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAS) em cachaça, rum, uísque e álcool combustível Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) in cachaça, rum, whiskey and alcohol fuel.** *Quím. Nova*, 32 1447-1451 (2009)
- [38] Sousa, F. W.; **Estimativa da exposição e risco de câncer a compostos carbonílicos e btex em postos de gasolina na cidade de fortaleza-ce.** Tese doutorado (2011) Universidade Federal do Ceará.
- [39] Tahmasebi, R. H. R.; Khalil Farhadi, K.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Jouyban, A. & J.; **Novel cationic surfactant ion pair based solid**

phase microextraction fiber for nano-level analysis of BTEX. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 84 (2011) 13–17.

[40] Vidal, C. B.; Raulino, G. S. C.; Barros, A. L.; Lima, A. C. A.; Ribeiro, J. P.; Pires, M. J. R. & Nascimento, R. F.; **BTEX removal from aqueous solutions by HDTMA-modified Y zeolite.** *Journal of Environmental Management*, 112 (2012) Pages 178-185.

[41] Nourmoradia, H.; Nikaeena, M. & Khiadani, M.; **Removal of benzene, toluene, ethylbenzene and xylene (BTEX) from aqueous solutions by montmorillonite modified with nonionic surfactant: Equilibrium, kinetic and thermodynamic study.** *Chemical Engineering Journal*, 191 (2012) 341–348.

[42] Bogusz, S. J.; **Caracterização química da fração volátil e estudo do potencial antioxidante em pimentas do gênero *capsicum*.** Tese doutorado (2010) universidade Estadual de campinas.

[43] Karabagias, K. L.; Badeka, A.; Kontakos, S.; Karabournioti, S.; Michael G. & Kontominas, M. G.; **Characterisation and classification of Greek pine honeys according to their geographical origin based on volatiles, physicochemical parameters and chemometrics.** *Food Chemistry*, 146 (2014) 548-557.

[44] Seisonen, S.; Kivima, E. & Vene, K.; **Characterisation of the aroma profiles of different honeys and corresponding flowers using solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry/olfactometry.** *Food Chemistry*, 169 (2015) 34-40.

[45] Junior, S. B.; Melo, A. M. T.; Zini, C. A. & Godoy, H. T.; **Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction.** *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3345-3350.

[46] Castro Alves, V. C.; Pinto, N. O. F.; Penha, A. M. F.; Gomes, B. L.; Reifschneider, F. J. B. & Garruti, D. S.; **Chapter 104 - Aroma-Active Compounds of *Capsicum Chinense* Var. Biquinho.** *Flavour Science*, (2014) 567-571.

- [47] Aliferis , K. A.; Tarantilis, P. A.; Harizanis , P. C. & Alissandrakis, E.; **Botanical discrimination and classification of honey samples applying gas chromatography/mass spectrometry fingerprinting of headspace volatile compounds.** *Food Chemistry*, 121 (2010) 856–862.
- [48] Plutowska, B.; Chmiel, T.; Dymerski, T. & Wardencki, W.; **A headspace solid-phase microextraction method development and its application in the determination of volatiles in honeys by gas chromatography.** *Food Chemistry*, 126 (2011) 1288–1298.
- [49] Bianchi, F.; Mangia, A.; Mattarozzi, M. & Musci, M.; **Characterization of the volatile profile of thistle honey using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography–mass spectrometry.** *Food Chemistry*, 129 (2011) 1030–1036.
- [50] Bogusz, S. J.; Melo, A. M. T.; Zini, C. A. & Godoy, H. T.; **Optimization of the extraction conditions of the volatile compounds from chili peppers by headspace solid phase micro-extraction.** *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) 3345–3350.
- [51] Morenoa, E.; Fita, A.; González-Mas, C. M & Rodríguez-Burruezo, A. C.; **HS SPME study of the volatile fraction of Capsicum accessions and hybrids in different parts of the fruit.** *Scientia Horticulturae*, 135 (2012) 87–97.
- [52] Karabagias, I. K.; Vavoura, M. V.; Nikolaou, C.; Badeka, A. V.; Kontakos, S. & Kontominas, M. G.; **Floral authentication of Greek unifloral honeys based on the combination of phenolic compounds, physicochemical parameters and chemometrics.** *Food Research International*, 62 (2014) 753–760
- [53] Lianda, R. L. P.; **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante. Tese doutorado (2009) Universidade Federal Rio de Janeiro.**
- [54] Bastos, D. H. M.; Franco, M. R. B.; Silva, M. A. A. P.; Janzantti, N. S. & Marques, M. O. M.; **Composição de voláteis e perfil de aroma e sabor de méis de eucalipto e laranja.** *Ciência Tecnologia Alimentos*, 22 (2002) 122–129.

