

Josias de Oliveira Merib

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO EM
FASE SÓLIDA COM E SEM REFRIGERAÇÃO INTERNA EM
AMOSTRAS DE ERVAS MEDICINAIS E ÁGUA DE RIO**

Dissertação submetida ao
Programa de Pós-Graduação em
Química da Universidade Federal
de Santa Catarina para a obtenção
do Grau de Mestre em Química

Orientador: Prof. Dr. Eduardo
Carasek da Rocha

Florianópolis

2013

Josias de Oliveira Merib

**OTIMIZAÇÃO E APLICAÇÃO DA MICROEXTRAÇÃO EM
FASE SÓLIDA COM E SEM REFRIGERAÇÃO INTERNA EM
AMOSTRAS DE ERVAS MEDICINAIS E ÁGUA DE RIO**

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

Florianópolis, 19 de fevereiro de 2013.

Prof. Dr. Almir Spinelli
Coordenador do Programa

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Eduardo Carasek da Rocha
Orientador

Prof. Dr. Luiz Augusto dos Santos Madureira
(DQ-UFSC)

Prof^a. Dr^a. Ana Carolina de Oliveira Costa
(CAL-UFSC)

Dr^a. Heloisa França Maltez
(CAL-UFSC)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela força e vontade de seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais José e Izaldi, e ao meu irmão Jonivan, pelo carinho e apoio de sempre, pelo exemplo de vida e por me ensinarem a nunca desistir.

A minha namorada Giuliana Stael Nardini, pelo carinho, amor, amizade, pelo auxílio em diversas etapas desse trabalho, bem como pelo enorme aprendizado.

Ao professor Dr. Eduardo Carasek pela orientação, sugestões, ideias e também por ter me aceito no seu grupo de pesquisa.

Aos amigos e colegas do Laboratório 209 do Departamento de Química da UFSC, pelo ambiente, discussões e propostas de trabalho.

Ao amigo Alfredo pelas conversas, discussões e troca de ideias.

Aos amigos e parentes de Lagoa Vermelha – RS, que mesmo de longe estão sempre comigo, principalmente aos meus primos Vinícius e Guilherme e aos grandes amigos Anderson e Claudinei.

Aos professores e servidores do Departamento de Química da UFSC.

À Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida.

SUMÁRIO

RESUMO.....	.i
ABSTRACT.....	.iii
LISTA DE FIGURAS.....	v
LISTA DE TABELAS.....	.xi
LISTA DE EQUAÇÕES.....	.xiii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xv
CAPÍTULO I: Revisão de Literatura	17
1.1 Preparo de amostras.....	17
1.2 Microextração em Fase Sólida.....	20
1.3 Imersão direta-SPME.....	21
1.4 <i>Headspace</i> -SPME.....	21
1.5 Tipos de fibras para SPME.....	23
1.6 Microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado.....	24
1.7 Sistema de microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado	26
1.8 Otimização multivariada.....	28
1.9 Planejamento composto central	28
1.10 Cromatografia	29
CAPÍTULO II: Objetivos.....	32
2.1 Objetivo Geral	32
2.2 Objetivos Específicos	32
CAPÍTULO III: Otimização e aplicabilidade dos procedimentos envolvendo SPME convencional e SPME com recobrimento internamente refrigerado para determinação do perfil volátil de ervas medicinais brasileiras	33
3.1 INTRODUÇÃO.....	33
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	35
3.2.1 Equipamentos.....	35
3.2.2 Materiais em geral.....	35

3.2.3	Amostras	35
3.2.4	Preparo das amostras.....	36
3.2.5	Escolha do recobrimento da fibra para o procedimento HS-SPME convencional	36
3.2.6	Otimizações multivariadas.....	36
3.2.7	Determinação do perfil volátil das ervas medicinais....	39
3.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
3.3.1	Escolha da fibra para HS-SPME convencional.....	40
3.3.2	Procedimento HS-SPME convencional	40
3.3.3	Otimização da temperatura da fibra no procedimento de HS-CF-SPME	43
3.3.4	Procedimento envolvendo HS-CF-SPME.....	46
3.3.5	Uso de duas temperaturas da fibra em um mesmo procedimento de CF-HS-SPME.....	48
3.3.6	Comparação entre os procedimentos HS-SPME convencional e HS-CF-SPME	52
3.3.7	Determinação do perfil volátil das ervas medicinais por CF-HS-SPME	54
3.4	CONCLUSÕES.....	59
CAPÍTULO IV: Determinação simultânea de trihalometanos (THM) e pesticidas organoclorados em amostras aquosas utilizando DI-HS-SPME com duas temperaturas de extração em um mesmo procedimento de microextração		
4.1	INTRODUÇÃO.....	61
4.2	MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.2.1	Equipamentos.....	63
4.2.2	Materiais em geral.....	63
4.2.3	Reagentes e soluções.....	63
4.2.4	Coleta das amostras.....	64
4.2.5	Escolha do recobrimento da fibra para o procedimento HS-SPME	64

4.2.6	Otimizações multivariadas	64
4.2.7	Parâmetros analíticos de mérito	66
4.2.8	Comparação da eficiência dos procedimentos.....	67
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	68
4.3.1	Escolha da fibra para a SPME.....	68
4.3.2	Otimizações das condições de extração no modo HS- SPME.....	68
4.3.3	Otimizações das condições de extração no modo DI- SPME.....	72
4.3.4	Otimização do procedimento de extração utilizando DI- HS-SPME.....	75
4.3.5	Parâmetros analíticos de mérito	77
4.3.6	Aplicação do procedimento envolvendo DI-HS-SPME em amostras de água de rio	78
4.3.7	Comparação da eficiência dos procedimentos.....	81
4.4	CONCLUSÕES	83
5.	REFERÊNCIAS.....	85

RESUMO

A microextração em fase sólida no modo de extração *headspace* (HS-SPME, do inglês *headspace – solid phase microextraction*) e a microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado no modo *headspace* (HS-CF-SPME, do inglês *headspace – coldfiber – solid phase microextraction*) foram utilizadas para a determinação do perfil volátil de amostras de ervas medicinais comumente encontrados no sul do Brasil, sendo elas sálvia, alcachofra, erva-doce, hortelã, macela e camomila. Otimizações multivariadas permitiram a determinação das condições de extração para ambos procedimentos e as análises foram feitas por cromatografia gasosa com detector de ionização em chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography – flame ionization detector*), as repostas utilizadas foram as médias geométricas dos compostos extraídos. As condições otimizadas para o procedimento HS-SPME foram 60 °C e 40 min para, respectivamente, temperatura e tempo de extração. Para o procedimento HS-CF-SPME a condição otimizada de temperatura de extração foi de 60 °C e o tempo de extração de 15 min, sendo a temperatura otimizada do recobrimento da fibra de 5 °C. A utilização de duas temperaturas da fibra no mesmo procedimento de extração para HS-CF-SPME, com o objetivo de extrair compostos voláteis e semi-voláteis, foi otimizada como sendo 60 °C nos primeiros 7,5 min e 5 °C nos 7,5 min finais com um tempo de extração total de 15 min. Os dois procedimentos de HS-CF-SPME foram comparados, sendo que o procedimento HS-CF-SPME com apenas uma temperatura da fibra apresentou melhor desempenho para os compostos mais voláteis, e a estratégia em utilizar duas

temperaturas da fibra apresentou melhor desempenho para todos os compostos. Também foi possível determinar o perfil volátil de cada erva estudada por esta técnica de preparo de amostras utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *gas chromatography – mass spectrometry*).

A utilização de dois modos de extração (imersão direta e *headspace*) e duas temperaturas de extração em um mesmo procedimento de SPME para a determinação simultânea de trihalometanos (THM) e pesticidas organoclorados em amostras aquosas foi estudada. Otimizações multivariadas para a escolha das melhores formas de extração (*headspace* e imersão direta) foram aplicadas. Em relação a utilização dos dois modos de extração simultâneos em um mesmo procedimento, as condições ideais foram tempo de extração de 70 min, sendo 28 min no modo HS-SPME a 12 °C (favorecendo a extração dos THM) e 42 min no modo DI-SPME a 80 °C (favorecendo a extração dos pesticidas organoclorados). A partir desta otimização foi construída a curva de calibração para os compostos estudados sendo obtidos coeficientes de correlação acima de 0,98; percentuais de recuperação entre 90,8 – 103,7% e desvios padrão relativos entre 11,4 e 17,9%, ambos esses dados obtidos para concentrações de 20 µg.L⁻¹ e utilizada a média aritmética das triplicatas (n=3). Posteriormente, esse procedimento foi aplicado em amostras de água coletadas do rio Araranguá – SC.

Palavras-chave: preparo de amostras, HS-SPME, HS-CF-SPME, trihalometanos, pesticidas organoclorados.

ABSTRACT

The solid phase microextraction in headspace extraction mode (HS-SPME) and internally-cooled-solid phase microextraction in headspace mode (HS-CF-SPME) were used for determining the volatile profile in samples of herbs commonly found in southern Brazil, such as sage, artichoke, fennel, peppermint, macela and chamomile. Multivariate optimizations allowed the determination of the extraction conditions for both procedures and analyzes were performed by gas chromatography with flame ionization detector (GC-FID) the responses were the geometric means of extracted compounds. The optimized conditions for the HS-SPME procedure were 60 °C and 40 min respectively for temperature and extraction time. For the HS-CF-SPME procedure the optimized condition was extraction temperature 60 °C and the extraction time of 15 min with the fiber coating temperature optimized at 5 °C. The use of two fiber temperatures in the HS-CF-SPME procedure in order to extract volatile and semi-volatile compounds has been optimized, were used 60 °C in first 7.5 min and 5 °C in 7.5 min remaining, on a total extraction time of 15 min. Both procedures HS-CF-SPME were compared, and the HS-CF-SPME procedure with one fiber temperature performed better only for the more volatile compounds, and the strategy of using two fiber temperatures showed better performance for all compounds. It was also possible to determine the volatile profile of each herb studied by this sample preparation technique using gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS).

The use of two extraction modes (direct immersion and headspace) and two extraction temperatures in the same SPME procedure to

simultaneous determination of trihalomethanes (THM) and organochlorine pesticides in aqueous samples was studied. Multivariate optimizations for the choice of the best extraction conditions (headspace and direct immersion) so applied. Regarding the use of two modes of simultaneous extraction in a single extraction procedure, the ideal conditions were extraction time of 70 min, 28 min in the HS-SPME mode at 12 °C (favoring the extraction of THM) and 42 min in the DI-SPME mode at 80 °C (favoring the extraction of organochlorine pesticides). From this optimization was made a calibration curve for the compounds studied were obtained correlation coefficients above of 0.98; percentage of recovery between 90.8 – 103.7% and relative standard deviations between 11.4 e 17.9%, both this dates were obtained to concentrations of 20 $\mu\text{g.L}^{-1}$ being the arithmetic mean of triplicates (n=3). After, this procedure was applied in water samples collected from the river Araranguá - SC.

Keywords: sample preparation, HS-SPME, HS-CF-SPME, trihalomethanes, organochlorine pesticides

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Fibras para SPME e aplicador (<i>holder</i>).	16
Figura 2: Modo de extração por imersão direta (DI-SPME).....	17
Figura 3: Modo de extração no <i>headspace</i> da amostra (HS-SPME)....	18
Figura 4: Esquema utilizado para a <i>Cold-fiber</i> -SPME.....	22
Figura 5: Esquema da seringa utilizada em <i>Cold-fiber</i> -SPME.....	23
Figura 6: Planejamento composto central: A) duas variáveis ($\alpha = 1,41$) e B) três variáveis ($\alpha = 1,68$).....	25
Figura 7: Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.....	27
Figura 8: Sistema <i>Cold-fiber</i> -SPME disponível no laboratório. 1) Cilindro de CO _{2(l)} ; 2) Capilar de transferência de CO _{2(l)} e fios do termopar; 3) Controlador de temperatura; 4) Válvula solenóide; 5) Bloco de aquecimento da amostra; 6) Seringa de extração; 7) Frasco com a amostra.	33
Figura 9: Gráfico de barras representando a eficiência de extração das diferentes fibras utilizando 10 mg de uma mistura das ervas estudadas, com tempo de extração de 20 min e temperatura de amostra de 60 °C.	36
Figura 10: Superfícies de resposta obtidas com o procedimento HS-SPME convencional para compostos mais voláteis (A), compostos semivoláteis (B) e para todos os compostos (C). Com o tempo de extração variando entre 5 e 50 minutos e a temperatura da amostra variando entre 30 e 60 °C.	37

Figura 11: Superfícies de resposta mostrando a relação entre a temperatura da fibra e o tempo total de extração para compostos mais voláteis (A) e semivoláteis (B). Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura da fibra variando entre 5 e 60 °C, sendo fixada a temperatura da amostra em 60 °C e membrana de PDMS utilizada como fase extratora. 40

Figura 12: Superfície de resposta obtida a partir da condição compromisso entre ambas as classes de compostos relacionando tempo de extração e temperatura da fibra. Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura da fibra variando entre 5 e 60 °C, sendo fixada a temperatura da amostra em 60 °C. 41

Figura 13: Superfícies de resposta representando as diferentes classes de compostos em relação às variáveis tempo e temperatura de extração para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME, sendo (A) compostos mais voláteis; (B) compostos semivoláteis e (C) ambas as classes de compostos. Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura de amostra variando entre 30 e 60 °C mantendo a fibra a 5 °C. 42

Figura 14: Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central, utilizando o tempo total da extração variando entre 5 e 25 min e o percentual desse tempo em que o recobrimento de fibra foi mantido a 5 °C sendo este variado entre 0 e 100% para compostos mais voláteis (A) e semivoláteis (B). 45

Figura 15: Superfície de resposta obtida para a condição compromisso entre ambas as classes de compostos. Utilizando tempo total da extração variando entre 5 e 25 min e o percentual desse tempo em que o recobrimento de fibra foi mantido a 5 °C sendo este variado entre 0 e 100%. 46

Figura 16: Cromatogramas obtidos com GC-FID a partir de uma mistura de sálvia, hortelã, erva-doce, camomila, alcachofra e macela, utilizando membrana de PDMS para o procedimento HS-CF-SPME, temperatura da amostra a 60 °C. (A) temperatura da fibra a 60 °C durante 40 min; (B) temperatura da fibra a 5 °C durante 15 min; (C) Temperatura da fibra a 60 °C durante 7,5 min seguida por resfriamento da fibra a 5 °C mantida durante 7,5 min restantes..... 47

Figura 17: Comparação da eficiência de extração utilizando-se os procedimentos: 1) HS-CF-SPME (membrana de PDMS); 2) HS-CF-SPME (usando duas temperaturas da fibra e membrana de PDMS); 3) HS-SPME (fibra de PDMS); 4) HS-SPME (fibra de PDMS/DVB/CAR); 5) HS-SPME (fibra de PDMS/DVB); 6) HS-SPME (fibra de PA). 48

Figura 18: Superfície de resposta obtida em relação a THM e organoclorados no modo HS-SPME. Utilizando fibra de PDMS/DVB/CAR e tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL..... 65

Figura 19: Superfícies de resposta referentes a THM (A) e pesticidas organoclorados (B) obtidas no modo HS-SPME, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL..... 66

Figura 20: Superfície de resposta obtida em relação às variáveis temperatura de extração e volume de solução aquosa de NaCl a 20% adicionado. utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL..... 67

Figura 21: Superfície de resposta obtida em relação a THM e pesticidas organoclorados no modo DI-SPME, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL. 68

Figura 22: Superfícies de resposta obtidas para as microextrações no modo DI-SPME para (A) THM e (B) pesticidas organoclorados, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL. 69

Figura 23: Superfície de resposta obtida no modo DI-SPME em relação às variáveis tempo de extração e volume de solução de NaCl a 20% adicionado, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL. 71

Figura 24: Superfície de resposta obtida para ambas as classes de compostos relacionando o tempo total de extração e o percentual desse tempo em que foi realizado o procedimento de microextração no modo HS-SPME, utilizando tempo total de extração variando entre 5 – 120 min, percentual do tempo que foi realizada a extração no modo HS-SPME entre 0 – 100% e volume de solução aquosa a 20% de NaCl adicionada entre 0 – 10 mL. 72

Figura 25: Superfície de resposta obtida para ambas as classes de compostos relacionando o tempo de extração e o volume de solução de NaCl adicionada, utilizando tempo total de extração variando entre 5 – 120 min, percentual do tempo que foi realizada a extração no modo HS-SPME entre 0 – 100% e volume de solução aquosa a 20% de NaCl adicionada entre 0 – 10 mL. 73

Figura 26: Cromatograma de uma amostra de água de rio fortificada com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos: 1) clorofórmio; 2) bromodiclorometano; 3) clorodibromometano; 4) bromofórmio; 5) lindano; 6) BHC; 7) aldrin; 8) heptacloro epóxido 76

Figura 27: Gráfico de barras relacionado cada modo com o desempenho de extração de cada composto. 1) Clorofórmio, 2) Bromodiclorometano, 3) Dibromoclorometano, 4) Bromofórmio, 5) Lindano, 6) BHC, 7) Aldrin, 8) Heptacloro epóxido. Modo DI-SPME: temperatura de $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e o tempo de extração de 42 min com 2 mL de NaCl a 20%, modo HS-SPME: temperatura de $12 \text{ }^\circ\text{C}$ e o tempo de extração de 28 min com 10 mL de NaCl a 20%, modo DI-HS-SPME: 42 min a $80 \text{ }^\circ\text{C}$ e 28 min a $12 \text{ }^\circ\text{C}$ com 5 mL de NaCl a 20%. 77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Características de algumas técnicas de extração.....	14
Tabela 2: Variáveis e níveis estudados em cada etapa das otimizações.	35
Tabela 3: Compostos extraídos das ervas medicinais através do procedimento HS-CF-SPME.....	51
Tabela 4: Variáveis e níveis estudados em cada etapa de otimização. .	62
Tabela 5: Parâmetros analíticos de mérito para os compostos analisados.	74
Tabela 6: Percentual de recuperação dos compostos na amostra de água do rio Araranguá.....	74

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1: Constante de equilíbrio matriz-*headspace*.

Equação 2: Constante de equilíbrio *headspace*-fibra.

Equação 3: Constante de equilíbrio matriz-fibra.

Equação 4: Quantidade de analito presente na amostra.

Equação 5: Quantidade de analito extraída pela fibra.

Equação 6: Entropia relacionada ao equilíbrio no *headspace* da mistura gasosa.

Equação 7: Entropia relacionada ao equilíbrio do resfriamento de parte dos analitos pelo recobrimento.

Equação 8: Entropia relacionada ao equilíbrio que ocorre na absorção dos analitos pela fibra.

Equação 9: Taxa de variação da entropia (ΔS) em função da quantidade de analito absorvida pela fibra.

Equação 10: Constante de partição (K_T) entre o recobrimento da fibra e o *headspace* aquecido.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DI – *Direct Immersion* – Imersão direta

HS – *Headspace*

GC – *Gas chromatography* – Cromatografia a gás

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

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

MS – *Mass spectrometry* – Espectrometria de massas

CF- *Cold-fiber*

PDMS - Polidimetilsiloxano

PA - Poliacrilato

PDMS/DVB – Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno

PDMS/DVB/CAR– Polidimetilsiloxano/Divinilbenzeno/Carboxeno

CAR - Carboxeno

DVB - Divinilbenzeno

THM - Trihalometanos

RSM – *Response surface methodology* – Metodologia de superfície de resposta

LOD – *Limit of detection* – Limite de detecção

LOQ – *Limit of quantification* – Limite de quantificação

RSD – *Relative standard deviation* – Desvio padrão relativo

CAPÍTULO I: Revisão de Literatura

1.1 Preparo de amostras

Em praticamente todos os tipos de análises realizadas na química é necessário uma etapa de preparo de amostra anteriormente à análise propriamente dita. É comum não se analisar quimicamente matrizes na forma bruta, pois elas costumam ter e gerar interferências e incompatibilidades com equipamentos analíticos. Para contornar tais problemas, são empregados procedimentos de preparo de amostra, com os quais procura-se isolar e concentrar os analitos a níveis adequados e obter uma condição de limpeza da amostra que não comprometa a sua análise química (VALENTE; AUGUSTO, 2000, p.523).

Existem diversos métodos utilizados na preparação de amostras nas mais variadas matrizes, sendo alguns destes, juntamente com suas vantagens e desvantagens, apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características de algumas técnicas de extração.

Técnica	Princípio da técnica	Vantagens	Desvantagens
Extração Líquido-Líquido	Distribuição do analito entre dois líquidos imiscíveis em função de um coeficiente de partição.	Boa reprodutibilidade, fácil manuseio.	Exige solventes puros, produz grandes quantidades de resíduos.
Extração em fase sólida	Adsorção seletiva do analito em materiais sólidos e posterior dessorção com solventes. Segue os mecanismos da cromatografia em coluna clássica.	Grande disponibilidade de materiais adsorventes, altas recuperações, baixo consumo de solventes.	Cartuchos e discos extratores tornam a técnica mais cara, mais complicada quando realizada manualmente.
Microextração em fase sólida	Distribuição do analito entre duas fases imiscíveis onde a fase extratora é um polímero que reveste uma fibra de sílica fundida.	Técnica versátil, livre do consumo de solventes, pouca quantidade de amostra. Fibras reaproveitáveis.	Fragilidade das fibras, limites de temperatura para cada recobrimento utilizado.

Continua

Continuação

Extração com Membranas	Permeação seletiva do analito através de uma membrana que separa duas fases líquidas.	Alto poder de concentração empregando quantidades reduzidas de solvente.	Parâmetros como o pH algumas vezes devem ser devidamente controlados
Precipitação Protéica	Adição de sais e solventes orgânicos que competem com as proteínas pela água disponível.	Técnica muito simples; baixo custo.	Pouca eficiência na retirada de interferentes; baixa reprodutibilidade; perda do analito.
Extração com Fluido Supercrítico	Solubilização do analito por um fluido no estado supercrítico que depois é coletado em um líquido ou adsorvente.	Pode ser utilizada tanto em amostras sólidas, semissólidas ou líquidas. Não necessita de solventes orgânicos.	O analito precisa ser solúvel no fluido supercrítico.

Adaptado de Orlando, R. M. et al. (2009).

Devem-se levar em consideração vários fatores quando se pretende definir uma forma de preparo de amostra adequada, tais como a quantidade de amostra, o uso ou não de solventes etc. tendo em vista também o tempo necessário de preparo e o instrumento no qual a amostra será analisada.

1.2 Microextração em Fase Sólida

Dentre as técnicas de preparo de amostras, merece destaque a microextração em fase sólida, pois trata-se de uma técnica simples, relativamente rápida, que dispensa o uso de solventes orgânicos extratores e segura (MOHAMMADI; YAMINI; ALIZADEH, 2005, p.1). Foi desenvolvida por Pawliszyn e colaboradores (ARTHUR; PAWLISZYN, 1990, p.2145). Como mencionado anteriormente a SPME é uma alternativa de extração sem o uso de solventes. Este tipo de extração envolve a adsorção/absorção de analitos por uma fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária adequada e a sua subsequente dessorção imediatamente antes da análise cromatográfica (KATAOKA; LORD; PAWLISZYN, 2000, p.35). Na Figura 1 é mostrada uma ilustração esquematizando fibras para SPME juntamente com um dispositivo que protege a fibra e controla a exposição da mesma conhecido como *holder*.

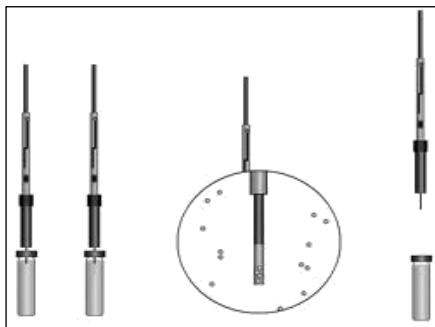


Figura 1: Fibras para SPME e aplicador (*holder*). Fonte: adaptado de Valente; Augusto (2000).

O primeiro passo para o desenvolvimento de um método para SPME é a escolha do recobrimento polimérico. Diferentes fases estacionárias estão disponíveis, diferenciando-se na polaridade, espessura da fase estacionária e o tamanho do recobrimento. Vários recobrimentos utilizam tanto o mecanismo de adsorção (recobrimentos sólidos) quanto o de absorção (recobrimentos líquidos) para extrair os analitos das amostras. Os recobrimentos compostos por PDMS e PA são baseados na absorção, as fibras mistas compostas por PDMS/DVB, CAR/PMDS e a fibra composta por CAR/DVB/PDMS usam o mecanismo de adsorção, sendo que a escolha do recobrimento é determinado pela massa molecular e polaridade dos analitos de interesse

(PAWLISZYN, 2009, p.176). Uma das fibras que tem uma grande aplicabilidade na análise de diferentes tipos de amostras é a composta pelos três polímeros CAR/DVB/PDMS. Esta combinação foi desenvolvida para reter uma maior gama de compostos voláteis, com diferentes polaridades, tais como cetonas, álcoois, aldeídos, ésteres e hidrocarbonetos terpênicos (CEVA-ANTUNES et. al., 2006, p.437).

1.3 Imersão direta-SPME

Um dos modos de extração em SPME é a imersão direta da fibra na amostra, sendo estabelecido um equilíbrio entre o recobrimento da fibra e a amostra propriamente dita. Esta forma de extração é bastante utilizada quando os analitos de interesse não são compostos muito voláteis, tendo desta forma dificuldade em serem liberados para o *headspace* da amostra. A Figura 2 mostra uma representação esquemática de uma microextração em fase sólida pela imersão direta da fibra na amostra.

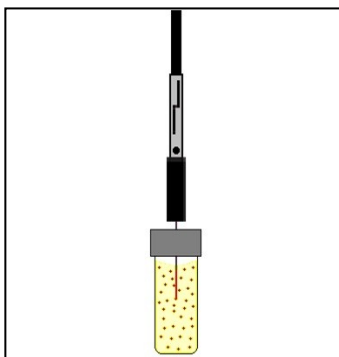


Figura 2: Modo de extração por imersão direta (DI-SPME). Fonte: adaptado de Valente; Augusto (2000).

1.4 *Headspace*-SPME

HS-SPME permite o estabelecimento de um equilíbrio entre a matriz da amostra, no espaço superior acima da amostra, e uma fase estacionária revestida em uma fibra de sílica fundida, tem sido usada para a extração de compostos voláteis em diversas matrizes, tais como legumes, frutas, sucos, refrigerantes ou bebidas alcoólicas (KATAOKA; LORD; PAWLISZYN, 2000. p.35). Um esquema da microextração em fase sólida utilizando *headspace* é mostrado na Figura 3.

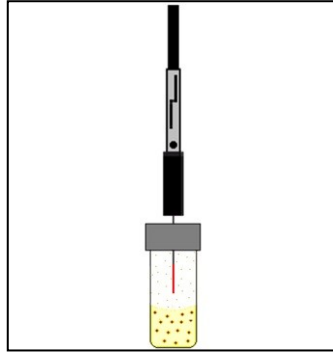


Figura 3: Modo de extração no *headspace* da amostra (HS-SPME).
Fonte: adaptado de Valente; Augusto (2000).

A HS-SPME envolve algumas importantes considerações sobre o equilíbrio estabelecido em relação aos constituintes do sistema, para que se possa ter um entendimento satisfatório desse procedimento de extração. O sistema pode ser dividido em três partes:

- fibra (f)
- matriz (m) e
- *headspace* (h)

Com isso, no processo de microextração podem ser considerados os seguintes equilíbrios e as respectivas constantes de equilíbrio (K) entre o analito (A) e as partes constituintes do sistema:

$$A(\text{matriz}) \rightleftharpoons A(\text{headspace}) \quad K_{mhs} = \frac{chs}{cm} \quad (1)$$

$$A(\text{headspace}) \rightleftharpoons A(\text{fibra}) \quad K_{hsf} = \frac{cf}{chs} \quad (2)$$

Somando-se as equações (1) e (2) pode-se chegar à equação resultante do processo de microextração representada em (3).

$$A(\text{matriz}) \rightleftharpoons A(\text{fibra}) \quad K_{mf} = \frac{cf}{cm} \quad (3)$$

Onde:

Cf = concentração do analito extraída pela fibra

Cm = concentração do analito presente na matriz

Chs = concentração do analito presente no *headspace* da amostra

K_{mhs} = constante de equilíbrio matriz – *headspace*

K_{hsf} = constante de equilíbrio *headspace* – fibra

K_{mf} = constante de equilíbrio matriz – fibra

Através dessas representações, pode-se dizer que a quantidade de analito presente na matriz da amostra é a soma das quantidades presentes quando a condição de equilíbrio é alcançada nos três constituintes do sistema (matriz, *headspace* e fibra) e pode ser representada por:

$$n_0 = n_f + n_{hs} + n_m = c_0 \cdot V_m \quad (4)$$

Onde:

n_0 = quantidade inicial do analito presente na amostra

n_f = quantidade de analito extraída pela fibra no equilíbrio

n_{hs} = quantidade de analito presente no *headspace* da amostra no equilíbrio

n_m = quantidade de analito presente na matriz da amostra no equilíbrio

c_0 = concentração do analito na amostra

V_m = volume de amostra

Utilizando as equações anteriores e fazendo-se algumas relações matemáticas, pode-se obter a equação que permite calcular a quantidade de analito extraída pela fibra, mostrada na equação (5).

$$n_f = \frac{c_0 \cdot V_m \cdot V_f \cdot K_{mhs} \cdot K_{hsf}}{V_m + V_{hs} \cdot K_{msh} + V_f \cdot K_{mhs} \cdot K_{hsf}} \quad (5)$$

Desta forma, pode-se observar que o processo de microextração no *headspace* da amostra depende de algumas constantes de equilíbrio, já representadas anteriormente, bem como dos volumes de amostra e de fase extratora (V_m e V_f) utilizados.

1.5 Tipos de fibras para SPME

Diversos tipos de fibras para SPME são fabricadas, podendo estas ter diferenças quanto ao tamanho, espessura do recobrimento e também tipo do recobrimento polimérico utilizado. Os recobrimentos poliméricos comercializados atualmente são produzidos a partir de: PDMS (polidimetilsiloxano), CAR (Carboxeno), DVB (divinilbenzeno), PA (poliacrilato) e PEG (polietilenoglicol). A partir desses podem ser

feitas combinações sendo que alguns são utilizados simultaneamente em fibras comerciais.

1.6 Microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado

Na HS-SPME a aplicação de alta temperatura aumenta a liberação de analitos da matriz da amostra para a fase gasosa, mas também pode diminuir o coeficiente de partição entre a fibra e o *headspace* da amostra, e desta forma, diminuir a extração dos compostos de interesse, devido à natureza exotérmica da absorção (GHIASVAND; HOSSEINZADEH; PAWLISZYN, 2006, p.35).

Com o objetivo de superar a característica exotérmica de sorção do analito pela fase extratora, novas configurações para SPME foram propostas. Para isso, o novo método proposto envolveu a utilização de temperaturas elevadas na amostra enquanto simultaneamente a fase extratora era resfriada durante a microextração. Por esta abordagem, um aumento significativo dos coeficientes de partição da matriz-analito pode ser observado, isso pode proporcionar uma extração exaustiva da maioria dos analitos presentes em algumas amostras (MARTENDAL; CARASEK, 2011, p.367). Esta forma de extração ficou conhecida como microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (CF-SPME, do inglês *cold fiber – solid phase microextraction*) sendo proposto em 1995 por Zhang e Pawliszyn, este modo de extração permitiu redução na perda dos analitos mais voláteis ocasionado pelo efeito exotérmico em SPME.

O processo envolvido na extração dos analitos pela fibra é conduzido pela variação da entropia termodinâmica durante o mesmo, desta forma a extração é facilitada quando a temperatura de recobrimento é diminuída, fazendo com que a entropia do sistema aumente e possa haver uma melhor retenção dos analitos durante o processo de extração (ZHANG; PAWLISZYN, 1995, p.34). Essa entropia total do sistema pode ser dividida em três estágios principais:

- (1) Entropia relacionada ao equilíbrio no *headspace* da mistura gasosa
- (2) Entropia relacionada ao equilíbrio do resfriamento de parte dos analitos pelo recobrimento
- (3) Entropia relacionada ao equilíbrio que ocorre na absorção dos analitos pela fibra

Em relação aos equilíbrios que ocorrem no *headspace* da amostra as equações matemáticas que definem a entropia em cada processo são mostradas em (6), (7) e (8).

$$\Delta S_1 = n_{hs} \cdot R \cdot \ln \frac{n_{hs}}{n_H} + n_0 \cdot R \cdot \ln \frac{n_0}{n_H} \quad (6)$$

$$\Delta S_2 = n_f \cdot C_p \cdot \frac{T_{hs} - T_f}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_{hs}} \quad (7)$$

$$\Delta S_3 = -n_f \cdot R \cdot \ln \frac{T_f \cdot n_f \cdot V_{hs}}{T_{hs} \cdot V_f \cdot K_0 \cdot n_H} \quad (8)$$

Onde:

n_{hs} = quantidade inicial do analito presente no *headspace* quando o equilíbrio é alcançado

n_H = quantidade ar no *headspace*

n_f = quantidade de extraída pelo recobrimento da fibra no equilíbrio

C_p = Capacidade calorífica do analito à pressão constante

T_{hs} = Temperatura do *headspace*

T_f = Temperatura da fibra

V_{hs} = Volume do *headspace*

K_0 = Constante de distribuição do analito entre o *headspace* e a fibra quando ambos se encontram na temperatura da fibra T_f

A partir dessas três equações e tendo em vista que no equilíbrio a taxa de variação da entropia (ΔS) em função da quantidade de analito absorvida pela fibra n_f é igual a zero, pode-se chegar a seguinte expressão:

$$C_p \cdot \left(\frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_{hs}} \right) - R \cdot \ln \frac{T_f \cdot n_f \cdot V_{hs}}{T_{hs} \cdot V_f \cdot K_0 \cdot n_H} = 0 \quad (9)$$

A partir disso e tendo em consideração que a constante de partição entre o recobrimento da fibra e o *headspace* aquecido é

$K_T = \frac{C_f}{C_{hs}} = \frac{n_f \cdot V_s}{n_s \cdot V_f}$, pode-se determinar que:

$$K_T = K_0 \cdot \left(\frac{T_{hs}}{T_f} \right) \exp \left[\frac{C_p}{R} \left(\frac{\Delta T}{T_f} + \ln \frac{T_f}{T_{hs}} \right) \right] \quad (10)$$

Com isso, pode-se observar que ocorre um aumento do coeficiente de partição (K_T) conforme o aumento da diferença de temperatura entre o *headspace* aquecido e o recobrimento da fibra, desta forma pode-se aumentar a temperatura da amostra permitindo que a matriz libere uma maior quantidade de analitos simultaneamente com o resfriamento da fibra, isso faz com que seja aumentado o coeficiente de partição, e em muitas vezes podem ocorrer extrações quase que totalmente exaustivas dos analitos de interesse.

1.7 Sistema de microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado

Foi proposto em 1995 por Zhang e Pawliszyn, um esquema que permitiu a realização dos procedimentos de microextração e a refrigeração da fibra simultaneamente, e mais tarde em 2006 esse sistema foi miniaturizado e automatizado por Chen e Pawliszyn. O sistema mostrado na Figura 4 foi o mesmo utilizado nesse trabalho e consiste basicamente de um cilindro de $\text{CO}_2(l)$, sendo este ligado a uma válvula solenoide por meio de pequenos capilares, os quais permitem a entrada de dióxido de carbono líquido no interior da seringa utilizada para a microextração.

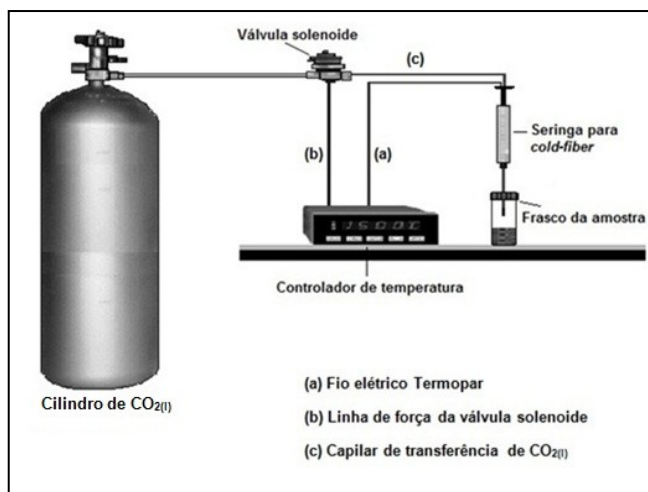


Figura 4: Esquema utilizado para a *Cold-fiber*-SPME. Fonte: adaptado de Chen; Pawliszyn (2006).

A seringa *gas-tight* utilizada para a microextração é composta por um tubo utilizado como suporte para a fibra, neste caso foi utilizada uma membrana de PDMS, foram utilizados como êmbolos dois tubos de aço inoxidável com diâmetro externo de 0,71 e diâmetro interno de 0,60 mm, respectivamente, o esquema da seringa mostrado na Figura 5.

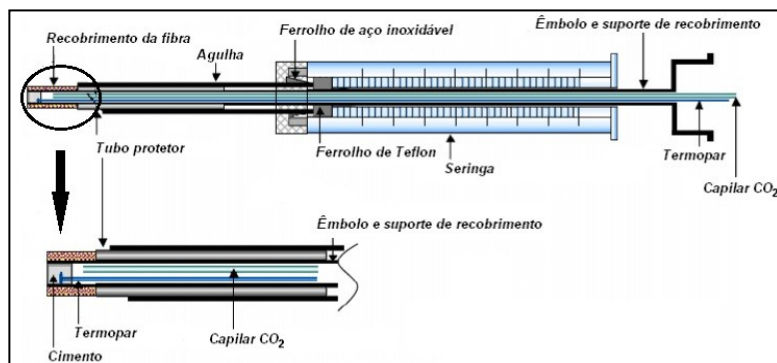


Figura 5: Esquema da seringa utilizada em *Cold-fiber-SPME*. Fonte: adaptado de Chen; Pawliszyn (2006).

A fixação da membrana de PDMS no suporte de extração é feita mergulhando a mesma em um solvente (hexano ou tolueno) desta forma ela sofre uma dilatação e é colocada no suporte, em seguida, mediante evaporação desse solvente, a membrana é fortemente aderida ao tubo. Um tubo auxiliar de aço inoxidável de 0,81 mm de diâmetro interno e 1,07 mm de diâmetro externo foi posicionado a aproximadamente 1 cm da ponta selada do êmbolo/suporte para proteger o recobrimento da fibra durante o procedimento de extração.

Vários fatores influenciam a velocidade e/ou quantidade de analito extraída por SPME tais como o tipo de recobrimento da fibra, tempo e temperatura de dessorção, modo de extração (*headspace* ou imersão direta), velocidade e modo de agitação, massa ou volume de amostra, pH e força iônica, e também tempo e temperatura de extração (MARTENDAL, 2011). Portanto, experimentos envolvendo SPME necessitam de otimização dos parâmetros para uma melhor eficiência, e para isso, uma das ferramentas mais utilizadas é o planejamento experimental.

1.8 Otimização multivariada

Otimizar refere-se a melhorar o desempenho de um sistema, um processo, ou de um produto de modo a obter o máximo benefício. O termo otimização tem sido comumente usado em análise química como um meio de descobrir as condições em um determinado processo que produzam as melhores respostas (ARAUJO; BRERETON, 1996, p.63).

Em diversas otimizações é utilizada a metodologia univariada, que consiste na mudança de apenas uma das variáveis estudadas, mantendo-se constante as demais. Essa forma de otimização tem como desvantagens não levar em consideração a interação destas variáveis entre si e também a necessidade da realização de um número maior de experimentos.

A fim de superar este problema, a otimização de procedimentos analíticos tem sido realizada por meio de técnicas de estatística multivariada. Entre as técnicas multivariadas mais relevantes utilizadas na otimização de metodologia analítica destaca-se a de superfície de resposta (RSM, do inglês *Response Surface Methodology*). Metodologia de superfície de resposta é uma coleção de técnicas matemáticas e estatísticas baseadas no ajuste de uma equação polinomial aos dados experimentais, que deve descrever o comportamento de um conjunto de dados com o objetivo de fazer previsões estatísticas podendo ser bem aplicada quando uma resposta ou um conjunto de respostas de interesse são influenciadas por diversas variáveis. O objetivo é, simultaneamente, otimizar os níveis dessas variáveis para atingir o melhor desempenho do sistema (BEZERRA *et al.*, 2008, p.965).

Existem diversos tipos de planejamentos multivariados que podem ser utilizados para a construção de superfícies de resposta que permitam a identificação da região de melhor desempenho do sistema tais como: planejamento fatorial, planejamento Box-Behnken, planejamento Doehlert e planejamento composto central.

1.9 Planejamento composto central

Segundo Bezerra *et al.* esse planejamento consiste basicamente de: um planejamento fatorial completo ou planejamento fatorial fracionário; além disso possui uma parte na forma de estrela em que os pontos centrais ficam a uma distância α do centro; e um ponto central, um exemplo é mostrado no esquema da Figura 6 para duas variáveis e três variáveis respectivamente.

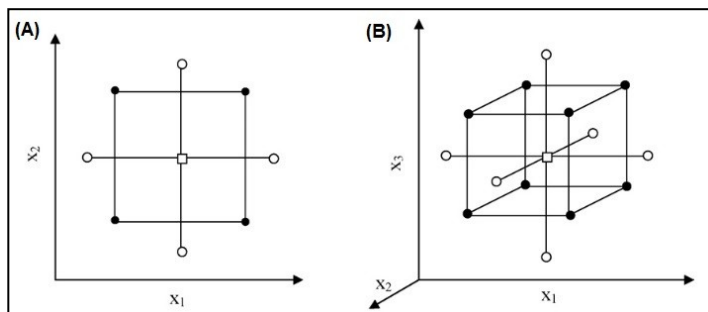


Figura 6. Planejamento composto central: A) duas variáveis ($\alpha = 1,41$) e B) três variáveis ($\alpha = 1,68$). Fonte: adaptado de Bezerra *et al.* (2008).

O planejamento composto central apresenta as seguintes características:

- Requer número de experimentos representados por $N = k^2 + 2k + C_p$, onde k corresponde ao número de fatores e C_p representa as replicatas no ponto central.

- Os valores de α podem ser calculados por $\alpha = 2^{(k-p)/4}$. Para duas, três e quatro variáveis esses valores são respectivamente: 1,41; 1,68; 2,00.

- Todos os fatores são estudados em cinco níveis ($-\alpha, -1, 0, +1, +\alpha$).

1.10 Cromatografia

A cromatografia é uma técnica físico-química de separação dos componentes de um sistema, realizada através da distribuição das espécies químicas entre duas fases, que estão em contato íntimo. Uma destas fases permanece estacionária enquanto a outra se move através desta. A separação das espécies químicas existentes numa mistura se dá pela interação de cada componente desta mistura com a fase estacionária, ficando cada um seletivamente retido nesta, possibilitando uma migração diferencial através da coluna cromatográfica (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006).

Considerando o estado físico da fase móvel, distingui-se a cromatografia gasosa, na qual a fase móvel é um gás; a cromatografia líquida, em que a fase móvel é um líquido; a cromatografia com fluido supercrítico onde a fase móvel é um gás pressurizado, em temperatura acima de sua temperatura crítica.

A cromatografia pode ser dividida segundo os mecanismos de separação em cromatografia de:

Adsorção: em que as partículas do soluto analisado ficam adsorvidas ou retidas na superfície da fase estacionária utilizada, sendo este o mecanismo mais comumente encontrado em cromatografia de camada delgada, cromatografia gás-sólido, cromatografia líquido-sólido e cromatografia com fluido supercrítico em que a fase estacionária é sólida;

Partição ou absorção: em que ocorre a transferência do soluto contido na amostra para a fase estacionária, sendo baseado nas diferentes solubilidades dos componentes da amostra na fase estacionária, encontra-se este mecanismo na cromatografia em papel, na cromatografia gás-líquido e na cromatografia líquido-líquido;

Troca iônica: a fase estacionária é constituída de uma matriz onde são adicionados grupos funcionais ionizáveis. Desta forma são obtidos os trocadores aniônicos que tem sítios ativos carregados positivamente, retendo ânions, e os trocadores catiônicos que tem sítios carregados negativamente que retém cátions.

Bioafinidade: Utilizam-se grupos com especificidade biológica, quimicamente ligados às matrizes. Estes grupos podem ser antígenos, os quais retiram da fase móvel somente os componentes complementares, os anticorpos.

Exclusão: Baseia-se em um processo mecânico. A fase estacionária é uma matriz de composição inerte, com partículas de forma, tamanho e porosidade uniformes. As moléculas da amostra são separadas porque as menores são capazes de penetrar nos poros da fase estacionária, enquanto as maiores são excluídas destes poros.

1.11 Cromatografia gasosa

Gases ou substâncias volatilizáveis podem ser separados utilizando a técnica de cromatografia gasosa, sendo que esta separação baseia-se na diferente distribuição da amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e uma fase móvel (gás). A amostra, por meio de um sistema de injeção, é introduzida em uma coluna contendo a fase estacionária. O uso de temperaturas convenientes no local da injeção possibilita a vaporização dessas substâncias que, de acordo com suas propriedades e as da fase estacionária, são retidas por tempos determinados e chegam à saída da coluna em tempos diferentes. O uso de um detector adequado na saída da coluna torna possível a detecção e quantificação dessas substâncias (COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006). A Figura 7 mostra, basicamente, um diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico.

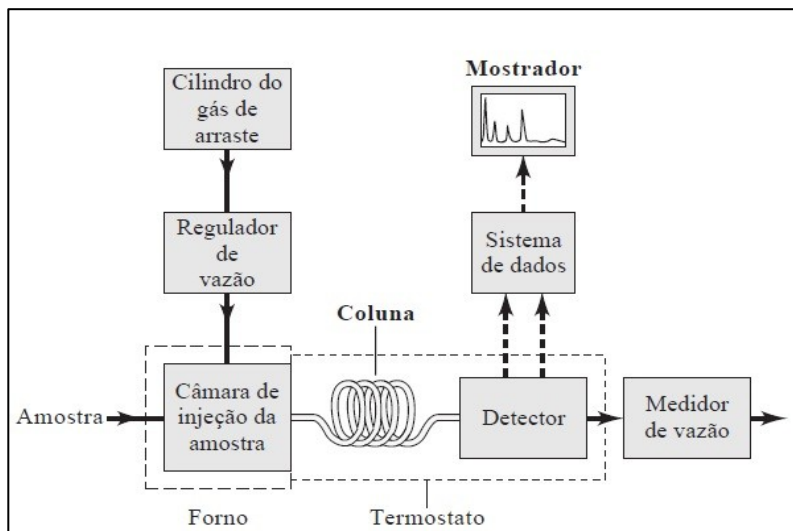


Figura 7: Diagrama de blocos de um cromatógrafo a gás típico. Fonte: adaptado de Skoog *et al.* (2006).

Os principais fatores que influenciam os tempos de retenção dos compostos em cromatografia a gás são a temperatura de ebulição e a polaridade dos analitos. Primeiramente a amostra é totalmente volatilizada no injetor, é importante que os analitos sejam termicamente estáveis, ou seja, não sofram degradação durante esse processo. Após isso, eles são carreados por um gás de arraste inerte para a coluna cromatográfica onde ocorre a separação, sendo que no final desta há um sistema de detecção dos compostos.

CAPÍTULO II: Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Aplicar e otimizar as técnicas de microextração em fase sólida convencional (HS-SPME) e microextração em fase sólida com recobrimento internamente refrigerado (HS-CF-SPME) em amostras de ervas medicinais, bem como otimizar e aplicar a técnica de DI-HS-SPME em amostras de água de rio.

2.2 Objetivos Específicos

Determinar as melhores condições de extração para os procedimentos de HS-SPME e HS-CF-SPME, utilizando otimizações multivariadas.

Determinar as melhores condições de extração para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME, utilizando duas temperaturas da fibra durante o processo de microextração.

Comparar a eficiência dos procedimentos envolvendo HS-SPME, HS-CF-SPME (utilizando uma única temperatura da fibra) e HS-CF-SPME (utilizando duas temperaturas da fibra).

Aplicar o procedimento otimizado de HS-CF-SPME, utilizando duas temperaturas da fibra, na determinação do perfil volátil das seguintes ervas medicinais: alcachofra, sálvia, hortelã, macela, camomila e erva-doce.

Determinar as melhores condições de extração para os procedimentos de HS-SPME, DI-SPME e DI-HS-SPME; para análise de trihalometanos e pesticidas organoclorados em água de rio.

Comparar a eficiência de cada procedimento otimizado em relação às extrações de trihalometanos e pesticidas organoclorados, bem como determinar os parâmetros analíticos de mérito, utilizando o procedimento de DI-HS-SPME, na análise de trihalometanos e pesticidas organoclorados em amostras de água de rio.

Analisar amostras de água de rio coletadas do rio Araranguá – SC, através do procedimento envolvendo DI-HS-SPME e determinar qualitativa e quantitativamente os analitos estudados.

CAPÍTULO III: Otimização e aplicabilidade dos procedimentos envolvendo SPME convencional e SPME com recobrimento internamente refrigerado para determinação do perfil volátil de ervas medicinais brasileiras

3.1 INTRODUÇÃO

As florestas tropicais contêm mais da metade das espécies de plantas de todo o mundo, cerca de 500.000 espécies. Menos de 1% destas plantas têm sido pesquisadas para a serem utilizadas como recursos medicinais (DI STASI *et al*, 2002, p.69). Embora a importância das plantas possa ser pouco aparente na nossa sociedade, cada vez mais urbanizada, a utilização de plantas medicinais e aromáticas em aplicações médicas, cosméticos, bem como outros não alimentares deverá aumentar globalmente (RETTA *et al.*, 2012, p.27). O uso de plantas medicinais na terapêutica ou como suplementos dietéticos remonta além da história registrada, mas tem aumentado substancialmente nas últimas décadas, neste contexto o Brasil possui uma grande variedade de espécies de plantas usadas na medicina (CALDAS, 2004, p.599).

Nos últimos anos o interesse para o estudo dos compostos orgânicos a partir de plantas e à sua atividade aumentou. Vários métodos de extração e métodos analíticos como espectrofotometria, cromatografia líquida de alta eficiência, eletroforese capilar, cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID, do inglês *gas chromatography – flame ionization detector*), cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC-MS, do inglês *gas chromatography mass-spectrometry*) são desenvolvidos para estudo de plantas e compostos ativos. A combinação de uma técnica de separação ideal (cromatografia gasosa) com a melhor técnica de identificação (espectrometria de massas) se tornou uma técnica ideal tanto qualitativa quanto quantitativamente para a separação e identificação dos compostos voláteis e semivoláteis presentes em diferentes amostras. Além disso, a utilização de um método de extração adequado é necessário para preparo das amostras antes de determinações analíticas (IORDACHE, 2009, p.338), desta forma a SPME se enquadra como uma técnica extremamente importante no preparo de amostras de matrizes contendo grande quantidade de compostos voláteis, como os presentes em amostras de plantas.

Em microextração em fase sólida a aplicação de temperatura elevada aumenta a liberação de substâncias da matriz, essa temperatura

alta, porém, pode diminuir os seus coeficientes de partição entre a matriz da amostra e a fibra e, desta forma, a eficiência de extração, devido à natureza exotérmica da sorção (GHASVAND; HOSSEINZADEH; PAWLISZYN, 2006, p.35). Com o objetivo de superar a característica exotérmica de sorção dos analitos pela fase extratora, novas configurações para SPME foram propostas. Neste caso, o método envolve a utilização de temperaturas de amostra elevadas enquanto simultaneamente ocorre o resfriamento da fase de extratora, esse dispositivo ficou conhecido como *cold-fiber-SPME* e foi desenvolvido por Pawliszyn e colaboradores em 1995.

O objetivo deste trabalho foi otimizar as condições de extração envolvendo os procedimentos de HS-SPME convencional e HS-CF-SPME usando amostras de alcachofra, sálvia, hortelã, macela, erva-doce e camomila, além de usar pela primeira vez neste tipo de matriz, uma abordagem para HS-CF-SPME em que duas temperaturas de revestimento de fibra são utilizadas, também foi feita uma comparação entre a eficiência de tais métodos de extração para a determinação do perfil aromático de cada erva estudada, com separação/identificação dos compostos extraídos por GC-MS.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-14B (Kyoto, Japão) equipado com detector de ionização em chama e coluna cromatográfica Rtx-5MS[®] Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) obtida da Restek Corporation (Bellefonte, PA, EUA). Também foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu (Kyoto, Japão) acoplado a espectrômetro de massas GC-MS QP-2010 Plus. A programação de temperatura no forno cromatográfico foi a mesma para os dois equipamentos sendo: 40 °C (mantida por 4 min), 4 °C min⁻¹ até 240 °C (mantida por 1 minuto). A temperatura do injetor foi de 250 °C e 260 °C foi usado como temperatura do detector. Para o GC-MS foi utilizada temperatura da fonte de ionização em 230 °C e temperatura da interface em 260 °C e foi utilizado o modo de aquisição de dados *full scan*. A vazão de gás de arraste foi de 1,3 mL min⁻¹. O tempo de dessorção da fibra no injetor foi fixado em 10 min e o modo *splitless* foi utilizado.

3.2.2 Materiais em geral

Banho termostatizado (Nova Técnica, São Paulo, Brasil), agitadores magnéticos, frascos para SPME de 40 mL de capacidade (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), béqueres de diferentes capacidades, micropipetadores, espátulas de aço inox, balança analítica (Marte Comércio de Instrumentação Analítica, São Paulo, Brasil), bloco de aquecimento (DIST, Florianópolis, Brasil) também foram utilizadas as fibras para SPME com os seguintes recobrimentos poliméricos: PDMS/DVB/CAR (50/30 µm de espessura) PDMS/DVB (65 µm), PA (85 µm), PDMS/CAR (85 µm) e PDMS (100 µm) todas as fibras foram obtidas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA) e o sistema de *cold-fiber* SPME disponível no laboratório.

3.2.3 Amostras

Neste trabalho foram estudadas ervas medicinais tipicamente encontradas na região sul do Brasil, sendo elas: alcachofra (*Cynara cardunculus*), sálvia (*Salvia officinalis*), macela (*Achyrocline satureioides*), erva-doce (*Pimpinella anisum*), hortelã (*Mentha spicata*) e camomila (*Matricaria recutita*). As amostras foram obtidas no comércio local de Florianópolis e foram identificadas conforme nomenclatura (usual e científica) localizadas na embalagem do produto.

3.2.4 Preparo das amostras

Apenas as folhas e as flores foram utilizadas sendo os galhos e caules removidos. Primeiramente, fez-se a moagem do material a ser estudado, então separou-se de acordo com as espécies em frascos diferentes e armazenou-se em refrigerador a 4 °C até que o procedimento de extração fosse realizado.

Para a realização das extrações foram pesados 10 mg de cada erva, essa quantidade permitiu a obtenção de cromatogramas bem resolvidos, diferentemente do que aconteceu quando foram utilizadas massas maiores de ervas. Posteriormente, transferiu-se essa quantidade para frascos com capacidade de 40 mL próprios para SPME, sendo estes frascos devidamente selados. A mistura foi colocada em um banho termostatizado com a mesma temperatura utilizada durante extração por um período de pré-equilíbrio de 5 min, após isso a fibra para SPME foi exposta no *headspace* da amostra para a realização da extração.

3.2.5 Escolha do recobrimento da fibra para o procedimento HS-SPME convencional

Previamente à realização das otimizações, foi estudado desempenho dos recobrimentos poliméricos das fibras para SPME comercialmente disponíveis, foram estudados PDMS/DVB/CAR (50/30 μm), PDMS/DVB (65 μm), PA (85 μm) PDMS/CAR (85 μm) e PDMS (100 μm). Para tal otimização foram feitas extrações utilizando-se 10 mg de amostras de cada erva medicinal, sendo utilizados um tempo de extração de 20 min e temperatura de amostra de 60 °C. Após isso foram analisados os cromatogramas e calculadas as médias geométricas obtidas a partir das áreas dos picos cromatográficos relativas a cada fibra, sendo após feita a normalização dessas médias obtendo-se, então, o recobrimento polimérico mais adequado.

3.2.6 Otimizações multivariadas

Os dados referentes às otimizações foram obtidos com um GC-FID e a resposta utilizada foi a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos obtidas em cada extração. Planejamentos compostos centrais para a construção das superfícies de resposta (através do software Statistica 8.0, STATSOFT, EUA) que representaram as condições ideais encontradas em cada etapa do trabalho foram utilizados. Quatro etapas referentes a otimização dos procedimentos estudados foram realizadas, sendo estas:

1) *Otimização das condições de extração envolvendo o procedimento de HS-SPME convencional*

Na primeira etapa das otimizações realizadas neste capítulo, as condições experimentais foram otimizadas para o processo de HS-SPME convencional, para isso, foram estudados tempo de extração e temperatura da amostra durante o processo de microextração, utilizando tempo de extração variando entre 5 e 50 minutos e a temperatura variando entre 30 e 60 °C. Neste procedimento foi utilizada fibra composta por PDMS/DVB/CAR a qual obteve melhor desempenho em relação às outras fibras utilizadas.

2) *Otimização da temperatura da fibra no procedimento HS-CF-SPME*

Para determinar a temperatura ideal da fibra utilizada no procedimento HS-CF-SPME foram utilizados o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura da fibra variando entre 5 e 60 °C, sendo fixada a temperatura da amostra em 60 °C. Membrana de PDMS foi utilizada como fase extratora e o resfriamento da mesma foi realizado com um sistema de CF-SPME por fluxo de CO₂ contendo um termopar para controle da temperatura da membrana durante as extrações, este sistema está mostrado na Figura 8.

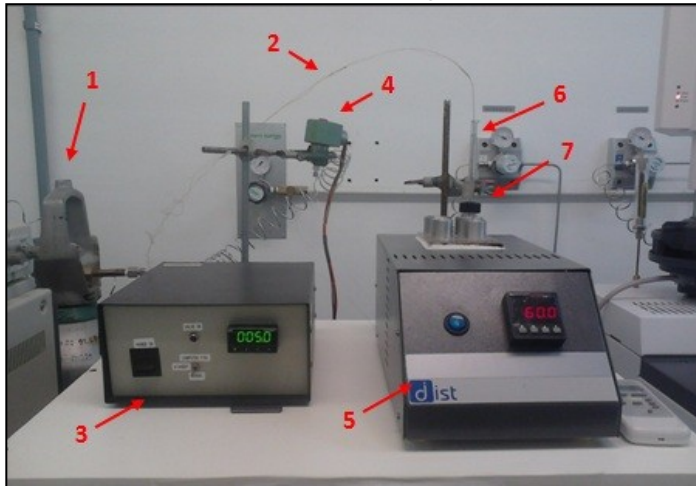


Figura 8: Sistema *Cold-fiber*-SPME disponível no laboratório. 1) Cilindro de CO_{2(l)}; 2) Capilar de transferência de CO_{2(l)} e fios do termopar; 3) Controlador de temperatura; 4) Válvula solenóide; 5) Bloco de aquecimento da amostra; 6) Seringa de extração; 7) Frasco com a amostra.

3) *Otimização das condições de extração envolvendo o procedimento HS-CF-SPME*

Para determinar as condições de extração ideais no procedimento envolvendo HS-CF-SPME foram utilizados o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura de amostra variando entre 30 e 60 °C mantendo a fibra a 5 °C. Para isto foi utilizado um bloco de aquecimento para a estabilização da temperatura das amostras e a membrana foi exposta ao *headspace* da amostra conforme planejamento experimental estabelecido.

4) *Otimização do percentual do tempo em temperatura baixa no procedimento HS-CF-SPME*

Na última etapa das otimizações, devido a eficiência de extração de compostos mais voláteis ser melhorada com o procedimento HS-CF-SPME e a eficiência da extração de compostos semivoláteis ser diminuída com esta técnica, foi feito uma nova otimização para que não fosse prejudicada a eficiência de extração de nenhuma classe dos compostos em estudo. Assim, foram utilizadas duas temperaturas da fibra em um único procedimento de HS-CF-SPME, as extrações foram iniciadas à temperatura da fibra mais elevada e, após um tempo definido no planejamento experimental foi feito o resfriamento da fibra, mantida resfriada até o final da extração. Para a otimização do tempo que a fibra foi mantida fria foi realizado outro planejamento composto central utilizando o tempo total da extração variando entre 5 e 25 min e o percentual desse tempo em que o recobrimento de fibra foi mantido a 5 °C sendo este variado entre 0 e 100%. A Tabela 2 permite uma visualização dos níveis estudados das variáveis em cada etapa destas otimizações.

Tabela 2: Variáveis e níveis estudados em cada etapa das otimizações.

HS-SPME convencional (condições de extração)					
Variáveis	Níveis estudados				
Temperatura da amostra (°C)	30	37,5	45	52,5	60
Tempo de extração (min)	5	16	27,5	38	50
HS-CF-SPME (temperatura da fibra)					
Temperatura da fibra (°C)	5	18,7	32,5	46,2	60
Tempo de extração (min)	5	10	15	20	25
HS-CF-SPME (condições de extração)					
Temperatura da amostra (°C)	30	37,5	45	37,5	60
Tempo de extração (min)	5	10	15	20	25
HS-CF-SPME (percentual do tempo total em temperatura baixa)					
Tempo de extração (min)	5	10	15	20	25
Percentual do tempo com a fibra a 5 (°C)	0	25	50	75	100

3.2.7 Determinação do perfil volátil das ervas medicinais

Na última etapa do presente capítulo foi feita uma comparação da eficiência da extração envolvendo os procedimentos de HS-SPME convencional, HS-CF-SPME (utilizando somente uma temperatura da fibra) e HS-CF-SPME (utilizando duas temperaturas da fibra) em amostras ervas de medicinais, sendo determinado o perfil de volátil de cada erva, com separação/identificação dos compostos por GC-MS.

3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.3.1 Escolha da fibra para HS-SPME convencional

Após as análises, foram obtidos os dados das médias geométricas em relação à área dos picos cromatográficos dos compostos extraídos a partir de cada recobrimento polimérico testado das fibras para SPME disponíveis comercialmente, com isso, foi possível estabelecer a fibra que permitiu uma extração mais eficiente. O gráfico de barras mostrado na Figura 9 estabelece a área normalizada da média geométrica obtida com cada fibra testada.

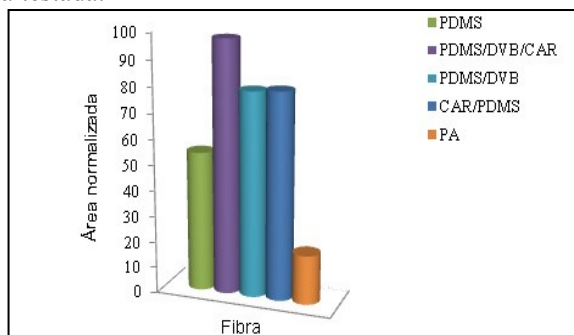


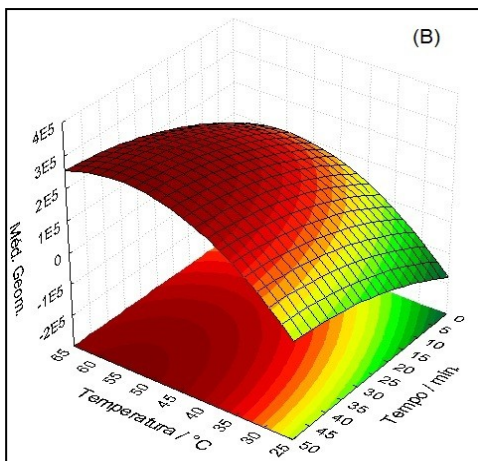
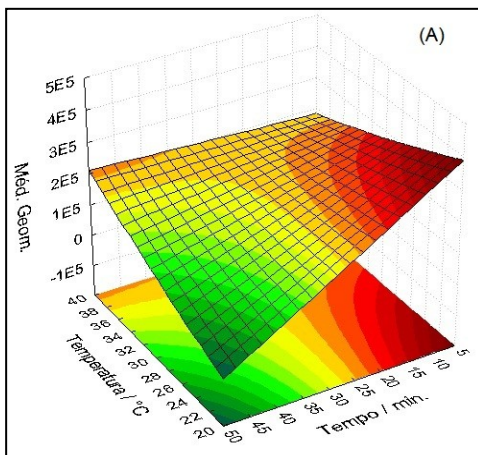
Figura 9: Gráfico de barras representando a eficiência de extração das diferentes fibras utilizando 10 mg de uma mistura das ervas estudadas, com tempo de extração de 20 min e temperatura de amostra de 60 °C.

Pode-se então estabelecer que a fibra com o recobrimento polimérico composto por PDMS/DVB/CAR apresentou melhor desempenho em relação às demais, desta forma este foi o recobrimento polimérico escolhido para o restante desse estudo.

3.3.2 Procedimento HS-SPME convencional

Através de um planejamento experimental mencionado anteriormente (planejamento composto central) as condições ideais de extração foram obtidas para o procedimento envolvendo a HS-SPME convencional, sendo utilizada como fibra a composta por PDMS/DVB/CAR. As superfícies de resposta obtidas para todas as análises foram representadas como a média geométrica das áreas dos picos cromatográficos para cada condição experimental previamente estabelecida. Este planejamento experimental permitiu também a construção das superfícies de resposta para os compostos mais voláteis (tempo de eluição até 22 min) e compostos semivoláteis (tempo de eluição após 22 min) bem como para a condição compromisso entre

esses dois grupos de compostos, as quais são mostradas na Figura 10 (A), (B) e (C) respectivamente.



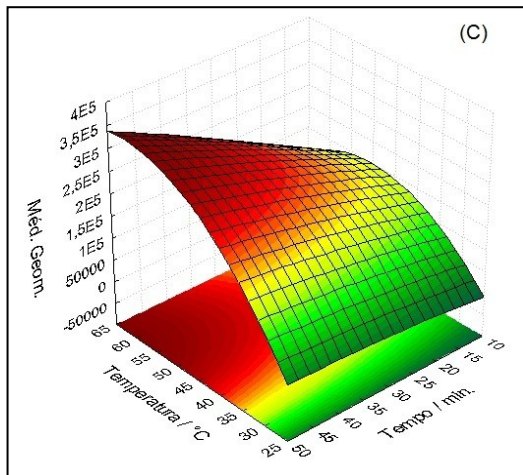


Figura 10: Superfícies de resposta obtidas com o procedimento HS-SPME convencional para compostos mais voláteis (A), compostos semivoláteis (B) e para todos os compostos (C). Com o tempo de extração variando entre 5 e 50 minutos e a temperatura da amostra variando entre 30 e 60 °C.

Como pode ser observado através das superfícies de resposta, as diferentes classes de compostos presentes nas amostras apresentaram comportamentos distintos em relação às variáveis estudadas. Para os compostos mais voláteis (A) as melhores condições de extração foram obtidas quando se utilizaram tempos de extração curtos e temperaturas relativamente baixas, sendo que esses compostos apresentam facilidade em serem liberados da matriz da amostra, apresentando uma boa quantidade no *headspace*, mesmo em temperaturas menores, neste caso, com tempos de extração menores que 10 min e temperaturas em torno de 20°C conseguiram-se boas respostas. Em relação aos compostos semivoláteis (B), estes apresentam uma dificuldade maior em serem liberados da matriz da amostra, desta forma necessitaram de uma temperatura maior e um tempo mais longo de extração para que pudessem ser extraídos com eficiência. No caso das ervas medicinais utilizadas neste estudo, foi necessário um tempo de extração de aproximadamente 40 min e temperatura da amostra em torno de 50 °C para que fossem obtidos os melhores resultados. Fazendo-se a condição compromisso entre temperatura e tempo de extração para ambas as classes de compostos (C), observou-se que os compostos semivoláteis apresentaram uma maior influência na determinação das condições

ideais de extração sendo obtidas as melhores respostas para tempos de extração acima de 35 min e temperatura da amostra em torno de 55 °C.

Desta forma, a condição ideal foi fixada para o procedimento envolvendo HS-SPME convencional como sendo tempo de extração de 40 min e temperatura da amostra em 55 °C.

3.3.3 Otimização da temperatura da fibra no procedimento de HS-CF-SPME

Antes de otimizar as condições de extração para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME, foi efetuada a análise da temperatura da fibra que permitiu obter os melhores resultados, utilizando a membrana de PDMS como recobrimento extrator. Neste caso foram otimizadas a temperatura da fibra em relação ao tempo total da extração, sendo mantida fixa a temperatura da amostra em 60 °C. Também foram utilizadas como resposta as médias geométricas obtidas a partir da área dos picos cromatográficos. Observou-se o comportamento de cada classe de compostos em relação à temperatura da fibra e o tempo de extração, os quais são representados na Figura 11, sendo estes separados em compostos voláteis (A) e semivoláteis (B).

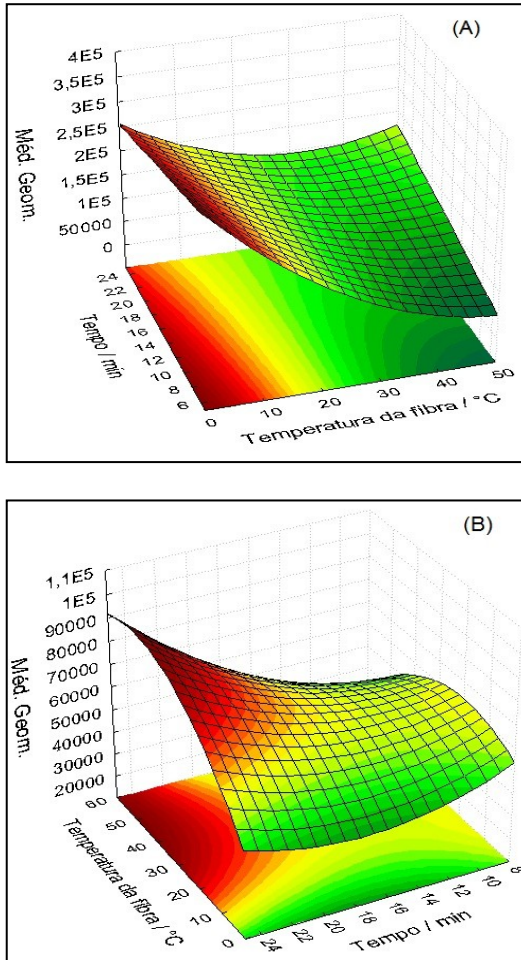


Figura 11: Superfícies de resposta mostrando a relação entre a temperatura da fibra e o tempo total de extração para compostos mais voláteis (A) e semivoláteis (B). Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura da fibra variando entre 5 e 60 °C, sendo fixada a temperatura da amostra em 60 °C e membrana de PDMS utilizada como fase extratora.

Pode ser observado que temperaturas de fibra menores permitem um aumento na eficiência de extração dos compostos mais voláteis (A), enquanto a temperatura da fibra é diminuída os compostos tendem a ser mantidos na fibra. Em virtude do processo de sorção ser exotérmico, a

temperatura mais baixa favorece a extração desta classe de compostos. Outro fator importante a observar é que foram conseguidos tempos de extração menores, se comparados com a HS-SPME convencional. Para os compostos menos voláteis o efeito exotérmico não é pronunciado, assim, os melhores resultados de extração destes compostos foram encontrados utilizando-se temperaturas maiores para a fibra e maiores tempos de extração, principalmente em virtude da membrana de PDMS variar sua viscosidade tornando-se mais rígida com temperaturas baixas, fazendo com que a eficiência de extração da classe de compostos semivoláteis, a qual apresenta coeficientes de difusibilidade mais baixos, seja prejudicada. Porém, é importante ressaltar que, mesmo para os compostos semivoláteis, o tempo de extração foi menor que o encontrado na otimização do procedimento envolvendo HS-SPME convencional.

Com estes resultados, tornou-se necessário encontrar uma condição compromisso de temperatura de fibra e tempo de extração para estas duas classes distintas de compostos, a fim de se obter uma condição ideal na qual nenhuma classe fosse prejudicada e pudesse ser obtida uma resposta satisfatória. A Figura 12 permite observar o comportamento para ambas as classes estudadas simultaneamente.

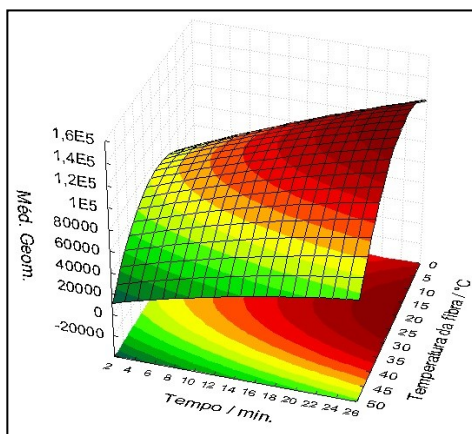
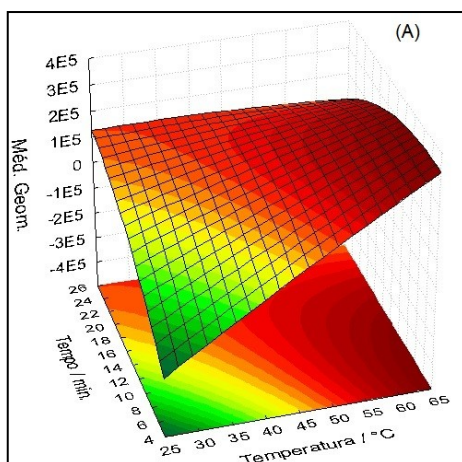


Figura 12: Superfície de resposta obtida a partir da condição compromisso entre ambas as classes de compostos relacionando tempo de extração e temperatura da fibra. Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura da fibra variando entre 5 e 60 °C, sendo fixada a temperatura da amostra em 60 °C.

Como pode ser observado, a diminuição da temperatura da fibra para valores entre 5 e 25 °C provocou um aumento considerável na resposta sendo que, aumentando a temperatura da fibra, a eficiência na extração foi diminuída. Isso se deve ao efeito de dessorção dos analitos da fibra quando a mesma é aquecida em temperaturas altas. Desta forma, mantendo a fibra a uma temperatura baixa em relação a amostra, a eficiência na extração tem um ganho considerável, o que permite comprovar os resultados teóricos que foram estudados. A partir dos dados experimentais obtidos, ficou estabelecida que a condição ideal de temperatura do recobrimento da fibra de PDMS foi de 5°C, a qual foi utilizada durante todos os procedimentos envolvendo HS-CF-SPME neste trabalho.

3.3.4 Procedimento envolvendo HS-CF-SPME

A partir dos dados de temperatura da fibra otimizada, foi possível determinar as condições ideais de extração utilizando as variáveis tempo total de extração e temperatura da amostra para o procedimento de HS-CF-SPME. Também foi possível estabelecer uma interessante comparação da relação das variáveis estudadas com as diferentes classes de compostos, a qual é mostrada na Figura 13, sendo que foram obtidas as superfícies de resposta para os compostos mais voláteis (A) e semivoláteis (B), bem como a condição compromisso para ambas as classes de compostos (C).



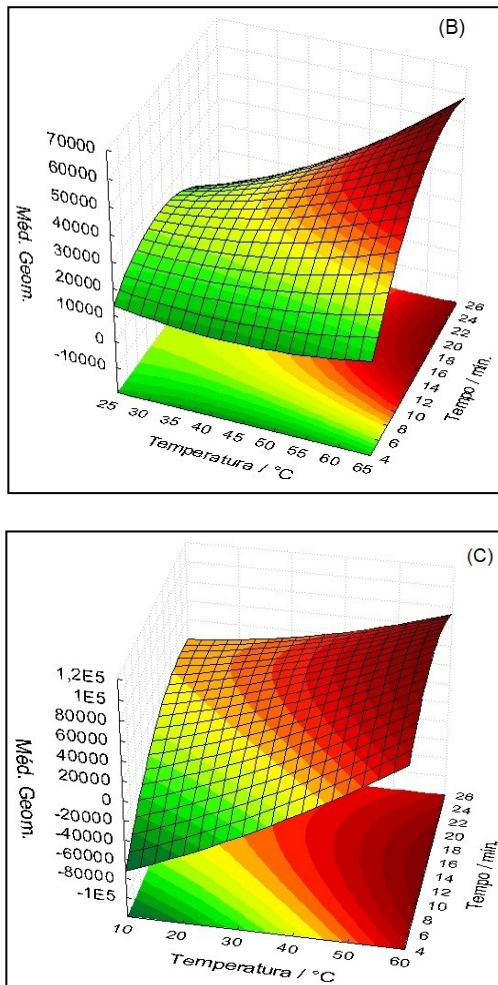


Figura 13: Superfícies de resposta representando as diferentes classes de compostos em relação às variáveis tempo e temperatura de extração para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME, sendo (A) compostos mais voláteis; (B) compostos semivoláteis e (C) ambas as classes de compostos. Com o tempo de extração variando entre 5 e 25 min e a temperatura de amostra variando entre 30 e 60 °C mantendo a fibra a 5 °C.

Para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME, foi observado um comportamento diferente em relação aos compostos mais voláteis

(A) se comparado com o procedimento HS-SPME convencional no que diz respeito à variável temperatura da amostra. No caso do procedimento envolvendo o recobrimento internamente refrigerado, foi possível observar que temperaturas da amostra mais elevadas permitiram melhores eficiências de extração, enquanto que para o procedimento convencional, as melhores eficiências ocorreram utilizando temperaturas mais baixas. Isso provavelmente se deve ao fato de que a fibra resfriada retém com maior intensidade os compostos mais voláteis, devido ao efeito exotérmico de sorção dos mesmos, permitindo desta forma, a utilização de temperaturas mais elevadas sem prejudicar a extração; já em relação ao procedimento convencional, o aumento da temperatura facilita a dessorção desses analitos, inicialmente retidos pela fibra, parte desses analitos retornam para o *headspace* da amostra fazendo com que a extração tenha desempenho reduzido para essa classe.

Observou-se também que com o procedimento envolvendo HS-CF-SPME foi obtido o tempo de extração ótimo de cerca de 15 min com uma temperatura de amostra de 60 °C. Isto mostra que o tempo de extração encontrado para o procedimento envolvendo HS-CF-SPME foi aproximadamente três vezes menor do que o tempo ótimo encontrado na aplicação do procedimento de HS-SPME convencional, nesta otimização, foi utilizada a fibra resfriada durante todo o tempo de extração, com isso a extração de compostos mais voláteis foi muito eficiente, porém a eficiência da extração de compostos semivoláteis foi diminuída, em virtude disso, uma nova otimização foi realizada a fim de encontrar uma condição de compromisso que permitisse a extração de ambas as classes de compostos (voláteis e semivoláteis) e que nenhum grupo de compostos fosse muito prejudicado durante o procedimento, desta forma, foi realizada uma última otimização em que foram utilizadas duas temperaturas da fibra durante o mesmo procedimento de extração.

3.3.5 Uso de duas temperaturas da fibra em um mesmo procedimento de CF-HS-SPME

Através desta otimização, foi possível encontrar uma condição ideal, em que foram utilizadas duas temperaturas da fibra, com os dados do planejamento composto central realizado, utilizando-se como variáveis o tempo total de extração e o percentual desse tempo em que a fibra foi mantida resfriada.

As superfícies de resposta obtidas para esse procedimento estão representadas na Figura 14. Observou-se que com temperaturas baixas

da fibra, ou seja, com percentual do tempo total da extração acima de 60% com a fibra mantida resfriada, e tempos de extração curtos a extração de compostos mais voláteis (A) foi favorecida. Temperaturas mais elevadas da fibra, ou seja, abaixo de 20% do tempo total da extração com a fibra mantida sob resfriamento, e tempos de extração mais longos houve uma melhor resposta para os compostos semivoláteis (B).

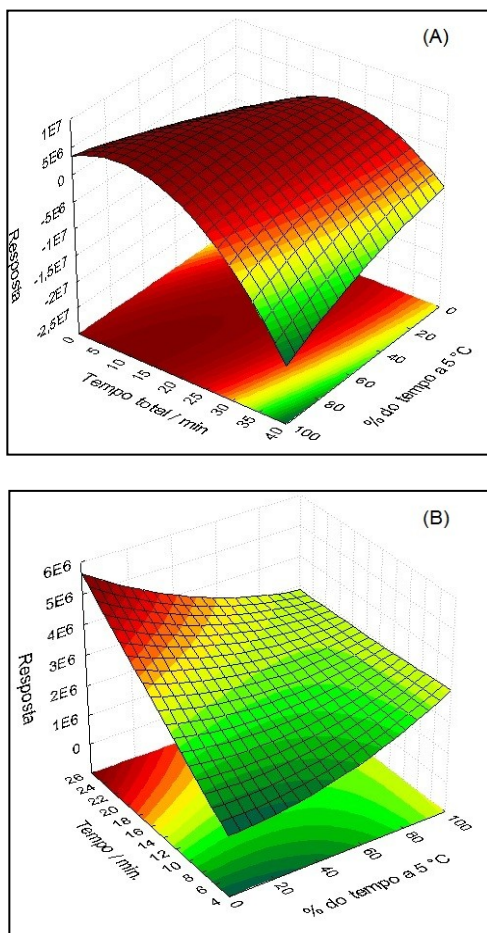


Figura 14: Superfícies de resposta obtidas a partir do planejamento composto central, utilizando o tempo total da extração variando entre 5 e 25 min e o percentual desse tempo em que o recobrimento de fibra foi mantido a 5 °C sendo este variado entre 0 e 100% para compostos mais voláteis (A) e semivoláteis (B).

Desta forma, foi possível estabelecer uma condição em que ambas as classes de compostos puderam ser extraídas de maneira eficiente, ou seja, a fibra foi mantida durante um certo tempo em uma temperatura alta (temperatura da amostra) e após isso, foi resfriada a 5 °C. Com isso, foi possível estabelecer a superfície de resposta mostrada na Figura 15, sendo que pode-se observar que as condições de extração ideais foram tempo de extração total de 15 min sendo 50% deste período de tempo (7,5 min) com a fibra mantida em temperatura elevada, neste caso a 60 °C, e depois disto a fibra foi resfriada a 5 °C e mantida nesta temperatura até o final do tempo total de extração (7,5 min restantes).

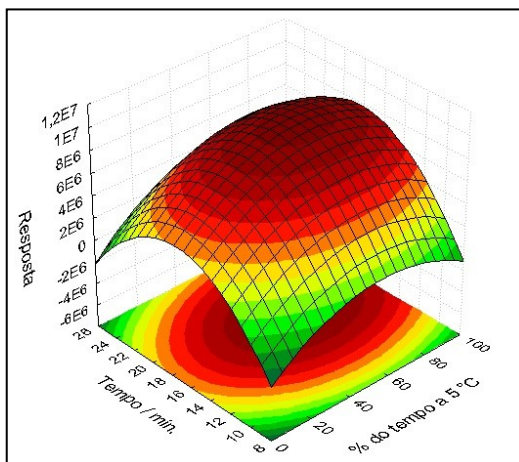


Figura 15: Superfície de resposta obtida para a condição compromisso entre ambas as classes de compostos. Utilizando tempo total da extração variando entre 5 e 25 min e o percentual desse tempo em que o recobrimento de fibra foi mantido a 5 °C sendo este variado entre 0 e 100%.

Foi possível a análise dos efeitos do resfriamento da fibra através dos cromatogramas obtidos a partir de uma mistura contendo 10 mg de cada erva medicinal em estudo. Na Figura 16, pode-se observar o uma grande eficiência na extração de ambas as classes de compostos mediante a utilização de duas temperaturas da fibra.

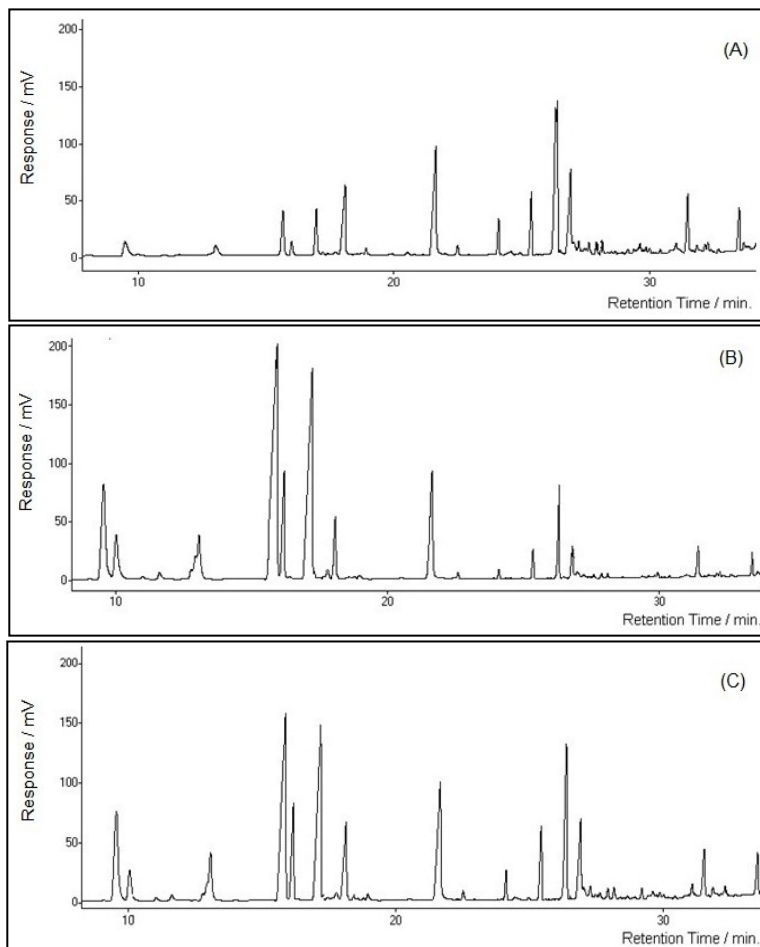


Figura 16: Cromatogramas obtidos com GC-FID a partir de uma mistura de sálvia, hortelã, erva-doce, camomila, alcachofra e macela, utilizando membrana de PDMS para o procedimento HS-CF-SPME, temperatura da amostra a 60 °C. (A) temperatura da fibra a 60 °C durante 40 min; (B) temperatura da fibra a 5 °C durante 15 min; (C) Temperatura da fibra a 60 °C durante 7,5 min seguida por resfriamento da fibra a 5 °C mantida durante 7,5 min restantes.

Através destas otimizações, foi possível estabelecer uma condição ideal para o procedimento de HS-SPME convencional e HS-

CF-SPME, sendo estas condições utilizadas para comparar a eficiência de extração dos compostos voláteis nas ervas medicinais estudadas, bem como determinar o perfil volátil das mesmas através do procedimento de HS-CF-SPME.

3.3.6 Comparação entre os procedimentos HS-SPME convencional e HS-CF-SPME

Através das otimizações, foi possível estabelecer uma comparação entre a eficiência de cada extração. Os gráficos de barras na Figura 17 permitem a comparação das eficiências de extração de compostos voláteis (A), compostos semivoláteis (B) e a condição de compromisso para todos os compostos (C), utilizando a área normalizada dos picos cromatográficos de interesse, utilizando diferentes procedimentos.

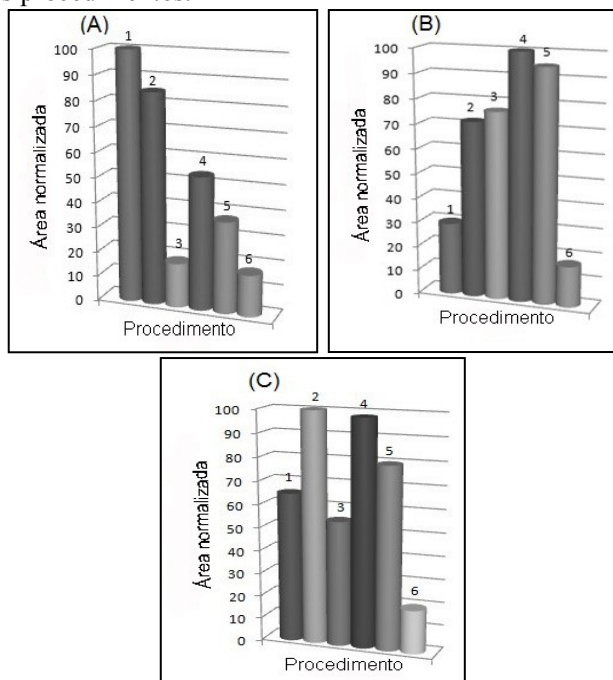


Figura 17: Comparação da eficiência de extração utilizando-se os procedimentos: 1) HS-CF-SPME (membrana de PDMS); 2) HS-CF-SPME (usando duas temperaturas da fibra e membrana de PDMS); 3) HS-SPME (fibra de PDMS); 4) HS-SPME (fibra de PDMS/DVB/CAR); 5) HS-SPME (fibra de PDMS/DVB); 6) HS-SPME (fibra de PA).

Através de uma análise dos resultados obtidos a partir destes gráficos, pode ser enfatizada a eficiência do processo de HS-CF-SPME com temperatura baixa da fibra para os compostos mais voláteis presentes nas ervas medicinais. Como pode ser visto na Figura 17-A, com a fibra mantida resfriada durante todo o tempo da extração, pode-se observar a grande contribuição do efeito exotérmico para esta classe de compostos. Outro fator que deve ser mencionado, é o fato de o procedimento HS-CF-SPME utilizando duas temperaturas da fibra ter apresentado um desempenho muito bom também para os compostos mais voláteis. Geralmente, quando a fibra é mantida à mesma temperatura da amostra, os compostos mais voláteis são desorvidos novamente para *heaspace* da amostra o que provoca uma menor eficiência de extração. Para os compostos menos voláteis, representados na Figura 17-B, o procedimento utilizando HS-CF-SPME com a fibra refrigerada 100% do tempo de extração não mostrou resultados satisfatórios, porém, com a utilização do procedimento HS-CF-SPME com duas temperaturas da fibra, houve um considerável ganho em eficiência de extração para esta classe de compostos. Estes resultados são semelhantes aos obtidos com HS-SPME convencional utilizando PDMS como fase extratora. No caso de compostos semivoláteis, o efeito exotérmico não é significativo, o que predomina é a mudança das características do polímero PDMS em virtude do resfriamento da membrana, sendo que isso faz com que diminua o coeficiente de difusão dos analitos semivoláteis através da fibra, fazendo com que a extração dessa classe de compostos seja, geralmente, prejudicada com a utilização da *cold fiber*. Em uma análise da totalidade dos compostos, utilizando-se a condição de compromisso encontrada em otimizações anteriores, a eficiência de extração representada na Figura 17-C mostra que o procedimento HS-CF-SPME com duas temperaturas da fibra teve uma grande eficiência e apresentou o melhor desempenho em relação ao processo de HS-SPME convencional e HS-CF-SPME utilizando uma única temperatura de fibra. Esta utilização de duas temperaturas da fibra permitiu a extração de ambas as classe de compostos (compostos voláteis e semivoláteis). A utilização de somente uma temperatura da fibra facilitaria a extração de uma determinada classe de compostos, isso acarretaria a perda de eficiência na extração da outra classe de compostos em estudo.

Além do excelente desempenho dos procedimentos envolvendo HS-CF-SPME, este apresentou vantagem na cinética de extração, tendo sido obtidos tempos de extração cerca de 3 vezes menores do que o procedimento de HS-SPME convencional.

3.3.7 Determinação do perfil volátil das ervas medicinais por CF-HS-SPME

O uso do procedimento de HS-CF-SPME utilizando duas temperaturas da fibra apresentou um desempenho superior e menor tempo de extração se comparado ao procedimento HS-SPME convencional para a extração de vários compostos na mistura de ervas. Assim, foi possível estabelecer o perfil volátil de cada erva estudada, utilizando este procedimento, e também foi possível identificar os compostos utilizando GC-MS. Foi estabelecida a composição volátil de todas as ervas estudadas, utilizando GC-MS a partir de comparação dos espectros de massas obtidos com dados presentes na biblioteca NIST-05. A Tabela 3 mostra os compostos identificados com no mínimo 85% de confiabilidade.

Tabela 3: Compostos extraídos das ervas medicinais através do procedimento HS-CF-SPME

Composto	A	S	C	E	M	H
Anuleno						X
α -Pinoeno		X			X	X
Canfeno		X			X	
Sabineno						X
β -Pinoeno		X			X	X
beta.-Mirceno		X			X	X
1-Octen-3-ol		X				
3-Octanol						X
(+) 4-Careno		X			X	
<i>o</i> -Cymeno		X				
<i>p</i> -Cymeno					X	
Limoneno	X				X	
2-Etil-1-hexanol	X					
5-Isopropil-2-metilbicyclo[3.1.0]hexan-2-ol		X				
α -Metil- α -[4-metil-3-pentenil]oxiranemetanol	X	X				
Eucaliptol		X		X		X
β -trans-Ocimeno					X	X
1-Metil-4-(1-metiletetil)-benzeno		X				
2-(5-Metil-5-viniltetrahidro-2-furanil)-2-propanol	X					
Ocimeno						X
cis-Carveol		X				
γ -Terpineno	X				X	
β -Terpineol						X
n-Octanol	X	X	X		X	X
Terpinoleno					X	
<i>p</i> -Dimetilestireno						X
3-Octil acetato						X
Fenchol					X	

Continua

Continuação

Composto	A	S	C	E	M	H
Decanal						X
Linalol	X			X		X
2-(2,4-hexadiinilidene)-1,6 Dioxaspiro[4.4]non-3-eno			X			
cis-3-Decen-1-ol	X					
L-pinocarveol					X	
3,4-Dimetilciclohexanol	X					
3-Tujanona		X				
Borneol				X	X	
alfa Terpineol		X			X	
Tujona		X				
Alcanfor	X	X		X		
Isobornil formato		X				
continuação						
6-Isopropenil-5-metileno-3- ciclohexen-1-ol	X					
Rodinal	X					
Isopulegol	X					
Mentona						X
p-Mentan-3-ona						X
p-ment-1-en-8-ol						X
p-Ment-8-en-2-ol						X
6-Metil-2-vinil-5-hepten-1-ol						X
4-Carvomentenol	X	X			X	
α -Copaeno	X	X	X		X	
Dihidrocarveol	X					
Limoneno diepoxido	X	X				
2-Propil-1-heptanol	X					
Ciclodecanol	X					
<i>p</i> -Cimen-8-ol		X				X
Estragol		X		X		X
Pulegona	X					X
(+) Carvona	X					X
Piperitona oxido						X

Continua

Continuação

Composto	A	S	C	E	M	H
l-Verbenona						X
Bornil acetato		X				X
α -Bourboneno						
2-Isopropilideno ciclohexanona	X					
<i>p</i> -propenil Anisol	X		X	X		
Anisaldeido				X		
Teresantalol				X		
Ácido Caprico metil ester			X			
Tetradecano	X					
Berbenona	X					
β -Elemeno						X
γ -Elemeno			X			
Ylangeno					X	
α -Bisabolol			X			
Cinerolon						X
α -Cariofileno					X	
β -Cariofileno	X	X			X	X
γ -Muuroloeno	X	X	X		X	X
α -Muuroloeno					X	
Alloaromadendreno			X		X	
α -Cubebena			X			X
β -Cubebena			X			X
Seichelena			X			
Cedr-8-en-13-ol		X				
Varidiflorena		X				
Aromadendreno					X	
β -Farneseno	X	X	X			X
α -Guaiena			X		X	
γ -Cadineno					X	
Germacreno D			X			X
γ -Gurjunena						X
Humuleno	X		X	X		
β -Himachaleno				X		

Continua

Continuação

Composto	A	S	C	E	M	H
Palustrol	X					
α -Farneseno			X			
Δ -Cadineno	X	X	X		X	X
Calameneno					X	X
Espatuleno			X			
β -Panasinseno					X	
óxido Cariófileno		X			X	
Isoledeno					X	
Viridiflorol				X	X	
α -Selineno	X					
Hexadecano	X					
(-)-Espatuleno				X		
Epiglobulol		X				
Longiborneol				X		
β -Bisaboleno			X	X		
cis-Isoeugenol				X		
α -Bisabolol óxido			X			

A – Alcachofra; S – Sálvia; C – Camomila; E – Erva-Doce; M – Macela; H - Hortelã

Como pode ser observado, foram encontrados diversos compostos durante a análise dessas ervas. Diversos trabalhos já foram desenvolvidos tendo como base a identificação de alguns compostos presentes em matrizes vegetais, por exemplo, foram encontrados os compostos α -bisabolol, α -bisabolol óxido e β -farneseno em amostras de camomila (SCALIA; GIUFFREDA; PALLADO, 1999, p.549), também foram analisadas amostras de erva-doce em que estavam presentes os compostos borneol, β -bisaboleno e estragol (SANTOS *et al.*, 1998, p. 455), outras matrizes analisadas foram a alcachofra e a macela onde foram encontrados terpineno, limoneno, copaeno, α -pineno e α -cariofileno (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2008, p.147; RETTA *et al.*, 2012, p.27). Também foram estudadas amostras de hortelã e sálvia onde foram identificados os compostos germancreno D, carvona, β -pineno, terpineol e bornil acetato (CHAUHAN *et al.*, 2009, p.654; RADULESCU; CHILIMENT; OPREA, 2004, p.121).

3.4 CONCLUSÕES

O procedimento HS-CF-SPME utilizando duas temperaturas da fibra mostrou uma melhor eficiência de extração dos compostos presentes nas ervas medicinais estudadas, permitiu a extração de compostos de volatilidades diferentes e obteve-se desempenho muito satisfatório em comparação com o procedimento de HS-SPME convencional. Além disso, o tempo de extração do procedimento HS-CF-SPME foi aproximadamente três vezes menor em comparação com o procedimento HS-SPME convencional. Foi possível estabelecer o perfil de voláteis individual das plantas estudadas e separar/identificar mediante cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa os compostos extraídos a partir de um grau de certeza de no mínimo 85%. O procedimento de HS-CF-SPME com duas temperaturas da fibra provou ser muito eficiente para a análise do perfil de voláteis destas matrizes.

CAPÍTULO IV: Determinação simultânea de trihalometanos (THM) e pesticidas organoclorados em amostras aquosas utilizando DI-HS-SPME com duas temperaturas de extração em um mesmo procedimento de microextração

4.1 INTRODUÇÃO

O cloro é aplicado na água potável, a fim de desativar microrganismos e/ou para assegurar as concentrações residuais no sistemas de distribuição de água potável, protegendo assim a água do crescimento desses micro-organismos (DOS SANTOS; MARTENDAL; CARASEK, 2011, p.290). Os trihalometanos (THM) podem ser formados neste processo, sendo que a formação de compostos halogenados depende do tipo e da concentração de matéria orgânica natural, da concentração de íons brometo, forma e concentração de cloro, pH, temperatura e concentração de nitrogênio orgânico (ABOUL; WELLS, 2006, p.272). Os THM formados são o clorofórmio (CHCl_3), bromofórmio (CHBr_3), clorodibromometano (CHClBr_2) e bromodiclorometano (CHCl_2Br). Devido à toxicidade dos THM, diversos países possuem legislações específicas no que diz respeito à concentração máxima de trihalometanos presente em água potável, no Brasil, por exemplo, é permitida uma concentração total máxima de THM de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2004), já anos Estados Unidos a Agencia Nacional de Proteção ao Meio Ambiente estipulou uma concentração limite total de $80 \mu\text{g L}^{-1}$ (TOBISZEWSKI *et al*, 2009, p.943).

Os compostos organoclorados são conhecidos por serem um dos mais persistentes micropoluentes orgânicos presentes no ambiente e tendem a acumular-se em tecidos de diversos organismos (DONG; ZENG, 2005, p.721). Muitos organoclorados encontram-se nos tecidos de peixes em concentrações que são ordens de grandeza maiores que as encontradas nas águas em que vivem, esses compostos são essencialmente muito mais solúveis em meios similares a hidrocarbonetos, como o tecido gorduroso dos peixes, do que em água. Assim, quando a água passa através das brânquias dos peixes, os compostos difundem de forma seletiva desde a água até a carne gordurosa, tornando-se aí mais concentrados, em um processo conhecido como bioconcentração (BAIRD, 2002).

Os pesticidas organoclorados têm sido usados intensamente na agricultura, como consequência, a maioria destes pesticidas têm seu uso restringido ou mesmo proibido em muitos países. No Brasil, pesticidas organoclorados tais como aldrin, endrin, heptacloro, lindano e outros

foram os mais empregadas entre 1950 e 1970. Portanto, a determinação de pesticidas em água, plantas, solos e gêneros alimentícios, é de grande importância para a proteção da saúde humana e controle ambiental (JUNIOR; RÉ-POPPI, 2007, p.1833). A natureza perigosa dos pesticidas organoclorados é um resultado da sua toxicidade em combinação com alta estabilidade química e biológica e um elevado grau de lipofilicidade. No Brasil, a legislação específica a concentração máxima permitida dos principais pesticidas organoclorados em água de consumo humano como sendo: aldrin e dieldrin $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$; endossulfan $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$; endrin $0,6 \mu\text{g L}^{-1}$; heptacloro epóxido $0,03 \mu\text{g L}^{-1}$; lindano $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$; BHC $1,0 \mu\text{g L}^{-1}$; metoxicloro $20,0 \mu\text{g L}^{-1}$; DDT $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$ (BRASIL, 2004).

Vários métodos tem sido empregados na determinação de pesticidas organoclorados nas mais diversas matrizes (CHEN *et al.*, 2007, p.1315; DONG *et al.*, 2002, p.246; GULER *et al.*, 2010, p 1218; KAMPIRE *et al.*, 2011. p.923; LU; WANG; SYE, 2011, p.1984; SALEM; AHMAD; ESTAITIEH, 2009, p.673; SHETE; GUNALE; PANDIT, 2009, p.1483; VAGI *et al.*, 2007, p.146; WALISZEWSKI *et al.*, 1997, p.127; YANG *et al.*, 2010, p.2310; ZA WIAH *et al.*, 2007, p.98), podendo ser destacados os métodos utilizando microextração em fase sólida, que é uma técnica que não utiliza solventes tóxicos e apresenta muitas vantagens em relação a algumas técnicas que também são utilizadas para a determinação destes compostos, sendo esta técnica também utilizada na determinação de THM (. Uma técnica bastante promissora para SPME, quando se trabalha com compostos que apresentam volatilidades muito diferentes, é a utilização simultânea dos modos DI e HS em SPME (DI-HS-SPME) com diferentes temperaturas de extração (BIANCHIN *et al.*, 2012, p.22).

O objetivo desse trabalho foi aplicar a técnica de SPME utilizando a DI-HS-SPME com diferentes temperaturas da amostra, em amostras aquosas contendo mistura de THM (voláteis) e pesticidas organoclorados (semivoláteis), bem como otimizar as condições de extração para encontrar a maior eficiência de extração para ambos os grupos de compostos estudados.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Equipamentos

Foi utilizado um cromatógrafo a gás Shimadzu equipado com detector por espectrometria de massas (Kyoto, Japão) GC-MS QP-2010 Plus e coluna cromatográfica Rtx-5MS[®] Restek (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm) obtida da Restek corporation (Bellefonte, PA, EUA). A programação de temperatura utilizada no forno cromatográfico foi de 40 °C (mantida por 4 min), 5 °C min^{-1} até 100 °C (mantida por 1 min), 20 °C min^{-1} até 180 °C, 5 °C min^{-1} até 220 °C, 3 °C min^{-1} até 250 °C. A temperatura do injetor foi de 260 °C, a temperatura da fonte de ionização e da interface foram de 210 °C e 220 °C, respectivamente, utilizou-se fluxo de gás de arraste de 1 mL min^{-1} . O tempo de dessorção da fibra no injetor do cromatógrafo foi fixado em 10 min e o modo de injeção utilizado foi o *splitless*. Foram realizadas análises no GC-MS modo SIM utilizando para quantificação as seguintes razões massa/carga: clorofórmio (83), bromodiclorometano (83), diclorobromometano (129), bromofórmio (173), lindano (181), BHC (181), heptaclor epóxido (81), aldrin (263).

4.2.2 Materiais em geral

Banho termostatzado (Nova Técnica, São Paulo, Brasil), agitadores magnéticos, frascos para SPME de 40 mL de capacidade (Supelco, Bellefonte, EUA), béqueres de diferentes capacidades, micropipetadores, espátulas de aço inox e balança analítica (Marte Comércio de Instrumentação Analítica, São Paulo, Brasil). Também foram utilizadas as fibras para SPME com os seguintes recobrimentos poliméricos: PDMS/DVB/CAR (50/30 μm de espessura) PDMS/DVB (65 μm), PDMS (100 μm), CAR/PDMS (85 μm) todas as fibras foram obtidas da Supelco (Bellefonte, PA, EUA).

4.2.3 Reagentes e soluções

Cloreto de sódio P.A. (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil), solução padrão dos pesticidas Aldrin, BHC, Heptaclor epóxido e Lindano na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA), água ultra purificada (Mega Purity, Billerica, EUA), solução padrão dos trihalometanos clorofórmio, bromodiclorometano, clorodibromometano e bromofórmio todos a 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol (Sigma-Aldrich, Milwaukee, WI, EUA).

4.2.4 Coleta das amostras

As amostras de água foram coletadas diretamente do rio Araranguá localizado na cidade de Araranguá, Santa Catarina, Brasil. Elas foram armazenadas em recipientes de polietileno, devidamente vedados e armazenados em refrigerador a aproximadamente 4°C até o momento da análise.

4.2.5 Escolha do recobrimento da fibra para o procedimento HS-SPME

Foram estudadas as fibras contendo os seguintes recobrimentos poliméricos: PDMS/DVB/CAR (50/30 μm), PDMS/DVB (65 μm), PDMS/CAR (85 μm) e PDMS (100 μm). As extrações foram realizadas utilizando-se amostras aquosas de uma mistura contendo 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada solução padrão de THM e pesticidas organoclorados. Neste teste foi utilizada SPME combinando os dois modos de extração (imersão direta e *headspace*). Primeiramente, foi feita a extração com imersão direta durante 30 min a 70 °C, após isso a amostra foi colocada em um banho termostatizado a 10 °C durante 15 min e realizada a extração no *headspace* da amostra, totalizando 45 min de extração. Após esse procedimento foram obtidas as áreas cromatográficas referentes a cada composto presente na mistura e foi obtida a média geométrica dos picos, sendo esta normalizada e com isso verificado o recobrimento polimérico que apresentou o melhor desempenho nos testes.

4.2.6 Otimizações multivariadas

Para a realização dos procedimentos de otimização foram utilizadas as médias geométricas da área dos picos cromatográficos obtidos, foram utilizados planejamento compostos centrais para a construção das superfícies de resposta (através do software Statistica 8.0, STATSOFT, EUA) que representaram as condições ideais encontradas em cada etapa do trabalho.

1) Otimização das condições de extração envolvendo o procedimento de HS-SPME

Primeiramente foi realizada a otimização com a finalidade de se obter as condições ideais de extração envolvendo o procedimento HS-SPME. As variáveis foram: tempo de extração (5 – 120 min), temperatura da amostra (10 – 80 °C) e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada (0 – 10 mL). Foi elaborado um planejamento composto central utilizando essas variáveis e as respostas

utilizadas foram as médias geométricas obtidas a partir dos picos cromatográficos dos compostos de interesse.

2) Otimização das condições de extração envolvendo o procedimento DI-SPME

Também foi realizada a otimização para encontrar as condições ideais de extração envolvendo o procedimento DI-SPME, com as seguintes variáveis: tempo de extração (5 – 120 min), temperatura da amostra (10 – 80 °C) e quantidade de solução de cloreto de sódio a 20% adicionada (0 – 10 mL), sendo realizado da mesma forma um planejamento composto central e as médias geométricas para obtenção das respostas de interesse na construção das superfícies de resposta.

3) Otimização das condições de extração envolvendo o procedimento DI-HS-SPME

Na última etapa das otimizações deste capítulo, foi aplicado um novo planejamento composto central para verificar as melhores condições de extração para a técnica envolvendo o procedimento DI-HS-SPME. Estudou-se o tempo total de extração (5 – 120 min), percentual do tempo que foi realizada a extração no modo HS-SPME (0 – 100%) e volume de solução aquosa a 20% de NaCl adicionada (0 – 10 mL).

A Tabela 4 mostra os níveis estudados, bem como as variáveis estudadas em cada etapa de otimização realizada neste capítulo.

Tabela 4: Variáveis e níveis estudados em cada etapa de otimização.

HS-SPME					
Variáveis	Níveis estudados				
Temperatura da amostra (°C)	10	27,5	45	62,5	80
Tempo de extração (min)	5	16	27,5	38	120
Volume de solução NaCl a 20% (mL)	0	2,5	5	7,5	10
DI-SPME					
Temperatura da amostra (°C)	10	27,5	45	62,5	80
Tempo de extração (min)	5	16	27,5	38	50
Volume de solução NaCl a 20% (mL)	0	2,5	5	7,5	10
DI-HS-SPME					
Temperatura da amostra (°C)	10	27,5	45	62,5	80
Tempo de extração (min)	5	16	27,5	38	50
Volume de solução NaCl a 20% (mL)	0	2,5	5	7,5	10

4.2.7 Parâmetros analíticos de mérito

Foram avaliados alguns parâmetros analíticos de mérito tais como limite de quantificação (LQ), coeficiente de correlação (r), faixa linear e desvio padrão relativo (DPR). Também foram determinados os percentuais de recuperação dos analitos de interesse em amostras previamente fortificadas com concentrações conhecidas dos mesmos, bem como realizadas microextrações em amostras reais para verificar a presença desses analitos utilizando-se a metodologia abordada.

4.2.8 Comparação da eficiência dos procedimentos

Através da análise dos cromatogramas obtidos com as metodologias envolvendo HS-SPME, DI-SPME e DI-HS-SPME, sendo as condições de extração previamente otimizadas, pode-se verificar a eficiência desses procedimentos na extração dos analitos em estudo, sendo feita uma comparação mediante a utilização das áreas normalizadas referentes às médias geométricas dos picos cromatográficos dos analitos.

4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.3.1 Escolha da fibra para a SPME

Foram analisados diversos recobrimentos poliméricos disponíveis, sendo obtidas as áreas referentes aos picos cromatográficos de interesse. Através destes dados foi possível estabelecer uma comparação para a escolha do recobrimento polimérico que apresentou o melhor desempenho. Com isso a fibra composta por PDMS/DVB/CAR apresentou maior eficiência na extração de praticamente todos os compostos. Entretanto, não apresentou área de picos tão pronunciada para os THM quanto à fibra composta por PDMS/DVB. Porém, a fibra PDMS/DVB apresentou problemas na extração dos pesticidas organoclorados, sendo que alguns deles não puderam ser extraídos. Desta forma, apesar de a fibra composta por PDMS/DVB/CAR não apresentar uma eficiência tão boa para os compostos mais voláteis, ela foi a escolhida para o restante do estudo, tendo em vista a condição de que ela apresentou um rendimento satisfatório para ambas as classes de compostos. As demais fibras testadas apresentaram desempenho bem inferior aos das citadas acima.

4.3.2 Otimizações das condições de extração no modo HS-SPME

Primeiramente foram avaliadas as melhores condições de extração para o modo HS-SPME. A partir dos dados dos cromatogramas obtidos para os compostos de interesse pode-se construir as superfícies de resposta que permitiram a visualização das melhores condições de extração. A superfície de resposta para a otimização das variáveis tempo e temperatura de extração em relação a todos os compostos (THM e pesticidas organoclorados) está mostrada na Figura 18.

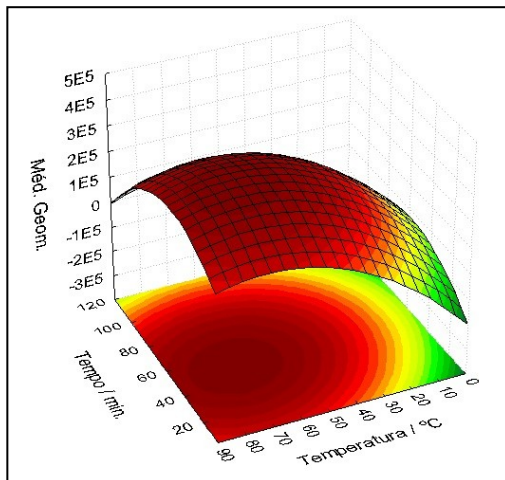


Figura 18: Superfície de resposta obtida em relação a THM e organoclorados no modo HS-SPME. Utilizando fibra de PDMS/DVB/CAR e tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

Através dessa superfície de resposta foi possível observar que se obteve eficiência máxima de extração quando a temperatura foi mantida em torno de 60 °C e o tempo de extração foi de aproximadamente 40 min, sendo essa uma condição compromisso envolvendo ambas as classes de compostos (THM e organoclorados). Porém foi possível observar que essas classes de compostos apresentam comportamento muito distinto em relação às condições de extração, desta forma elas foram estudadas separadamente.

Foram obtidas as superfícies de resposta relacionando a temperatura de extração e o tempo de extração para cada classe de compostos estudada. Na Figura 19-A é mostrada a superfície obtida para os THM e na Figura 19-B é mostrada a superfície em relação aos compostos organoclorados.

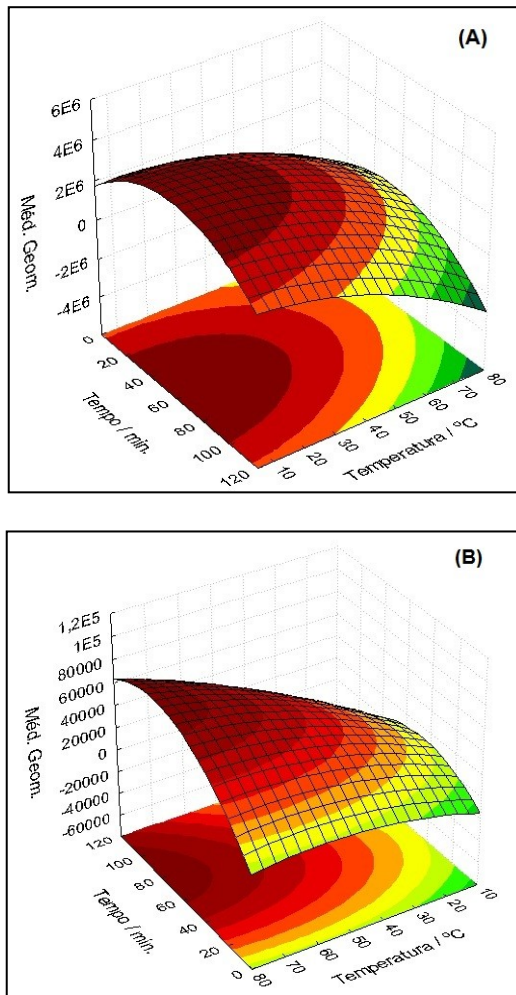


Figura 19: Superfícies de resposta referentes a THM (A) e pesticidas organoclorados (B) obtidas no modo HS-SPME, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

Através dessas superfícies pode-se evidenciar o comportamento distinto dessas duas classes de compostos principalmente no que diz respeito à temperatura de extração. Em relação aos THM foram obtidas as melhores eficiências de extração com a temperatura abaixo de 20 °C.

Isso deve-se ao fato desses compostos apresentarem alta volatilidade e, mesmo com temperaturas relativamente baixas, encontram-se em grande quantidade no *headspace* da amostra. Além disso, um aumento na temperatura facilitaria a dessorção desses compostos novamente ao *headspace* devido ao efeito exotérmico do processo. Também foi obtido um tempo de extração relativamente curto, em torno de 20 min. Por outro lado, em relação aos compostos organoclorados foram obtidas as melhores eficiências de extração com temperaturas superiores a 70°C e um tempo de extração de aproximadamente 60 min. Isso pode ser explicado tendo em vista que, em virtude de serem compostos de maior massa molecular quando comparados aos THM, apresentam maior dificuldade de serem liberados da matriz da amostra para o *headspace*, sendo necessária uma temperatura maior para que estes compostos sejam volatilizados. Através da análise desses dados fica evidenciado que essas classes de compostos apresentam comportamentos muito diferentes em relação à extração no modo HS-SPME.

Também foi possível estabelecer o volume de solução aquosa de NaCl a 20% que permitiu os melhores resultados no modo HS-SPME. Conforme está mostrado na Figura 20, foi observado que utilizando um volume de aproximadamente 10 mL obteve-se os melhores resultados.

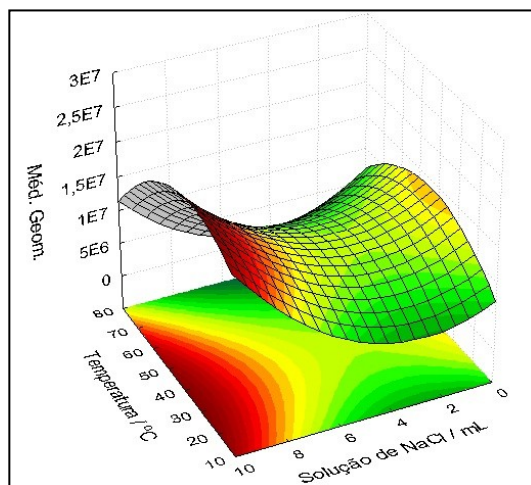


Figura 20: Superfície de resposta obtida em relação às variáveis temperatura de extração e volume de solução aquosa de NaCl a 20% adicionado. utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

4.3.3 Otimizações das condições de extração no modo DI-SPME

Também foram avaliadas as melhores condições de extração para o modo DI-SPME. Utilizando-se o mesmo método estatístico abordado para o modo HS-SPME pode-se construir as superfícies de resposta que permitiram a visualização das melhores condições de extração. A superfície de resposta para a otimização das variáveis tempo e temperatura de extração em relação a todos os compostos (THM e pesticidas organoclorados) está mostrada na Figura 21.

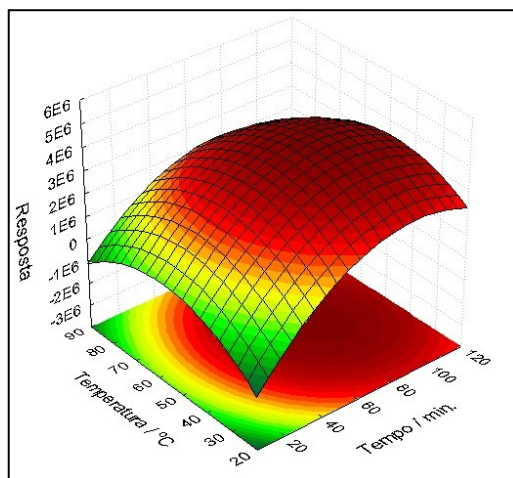


Figura 21: Superfície de resposta obtida em relação a THM e pesticidas organoclorados no modo DI-SPME, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

Através dessa superfície de resposta foi possível observar que se obteve eficiência máxima de extração quando a temperatura foi mantida em torno de 50 °C e o tempo de extração foi de aproximadamente 80 min, sendo essa uma condição compromisso envolvendo ambas as classes de compostos (THM e organoclorados). Porém, também para o modo DI-SPME foi possível observar que essas classes de compostos apresentaram comportamento muito distinto em relação às condições de extração, desta forma foram estudadas as classes de compostos separadamente, como é mostrado na Figura 22-A para os THM e 22-B para os pesticidas organoclorados.

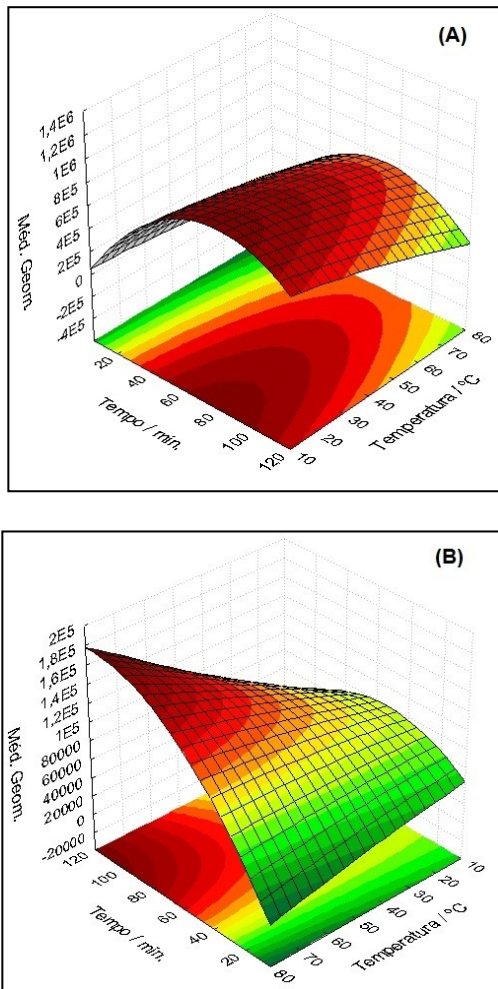


Figura 22: Superfícies de resposta obtidas para as microextrações no modo DI-SPME para (A) THM e (B) pesticidas organoclorados, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

Ao verificar as superfícies de resposta também pode-se observar um comportamento distinto desses grupos de compostos no modo de extração DI-SPME. Em relação aos THM foram obtidas as melhores eficiências de extração com a temperatura abaixo de 20 °C, porém o

tempo para que o equilíbrio fosse atingido para essa classe de compostos foi superior ao encontrado no modo HS-SPME. Por outro lado, em relação aos compostos organoclorados foram obtidas as melhores eficiências de extração com temperaturas superiores a 80°C e tempo de extração por volta de 60 min. Esses resultados foram similares aos encontrados para essa classe de compostos no modo HS-SPME, e podem ser explicados devido a essas moléculas possuírem maior massa molecular e apresentarem menores coeficientes de difusão.

Os analitos mais voláteis (THM) foram mais eficientemente extraídos quando se utilizou o modo HS-SPME, porém neste modo, a eficiência de extração dos pesticidas organoclorados ficou reduzida. Utilizando-se o modo DI-SPME os pesticidas organoclorados tiveram uma melhora muito grande em sua extração, sendo que os THM apresentam eficiência de extração reduzida em relação ao modo HS-SPME.

Também foi possível observar a quantidade de solução aquosa de NaCl a 20% que permitiu os melhores resultados no modo DI-SPME. Tendo como base a Figura 23, observou-se que foram obtidas as melhores eficiências de extração com um volume abaixo de 2 mL de solução de NaCl a 20%, visto que como são compostos mais pesados não necessitam de grandes quantidades de sal para que sejam extraídos com eficiência.

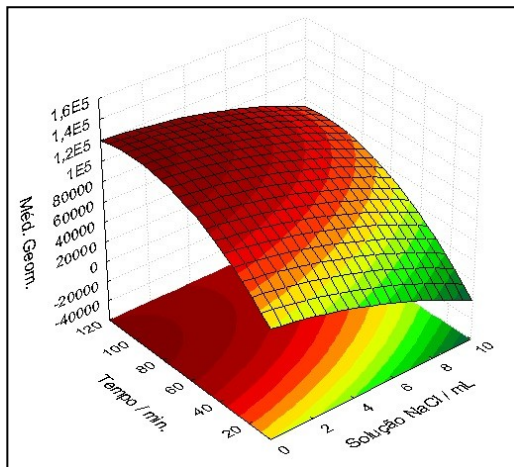


Figura 23: Superfície de resposta obtida no modo DI-SPME em relação às variáveis tempo de extração e volume de solução de NaCl a 20% adicionado, utilizando tempo de extração variando entre 5 – 120 min, temperatura da amostra entre 10 – 80 °C e quantidade de solução aquosa de cloreto de sódio a 20% adicionada entre 0 – 10 mL.

Tendo em vista ambas as otimizações, ficou comprovado que os grupos apresentam diferentes comportamentos, principalmente em relação à variável temperatura de extração. No modo HS-SPME utilizando temperaturas baixas a extração dos compostos mais voláteis (THM) foi favorecida em comparação com a extração no modo DI-SPME. No modo DI-SPME, utilizando-se temperaturas mais elevadas a extração dos pesticidas organoclorados foi mais eficiente se comparada com o modo HS-SPME.

Desta forma foi proposta a utilização de uma metodologia de extração em que foram combinados os modos DI e HS em SPME utilizando-se duas temperaturas diferentes da amostra durante o mesmo procedimento de microextração, criando uma condição compromisso para ambas as classes de compostos em virtude de seu comportamento distinto frente à SPME.

4.3.4 Otimização do procedimento de extração utilizando DI-HS-SPME

Em virtude do comportamento distinto das classes de compostos estudadas, foi proposta a última otimização utilizada neste capítulo, na qual foram otimizados o tempo total de extração e o percentual desse

tempo em que foi realizada a microextração no modo HS-SPME, bem como a quantidade de solução de NaCl a 20% adicionada. A temperatura de extração utilizada para o procedimento HS-SPME foi de 12 °C, a qual apresentou a maior eficiência de extração para os THM e a temperatura utilizada no modo DI-SPME foi de 80 °C, sendo que esta apresentou melhora na eficiência de extração para os pesticidas organoclorados. Estes dados foram obtidos a partir das otimizações anteriores. A superfície de resposta obtida para a condição compromisso entre ambas as classes de compostos está representada na Figura 24.

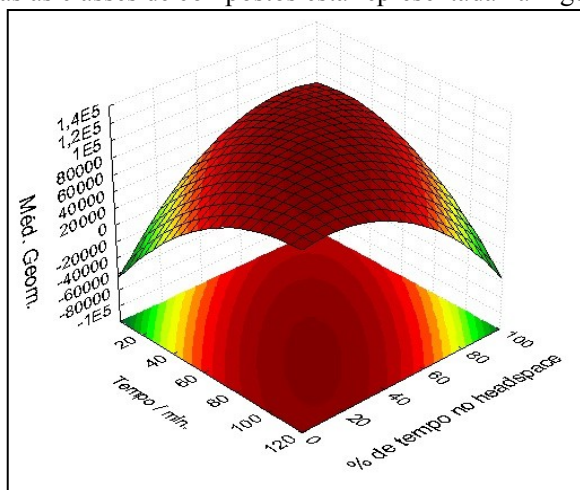


Figura 24: Superfície de resposta obtida para ambas as classes de compostos relacionando o tempo total de extração e o percentual desse tempo em que foi realizado o procedimento de microextração no modo HS-SPME, utilizando tempo total de extração variando entre 5 – 120 min, percentual do tempo que foi realizada a extração no modo HS-SPME entre 0 – 100% e volume de solução aquosa a 20% de NaCl adicionada entre 0 – 10 mL.

Desta forma foi possível estabelecer uma condição compromisso em que fossem eficientemente extraídas ambas as classes de compostos. Pode-se observar que em um tempo total de extração de 70 min, sendo utilizado 40% desse tempo (28 min) no modo *headspace* e o restante (42 min) no modo imersão direta foram obtidos os melhores resultados. Sempre foram realizadas as extrações primeiramente no modo DI-SPME e, após isso, a amostra foi transferida para outro banho termostatizado com temperatura menor para a realização do procedimento no modo HS-

SPME. Também foi possível estabelecer o volume de solução aquosa NaCl a 20% que apresentou os melhores resultados para ambas as classes de compostos, sendo este estabelecido em 5 mL como representado na Figura 25, tendo-se como volume total de amostra 20 mL.

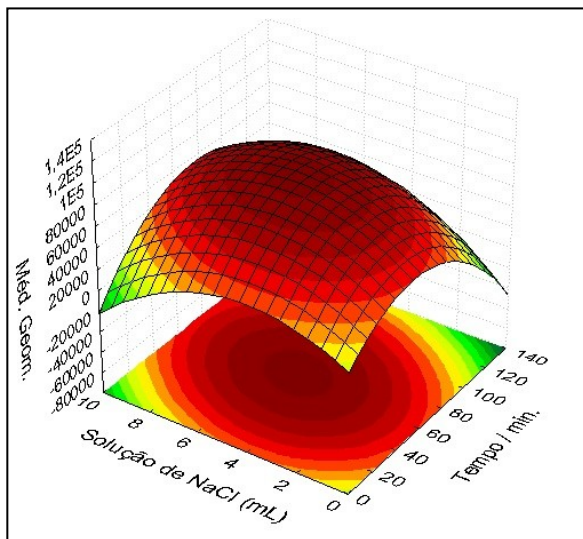


Figura 25: Superfície de resposta obtida para ambas as classes de compostos relacionando o tempo de extração e o volume de solução de NaCl adicionada, utilizando tempo total de extração variando entre 5 – 120 min, percentual do tempo que foi realizada a extração no modo HS-SPME entre 0 – 100% e volume de solução aquosa a 20% de NaCl adicionada entre 0 – 10 mL.

Com esses dados obteve-se a condição ideal para a combinação dos modos de extração DI-SPME e HS-SPME, sendo esta condição utilizada para a construção da curva de calibração dos compostos de interesse e posterior determinação dos parâmetros analíticos de mérito.

4.3.5 Parâmetros analíticos de mérito

Para a construção da curva analítica foram realizadas microextrações em amostras de água ultrapurificada de 20 mL, sendo feitos 5 pontos em triplicata e foi utilizada a área obtida da média aritmética dessas triplicatas para a construção da curva analítica. Do total de 20 mL de amostra, 5 mL foram de solução aquosa de NaCl a

20%, o tempo total de cada extração foi de 70 min, sendo 42 min no modo de imersão direta com temperatura fixa em 80 °C e 28 min no modo *headspace* com temperatura em 12 °C. Os valores encontrados estão listados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros analíticos de mérito para os compostos analisados.

Composto	Faixa linear ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)	r	RSD (%)
Clorofórmio	0,5 – 40	0,16	0,5	0,9919	11,4
Bromodichloro- metano	0,5 – 100	0,16	0,5	0,9977	13,5
Dibromocloro- metano	0,5 – 100	0,16	0,5	0,9913	17,9
Bromofórmio	0,5 – 100	0,16	0,5	0,9957	13,2
Lindano	0,5 – 75	0,16	0,5	0,9961	12,6
Aldrin	0,5 – 75	0,16	0,5	0,9901	16,4
BHC	10 – 100	3,33	10	0,9860	13,1
Heptacloro epóxido	5 – 75	1,66	5	0,9881	17,8

LOD – Limite de Detecção, do inglês *limit of detection*.

LOQ – Limite de Quantificação, do inglês *limit of quantification*.

RSD - Desvio Padrão Relativo, do inglês *relative standard deviation*, para uma concentração de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ (n=3).

4.3.6 Aplicação do procedimento envolvendo DI-HS-SPME em amostras de água de rio

O procedimento otimizado envolvendo os dois modos de extração foi aplicado em amostras de água coletadas do rio Araranguá. A Tabela 6 mostra os resultados obtidos a partir das análises, sendo que através de fortificações em amostras de água de rio foi possível estabelecer o percentual recuperação utilizando concentrações de 20 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto.

Tabela 6: Percentual de recuperação dos compostos na amostra de água do rio Araranguá.

Composto	Amostra	Rec.(%)*
Clorofórmio	DE	91,90
Bromodictlorometano	ND	78,80
Dibromoclorometano	ND	85,98
Bromofórmio	ND	75,88
Lindano	ND	103,72
Aldrin	ND	94,41
BHC	DE	86,10
Heptaclor epóxido	ND	90,80

*Recuperação para concentração de $20 \mu\text{g L}^{-1}$ de cada composto

DE = detectado

ND = não detectado

É mostrado na Figura 26 (A e B) um cromatograma da amostra fortificada com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos de interesse. Para facilitar a visualização o cromatograma foi dividido em duas partes, a primeira parte com tempo de eluição de até 10 min, permite verificar a presença dos THM, e a segunda parte com tempo de eluição após 24 min. permite verificar a presença dos pesticidas organoclorados.

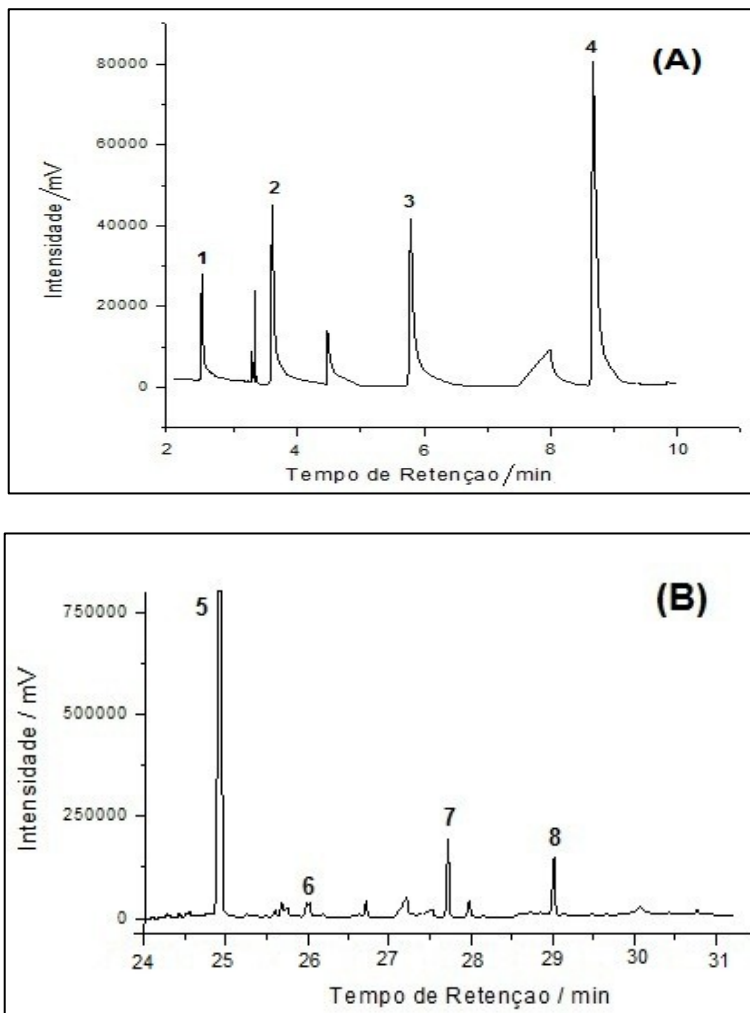


Figura 26: Cromatograma obtido com GC-MS de uma amostra de água de rio fortificada com $20 \mu\text{g L}^{-1}$ dos compostos: 1) clorofórmio; 2) bromodiclorometano; 3) clorodibromometano; 4) bromofórmio; 5) lindano; 6) BHC; 7) aldrin; 8) heptacloro epóxido

4.3.7 Comparação da eficiência dos procedimentos

Através das análises das áreas dos picos cromatográficos dos analitos de interesse pode-se fazer uma comparação da eficiência das análises utilizando os procedimentos de HS-SPME, DI-SPME e DI-HS-SPME. Foi construído um gráfico de barras, mostrado na Figura 26, que permite estabelecer uma interessante comparação dos diferentes modos de extração em relação a cada composto.

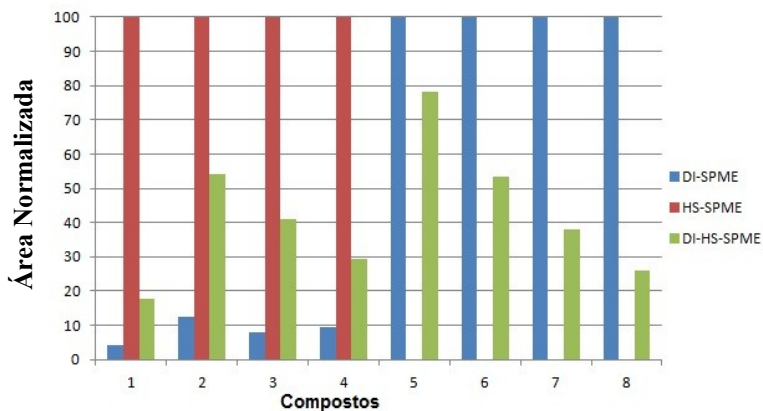


Figura 27: Gráfico de barras relacionado cada modo com o desempenho de extração de cada composto. 1) Clorofórmio, 2) Bromodichlorometano, 3) Dibromoclorometano, 4) Bromofórmio, 5) Lindano, 6) BHC, 7) Aldrin, 8) Heptacloro epóxido. Modo DI-SPME: temperatura de 80 °C e o tempo de extração de 42 min com 2 mL de NaCl a 20%, modo HS-SPME: temperatura de 12 °C e o tempo de extração de 28 min com 10 mL de NaCl a 20%, modo DI-HS-SPME: 42 min a 80 °C e 28 min a 12 °C com 5 mL de NaCl a 20%.

Através da análise dos dados obtidos pode-se observar que para os compostos mais voláteis (THM) a melhor forma de extração foi o modo *headspace*. Porém, utilizando este modo de extração obteve-se uma extração extremamente ineficiente para os compostos semivoláteis (pesticidas organoclorados), os quais tiveram uma grande eficiência de extração no modo de imersão direta. Nesse modo de extração, os THM não tiveram uma boa eficiência de extração. Desta forma pode-se observar que o modo DI-HS-SPME permitiu a extração de ambas as classes de compostos, tendo sido observado que todos os compostos foram extraídos com uma eficiência que permitem serem analisados simultaneamente, possibilitando que, para análises de amostras aquosas

que contenham compostos de volatilidades bastante distintas essa forma de extração se torna uma boa alternativa.

4.4 CONCLUSÕES

A utilização da microextração em fase sólida combinando em um mesmo procedimento duas temperaturas de extração, bem como dois modos foi muito interessante na extração de ambas as classes de compostos estudadas (THM e pesticidas organoclorados), sendo de fácil aplicação e permitindo que seja utilizada em amostras que contenham classes de compostos bastante distintas em relação à volatilidade.

Como se pode observar no gráfico de comparação entre os modos de extração, as áreas normalizadas para os compostos mais voláteis (THM) utilizando a metodologia DI-HS-SPME não foram muito altas, desta forma, é necessário que sejam realizados mais alguns testes para melhorar esses valores, um exemplo pode ser a utilização de um tempo de extração um pouco menor para essa classe de compostos em virtude da alta volatilidade dos mesmos, porém os limites de detecção obtidos foram bastante satisfatórios, ficando abaixo dos limites máximos permitidos na legislação para essa classe de compostos. Em relação aos pesticidas organoclorados, foi possível estabelecer que para o lindano, aldrin e BHC os limites de detecção obtidos com essa metodologia ficaram acima dos limites máximos permitidos pela legislação, desta forma devem ser testados tempos maiores no modo DI-SPME para que esses compostos possam ser extraídos com uma melhor eficiência, em virtude de suas baixas volatilidades, para que desta forma, possa ser diminuído o LOD para esses analitos.

5. REFERÊNCIAS

- ABOUL, M. Y. Z.; WELLS, M. J. M. **Assessing the trihalomethane formation potential of aquatic fulvic and humic acids fractioned using thin-layer chromatography.** *Journal of Chromatography. A*, 1116 (2006) p. 272.
- ARAUJO, P. W.; BRERETON, R. G. **Experimental design II. Optimization.** *Trends In Analytical Chemistry*, 15 (1996) p.63.
- ARTHUR, C.L., PAULISZYN, J. **Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.** *Analytical Chemistry*, 62 (1990) p.2145.
- BEZERRA, M. A. *et al.* **Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry.** *Talanta*, 76 (2008) p. 965.
- BIANCHIN, J. N. *et al.* **Simultaneous determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and benzene, toluene, ethylbenzene and xylene in water samples using a new sampling strategy combining different extraction modes and temperatures in a single extraction solid-phase microextraction-gas chromatography–mass spectrometry procedure.** *Journal of Chromatography A*. 1233 (2012) p.22.
- BAIRD, C. **Química Ambiental.** 2ª Edição. Editora Bookman. 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Norma de Qualidade da Água para Consumo Humano.** Portaria 518 de 24 de março de 2004. Brasília, 2004.
- CALDAS, E.D.; MACHADO, L.L. **Cadmium, mercury and lead in medicinal herbs in Brazil.** *Food and Chemical Toxicology*, 42 (2004) p.599.
- CAPPELINI, L. T. D. **Análise dos pesticidas ametrina, atrazina, diuron e fipronil em amostras de água do Ribeirão do Feijão.** São Carlos – SP. 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências – Química Analítica). Universidade de São Paulo, São Carlos.

CEVA-ANTUNES, P. M. N. *et al.* **Analysis of volatile composition of siriguela (*Spondias purpurea* L.) by solid phase microextraction (SPME).** *LWT – Food Science and Technology*. 39 (2006) p.437.

CHAUHAN, R. S. *et al.* **Chemical composition of essential oils in *Mentha spicata* L. accession [IIIM(J)26] from North-West Himalayan region, India.** *Industrial Crops and Products*, 29 (2009) p.654.

CHEN, S. *et al.* **Determination of organochlorine pesticide residues in rice and human and fish fat by simplified two-dimensional gas chromatography.** *Food Chemistry*. 104 (2007) p.1315.

CHEN, Y.; PAWLISZYN, J. **Miniaturization and Automation of an Internally Cooled Coated Fiber Device.** *Analytical Chemistry*, 78 (2006) p.5222.

COLLINS, C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos de cromatografia.** Editora da Unicamp. 2006.

DI STASI, L.C. *et al.* **Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest.** *Fitoterapia*, 73 (2002) p.69.

DONG, C.; ZENG, Z.; LI, X. **Determination of organochlorine pesticides and their metabolites in radish after headspace solid-phase microextraction using calix[4]arene fiber.** *Talanta*, 66 (2005) p.721.

DOONG, R. A. *et al.* **Composition and distribution of organochlorine pesticide residues in surface sediments from the Wu-Shi River estuary, Taiwan.** *Marine Pollution Bulletin*, 45 (2002) p.246.

DOS SANTOS, M. S.; MARTENDAL, E.; CARASEK, E. **Determination of THMs in soft drink by solid-phase microextraction and gas chromatography.** *Food Chemistry*, 127 (2011) p.290.

FERNÁNDEZ-GARCIA, E. *et al.* **Terpenoids and benzenoids in La Serena cheese made at different seasons of the year with a *Cynara cardunculus* extract as coagulant.** *International Dairy Journal*, 18 (2008) p.147

GHIASVAND, A. R.; HOSSEINZADEH, S.; PAWLISZYN, J. **New cold-fiber headspace solid-phase microextraction device for quantitative extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons in sediment.** *Journal of Chromatography A*, 1124 (2006) p.35.

GULER, G.O. *et al.* **Organochlorine pesticide residues in wheat from Konya region, Turkey.** *Food and Chemical Toxicology*, 48 (2010) p. 1218.

IORDACHE, A. *et al.* **Characterization of some plant extracts by GC-MS.** *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 267 (2009) p.338.

JUNIOR, J. L. R.; RÉ-POPPI, N. **Determination of organochlorine pesticides in ground water samples using solid-phase microextraction by gas chromatography-electron capture detection.** *Talanta*. 72 (2007) p.1833.

KAMPIRE, E. *et al.* **Organochlorine pesticide in fresh and pasteurized cow's milk from Kampala markets.** *Chemosphere*, 84 (2011) p.923.

KATAOKA, H., LORD, H.L., PAWLISZYN, J. **Applications of solid-phase microextraction in food analysis.** *Journal of Chromatography A*, 880 (2000) p.35.

LU, L. C.; WANG, C. I.; SYE, W. F. **Applications of chitosan beads and porous crab shell powder for the removal of 17 organochlorine pesticides (OCPs) in water solution.** *Carbohydrate Polymers*, 83(2011) p.1984.

MARTENDAL, E. **Novas estratégias de otimização para a técnica de SPME e SPME com recobrimento internamente refrigerado.** 2011. 101 p. Tese de Doutorado em Química Analítica. Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis.

MARTENDAL, E., CARASEK, E. **A new optimization strategy for gaseous phase sampling by an internally cooled solid-phase microextraction technique.** *Journal of Chromatography A*, 1218 (2011) p.367.

MOHAMMADI, A., YAMINI, Y.;ALIZADEH N. **Dodecylsulfate-doped polypyrrole film prepared by electrochemical fiber coating technique for headspace solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons.** *Journal of Chromatography A*, 1063 (2005) p.1.

ORLANDO R. M., *et al.* **Pré tratamento de amostas.** *Vita et Sanitas*, 3, (2009) p.122.

PAWLISZYN, J. **Handbook of Solid Phase Microextraction.** *Chemical Industry Press*. Pequim, 2009.

RADULESCU, V.; CHILIMENT, S.; OPREA, E. **Capillary gas chromatography–mass spectrometry of volatile and semi-volatile compounds of *Salvia officinalis*.** *Journal of Chromatography A*, 1027 (2004) p.121.

RETTA, D. *et al.* **Marcela, a promising medicinal and aromatic plant from Latin America: A review.** *Industrial Crops and Products* 38 (2012) 27– 38.

SALEM, N. M.; AHMAD, R.; ESTAITIEH, H. **Organochlorine pesticide residues in dairy products in Jordan.** *Chemosphere*, 77 (2009) p.673.

SANTOS, P. *et al.* **Essential oils from hairy root cultures and from fruits and roots of *pimpinella anisum*.** *Phytochemistry*, 48 (1998) p.455.

SCALIA, S.; GIUFFREDA, L.; PALLADO, P. **Analytical and preparative supercritical fluid extraction of Chamomile flowers and its comparison with conventional methods.** *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21 (1999) p.549.

SHETE, A.; GUNALE, V.R.; PANDIT, G.G. **Organochlorine pesticides in *Avicennia marina* from the Mumbai mangroves, India.** *Chemosphere* 76 (2009) p.1483.

SKOOG, D. A. **Fundamentos de Química Analítica.** 8ª edição. Editora Thomson. 2006.

TOBISZEWSKI, M. *et al.* **Green analytical chemistry in sample preparation for determination of trace organic pollutants.** *Trends Analytical Chemistry*, 28 (2009) p.943.

VAGI, M. C. *et al.* **Determination of organochlorine pesticides in marine sediments samples using ultrasonic solvent extraction followed by GC/ECD.** *Desalination*. 210 (2007) p.146.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. **Microextração em fase sólida.** *Química Nova*, v.23, (2000) p.523.

WALISZEWSKI, S.M. *et al.* **Organochlorine pesticide residues in cow's milk and butter in Mexico.** *Science of The Total Environment*, 208 (1997) p.127.

YANG, R. *et al.* **Organochlorine pesticides and PCBs in fish from lakes of the Tibetan Plateau and the implications.** *Environmental Pollution*, 158, (2010) p.2310.

ZAWIAH, S. *et al.* **Determination of organochlorine and pyrethroid pesticides in fruit and vegetables using SAX/PSA clean-up column.** *Food Chemistry*. 102 (2007) p.98.

ZHANG, Z.; PAWLISZYN, J. **Quantitative Extraction Using an internally Cooled Solid Phase Microextraction Device.** *Analytical Chemistry*, 67 (1995) p.34.