[55] Bogusz, S. J.; Tavares, A. M.; Filho, J. T.; Zini, C. A. & Helena Teixeira Godoy, H. T.; **Analysis of the volatile compounds of Brazilian chilli peppers (*Capsicum* spp.) at two stages of maturity by solid phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry.** *Food Research International*, 48 (2012) 98–107.

[56] Bandeira, C. M.; **Desenvolvimento e validação de um método para determinação de colesterol em farinha de carne e ossos em mistura de alimentos para ruminantes utilizando cromatografia gasosa;** Dissertação mestrado (2007) Escola de Veterinária da Universidade Federal de Minas Gerais da cidade de Belo Horizonte.

[57] Collins, C.; Braga, G. & Bonato, P.; **Fundamentos de cromatografia.** Editora da UNICAMP (2006) 452.

[58] Lopes, C. M. O.; **Caracterização de resinas naturais e seus derivados por análise multivariada.** Dissertação de mestrado (2008) Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa. (2008)

[59] Budsiak, D.; **Desenvolvimento de método para a determinação de trihalometanos em águas de Florianópolis – sc usando purge & trap e cromatografia gasosa.** Dissertação de mestrado (2005) UFSC.

[60] Grossi, P.; **Desenvolvimento e aplicação de técnicas miniaturizadas de preparo de amostras para análises ambientais via GC-MS.** Tese de doutorado (2009) Universidade de São Paulo.

[61] Caldas, S. S.; Gonçalves, F. F.; Primel, E. G.; Prestes, O. D.; Martins, M. L. & Zanella, R.; **Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas.** *Quim. Nova*, 34 (2011) 1604-1617.

[62] Pinho, G. P.; Neves, A. A.; Queiroz, M. E. L. R. & Silvério, F. O.; **Pesticide determination in tomatoes by solid-liquid extraction with purification at low temperature and gas chromatography.** *Food Chemistry*, 121 (2010) 251-256.

- [63] FCamino-Sánchez, F. J.; Rodríguez-Gómez, R.; Zafra-Gómez, A.; Santos-Fandila, A. & Vílchez, J.L.; **Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends- Review.** *Talanta*, 130 (2014) 388-399.
- [64] Moniruzzaman, M.; Rodríguez, I.; Rodríguez-Cabo, T.; Cela, R.; Sulaiman, S. A. & Gan, S. H.; **Assessment of dispersive liquid-liquid microextraction conditions for gas chromatography time-of-flight mass spectrometry identification of organic compounds in honey.** *Journal of Chromatography A*, 1368 (2014) 26-36.
- [65] Silva, B. J. G.; **Avaliação da técnica SPME/LC na análise de antidepressivos em amostra de plasma para fins de monitorização terapêutica.** Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo.
- [66] Chaves, A. R. & Queiroz, M. E. C.; **Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos.** *Quím. Nova* (2008) 31 1814-1819.
- [67] Almeida, C. P. S.; **Determinação de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em águas por microextração em fase líquida associada à cromatografia gasosa e espectrometria de massa.** Dissertação de mestrado (2010) Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa.
- [68] Simões, R. A.; **Avaliação de técnica miniaturizadas de preparação de amostras na análise enantiosseletiva de fármacos quirais com diferentes características ácido-base em meio microsomal e aplicação em estudos de metabolismo in vitro.** Tese de doutorado Universidade de São Paulo.
- [69] Nome, R. C. **Uso de um novo método de agitação para microextração em fase sólida – SPME- na determinação de fenóis em água.** Dissertação de mestrado (2002) UFSC. Florianópolis.
- [70] Baltussen, E.; Sandra, P. Cramers, F. D. C.; **Stir Bar Sorptive Extraction(SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles.** *Journal Microcol*, 11 (1999) 737-747.

[71] Arthur, C. L.; Pawliszyn, J. **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.** *Analytical Chemistry*, 62 (1990) 2145

[72] Silva, C. F. **Determinação de resíduos dos pesticidas pirimetanil, pirimicarbe e buprofezina em águas ambientais por SPME e GC-MS.** Dissertação de mestrado (2009) Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão.