UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA DE SÃO CARLOS

**Desenvolvimento de novos materiais para o
preparo de amostras acoplado *on-line* com GC-
MS/MS e aplicações na análise de amostras de
café**

MARCELA JORDAN SINISTERRA

São Carlos

2020

MARCELA JORDAN SINISTERRA

**Desenvolvimento de novos materiais para o
preparo de amostras acoplado *on-line* com GC-
MS/MS e aplicações na análise de amostras de
café**

Tese apresentada ao Instituto de Química de
São Carlos da Universidade de São Paulo
como parte dos requisitos para a obtenção do
título de Doutor em Química.

Área de concentração: Química Analítica e
Inorgânica

Orientador: Prof. Dr. Fernando Mauro Lanças

São Carlos

2020

Aos que sempre estão aí, minha tribo, meus pais Humberto e Fanny, a Oriana minha parceira nesta viagem chamada vida, a Alex meu confidente e motivador, a Gungo meu angel de quatro patas, e ao mais lindo que tenho em minha vida, meu amor, meu Manolete. Este triunfo é de vocês, para vocês e por vocês. Obrigada!!!

*“Y así un día se llenó el mundo con la nefesta promesa de un apocalipsis viral..
Y de pronto las fronteras que se defendieron con guerras se quebraron con gotitas de saliva
Hubo equidad en el contagio que se repartía igual para ricos y pobres,
Las potencias que se sentían infalibles vieron cómo se puede caer ante un BESO, ante un ABRAZO
Y nos dimos cuenta de lo que era y no importante, y entonces..
Una enfermera se volvió más indispensable que un futbolista,
Y un hospital se hizo más urgente que un misil!
Se apagaron luces en estadios, se detuvieron los conciertos, los rodajes de películas, las misas y los encuentros masivos
Y entonces en el mundo hubo tiempo para LA REFLEXIÓN a solas
Y para esperar en casa que lleguen todos y para reunirse frente a fogatas, mesas, mecedoras, hamacas
Y contar cuentos que estuvieron a punto de ser olvidados.
Tres gotitas de mocos en el aire,
Nos han puesto a cuidar ancianos, a valorar la ciencia por encima de la economía,
Nos ha dicho que no solo los indigentes traen pestes, que nuestra pirámide de valores estaba invertida,
Que la vida siempre fue primero y que las otras cosas eran accesorios.
No hay un lugar seguro, en la mente de todos nos caben todos y empezamos a desearle el bien al vecino
Necesitamos que se mantenga seguro, necesitamos que no se enferme, que viva mucho, que sea feliz
Y junto a una paranoia hervida en desinfectante nos damos cuenta que
Si yo tengo agua y el de más allá no, mi vida está en riesgo.
Volvíamos a ser la aldea, la solidaridad se tiñe de miedo
Y a riesgo de perdernos en el aislamiento, existe una sola alternativa:
SER MEJORES JUNTOS”*

*Empatía Viral
Edna Rueda Abrahams*

Agradecimentos

Quando uma pessoa está chegando no fim de um estudo, geralmente está cheio de dúvidas sobre o que vai fazer depois, e tenho certeza que dificilmente na mente de alguém pode passar a ideia de escrever uma tese de doutorado na metade de uma pandemia; pior ainda sem saber quando poderá voltar para seu país. Por isso estes agradecimentos se tornarem mais difícil e mais sentimentais do que em um dia qualquer já seriam.

Neste ponto da minha vida, tudo parecia muito claro: consegui estabelecer novas metas após as metas atingidas mas, em um mês, vi como todos esses planos entraram em colapso como a caída de um castelo de cartas diante dos meus olhos. É por isso que começo agradecendo a meus pais Humberto e Fanny, porque sem seu amor, sem sua confiança em mim, sem a formação que durante toda minha vida recebi de vocês, eu não teria conseguido. Este triunfo é realmente de vocês, por vocês e para vocês.

À Oriana, porque a palavra irmã é muito pouco para definir o que você é para mim. Cada dia que trabalhei neste doutorado era motivado pela ideia que ia caminhar junto a você por aqueles lugares que só nós temos em nossas lembranças. Deixava minha vida planejando cada um deles. Obrigada menina porque você é a alegria de minha vida.

Ao Alex, mais que meu namorado, você foi aqui tudo para mim, minha família, meu amigo, meu co-orientador, meu conforto, meu exemplo e até meu desafio porque muitas vezes querer fazer você sentir-se orgulhoso de mim, como eu me sinto de você, foi o que me fez ganhar até reconhecimentos. Vida, obrigada!!

A meus amores, o Don Gungo e o Manolete. Aqueles dois seres são meu oásis de paz e tranquilidade neste mundo louco, barulhento e competitivo que consome dia a dia nossas vidas.

À Vivane e o Claudio, não existe uma palavra que possa expressar a minha gratidão. Vi, você é o meu anjo brasileiro; obrigada menina porque esta parte de minha vida foi muito mais fácil e legal porque contei com sua maravilhosa companhia.

Ao professor Fernando M. Lanças por aceitar-me em seu grupo de pesquisa, pois isso era o único requisito que eu tinha para continuar estudando: trabalhar com o senhor ou ia embora para casa. Fico muito grata com a vida porque aprendi do melhor.

Aos técnicos, Elaine e Guilherme, pela ajuda, incentivo e paciência durante estes anos.

A todos os colegas do grupo de cromatografia pelas contribuições, companhia, auxílio e momentos de distração, principalmente Dalton, Arley, Pininho, Ana Lúcia, Douglas, Natalia, Karen e Felipe; levo vocês em meu coração.

Aos meus amigos e colegas em São Carlos e na Colômbia, pelos bons desejos e acompanhamento nesta importante etapa da minha vida, principalmente Ana Barbosa com quem vivi tantos momentos inesquecíveis; Catalina e Ângela minhas amigas de toda a vida; e Rafaely de quem tanto aprendi e ri.

À Universidad del Valle, porque ser Univalluna não só me deixa orgulhosa; a formação obtida me permitiu enfrentar uma pós-graduação no estrangeiro.

À CAPES pela bolsa concedida, FAPESP e ao CNPQ pelo apoio financeiro concedido ao grupo de cromatografia, que contribuiu para o desenvolvimento de minha pesquisa.

À Universidade de São Paulo e ao Instituto de Química pela infraestrutura e auxílios concedidos.

E por fim, a todos que contribuíram para minha formação e não foram mencionados.

RESUMO

Devido à necessidade crescente de estudar analitos em matrizes complexas, o emprego de técnicas miniaturizadas para o preparo das amostras combinadas com técnicas analíticas altamente sensíveis é, cada vez, mais desafiador. Por isso, vem-se trabalhando no desenvolvimento e aprimoramento de materiais extratores inovadores com o objetivo de melhorar o desempenho e a eficiência nos processos de análise. Atualmente existe uma grande variedade de sorventes seletivos, como líquidos iônicos, grafeno e seus derivados, entre tantos outros, para a extração de resíduos e poluentes. Por isso, esta tese teve como objetivo a síntese e avaliação de diferentes sorventes a serem utilizados na microextração de sorvente empacotado (MEPS) e na obtenção de fibras SPME para realizar análises totalmente automatizadas com GC-MS/MS nos estudos de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e resíduos de pesticidas em diferentes amostras de café. Os sorventes que apresentaram maior seletividade e, portanto, melhores resultados durante o processo de extração para cada um dos compostos modelo, foram caracterizados por diversas técnicas como microscopia eletrônica de varredura e espectroscopia vibracional na região do infravermelho, entre outras. A síntese e funcionalização de líquidos iônicos com materiais como óxido de grafeno e sílica também são descritas. As metodologias desenvolvidas durante este trabalho de pesquisa foram otimizadas e validadas através da obtenção de figuras de mérito para, posteriormente, aplicá-las na análise de analitos modelo em diferentes amostras de café. Por fim, a técnica automatizada SPME-GC-MS/MS foi utilizada inicialmente com fibras comerciais como referencia para, posteriormente, comparar com fibras *lab-made* utilizando o sorvente que proporcionou os melhores resultados no processo *off-line*. Esta parte adicional do trabalho não pode ser concluída devido à atual pandemia e o impedimento da continuidade e conclusão desta parte do projeto de doutoramento. Entretanto, devido aos resultados preliminares obtido e descritos nesta tese, sugere-se a continuidade do estudo, em futuras investigações, por colegas do grupo de cromatografia.

ABSTRACT

Due to the growing need to study analytes in complex matrices, the use of miniaturized techniques for sample preparation combined with highly sensitive analytical techniques is increasingly challenging. Therefore, we have been working on the development and improvement of innovative extractor materials with the aim of improving the performance and efficiency in the analysis processes. Currently there is a great variety of selective sorbents such as ionic liquids, graphene and its derivatives among many others, to extract residues and pollutants. That is why this thesis aimed at the synthesis and evaluation of different sorbents to be used in packed sorbent microextraction (MEPS) and in obtaining SPME fibers to carry out fully automated analyzes with GC-MS/MS in the studies of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and pesticide residues in different coffee samples. The sorbents that presented higher selectivity and therefore better results during the extraction process for each of the model compounds were characterized by various techniques such as scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy in the infrared region, among others. The synthesis and functionalization of ionic liquids with materials such as graphene oxide and silica are also described. The methodologies developed during this research work were optimized and validated by obtaining figures of merit to later apply them in the analysis of model analytes in different coffee samples. Finally, the automated SPME-GC-MS/MS technique was used initially with commercial fibers, as a reference, to later obtain lab-made fibers using the sorbent that gave the best results in the *off-line* process. This part of the project could not be concluded due to the fact that the current pandemic prevented the its continuity and conclusion, having to continue in future research work by colleagues from the chromatography group.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Tempos de retenção de HPAs e íons de fragmento selecionados (m/z dos íons quantificadores estão destacados em negrito).	55
Tabela 2. Transições MRM e parâmetros instrumentais utilizados na avaliação das figuras de mérito.	55
Tabela 3. Íons monitorados após a separação cromatográfica dos HPAs.	75
Tabela 4. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para os HPAs.	80
Tabela 5. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada um dos HPAs obtidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.	81
Tabela 6. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.	81
Tabela 7. Resultados obtidos na validação para exatidão.	81
Tabela 8. Resultados obtidos na validação para recuperação.	83
Tabela 9. Concentração de HPAs $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de café coletadas.	84
Tabela 10. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para os pesticidas.	98
Tabela 11. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada pesticidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.	98
Tabela 12. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.	99
Tabela 13. Resultados obtidos na validação para exatidão.	100
Tabela 14. Resultados obtidos na validação para recuperação.	100
Tabela 15. Concentração de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de café coletadas em diferentes locais, incluindo diferentes países.	102
Tabela 16. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada pesticidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.	117
Tabela 17. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária. ..	117
Tabela 18. Resultados obtidos na validação para exatidão.	118
Tabela 19. Resultados obtidos na validação para recuperação.	119
Tabela 20. Concentração de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de café coletadas em diferentes locais, incluindo diferentes países.	120

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do processo de extração e pré-concentração dos analitos utilizando a técnica de microextração em sorvente empacotado (MEPS) (13)	26
Figura 2. Esquema da síntese de um líquido iônico suportado em partículas de sílica (51)...	29
Figura 3. Esquema da síntese do grafeno a partir do grafite (57)	31
Figura 4. Resultados do teste de seletividade para os HPAs com os materiais sintetizados...	56
Figura 5. Resultados do teste de seletividade para os pesticidas com os materiais sintetizados	56
Figura 6. Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos sorbentes para extração dos HPAs	58
Figura 7. Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos sorbentes para extração dos pesticidas	59
Figura 8. Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1000 vezes: ILz (a), SiO ₂ /ILz (b), [C ₄ mim]/SiO ₂ (c) e [C ₈ mim]/SiO ₂ (d) para os HPAs	60
Figura 9. Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 2000 vezes: a) GO e b) IL/Si@GO para os pesticidas	60
Figura 10. Espectros de DRX dos sorbentes para extração dos pesticidas	61
Figura 11. Curvas TGA dos materiais sorventes desenvolvidos para extração dos pesticidas.	62
Figura 12. Avaliação %Recuperação dos sorventes empregados na extração dos pesticidas modelo.....	63
Figura 13. Capacidade de adsorção estática do ILz e ILz/Si@GO para pesticidas	64
Figura 14. Estrutura química dos HPAs estudados nesta pesquisa no café	71
Figura 15. Monitoramento de cada analito estudado, modo SIM	75
Figura 16. Comparação entre três tipos de solventes de diferentes polaridades para a eluição dos HPAs do líquido iônico zwitteriônico	76
Figura 17. Comparação dos volumes do solvente de eluição.....	77
Figura 18. Análise do efeito de cada etapa do processo MEPS para cada analito estudado...	78
Figura 19. Cromatogramas do café isento dos analitos (branco) e o café fortificado com os HPAs em estudo na concentração de 2 µg L ⁻¹	79
Figura 20. Estrutura química dos pesticidas estudados na matriz de café	90

Figura 21. Otimização do número de ciclos em cada etapa do procedimento MEPS para pesticidas modelo	93
Figura 22. Monitoramento de cada analito estudado, modo SIM	94
Figura 23. Comparação entre três tipos de solventes de diferentes polaridades para a eluição dos pesticidas com IL/Si@GO como sorbente	95
Figura 24. Comparação entre os volumes do solvente de eluição	96
Figura 25. Cromatogramas MRM da amostra de café branca e a mesma fortificada com os pesticidas na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$	97
Figura 26. Análise feita com Fibras-SPME. (a) dispositivo inserido no frasco que contém a amostra e a fibra é exposta, (b) a fibra é retraída para remover o dispositivo após o tempo de amostragem ser concluído, (c) injeção da fibra carregada no injetor GC para dessorção térmica dos analitos e (d) remoção da fibra para a seguinte extração	108
Figura 27. Vial da amostra no forno para ser aquecido e agitado previamente à extração por SPME-GC-MS/MS automatizado	110
Figura 28. Resultados do teste de seletividade para os pesticidas com as fibras de SPME comerciais	111
Figura 29. Otimização do tempo de exposição da fibra no frasco contendo a amostra de café	114
Figura 30. Otimização do tempo de dessorção térmica	115
Figura 31. Cromatograma dos pesticidas empregados no desenvolvimento do método automatizado SPME, modo SIM	116

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

FDA - Eurachem, Food and Drug Administration

G - Grafeno

GO - Óxido de grafeno

HPAs - Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos

HS - Headspace

ICH - International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

IL - Líquidos iônicos

INMETRO - Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

LLE - Extração líquido-líquido

LOD - Limites de detecção

LOQ - Limites de quantificação

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MEPS - Microextração em sorvente empacotado

PA - Poliacrilato

PDMS - Polidimetilsiloxano

S/N – Sinal/Ruido

SPE - Extração em fase sólida

SPME - Microextração em fase sólida

SUMÁRIO

Introdução	1
CAPÍTULO 1.....	23
Revisão Bibliográfica	23
1.1 Técnicas miniaturizadas de preparo da amostra	24
1.2 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)	25
1.3. Microextração em fase sólida no modo Headspace (HS-SPME)	26
1.4 Fases extratoras	27
1.4.1 Líquidos iônicos (ILs)	28
1.4.2 Grafeno (G) e Óxido de Grafeno (GO)	29
1.4.3 Nanomateriais derivados do carbono (G e GO) funcionalizados com líquidos iônicos.....	32
1.5 Figuras de mérito para avaliar métodos analíticos.....	33
1.5.1 Seletividade	33
1.5.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)	34
1.5.3 Linearidade	34
1.5.4 Precisão.....	35
1.5.5 Exatidão	36
1.5.6 Recuperação.....	36
CAPÍTULO 2.....	45
Objetivos	45
2.1 Objetivo geral	46
2.2 Objetivos específicos	46
CAPÍTULO 3.....	47
Síntese dos materiais sorventes	47
3.1 Introdução	48
3.2 Objetivo	48
3.3 Parte experimental	49
3.3.1 Padrões analíticos e reagentes	49
3.3.2 Síntese do líquido iônico zwitteriônico (IL).....	49
3.3.3 Síntese do grafeno (G).....	50

3.3.4	Preparação do material Si@GO funcionalizado, método 1.....	50
3.3.5	Preparação do material Si@GO funcionalizado, método 2.....	51
3.3.6	Deposição do IL na superfície de grafeno (IL/Si@GO).....	51
3.3.7	Obtenção do IL/Sílica-GO.....	51
3.3.8	Redução GO funcionalizado.....	52
3.3.9	Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados.....	52
3.3.10	Avaliação do material mais seletivo.....	53
3.3.11	Caracterização do material mais seletivo.....	53
3.3.12	Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da seletividade e retenção dos HPAs e pesticidas.....	54
3.4	Resultados e discussão.....	55
3.4.1	Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados.....	55
3.4.2	Caracterização do material mais seletivo para MEPS.....	57
3.4.3	Avaliação do material mais seletivo.....	62
3.4.4	Análise da capacidade de adsorção.....	63
4.5	Conclusão do capítulo.....	65
CAPÍTULO 4.....		69
Líquidos iônicos (IIs) suportados em sílica como sorventes para extração por MEPS de HPAs selecionados em amostras de café torrado		69
4.1	Introdução.....	70
4.1.1	Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no café.....	70
4.2	Objetivo.....	72
4.3	Parte experimental.....	72
4.3.1	Padrões analíticos e reagentes.....	72
4.3.2	Preparo das soluções contendo os padrões analíticos.....	72
4.3.3	Instrumentação e condições cromatográficas para separação dos HPAs no sistema GC-MS.....	73
4.3.4	Avaliação multivariável das condições de extração empregando-se MEPS.....	73
4.3.5	Validação do método no sistema MEPS GC-MS.....	73
4.3.6	Amostras.....	74
4.4	Resultados e discussão.....	75
4.4.1	Sistema MEPS GC-MS/MS.....	75

4.4.2 Otimização da extração empregando-se MEPS.....	76
4.4.3 Validação do método de extração.....	79
4.4.4 Análise das amostras de café.....	82
4.5 Conclusão do capítulo.....	85
CAPÍTULO 5.....	88
ILz/Si@GO como sorvente para extração por MEPS de Pesticidas selecionados em amostras de café torrado	88
5.1 Introdução	89
5.2 Objetivo	91
5.3 Parte experimental	91
5.3.1 Padrões analíticos e reagentes	91
5.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos.....	91
5.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação dos pesticidas no sistema MEPS GC-MS/MS	92
5.3.4 Otimização do método de extração MEPS	92
5.3.5 Validação do método MEPS GC-MS/MS	92
5.3.6 Amostras.....	94
5.4 Resultados e discussão.....	94
5.4.1 Sistema MEPS GC-MS/MS	94
5.4.2 Otimização do sistema MEPS	95
5.4.3 Validação do método MEPS GC-MS/MS	96
5.4.4 Amostras.....	99
5.5 Conclusão do capítulo.....	103
CAPÍTULO 6.....	107
Desenvolvimento e aplicação do sistema <i>on-line</i> automatizado SPME para extração de Pesticidas em amostras de café torrado	107
6.1 Introdução	108
6.2 Objetivo	109
6.3 Parte experimental	109
6.3.1 Montagem do sistema SPME	109
6.4 Resultados e discussão.....	112

6.4.1 Otimização dos principais parâmetros para o desenvolvimento do método automatizado SPME	112
6.4.2 Validação do método SPME-GC-MS/MS.....	115
6.5 Conclusão.....	121
CAPÍTULO 7.....	126
Conclusão geral e perspectivas futuras	126
7.1 Conclusão geral.....	127
7.2 Perspectivas futuras	127

Introdução

Na maioria das análises químicas, principalmente nas análises de resíduos nos quais os analitos se encontram em baixas concentrações ($\mu\text{g kg}^{-1}$ até ng kg^{-1}), os analitos presentes em uma matriz complexa exibem propriedades químicas distintas, requerendo a realização de uma etapa prévia de preparo de amostra. Caso os interferentes não sejam eliminados, os resultados poderão ser falsos (1,2).

Diante disso, é necessário a escolha adequada de uma técnica de preparo de amostra a qual dependa da natureza da matriz, das características do analito, e da técnica analítica que será empregada na determinação dos mesmos. Este é um fator chave na obtenção de resultados confiáveis com elevada exatidão, precisão e sensibilidade (2). Portanto, a seleção da técnica e das condições experimentais devem ser conduzidas cuidadosamente.

Dentro dos parâmetros a serem analisados está o estado físico da matriz (sólido, líquido ou gasoso), o tamanho da amostra, o pH e matéria orgânica (gordura, pigmentos, proteínas, entre outros). No analito, devem-se analisar as suas propriedades físicas, suas propriedades químicas (massa molar, carga, polaridade, volatilidade, pK_a), além de propriedades que permitam a sua detecção (absorção UV-Vis, fluorescência, eletroatividade) e a determinação de sua concentração (3).

Nas últimas décadas, a determinação de resíduos e contaminantes em amostras alimentares tem se tornado uma tarefa muito difícil mas também muito importante. As amostras cada dia são mais complexas, sendo importante determinar tanto os compostos de interesse, como compostos de outras classes de analitos também presentes na matriz, uma vez que esses podem trazer benefícios ou prejuízos comerciais (4).

Um exemplo de amostra alimentar é o café em grão, um dos principais produtos exportados pelo Brasil (US\$ 3,2 bilhões), destacando-se como o maior produtor mundial segundo as informações do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC) (5). A Colômbia, é o terceiro produtor mundial (US\$2,57bilhões), de acordo com a classificação da *International Coffee Organization* (6,7).

Portanto, o café é uma matriz relevante para ser estudada, continuando na conquista de novos mercados. Sendo considerada como uma bebida social, torna-se necessário identificar os inconvenientes que possam prejudicar seu consumo, além de atualizar as demandas que, dia a dia, surgem nos mercados existentes. Entre eles inclui-se, por exemplo, o controle de resíduos e contaminantes orgânicos presentes, tais como os denominados hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ou poliarenos (8) e os pesticidas (9), detectados como prejudiciais para a saúde humana.

Como o café é uma matriz complexa, é importante realizar um adequado preparo da amostra objetivando eliminar interferentes que dificultam sua análise. Na prática, o ideal é trabalhar com um método de preparo de amostra simples, quando possível, não somente para reduzir o tempo de análise mas também porque um número grande de etapas aumenta a possibilidade de introdução de erros (4).

Uma das técnicas atuais de preparo de amostra é a denominada microextração em sorvente empacotado (MEPS) (10), considerada como a miniaturização da técnica clássica de extração em fase sólida (SPE) por diminuir o volume trabalhado para a eluição dos analitos, de mililitros a microlitros, possibilitando sua injeção direta e a possibilidade do acoplamento *on-line* (totalmente ou parcialmente automatizados) com os sistemas cromatográficos (11).

Existe uma variedade de fases sorventes seletivas, apresentando diferentes mecanismos de extração, materiais que geralmente tem partículas irregulares de aproximadamente 50 μm e porosidade 60 Å. Embora a diversidade de fases extratoras para MEPS ainda é inferior à variabilidade de fases para SPE (12), uma vantagem dos materiais sorventes na MEPS é que podem ser reutilizados de 50 até 100 vezes, segundo o cuidado do analista, enquanto que os cartuchos de SPE geralmente são utilizados uma única vez e descartados.

Além disso, as microtécnicas de extração empregam pequenas quantidades de material sorvente, tornando necessário o uso de fases específicas e altamente seletivas para obter-se resultados satisfatórios na extração da classe de compostos em estudo. Recentes estudos vêm focalizando no desenvolvimento de novos materiais sorventes para serem utilizados como fase extratora no preparo de amostras. Isto se deve ao fato das fases comerciais apresentarem relevantes limitações como baixa eficiência, seletividade e estabilidade de extração, além de elevado custo, tornando a seleção do material extrator uma etapa crucial da análise (13).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em trabalhar com líquidos iônicos (ILs) como materiais extratores (14,15), com o objetivo de combinar as propriedades dos ILs com as vantagens de suportes sólidos, tais como partículas de sílica, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, grafeno e seus derivados, entre outros (16,17).

Porém, muito trabalho ainda precisa ser realizado para continuar desenvolvendo materiais sorventes inovadores que melhorem os estudos realizados nos diferentes campos de pesquisa e ajudem a cuidar do meio ambiente, levando em consideração as tendências recentes da química verde que, junto com a química analítica moderna, visa desenvolver

processos totalmente miniaturizados e automatizados tais como o acoplamento das técnicas cromatográficas com a espectrometria de massas.

Para maior clareza e compreensão das estratégias e metodologias utilizadas, esta tese foi dividida em capítulos.

O Capítulo 1 aborda uma revisão bibliográfica da literatura com informação mais detalhada dos principais temas descritos na tese.

O Capítulo 2 descreve o objetivo geral, e os específicos, dessa pesquisa.

O Capítulo 3 aborda as reações de síntese e as caracterizações dos materiais sorventes estudados para serem utilizados como fase extratora em sistemas de extração miniaturizada.

O Capítulo 4 apresenta o desenvolvimento de um sistema *on-line* automatizado envolvendo microextração em fase sólida (SPME), o qual foi utilizado para extração de diferentes classes de analitos em café.

Os Capítulos 5 e 6 apresentam, respectivamente, a aplicação dos sistema MEPS GC-MS/MS na determinação de HPAs e pesticidas em amostras de café torrado.

O Capítulo 7 apresenta as conclusões gerais desta tese e algumas perspectivas futuras.

Referências bibliográficas

1. Rejczak T, Tuzimski T. A review of recent developments and trends in the QuEChERS sample preparation approach. *Open Chem.* 2015;13:980–1010.
2. Merkle S, Kleeberg K, Fritsche J. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review. *Chromatography.* 2015 Jun 30;2(3):293–381.
3. Hercegová A, Dömötörová M, Matisová E. Sample preparation methods in the analysis of pesticide residues in baby food with subsequent chromatographic determination. Vol. 1153, *Journal of Chromatography A.* Elsevier; 2007. p. 54–73.
4. Souza-Silva ÉA, Gionfriddo E, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. Vol. 71, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry.* Elsevier B.V.; 2015. p. 236–48.
5. Invest & Export Brasil [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <http://www.investexportbrasil.gov.br/>
6. International Coffee Organization - What's New [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <http://www.ico.org/>
7. OEC - Colombia (COL) Exportaciones, Importaciones, y Socios comerciales [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <https://oec.world/es/profile/country/col/>
8. Paris A, Ledauphin J, Poinot P, Gaillard JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. Vol. 234, *Environmental Pollution.* Elsevier Ltd; 2018. p. 96–106.
9. An J, Rahn KL, Anderson JL. Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents. *Talanta.* 2017 May 15;167:268–78.
10. Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). *TrAC Trends Anal Chem* [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2019 Sep 5];67:34–44. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615000230>
11. Yang L, Said R, Abdel-Rehim M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017 Feb 1;1043:33–43.

12. Morales-Cid G, Cárdenas S, Simonet BM, Valcárcel M. Fully Automatic Sample Treatment by Integration of Microextraction by Packed Sorbents into Commercial Capillary Electrophoresis–Mass Spectrometry Equipment: Application to the Determination of Fluoroquinolones in Urine. 2009;
13. Fumes BH, Silva MR, Andrade FN, Nazario CED, Lanças FM. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. Vol. 71, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2015. p. 9–25.
14. Nawala J, Dawidziuk B, Dziedzic D, Gordon D, Popiel S. Applications of ionic liquids in analytical chemistry with a particular emphasis on their use in solid-phase microextraction. Vol. 105, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 18–36.
15. Rykowska I, Ziembińska J, Nowak I. Modern approaches in dispersive liquid-liquid microextraction (DLLME) based on ionic liquids: A review. Vol. 259, Journal of Molecular Liquids. Elsevier B.V.; 2018. p. 319–39.
16. Yavir K, Marcinkowski Ł, Marcinkowska R, Namieśnik J, Kloskowski A. Analytical applications and physicochemical properties of ionic liquid-based hybrid materials: A review. Vol. 1054, Analytica Chimica Acta. Elsevier B.V.; 2019. p. 1–16.
17. da Silva MR, Mauro Lanças F. Evaluation of ionic liquids supported on silica as a sorbent for fully automated online solid-phase extraction with LC-MS determination of sulfonamides in bovine milk samples. J Sep Sci [Internet]. 2018 May 1 [cited 2020 May 26];41(10):2237–44. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201701148>

CAPÍTULO 1

Revisão Bibliográfica

Parte deste Capítulo foi motivo da seguinte publicação:

Current Trends in Fully Automated On-Line Analytical Techniques for Beverage Analysis.
Karen Mejía-Carmona, Marcela Jordan-Sinisterra and Fernando M. Lanças
Beverages 2019, 5, 13
doi: 10.3390/beverages5010013

1.1 Técnicas miniaturizadas de preparo da amostra

Devido ao crescente avanço tecnológico que a química analítica consegue atingir dia a dia, os desafios dos métodos analíticos modernos são maiores para obter-se os melhores resultados no monitoramento de resíduos e contaminantes em níveis de concentração muito baixos em matrizes complexas (1). Essas análises são compostas por várias etapas, começando pela chamada preparação da amostra, que é extremamente importante pois, apesar dos contínuos avanços na instrumentação química analítica (principalmente em LC e GC), esta etapa afeta diretamente os dados que serão obtidos no nível cromatográfico, ou seja, um método de extração adequado e eficaz leva a um desempenho analítico de maior sucesso (1–3).

Por isso existem as chamadas agências reguladoras, as quais são responsáveis em todo o mundo por estabelecer os padrões e parâmetros adequados que esses procedimentos devem atender para garantir a qualidade e a confiabilidade dos métodos analíticos, avaliando-os por meio da chamada validação de métodos (4).

Já que o preparo da amostra visa eliminar a maior quantidade possível de interferentes presentes na matriz, realizando uma limpeza (*clean-up*) e obtendo uma pré-concentração dos compostos alvo, este minimiza a complexidade da matriz antes de sua injeção no equipamento. Considera-se esta etapa como a principal fonte de erros, tornando-a geralmente a etapa mais lenta e de maior cuidado (3).

Entre as principais técnicas clássicas para o preparo de amostras estão a extração em fase sólida (SPE), a extração líquido-líquido (LLE) e a extração Soxhlet, desenvolvidas e aplicadas há várias décadas para processar amostras. As desvantagens dessas técnicas incluem (i) o alto consumo de solvente e, portanto, a grande geração de resíduos; (ii) a laboriosidade do processo; (iii) a exposição da amostra, podendo levar a fácil contaminação da mesma; e (iv) os erros analíticos que podem ser apresentados pelo analista (5).

A SPE surgiu com o objetivo de superar as limitações do LLE, principalmente para reduzir a quantidade de solvente orgânico utilizado nessa técnica não seletiva. A SPE é, portanto, considerada econômica em comparação com seus antecessores, por basear seus princípios teóricos na miniaturização da cromatografia líquida clássica; é também uma técnica de fácil automatização, e com uma seletividade muito boa (6).

Já no início da década de 1990, a SPE serviu de base teórica para o desenvolvimento da técnica miniaturizada conhecida como SPME (microextração em fase sólida), a qual permitiu superar-se as dificuldades presentes na SPE: (i) menor número de etapas de extração; (ii) diminuição da quantidade de solvente, de mL para μL e; (iii) cartuchos de extração reutilizáveis (7–9).

A SPME é considerada a precursora das técnicas miniaturizadas: microextração em fase sólida em tubo (in-tube SPME); extração sortiva em barra de agitação (SBSE); microextração em fase sólida magnética (MSPE); microextração em sorvente empacotado (MEPS) e; microextração líquido-líquido dispersiva (dSPE) (7,8).

Essas técnicas, consideradas amigáveis ao meio ambiente, utilizam materiais sorventes para realizar o preparo das amostras, alcançando o consumo mínimo de solventes orgânicos e uma grande pré-concentração dos analitos de estudo, destacando-se a técnica MEPS nesta pesquisa (6–9).

1.2 Microextração em sorvente empacotado (MEPS)

Em 2004, foi desenvolvida uma técnica de determinação de anestésicos em plasma sanguíneo humano conhecida como microextração em sorvente empacotado (MEPS) (10), que é considerada a miniaturização da técnica clássica de extração de SPE, uma vez que o material sorvente é embalado diretamente na seringa e não em uma coluna adicional como no SPE. Isto facilita a automatização, permitindo trabalhar com baixos volumes de amostra (ordem de μL), reduzindo assim tanto o volume dos reagentes (solventes) quanto da amostra (ideal para o estudo sangue, plasma, urina, entre outras matrizes de difícil obtenção) (11).

Outra característica a destacar é que na SPE o fluxo da solução é em uma direção (para baixo), enquanto no MEPS o fluxo é em ambas as direções (para cima e para baixo), o que torna importante otimizar o número de ciclos em cada uma das etapas (amostragem, lavagem e eluição) para obter os melhores resultados (11).

Além disso, o sorvente no MEPS pode ser usado até cerca de 100 vezes, dependendo da matriz (12), enquanto em SPE o cartucho pode ser usado apenas uma vez. Ainda, em MEPS cerca de 1-2 mg de material sorvente são embalados na seringa (100-250 μL) (11), fazendo com que na mesma etapa sejam realizadas a extração, pré-concentração e limpeza da amostra (Figura 1).

Uma vez que o sorvente se desgasta, ele é facilmente substituível na seringa MEPS, de modo que o dispositivo completo pode ser operado manualmente ou online, facilitando o uso da técnicas com fases reversas, fases normais, fases mistas ou troca iônica, e sendo usado em linha com GC, LC ou MS sem sofrer qualquer modificação no instrumento (11).

As principais aplicações da MEPS, até o presente, são voltadas para a determinação de fármacos em amostras biológicas (14); mais recentemente tem sido utilizada na análise de contaminantes em bebidas e alimentos (15,16), principalmente no modo "off-line", embora também existam algumas publicações no modo "on-line" (16).

Figura 1. Representação esquemática do processo de extração e pré-concentração dos analitos utilizando a técnica de microextração em sorvente empacotado (MEPS) (13).

1.3. Microextração em fase sólida no modo Headspace (HS-SPME)

Um dos grandes avanços alcançados na SPME é a chamada microextração em fase sólida *via* headspace (HS-SPME), uma tecnologia introduzida na última década do século XX (17), e que tem sido amplamente aplicada para a análise de uma grande variedade de amostras complexas, incluindo biológicas, industriais, clínicas, alimentares, medicinal, ambiental, entre outras (18).

Uma das vantagens de trabalhar com HS-SPME, além de ser simples de operar, é o quão ecológico e rápido o processo é, comparado às técnicas clássicas, pois no processo se faz

amostragem, extração, concentração e injeção da amostra automaticamente e ao mesmo tempo (17), permitindo que picos cromatográficos bem resolvidos sejam obtidos em uma redução considerável no tempo de análise (19).

Além do HS-SPME, é possível utilizar-se fibras comerciais de SPME para realizar a extração automatizada. SPME é uma técnica de extração sem solvente (17), na qual os analitos são sorvidos diretamente, a partir de uma fase aquosa ou gasosa, na fibra de sílica fundida revestida com uma fase polimérica específica (20). Nesta técnica é necessário otimizar-se o tempo de exposição da fibra, levando em consideração os coeficientes de distribuição ou as constantes de equilíbrio de adsorção dos compostos objetivo (21). Por fim, os analitos são dessorvidos termicamente da fibra no injetor quente do cromatógrafo a gás (tempo que também deve ser otimizado) (22).

A SPME vem ganhando muita popularidade nos últimos tempos, principalmente em análises ambientais (23,24), análises de sabor e fragrância (25–27), identificação de feromônios em insetos (28,29), análise de voláteis de plantas (30), entre muitas outras aplicações.

Algo a se destacar é que ao trabalhar com este tipo de sistema (HS-SPME), a fibra não entra em contato direto com a amostra, reduzindo ou eliminando os problemas de interferências e possível contaminação durante as análises estáticas (31) e dinâmicas (32) realizadas.

1.4 Fases extratoras

Um dos desafios atuais para melhorar a eficiência dos processos de extração durante a preparação da amostra é obter-se um material extrator adequado. Atualmente existe uma ampla gama de novos materiais, incluindo: (i) polímeros de impressão molecular (MIP); (ii) líquidos iônicos (IL); (iii) imunoabsorventes (IS); (iv) materiais à base de carbono (G/GO); (v) compostos à base de sol-gel; entre outros (6,8,13,33).

A síntese desses materiais abre novas alternativas que permitem combinar sorventes seletivos com técnicas de extração miniaturizadas adequadas, de acordo com a classe química dos analitos de interesse e a natureza da matriz, para obter-se os melhores resultados (6).

Em 2015, foi publicada uma revisão com os avanços mais recentes até o momento em meios de acesso restrito, principalmente compostos modificados à base de sílica, polímeros, carbono e solventes, em aplicações biológicas (34). Outra publicação a destacar é a

apresentada por Masini et al., na qual os monólitos híbridos se destacam como absorventes promissores no preparo automatizado de amostras (35).

Clark e colaboradores publicaram uma compilação sobre sorventes à base de líquido iônico que incluem ILs sólidos/poliméricos/magnéticos em técnicas de extração de fase sólida e líquida (36). Finalmente, Maciel e colaboradores apresentaram uma revisão sobre o papel dos nanomateriais à base de grafeno na preparação de amostras (37).

1.4.1 Líquidos iônicos (ILs)

O primeiro IL sintetizado e aplicado foi publicado em 1914 (38), ano em que também foi proposta e aceita uma definição para diferenciar esses materiais dos sais inorgânicos (39).

O caminho que estes materiais tiveram que percorrer foi longo, mas atualmente o estudo realizado sobre os seus aspectos fundamentais (40), bem como sobre as suas aplicações (41), é muito extenso, graças às interessantes, notáveis e versáteis propriedades físico-químicas: a sua baixa volatilidade que permite que sejam considerados solventes verdes, substituindo os solventes convencionais que tanto afetam o meio ambiente (42,43); à sua alta estabilidade térmica; às suas propriedades de solvatação; à sua miscibilidade ou imiscibilidade conforme necessário em certos solventes; e a sua condutividade elétrica (44).

Todas essas características podem ser modificadas de acordo com a necessidade do que vai ser aplicado, por isso são também conhecidas como sorventes design (45), o que permite que podem ser utilizados para desenvolver revestimentos, por exemplo de fibras de SPME, seletivos e específicos para uma determinada aplicação (46–48).

Assim, Merdivan et al., funcionalizaram um líquido iônico reticulado com benzil (VBHDIM-NTf₂) que apresenta forte capacidade de interação π - π , para ser utilizado como revestimento sorvente em SPME para detecção de hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) em amostras de água ambiental, empregando HS-SPME-GC, e obtendo excelentes resultados quando comparados com a fibra comercial de polidimetilsiloxano (49).

Nos últimos anos, tem aumentado o interesse em trabalhar com fases suportadas com líquidos iônicos, com o alvo de combinar as propriedades dos ILs com as vantagens do suporte sólido, tais como partículas de sílica, polímeros, nanotubos de carbono, nanopartículas magnéticas, grafeno e derivados, entre outros (50).

A sílica destaca-se como material suporte pelo fato dos ILs serem difíceis de imobilizar em materiais inertes, obtendo-se resultados satisfatórios ao trabalhar os ILs suportados na sílica como material sorvente em técnicas de preparo de amostras (Figura 2).

Figura 2. Esquema da síntese de um líquido iônico suportado em partículas de sílica (51).

Etapa 1

Etapa 2

Etapa 3

Vários métodos encontram-se descritos na literatura para a síntese dos ILs modificados com sílica, destacando-se os ILs zwitteriônicos que são utilizados como fase extratora no preparo de amostra por terem cargas positivas e negativas localizadas em um mesmo grupo funcional (50).

1.4.2 Grafeno (G) e Óxido de Grafeno (GO)

Em 2004, foi publicado um trabalho o qual tem sido considerado uma das principais conquistas na área de materiais sorventes, revelando a existência de monocamadas de folhas de grafeno, obtidas por esfoliação mecânica (52). Mas essa história começou muito tempo antes, quando Landau e Peierls afirmaram que cristais 2D termodinamicamente estáveis poderiam muito bem existir (37,53). Mas naquela época não foi possível demonstrar que o ponto de fusão não é diretamente proporcional à espessura de um material e que, portanto, um material de película fina não se decompõe em altas temperaturas (37). Isso levou o grafeno a liderar teoricamente uma nova classe de materiais que com a espessura de um átomo são muito estáveis, e, portanto, muito interessantes de serem aplicados (37).

O grafeno é um alótropo de carbono que se apresenta na forma similar à de um favo de mel, cujos átomos possuem hibridização sp^2 , e que pode dar lugar a outras formas alotrópicas como nanotubos de carbono, grafite e fulerenos (54). É considerado um material bastante promissor devido aos orbitais σ no plano 2D, que garantem sua rigidez, e por sua vez, pela presença de orbitais π não hibridizados articulados para fora, que quando sobrepostos dão lugar à formação do sistema de elétrons π deslocalizados, responsáveis por suas excelentes propriedades ópticas e elétricas (54).

Apesar das propriedades maravilhosas que apresenta, um dos principais obstáculos e, portanto, desafios que devem ser enfrentados ao trabalhar-se com o grafeno, são os métodos de síntese para obtê-lo. Os dois caminhos mais utilizados são: (i) *top-down*, em que as nanoestruturas são obtidas a partir de estruturas de dimensões maiores, e (ii) *bottom-up*, ou seja, de átomos ou moléculas muito pequenos até atingir para materiais grandes (37).

No processo *top-down*, parte-se da grafite e, por esfoliação mecânica ou química, ou por síntese química, as finas camadas de grafeno que se empilham em paralelo na grafite e se unem por forças de Van der Waals, são separadas, Figura 3. O processo de esfoliação mecânica com fita adesiva é geralmente utilizado por ser um dos métodos mais simples; entretanto trata-se de um método de difícil reprodutibilidade, altamente suscetível a contaminação e altamente dependente da habilidade humana (55).

É por isso que o interesse em buscar e propor rotas alternativas estáveis seduz os químicos, utilizando para a esfoliação campos elétricos, sonificação, técnicas de impressão por transferência (56); outros tipos de substratos; o método *bottom-up*, e assim melhorar gradualmente a qualidade, o tamanho e a homogeneidade do grafeno obtido (55).

A primeira aplicação do grafeno foi relatada em 2011 (58,59); desde então tem havido um interesse crescente em trabalhar com ele e seus derivados, devido à grande demanda por obtenção de materiais seletivos e de alto desempenho para extrair analitos de matrizes complexas sem os interferentes presentes nela. O grafeno e seus derivados vêm ganhando grande importância como material adsorvente nas técnicas de extração devido à sua estrutura plana, que facilita a interação nos dois lados com os analitos alvo, o que não acontece com seus alótropos (nanotubos de carbono, fulerenos), nos quais só a superfície externa está disponível, reduzindo assim a eficiência por impedimento estérico em relação às técnicas de preparo de amostras baseadas em sorção (37), como é o caso desta pesquisa.

Figura 3. Esquema da síntese do grafeno a partir do grafite (57).

Outra vantagem de trabalhar com esses materiais se deve aos elétrons π deslocalizados, ideais para o estudo de compostos que possuem anéis aromáticos em suas estruturas, como pesticidas, conservantes, e outros (57).

Dentre os derivados do grafeno, destaca-se o óxido de grafeno (GO), que pode ser considerado uma folha de grafeno funcionalizada nas duas faces com diversos grupos oxigenados como hidroxila, carboxila e epóxi, conferindo-lhe um caráter hidrofílico, que consequentemente diminui a força das interações entre as camadas, mas permitindo uma esfoliação mais fácil (37). Essas estruturas dependem diretamente do método de purificação realizado (60), o que atualmente faz com que sua estrutura geral permaneça muito ambígua (61).

O método clássico de obtenção do GO é o originalmente proposto por Hummers (62), o qual sofreu múltiplas modificações até o momento em decorrência de seu aprimoramento. O método propõe a oxidação do pó de grafite utilizando KMnO_4 e NaNO_3 em H_2SO_4 , reagentes que foram substituídos por oxidantes menos tóxicos e que permitiram obter um produto de

maior qualidade (56). O GO é geralmente utilizado como sorvente para extrair contaminantes que não possuem anéis aromáticos em sua estrutura (37), uma vez que os grupos oxigenados que possui favorecem as interações com os sítios polares ativos das moléculas de interesse (63).

Tendo em conta o exposto, deve-se notar que o fato do grafeno ser um material ultraleve dificulta muito a sua utilização em termos operacionais, sendo necessária a realização de uma modificação química ou a funcionalização do material para contornar estes inconvenientes. A funcionalização pode ser realizada por meio de vias não covalentes (quebra das forças de Van der Waals, seguida de ligação não-covalente com o substrato por meio de π - π , π -cátion ou interações de Van der Waals) e covalente (se produz um baixo grau de substituição devido à conjugação estável de carbono, mas os grupos oxigenados reativos de GO podem ser aproveitados para a funcionalização) (37,64).

1.4.3 Nanomateriais derivados do carbono (G e GO) funcionalizados com líquidos iônicos

Como descrito anteriormente, devido à baixa adsorção seletiva que G e GO apresentam, a funcionalização desses materiais costuma ser realizada, destacando-se aquelas onde são utilizados líquidos iônicos (IL), por serem materiais facilmente alteráveis por sua capacidade de modificar a parte catiônica ou aniônica conforme necessário (para aumentar ou diminuir sua hidrofobicidade, hidrofiliabilidade, polaridade, propriedades ácido-base) e, por sua vez, devido às variáveis características que apresentam em aspectos como miscibilidade, viscosidade e alta estabilidade térmica (33,65).

Portanto, as propriedades combinadas de derivados de IL (sílica-IL, polímero-IL, Fe_3O_4 -IL, entre outros) com sorventes à base de grafeno (grande área de superfície, estrutura muito porosa, um sistema rico de elétrons π deslocalizados) são amplamente utilizadas para obter-se sorventes que melhoram o processo de pré-tratamento da amostra por serem capazes de adsorver analitos de forma forte e seletiva (33,36,66).

A funcionalização desses materiais é possível devido ao efeito sinérgico de G/GO e ILs, uma vez que as propriedades de superfície de G/GO são facilmente alteradas com ILs ajustáveis (33). Por exemplo, ao modificar a superfície do G/GO com um cátion imidazólio com Cl ou BF_4 , um sorvente com alta hidrofiliabilidade é obtido, enquanto ao modificar a superfície do G/GO com um cátion do tipo hexafluorofosfato(PF_6), o sorvente vai ser hidrofóbico. Isso permite obter sorventes que atendem claramente aos objetivos do pré-tratamento da amostra (33).

Muitos artigos e revisões foram publicados sobre o assunto até o momento (67–70), mas na maioria deles esses sorventes funcionalizados (G/GO-IL) têm sido aplicados em catálise heterogênea, como sensores eletroquímicos, em aditivos lubrificantes e como compostos poliméricos. Sua aplicação para o pré-tratamento de amostras em técnicas como extração em fase sólida (SPE), extração magnética em fase sólida (MSPE) e microextração em fase sólida (MEPS) vem ganhando cada vez mais interesse (33).

1.5 Figuras de mérito para avaliar métodos analíticos

Os métodos de análises precisam ser avaliados com o objetivo de certificar a confiabilidade dos resultados obtidos e realizar a interpretação deles através da avaliação de alguns parâmetros (figuras de mérito). Dentro dos órgãos responsáveis para garantir o cumprimento das exigências de uma validação, no Brasil destaca-se a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (71), o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) (72) e o Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) (73). Internacionalmente os mais conhecidos e implementados são os guias *da International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) (74), a *Eurachem, Food and Drug Administration* (FDA) (75) e a *National Association of Testing Authorities* (NATA) (76).

Analizando cada um deles, encontra-se diferenças significativas nas regulamentações fornecidas pelas agências de controle nacionais e internacionais, pelo que a escolha sobre qual deles seguir deve ser realizada segundo os objetivos e interesses da pesquisa levada a cabo. Em geral, todos apresentam parâmetros básicos para a validação de todo tipo de métodos, sendo os principais: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação, parâmetros que foram avaliados nesta tese.

1.5.1 Seletividade

Um dos parâmetros importantes na avaliação de um método analítico é sua seletividade em relação aos analitos em estudo, uma vez que o sinal analítico dos analitos alvo pode ser afetado (aumento ou diminuição) devido à presença de outros analitos, o que nem sempre é possível demonstrar.

Por esse motivo, a matriz livre de analitos e a matriz fortificada com eles, ou com compostos estruturalmente semelhantes, costumam ser comparadas para confirmar a

seletividade do método, usando detectores altamente sensíveis e seletivos, como um espectrômetro de massas.

1.5.2 Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ)

Para determinar o limite de detecção (concentração mínima do analito que pode ser detectada) e o limite de quantificação (concentração mínima do analito que pode ser quantificada com precisão), várias abordagens podem ser levadas em consideração, as quais dependerão de o procedimento ser instrumental ou não.

Entre os métodos mais utilizados para procedimentos instrumentais estão:

- Com base em uma avaliação visual, na qual o LOD e o LOQ são determinados por meio da análise de amostras com concentrações conhecidas do analito, estabelecendo um limite mínimo de concentração em que é detectado com segurança e quantificado com exatidão e precisão.

- Com base na relação sinal / ruído (S/N), na qual o sinal obtidos do analito na amostra em baixas concentrações e o sinal da amostra em branco são comparados, estabelecendo assim a concentração mínima detectável de forma confiável (S/N 3:1) e quantificável de forma confiável (S/N 10:1).

1.5.3 Linearidade

A linearidade é um parâmetro que avalia a capacidade do método de obter resultados diretamente proporcionais às concentrações conhecidas do analito em toda a faixa determinada pelo guia de validação utilizado. Parte-se do valor do LOQ obtido para cada composto, utilizando-se métodos estatísticos apropriados, mesmo sendo necessário em alguns casos realizar transformações matemáticas prévias para obter resultados finalmente aceitos. Os guias de validação sugerem trabalhar com pelo menos 5-6 concentrações em ordem crescente, injetadas pelo menos em triplicata cada uma delas.

A curva analítica obedece à regressão linear conforme mostrado na Equação 1.1, onde y é uma variável dependente e corresponde ao sinal analítico gerado pelas diferentes concentrações, x é uma variável independente e se refere as concentrações das soluções padrão, a é o coeficiente angular da reta, e b o coeficiente linear da reta.

$$y = a + bx$$

Equação 1.1

1.5.4 Precisão

A precisão permite avaliar o quão representativos são os erros e as variações entre os resultados obtidos com o método trabalhado. Para isso, avalia-se a repetibilidade (concordância entre os resultados de várias medições realizadas nas mesmas condições e em intervalos de tempo muito curtos), a precisão intermediária (concordância entre os resultados de várias medições realizadas nas mesmas condições, mas em dias diferentes, equipamentos diferente ou de outros analistas) e a reprodutibilidade (avaliada somente quando houver participação de outros laboratórios) do método.

A repetibilidade e a precisão intermediária são obtidas através de 9 determinações que abrangem uma faixa específica para o procedimento (geralmente 3 concentrações / 3 repetições para cada uma), ou através de um mínimo de 6 determinações a 100% da concentração do ensaio.

Os resultados devem ser reportados por meio do desvio padrão (RSD), Equação 1.2, ou como o coeficiente de variação (CV), Equação 1.3.

$$S = \sqrt{\frac{\sum(Xi - \bar{X})^2}{n - 1}}$$

Equação 1.2

Sendo:

X o valor individual de cada medição;

$\bar{X}$ a média aritmética do número de medições;

n o número de medições.

$$RSD (\%) = \frac{(s)}{\bar{X}} \times 100$$

Equação 1.3

Sendo:

s o desvio padrão das amostras;

$\bar{X}$ a média das réplicas avaliadas.

1.5.5 Exatidão

Este parâmetro avalia o quão concordante é a resposta média obtida a partir de vários resultados experimentais utilizando o método trabalhado, em relação a um valor de referência aceito como verdadeiro, sendo expressa através da relação entre a concentração média experimental e a concentração teórica (Equação 1.4.)

$$Exatidão = \frac{C1}{C2} \times 100$$

Equação 1.4

Sendo:

C1 a concentração média experimental na amostra fortificada;

C2 a concentração teórica.

1.5.6 Recuperação

A recuperação permite avaliar a eficiência do método em extrair a maior quantidade do analito de interesse da matriz em estudo. O resultado é expresso na forma de porcentagem, obtida pela relação entre a concentração obtida do analito quando extraído pelo método avaliado e a concentração do analito injetado diretamente (sem passar pelo processo de extração), Equação 1.4.

$$Recuperação = \frac{Co}{Cd} \times 100$$

Equação 1.4

Sendo:

Co a concentração obtida pela extração *on-line* no sistema;

Cd a concentração direta sem extração pelo sistema.

Referências bibliográficas

1. Niu Z, Zhang W, Yu C, Zhang J, Wen Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. Vol. 102, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 123–46.
2. Lynch KB, Chen A, Liu S. Miniaturized high-performance liquid chromatography instrumentation. Talanta. 2018 Jan 15;177:94–103.
3. Xu L, Qi X, Li X, Bai Y, Liu H. Recent advances in applications of nanomaterials for sample preparation. Vol. 146, Talanta. Elsevier B.V.; 2016. p. 714–26.
4. Pérez-Rodríguez M, Pellerano RG, Pezza L, Pezza HR. An overview of the main foodstuff sample preparation technologies for tetracycline residue determination. Vol. 182, Talanta. Elsevier B.V.; 2018. p. 1–21.
5. Filippou O, Bitas D, Samanidou V. Green approaches in sample preparation of bioanalytical samples prior to chromatographic analysis. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2017 Feb 1;1043:44–62.
6. Maciel EVS, de Toffoli AL, Neto ES, Nazario CED, Lanças FM. New materials in sample preparation: Recent advances and future trends. Vol. 119, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2019. p. 115633.
7. Płotka-Wasyłka J, Szczepańska N, de la Guardia M, Namieśnik J. Miniaturized solid-phase extraction techniques. Vol. 73, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2015. p. 19–38.
8. Calderilla C, Maya F, Leal LO, Cerdà V. Recent advances in flow-based automated solid-phase extraction. Vol. 108, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 370–80.
9. Azzouz A, Kailasa SK, Lee SS, J. Rascón A, Ballesteros E, Zhang M, et al. Review of nanomaterials as sorbents in solid-phase extraction for environmental samples. Vol. 108, TrAC - Trends in Analytical Chemistry. Elsevier B.V.; 2018. p. 347–69.
10. Abdel-Rehim M. New trend in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe for liquid and gas chromatography applications I. Determination of local anaesthetics in human plasma samples using gas chromatography-mass spectrometry. J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci. 2004 Mar 5;801(2):317–21.
11. Moein MM, Abdel-Rehim A, Abdel-Rehim M. Microextraction by packed sorbent (MEPS). TrAC Trends Anal Chem [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2019 Sep 5];67:34–44.

Available

from:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0165993615000230>

12. Altun Z, Abdel-Rehim M, Blomberg LG. New trends in sample preparation: On-line microextraction in packed syringe (MEPS) for LC and GC applications: Part III: Determination and validation of local anaesthetics in human plasma samples using a cation-exchange sorbent, and MEPS-LC-MS-MS. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2004 Dec 25;813(1–2):129–35.
13. Yang L, Said R, Abdel-Rehim M. Sorbent, device, matrix and application in microextraction by packed sorbent (MEPS): A review. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2017 Feb 1;1043:33–43.
14. Vlčková H, Svoboda P, Novák O, Solich P, Nováková L. Development of MEPS-UHPLC-MS/MS multistatin methods for clinical analysis. *Bioanalysis [Internet].* 2016 Feb 1 [cited 2020 Aug 19];8(4):333–49. Available from: <https://www.future-science.com/doi/abs/10.4155/bio.15.245>
15. Casado N, Perestrelo R, Silva CL, Sierra I, Câmara JS. Comparison of high-throughput microextraction techniques, MEPS and μ -SPEed, for the determination of polyphenols in baby food by ultrahigh pressure liquid chromatography. *Food Chem.* 2019 Sep 15;292:14–23.
16. Pereira JAM, Gonçalves J, Porto-Figueira P, Figueira JA, Alves V, Perestrelo R, et al. Current trends on microextraction by packed sorbent-fundamentals, application fields, innovative improvements and future applications [Internet]. Vol. 144, *Analyst*. Royal Society of Chemistry; 2019 [cited 2020 Aug 19]. p. 5048–74. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2019/an/c8an02464b>
17. Xu Y, Zhou X, Zhang D, Lan Z, Zhang Y, Wan J. Headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) coupled with gas chromatography-mass spectrometric (GC-MS) analysis of volatile profiles during the stir-frying process of malt. *Anal Methods [Internet].* 2016 Feb 21 [cited 2020 Aug 19];8(7):1699–704. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c5ay03347k>
18. Xiao L, Lee J, Zhang G, Ebeler SE, Wickramasinghe N, Seiber J, et al. HS-SPME GC/MS characterization of volatiles in raw and dry-roasted almonds (*Prunus dulcis*). *Food Chem.* 2014 May 15;151:31–9.
19. Picard M, Garrouste C, Absalon C, Nonier MF, Vivas N, Vivas N. Development of a Solid-Phase Microextraction-Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for

- Quantifying Nitrogen-Heterocyclic Volatile Aroma Compounds: Application to Spirit and Wood Matrices. *J Agric Food Chem* [Internet]. 2019 Dec 11 [cited 2020 Aug 19];67(49):13694–705. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/acs.jafc.9b05716>
20. McDaniel A, Perry L, Liu Q, Shih WC, Yu J. Toward the identification of marijuana varieties by headspace chemical forensics. *Forensic Chem*. 2018 Dec 1;11:23–31.
21. Maruti A, Durán-Guerrero E, Barroso CG, Castro R. Optimization of a multiple headspace sorptive extraction method coupled to gas chromatography-mass spectrometry for the determination of volatile compounds in macroalgae. *J Chromatogr A*. 2018 May 25;1551:41–51.
22. Shen M, Liu Q, Jia H, Jiang Y, Nie S, Xie J, et al. Simultaneous determination of furan and 2-alkylfurans in heat-processed foods by automated static headspace gas chromatography-mass spectrometry. *LWT - Food Sci Technol*. 2016 Oct 1;72:44–54.
23. Lam R, Lennard C, Kingsland G, Johnstone P, Symons A, Wythes L, et al. Rapid on-site identification of hazardous organic compounds at fire scenes using person-portable gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)—part 2: water sampling and analysis. *Forensic Sci Res* [Internet]. 2020 Apr 2 [cited 2020 Aug 19];5(2):150–64. Available from: <https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/20961790.2019.1662648>
24. Naccarato A, Tagarelli A. Recent applications and newly developed strategies of solid-phase microextraction in contaminant analysis: Through the environment to humans [Internet]. Vol. 6, Separations. MDPI Multidisciplinary Digital Publishing Institute; 2019 [cited 2020 Aug 19]. p. 54. Available from: www.mdpi.com/journal/separations
25. Bueno M, Resconi VC, Campo MM, Ferreira V, Escudero A. Development of a robust HS-SPME-GC-MS method for the analysis of solid food samples. Analysis of volatile compounds in fresh raw beef of differing lipid oxidation degrees. *Food Chem*. 2019 May 30;281:49–56.
26. Bezerra TKA, Araújo ARR, Arcanjo NM de O, da Silva FLH, Queiroga R de CR do E, Madruga MS. Optimization of the HS-SPME-GC/MS technique for the analysis of volatile compounds in caprine Coalho cheese using response surface methodology. *Food Sci Technol* [Internet]. 2016 Jan 1 [cited 2020 Aug 19];36(1):103–10. Available from: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612016000100103&lng=en&nrm=iso&tlng=en
27. Rehman S u., Latief R, Bhat KA, Khuroo MA, Shawl AS, Chandra S. Comparative

- analysis of the aroma chemicals of *Melissa officinalis* using hydrodistillation and HS-SPME techniques. *Arab J Chem*. 2017 May 1;10:S2485–90.
28. Lievers R, Groot AT. Disposable Polydimethylsiloxane (PDMS)-Coated Fused Silica Optical Fibers for Sampling Pheromones of Moths. Lorenzo MG, editor. *PLoS One* [Internet]. 2016 Aug 17 [cited 2020 Aug 19];11(8):e0161138. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0161138>
 29. Levi-Zada A, Steiner S, Fefer D, Kaspi R. Identification of the Sex Pheromone of the Spherical Mealybug *Nipaecoccus viridis*. *J Chem Ecol* [Internet]. 2019 Jun 15 [cited 2020 Aug 19];45(5–6):455–63. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10886-019-01075-3>
 30. Zhu F, Chen G. Applications of In Vivo and In Vitro Solid-Phase Microextraction Techniques in Plant Analysis. In: *Solid Phase Microextraction* [Internet]. Springer Berlin Heidelberg; 2017 [cited 2020 Aug 19]. p. 247–85. Available from: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-53598-1_9
 31. Kremser A, Jochmann MA, Schmidt TC. Systematic comparison of static and dynamic headspace sampling techniques for gas chromatography. *Anal Bioanal Chem* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2020 Aug 19];408(24):6567–79. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00216-016-9843-y>
 32. Ngamchuachit P, Kitai Y, Keeratipibul S, Phuwapraisirisan P. Comparison of Dynamic Headspace Trapping on Tenax TA and Headspace Stir Bar Sorptive Extraction for Analysis of Grilled Chicken (Yakitori) Volatiles. *Appl Sci Eng Prog* [Internet]. 2020 Jul 21 [cited 2020 Aug 19];13(3):202–12. Available from: <https://ph02.tci-thaijo.org/index.php/ijast/article/view/241540>
 33. Jon CS, Meng LY, Li D. Recent review on carbon nanomaterials functionalized with ionic liquids in sample pretreatment application. Vol. 120, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 115641.
 34. de Faria HD, Abrão LC de C, Santos MG, Barbosa AF, Figueiredo EC. New advances in restricted access materials for sample preparation: A review. Vol. 959, *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2017. p. 43–65.
 35. Masini JC, Svec F. Porous monoliths for on-line sample preparation: A review. Vol. 964, *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2017. p. 24–44.
 36. Clark KD, Emaus MN, Varona M, Bowers AN, Anderson JL. Ionic liquids: solvents and sorbents in sample preparation. *J Sep Sci* [Internet]. 2018 Jan [cited 2020 Jan

- 15];41(1):209–35. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201700864>
37. Maciel EVS, Mejía-Carmona K, Jordan-Sinisterra M, da Silva LF, Vargas Medina DA, Lanças FM. The Current Role of Graphene-Based Nanomaterials in the Sample Preparation Arena. *Front Chem* [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2020 Aug 12];8:664. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00664/full>
38. WALDEN, P. Molecular weights and electrical conductivity of several fused salts. *Bull Acad Imper Sci (St Petersburg)* [Internet]. 1914 [cited 2020 Aug 17];1800. Available from: <https://ci.nii.ac.jp/naid/10025720020>
39. Hapiot P, Lagrost C. Electrochemical reactivity in room-temperature ionic liquids [Internet]. Vol. 108, *Chemical Reviews*. American Chemical Society ; 2008 [cited 2020 Aug 17]. p. 2238–64. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/cr0680686>
40. Yavir K, Marcinkowski Ł, Marcinkowska R, Namieśnik J, Kloskowski A. Analytical applications and physicochemical properties of ionic liquid-based hybrid materials: A review. Vol. 1054, *Analytica Chimica Acta*. Elsevier B.V.; 2019. p. 1–16.
41. Javed F, Ullah F, Zakaria MR, Akil HM. An approach to classification and hi-tech applications of room-temperature ionic liquids (RTILs): A review. Vol. 271, *Journal of Molecular Liquids*. Elsevier B.V.; 2018. p. 403–20.
42. Yoo CG, Pu Y, Ragauskas AJ. Ionic liquids: Promising green solvents for lignocellulosic biomass utilization. Vol. 5, *Current Opinion in Green and Sustainable Chemistry*. Elsevier B.V.; 2017. p. 5–11.
43. Costa CM, Rodrigues HM, Gören A, Machado A V., Silva MM, Lanceros-Méndez S. Preparation of Poly(vinylidene fluoride) Lithium-Ion Battery Separators and Their Compatibilization with Ionic Liquid - A Green Solvent Approach. *ChemistrySelect* [Internet]. 2017 Jul 3 [cited 2020 Aug 17];2(19):5394–402. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/slct.201701028>
44. Yu H, Ho TD, Anderson JL. Ionic liquid and polymeric ionic liquid coatings in solid-phase microextraction. Vol. 45, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2013. p. 219–32.
45. Goossens K, Lava K, Bielawski CW, Binnemans K. Ionic Liquid Crystals: Versatile Materials [Internet]. Vol. 116, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2016 [cited 2020 Aug 17]. p. 4643–807. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cr400334b>

46. Tian Y, Feng J, Wang X, Luo C, Sun M. Ionic liquid-functionalized silica aerogel as coating for solid-phase microextraction. *J Chromatogr A*. 2019 Jan 4;1583:48–54.
47. Patinha DJS, Silvestre AJD, Marrucho IM. Poly(ionic liquids) in solid phase microextraction: Recent advances and perspectives. Vol. 98, *Progress in Polymer Science*. Elsevier Ltd; 2019. p. 101148.
48. Konieczna K, Yavir K, Kermani M, Mielewczyk-Gryn A, Kloskowski A. The new silica-based coated SPME fiber as universal support for the confinement of ionic liquid as an extraction medium. *Sep Purif Technol*. 2020 Jul 1;252:117411.
49. Merdivan M, Pino V, Anderson JL. Environmental Technology Determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in waters using headspace solid-phase microextraction with a benzyl-functionalized crosslinked polymeric ionic liquid coating Determination of volatile polycyclic aromatic hydrocarbons in waters using headspace solid-phase microextraction with a benzyl-functionalized crosslinked polymeric ionic liquid coating. 2016 [cited 2020 Aug 17]; Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=tent20>
50. Fumes BH, Silva MR, Andrade FN, Nazario CED, Lanças FM. Recent advances and future trends in new materials for sample preparation. Vol. 71, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2015. p. 9–25.
51. Qiao L, Dou A, Shi X, Li H, Shan Y, Lu X, et al. Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A* [Internet]. 2013 Apr 19 [cited 2019 May 28];1286:137–45. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967313003737>
52. Novoselov KS. Electric Field Effect in Atomically Thin Carbon Films. *Science* (80-). 2004 Oct;306(5696):666–9.
53. --2d. Quelques propriétés typiques des corps solides.
54. Grajek H, Jonik J, Witkiewicz Z, Wawer T, Purchała M. Critical Reviews in Analytical Chemistry Applications of Graphene and Its Derivatives in Chemical Analysis Applications of Graphene and Its Derivatives in Chemical Analysis. *Crit Rev Anal Chem*. 2019;0(0):1–27.
55. Solís-Fernández P, Bissett M, Ago H. Synthesis, structure and applications of graphene-based 2D heterostructures [Internet]. Vol. 46, *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2020 Aug 16]. p. 4572–613. Available from:

- <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/cs/c7cs00160f>
56. Lim JY, Mubarak NM, Abdullah EC, Nizamuddin S, Khalid M, Inamuddin. Recent trends in the synthesis of graphene and graphene oxide based nanomaterials for removal of heavy metals — A review. Vol. 66, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. Korean Society of Industrial Engineering Chemistry; 2018. p. 29–44.
 57. Toffoli AL de, Lanças FM. The role of graphene-based sorbents in modern sample preparation techniques. *J Sep Sci*. 2018;41(1):288–302.
 58. Luo Y-BB, Cheng J-SS, Ma QA, Feng Y-QQ, Li J-HH. Graphene-polymer composite: extraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples by stir rod sorptive extraction. *Anal Methods*. 2011;3(1):92–8.
 59. Zhang H, Lee HK. Plunger-in-needle solid-phase microextraction with graphene-based sol–gel coating as sorbent for determination of polybrominated diphenyl ethers. *J Chromatogr A*. 2011 Jul;1218(28):4509–16.
 60. Singh RK, Kumar R, Singh DP. Graphene oxide: Strategies for synthesis, reduction and frontier applications [Internet]. Vol. 6, *RSC Advances*. Royal Society of Chemistry; 2016 [cited 2020 Aug 17]. p. 64993–5011. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ra/c6ra07626b>
 61. Sun L. Structure and synthesis of graphene oxide. Vol. 27, *Chinese Journal of Chemical Engineering*. Chemical Industry Press; 2019. p. 2251–60.
 62. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1958 Mar [cited 2019 Dec 10];80(6):1339–1339. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01539a017>
 63. Smith AT, LaChance AM, Zeng S, Liu B, Sun L. Synthesis, properties, and applications of graphene oxide/reduced graphene oxide and their nanocomposites. *Nano Mater Sci*. 2019;1(1):31–47.
 64. Bottari G, Ángeles Herranz M, Wibmer L, Volland M, Rodríguez-Pérez L, Guldi DM, et al. Chemical functionalization and characterization of graphene-based materials [Internet]. Vol. 46, *Chemical Society Reviews*. Royal Society of Chemistry; 2017 [cited 2020 Aug 17]. p. 4464–500. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2017/cs/c7cs00229g>
 65. Hayes R, Warr GG, Atkin R. Structure and Nanostructure in Ionic Liquids [Internet]. Vol. 115, *Chemical Reviews*. American Chemical Society; 2015 [cited 2020 Aug 17]. p. 6357–426. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

66. Gionfriddo E, Souza-Silva ÉA, Ho TD, Anderson JL, Pawliszyn J. Exploiting the tunable selectivity features of polymeric ionic liquid-based SPME sorbents in food analysis. *Talanta*. 2018 Oct 1;188:522–30.
67. Abo-Hamad A, Alsaadi MA, Hayyan M, Juneidi I, Hashim MA. Ionic Liquid-Carbon Nanomaterial Hybrids for Electrochemical Sensor Applications: A Review. Vol. 193, *Electrochimica Acta*. Elsevier Ltd; 2016. p. 321–43.
68. He Z, Alexandridis P. Nanoparticles in ionic liquids: Interactions and organization [Internet]. Vol. 17, *Physical Chemistry Chemical Physics*. Royal Society of Chemistry; 2015 [cited 2020 Aug 17]. p. 18238–61. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2015/cp/c5cp01620g>
69. He Z, Alexandridis P. Ionic liquid and nanoparticle hybrid systems: Emerging applications. Vol. 244, *Advances in Colloid and Interface Science*. Elsevier B.V.; 2017. p. 54–70.
70. Wang X, Hao J. Recent advances in ionic liquid-based electrochemical biosensors [Internet]. Vol. 61, *Science Bulletin*. Science in China Press; 2016 [cited 2020 Aug 17]. p. 1281–95. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11434-016-1151-6>
71. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.
72. Manual de Garantia da Qualidade Analítica [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 13]. Available from: www.agricultura.gov.br
73. Inmetro | Portal de Serviços do Inmetro [Internet]. [cited 2020 Aug 16]. Available from: <https://www4.inmetro.gov.br/>
74. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).
75. US FDA Agent services for foreign companies FDA US Agent representation. [Internet]. [cited 2020 Aug 16]. Available from: https://www.fda.gov/oc/our-service/us-fda-agent/?gclid=CjwKCAjwj975BRBUEiwA4whRB4bR3tE1C1pNmKVRlhokuGJjuawtu0NTSdqUGOCnw2FTkN2EE4umARoCLE0QAvD_BwE
76. National Association of Testing Authorities, Australia - Home [Internet]. [cited 2020 Aug 16]. Available from: <https://www.nata.com.au/>

CAPÍTULO 2

Objetivos

2.1 Objetivo geral

Esta tese teve como objetivo geral a síntese de diferentes materiais sorbentes para extrair resíduos e contaminantes em amostras de café, utilizando a microtécnica de extração MEPS seguida de GC-MS/MS.

2.2 Objetivos específicos

- Sintetizar novos materiais como líquidos iônicos ancorados em sílica, grafeno e óxido de grafeno;
- Avaliar a seletividade dos materiais sintetizados e caracterizar o mais seletivo para a aplicação nas amostras de café;
- Estabelecer as melhores condições cromatográficas de análise para as classes selecionadas de resíduos e contaminantes em café por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Otimizar as condições de análise da microtécnica MEPS acoplada à GC-MS/MS;
- Validar a metodologia desenvolvida utilizando como fase extratora a mais seletiva para os analitos de interesse;
- Aplicar o método desenvolvido e validado na análise de amostras de café.

CAPÍTULO 3

Síntese e caracterização dos materiais sorventes

Parte deste Capítulo foi motivo da seguinte publicação:

The Current Role of Graphene-Based Nanomaterials in the Sample Preparation Arena

Edvaldo Vasconcelos Soares Maciel, Karen Mejía-Carmona, Marcela Jordan-Sinisterra,

Luis Felipe da Silva, Deyber Arley Vargas Medina and Fernando Mauro Lanças

Frontiers in Chemistry 8 (2020) 1-24

DOI: 10.3389/fchem.2020.00664

3.1 Introdução

Quando for feita a análise de um composto de interesse em uma matriz complexa, um dos grandes desafios é a escolha do material sorvente, já que o sucesso da extração dependerá em grande parte da escolha adequada dessa fase (1).

Existem muitas fases comercialmente disponíveis, mas essas fases geralmente têm eficiência moderada/baixa, além de serem pouco seletivas e até pouco estáveis, dependendo do tipo de análise em que serão utilizadas.

É por esta razão que os sorventes produzidos recentemente em laboratórios são cada vez mais desejados, pois não só garantem melhor extração, melhor isolamento e pré-concentração, mas também as análises tornam-se mais sensíveis, conseguindo-se não apenas que o analito de interesse seja extraído, mas também que os interferentes presentes sejam eliminados, resultando em uma análise bem-sucedida.

É bastante trabalho a ser feito, mas o caminho é bastante promissor, inovando no desenvolvimento de sorventes eficientes, seletivos, de fácil obtenção e também amigáveis ao meio ambiente e ao ser humano que está realizando a síntese (1).

Por isso, foi aceito nesta tese o desafio da busca e obtenção de sorventes com características químicas e físicas bastante promissoras. Destaca-se, neste trabalho, os líquidos iônicos, o grafeno e seus derivados e com muito mais zelo, a funcionalização que pode ser realizada entre eles.

Neste capítulo se descreve a síntese de todos materiais citados acima e a posterior avaliação da seletividade e retenção dos mesmos, seguida da caracterização e utilização deles na análise de duas classes de compostos muito importantes e estudados nessa tese.

3.2 Objetivo

Neste capítulo se descreve a síntese dos materiais sorbentes empregados nesta pesquisa: líquidos iônicos (ILs), óxido de grafeno e IL ancorado em óxido de grafeno funcionalizado. Seguidamente avaliou-se o mais seletivo dentre desses materiais para analisar HPAs e pesticidas. O material mais seletivo para cada um dos analitos foi caracterizado e, finalmente, avaliada a sua capacidade de retenção para os compostos de interesse.

3.3 Parte experimental

3.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Padrões analíticos de acenaftileno, fluoranteno, 1-nitropireno, 5-nitroacenafteno, 2-nitrofluoreno e 3-nitrofluoranteno foram adquiridos da Supelco (Bellefonte, EE.UU) e acenafteno (99,0%) e benzo[α]pireno (96,0%) adquiridos da Sigma-Aldrich (EE.UU e China). Padrões analíticos de heptachlor (99,1%), aldrin (98,6%), dieldrin (98,7%), endrin (98,2%), endosulfan sulfato (98,0%), methoxychlor (98,9%) e diazinon (98,1%), foram adquiridos da Chem Service (Pensilvania, EEUU). Os solventes utilizados foram acetato de etila, acetonitrila, tolueno, diclorometano e metanol grau HPLC da Tedia (Fairfield, EUA); a água deionizada foi obtida em um sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA). Para a síntese dos líquidos iônicos ancorados em sílica, utilizou-se os reagentes 1-vinil imidazol da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), 1,4-butano-sultona e 3-mercaptopropil trimetoxissilano da Sigma-Aldrich (Irvine KA128NB, Reino Unido), 2,2'-azobis(2-metilpropionitrilo), AIBN, da Sigma-Aldrich (Saint-Quentin-Fallavier, França), 1-metil-3-butil Imidazolium Hexafluorofosfato e 1-metil-3-octil Imidazolium Hexafluorofosfato da Sigma-Aldrich (São Paulo, Brasil) e sílica gel 60 da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). Para a síntese do óxido de grafeno foi utilizado nitrato de sódio, permanganato de potássio, diciclohexilcarbodiimida (DCC), todos Sigma-Aldrich (Saint Louis, EUA) e N,N – dimetilformamina da Sigma-Aldrich (Steinheim, Alemanha), grafite em pó da Sigma-Aldrich (Switzerland, Suíça), ácido sulfúrico da Synth (São Paulo, Brasil), ácido clorídrico da Qhemis (Indaiatuba, Brasil), hidrato de hidrazina 64% da Acros Organics (New Jersey, EUA) e peróxido de hidrogênio da Synth (Diadema, Brasil).

3.3.2 Síntese do líquido iônico zwitteriônico (IL)

O líquido iônico zwitteriônico, a base de imidazolium ancorado em sílica utilizado neste trabalho, foi sintetizado em três etapas como originalmente proposto por Quiao e colaboradores (2). Na primeira etapa se mistura 1-vinil imidazol e 1,4-butano-sultona (1:1) a temperatura ambiente, até obter um sólido branco, o qual é filtrado e seguidamente lavado com acetato de etila para remover reagentes que não reagiram. O precipitado é seco a vácuo a 60 °C por 24 horas. Na segunda etapa, se faz a funcionalização da sílica que previamente foi seca ao vácuo a 100 °C, suspendendo-a em tolueno anidro. Posteriormente, adicionou-se à solução, gota a gota, 1 mL de 3-mercaptopropil trimetoxissilano enquanto agitava-se em uma

atmosfera de nitrogênio a temperatura ambiente. O sistema foi aquecido a 110 °C com refluxo por 24 horas. A suspensão de sílica foi lavada, centrifugando-a várias vezes com tolueno e metanol (5000 rpm). Considerando a solubilidade da sílica no metanol, após o processo de lavagem por centrifugação, a sílica foi filtrada, resultando em maiores recuperações quando comparadas às obtidas pelos processos de decantação. Foi seca a 60 °C com vácuo. Finalmente, a etapa três consistiu na mistura dos produtos obtidos na primeira e segunda etapa, a uma razão de massa de 1,3: 2, respectivamente, com o objetivo de obter um maior conteúdo da espécie zwitteriônica. A reação é realizada em acetonitrilo por 24 horas a 60 °C empregando 2,2' – azobis(2-metil-propionitrila) (0,045 g) como catalisador. Por fim, a mistura foi centrifugada por 5 minutos a 5000 rpm e purificada por lavagem sequencial com acetonitrila, água e metanol e seco a vácuo a aproximadamente 60 °C para ser utilizado.

As outras duas fases extratoras, [C₄mim]@SiO₂ e [C₈mim]@SiO₂, foram preparadas utilizando-se o mesmo procedimento, e iguais condições descritas anteriormente, com o objetivo de avaliar a seletividade de cada um deles para extrair os analitos estudados.

3.3.3 Síntese do grafeno (G)

A metodologia trabalhada foi baseada na proposta original de Hummers e colaboradores (3). Iniciou-se com o resfriamento de 50 mL de H₂SO₄ num banho gelo (1 hora). Seguidamente foi adicionado 1 g de pó de grafite e 1 g de NaNO₃ sob agitação por 2 horas para evitar aglomeração. Depois adicionou-se 6 g de KMnO₄ lentamente, sob agitação, por 1 hora a temperatura inferior de 10 °C, deixando-se finalmente a mistura a 40 °C durante a noite, obtendo-se uma mudança na cor. Posteriormente, adicionou-se lentamente 40 mL de água destilada com forte agitação e, seguidamente, adicionou-se 10 mL de H₂O₂ gota a gota sob agitação. O produto obtido apresentou cor marrom, o qual é deixado precipitar durante um dia. O precipitado é lavado várias vezes com uma solução aquosa de HCl 5% para eliminar impurezas e íons sulfato ainda presentes. O produto é lavado com água até obter um pH de 7. Finalmente o produto é dissolvido em água deionizada em ultrassom por 30 minutos para depois ser seco a temperatura ambiente.

3.3.4 Preparação do material Si@GO funcionalizado, método 1.

Foi realizada a síntese baseada na proposta de Qiao e colaboradores (2), mas substituindo, na etapa 2, a sílica pelo óxido de grafeno, GO, sintetizado previamente segundo proposto por Hummers (3). Suspende-se 1,3 g de GO em 25 mL de tolueno, deixando em

agitação por 5 minutos. Em seguida é adicionado 1 mL de (3-mercaptopropil)trimetoxissilano gota a gota, deixando passar N₂ por 15 minutos. Depois o sistema é colocado em refluxo por 24 horas a 110 °C. Posteriormente, o produto é centrifugado com tolueno e com metanol para finalmente ser seco ao vácuo a 60 °C.

3.3.5 Preparação do material Si@GO funcionalizado, método 2.

Foi realizada a silanização do óxido de grafeno segundo proposto por Hou e colaboradores (4) - esquema 3.1 – dispersando-se 50 mg de GO em 25 mL de álcool anidro por sonificação durante 30 minutos. Em seguida, foi adicionado (3-mercaptopropil)trimetoxissilano sendo o sistema purgado com N₂ a 50 °C. Deixou-se em refluxo por 4 horas, a dispersão foi filtrada e o precipitado lavado como álcool anidro. Por fim, o produto é secado em vácuo a 60 °C.

3.3.6 Deposição do IL na superfície de grafeno (IL/Si@GO)

Para obter-se o IL-Si@GO, se realizou-se a terceira etapa como proposto por Quiao e colaboradores (2), mantendo-se a relação 1,3 g de GO funcionalizado por 2 g de líquido iônico, 25 mL de acetonitrila e 23 mg de AIBN para catalisar a reação, deixando em agitação por 24 horas e 60 °C o sistema - esquema 3.2.

Esquema 3.1. Esquema da silanização do GO segundo proposto por Hou e colaboradores (4).

3.3.7 Obtenção do IL/Sílica-GO

Para obter IL/Sílica-GO, foi trabalhada a metodologia proposta por Liu e colaboradores (5); o GO previamente obtido (3), foi pesado e dissolvido em DMF durante uma hora, usando-se ultrassom. Seguidamente foi adicionado 1 g de IL/sílica previamente obtida (2) e 40 mg de DCC como agente de acoplamento, deixando por 30 horas em agitação a 50 °C. O produto foi lavado com metanol para eliminar o GO não ligado e, finalmente, liofilizado.

Esquema 3.2. Esquema da síntese do líquido iônico suportado em óxido de grafeno, IL-Si@GO.

3.3.8 Redução GO funcionalizado

O processo de redução trabalhado foi empregado para vários tipos de materiais ancorados ao óxido de grafeno. O material de interesse foi pesado e dissolvido em água e, em seguida, adicionou-se lentamente hidrato de hidrazina, 64%. A mistura foi agitada usando um banho de óleo a 95 °C por duas horas. O produto foi lavado com metanol (6).

3.3.9 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados

A avaliação da seletividade e do desempenho do material sorvente obtido foi realizada por comparação com outros materiais. Para estudar a seletividade, 5,0 mg de cada material foram pesados em duplicata em um tubo do tipo eppendorf de 2 mL. Em seguida, foi adicionado 1 mL de uma solução de pesticida a 1 mg L⁻¹ em água, agitando cada tubo eppendorf por 30 minutos a 1500 rpm em uma mesa agitadora (IKA®Brand and Model VXR

Basic Vibrax). Cada tubo eppendorf foi então centrifugado por 30 minutos a 14500 rpm em uma microcentrífuga (*Eppendorf*, modelo MiniSpin Plus). O sobrenadante foi removido, e 0,8 mL de diclorometano foram adicionados para realizar o processo de eluição. O eppendorf foi centrifugado novamente por 30 minutos a 14500 rpm, e o sobrenadante filtrado em um filtro de celulose regenerada de 0,22 μm para, finalmente, ser injetar no GC-MS/MS.

A seguir, avaliou-se o percentual de retenção dos materiais que apresentaram melhor seletividade, acondicionando-se cada sorvente (7 mg) em uma seringa de 1 mL, utilizando-se duas fritas de polipropileno, conforme sugerido na literatura (6,7). A avaliação do melhor sorvente entre os estudados foi realizada utilizando o sistema GC-MS/MS descrito em 2.4 e uma solução de diclorometano enriquecida com 1 mg L^{-1} do analito modelo. Nesta fase, foram usados 5 ciclos de 600 μL (extração/expulsão) na etapa de amostragem, 5 ciclos de 600 μL de água (extração/expulsão) para lavagem e, finalmente, 50 μL de diclorometano por 5 ciclos (extração/expulsão) para dessorção. Durante a etapa de lavagem/condicionamento, foram utilizados 5 ciclos de 600 μL (extração/expulsão) do solvente de dessorção, repetindo este procedimento duas vezes para evitar o arraste. Finalmente, a seringa foi lavada 4 vezes com 4 ciclos de 1 mL de acetonitrila e 2 ciclos de 1 mL de metanol.

3.3.10 Avaliação do material mais seletivo

Depois de obter os gráficos comparativos do teste de seletividade dos sorbentes, foi realizado um teste para avaliar qual material apresentava melhor porcentagem de recuperação (em três diferentes concentrações 50, 200 e 500 $\mu\text{g L}^{-1}$), obtendo-se os melhores resultados na menor concentração, para cada um dos analitos objetivo. Assim, foi possível escolher-se o melhor material para este estudo.

Ao observar que aumentando a concentração dos analitos, a capacidade de recuperação em geral dos materiais vai diminuindo, se escolheu os dois materiais mais representativos, o líquido iônico zwitteriônico, ILz, e o líquido iônico zwitteriônico ancorado ao óxido de grafeno funcionalizado, IL/Si@GO, para avaliar sua capacidade de absorção e seletividade empregando como guia o modelo proposto por Langmuir e Freundlich (8).

3.3.11 Caracterização do material mais seletivo

A composição química dos produtos obtidos foi investigada em detalhes usando espectroscopia de infravermelho IRAffinity-1 (FT-IR) de Shimadzu (Kyoto, Japão). As propriedades estruturais foram investigadas por microscopia eletrônica de varredura (SEM)

em um Zeiss-Leica / 440 (Mannheim, Alemanha), difração de raios-X (XRD) de Bruker, modelo D8 Advance, equipado com um detector LynxEye e fonte de Cu ($1,5406 \text{ \AA}$) e análise termogravimétrica (TGA) em um SDT-Q600 da TA Instruments (New Castle, DE, EUA).

3.3.12 Instrumentação e condições cromatográficas para avaliação da seletividade e retenção dos HPAs e pesticidas

O sistema GC-MS consistia em um cromatógrafo de gás 7890A (GC) da Agilent (Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas sequencial (tandem MS/MS) Quattro da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização de elétrons (EI), equipada com duas bombas rotativas externas, e uma bomba interna turbomolecular de fluxo dividido, um amostrador automático CombiPAL. Empregou-se um software Waters MassLynx V4.1 para gerenciar as condições do instrumento, aquisição de dados e processamento durante a avaliação dos materiais absorventes, a otimização das variáveis MEPS, as figuras de mérito e a aplicação em amostras reais. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 μm) da Agilent (Santa Clara, CA, EUA).

Para análise dos HPAs, a temperatura na fonte de íons foi de 300 °C. O programa de temperatura da coluna GC começou com uma temperatura inicial do forno de 130 °C, que foi mantida por 5 min, aquecida a 220 a 120 °C min^{-1} e mantida por 4 min, aquecida a 250 a 75 °C min^{-1} e mantida por 4 min e finalmente aquecida a 280 a 80 °C min^{-1} e mantida por 4 min. O tempo total de execução estabelecido foi de 18,52 min. A injeção sem divisão (1 μL) foi usada a 280 °C. Hélio foi usado como gás de arraste a 1 mL min^{-1} a uma pressão de 60 kPa. O espectrômetro de massas foi empregado no modo de monitoramento de íon único (SIM), após um atraso de solvente de 5 min. A quantificação foi realizada na faixa de m/z de 45 a 300, com uma velocidade de varredura de 500. Os íons selecionados para serem monitorados no modo de aquisição SIM e os tempos de retenção de cada analito são relatados na Tabela 1.

Para análise dos pesticidas, a aquisição dos dados foi trabalhado o modo MRM, monitorando duas transições previamente otimizadas (a primeira para quantificar e a segunda para identificar qualitativamente cada analito estudado). A Tabela 2 mostra as transições, energias de colisão e tempo de permanência para cada transição. As demais condições do equipamento foram otimizadas e configuradas da seguinte forma: as temperaturas na interface e na fonte iônica foram 250 e 300 °C, respectivamente. O programa de temperatura do GC iniciou com uma temperatura inicial do forno de 170 °C que foi mantida por 5 minutos,

aquecida a 250 a 60 °C min⁻¹, foi mantida por 8,0 minutos, o tempo total de execução foi de 14,33 min. A injeção sem divisão foi usada para injetar 2 µL a 300 °C. O hélio foi usado como gás de arraste a 1,50 mL min⁻¹. O espectrômetro de massa foi executado usando o modo de monitoramento de íon único (SIR), após um atraso de solvente de 5 min.

Tabela 1. Tempos de retenção de HPAs e íons de fragmento selecionados (m/z dos íons quantificadores estão destacados em negrito).

HPAs	t _R	m/z
Acenafteno	5.92 ± 0.1 min	152 , 151, 150
Acenaftileno	8.76 ± 0.1 min	152, 153 , 154
Fluoranteno	9.25 ± 0.1 min	152, 167, 199
2-nitrofluoreno	9.66 ± 0.1 min	200, 101, 202
5-nitroacenafteno	11.47 ± 0.1 min	181, 165, 211
1-nitropireno	13.20 ± 0.1 min	189, 217, 247
3-nitrofluotanteno	13.86 ± 0.1 min	190, 218, 248
Benzo[α]pirene	15.99 ± 0.1 min	126, 250, 252

Tabela 2. Transições MRM e parâmetros instrumentais utilizados na avaliação das figuras de mérito.

Composto	Ion Precursor (m/z)	Transição MRM (m/z)	Energia de colisão (V)	Dwell-time (s)
Diazinon	179	137	10	0.5
	304	179	10	
Heptaclor	272	237	20	0.5
	337	266	20	
Aldrin	293	186	40	0.5
		257	10	
Dieldrin	345	263	15	0.5
	277	241	10	
Endrin	263	191	40	0.5
	279	243	25	
Endosulfan	387	241	15	0.5
Sulfate	272	236	20	
Metoxicloro	227	141	35	0.5
		212	30	

3.4 Resultados e discussão

3.4.1 Avaliação da seletividade dos materiais sintetizados

As Figuras 4 e 5 apresentam a porcentagem de cada HPA e pesticida, respectivamente, retida em cada um dos materiais desenvolvidos.

Figura 4. Resultados do teste de seletividade para os HPAs com os materiais sintetizados.

Figura 5. Resultados do teste de seletividade para os pesticidas com os materiais sintetizados.

A partir dos gráficos obtidos, foi possível verificar que o líquido iônico zwitteriônico sintetizado gerou os melhores resultados para as duas classes de analitos estudadas, pois se evidencia em geral uma maior retenção deles durante o preparo da amostra. Este fato deve-se, provavelmente, à sua natureza dual, ou seja, possui baixa polaridade frente a compostos apolares, como os HPAs, mas um maior polaridade comparada a compostos com fortes grupos doadores de prótons (9), o que se deve às suas múltiplas interações (hidrofóbicas e

eletrostáticas para este estudo em particular) que permitem vários mecanismos de separação (9).

Além disso, outro aspecto importante a se ter em mente é que o líquido iônico zwitteriônico possui um grupo imidazol com um radical vinil que lhe permite formar uma ligação covalente com a superfície de sílica modificada, formando um "tiol-éter" em um processo de hidrotiolação (10–13). Ao mesmo tempo, os outros dois líquidos iônicos apenas se ligam à superfície da sílica por meio de interações eletrostáticas, diminuindo sua afinidade pelos HPAs (14).

Para os pesticidas, o grafeno funcionalizado apresentou uma seletividade bastante diferenciada com respeito às outras fases extratoras, o qual é muito importante de ressaltar pois uma desvantagem de trabalhar com grafeno tem sido atribuída a sua incapacidade de adsorver analitos seletivamente (15). Assim, o grafeno ao ser esfoliado e ser convertido a óxido de grafeno (GO), pode ser reduzido ou funcionalizado (16), para finalmente ser ligado quimicamente a outro material (15), como no caso desta tese, melhorando a sua seletividade o pode ser observado na Figura 5.

A fase comercial, sílica, apresentou pouca retenção para esta classe de analitos, assim como o polímero DVB-MMA. No geral, os pesticidas foram melhor extraídos com o ILz, Si@GO e ILz/Si@GO, os quais apresentaram melhor capacidade de recuperação e melhor capacidade de adsorção, como vai ser apresentado posteriormente.

3.4.2 Caracterização do material mais seletivo para MEPs

3.4.2.1 Espectrometria vibracional no infravermelho (FTIR)

No espectro infravermelho adquirido para os sorventes preparados pela ancoragem dos ILs sintetizados em sílica - SiO₂/ILz, [C₄mim]/SiO₂ e [C₈mim]/SiO₂ – Figura 6, é observado um pico em 3449 cm⁻¹ que pode ser atribuído ao alongamento de vibrações de água. O pico em aproximadamente 1097 cm⁻¹ é atribuído a uma vibração de alongamento de siloxano (Si-O), a partir da sílica. Um pico observado em 804 cm⁻¹, e um pico mais intenso em 500 cm⁻¹, são atribuídos às vibrações simétricas Si-O-Si e de flexão O-Si-O. Finalmente, as bandas observadas em 2939 cm⁻¹ e 2860 cm⁻¹, respectivamente, são atribuídas ao alongamento C-H alifático e aromático do anel imidazol, indicando que o grupo imidazólio foi ligado com sucesso à superfície de sílica (2).

Figura 6. Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos sorbentes para extração dos HPAs.

Para análise da composição química do material sorvente para extração dos pesticidas, os espectros de cada um dos materiais foram registrados para demonstrar a adesão do IL no GO funcionalizado (Figura 7). No espectro GO (a), observam-se as bandas características deste material (17), o pico largo em 3500 cm^{-1} corresponde à vibração de alongamento e flexão dos grupos OH; picos de adsorção centrados em 1064 cm^{-1} (CO), 1250 cm^{-1} (C-OH), 1625 cm^{-1} (C=C), 1727 cm^{-1} (C=O) e 2380 cm^{-1} (CO₂) confirmam a presença de grupos funcionais que contêm oxigênio no GO. Já no espectro de IL-Si/GO (b) a diminuição da banda OH e o aparecimento de uma ampla banda de absorção em $1250\text{-}1000\text{ cm}^{-1}$ correspondendo às interações Si-OC e Si-O-Si são observados, o que confirma a funcionalização da superfície GO. A banda em 1585 cm^{-1} é atribuída à vibração C=C do anel imidazol que, por sua vez, confirma a presença da camada IL. Existem também picos em 1453 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} , os quais estão relacionados às ligações elásticas C-N e C-C do cátion imidazólio, respectivamente. Por fim, os picos agudos em 880 cm^{-1} e 1050 cm^{-1} são atribuídos à vibração das ligações =C-H e C-N da camada IL na superfície do nanocompósito, confirmando o sucesso da obtenção do sorvente apresentado.

Figura 7. Espectros de absorção vibracional na região do infravermelho dos sorbentes para extração dos pesticidas.

3.4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A avaliação das morfologias das superfícies dos materiais sorventes, e o tamanho e forma das partículas características de cada um deles, foi feita com ajuda do MEV. Nas Figuras 8 e 9 são apresentadas as morfologias dos sorbentes sintetizados para análise de HPAs e pesticidas, respectivamente.

Na Figura 8 é possível observar que as partículas são irregulares e não possuem tamanhos uniformes; em sua maioria, são inferiores a 10 μm . Ao comparar as imagens dos líquidos iônicos ancorados na superfície da sílica (Figs 8b-8d), observa-se que as partículas resultantes possuem um padrão particular não observado na imagem do líquido iônico zwitteriônico antes de serem ancorados na sílica (Fig 8a). Esta observação sugere que a ancoragem dos ILs nas partículas de sílica foi alcançada.

No caso dos sorventes empregados para os pesticidas, trabalho-se com o mesmo líquido iônico zwitteriônico apresentado anteriormente, são apresentadas as morfologias do GO na Figura 9a (característica das lâminas do GO) e a Figura 9b na qual observam-se lâminas aglomeradas ou mais espessas, o que indica que a deposição de partículas ILz nas folhas do GO foi bem-sucedida.

Figura 8. Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 1000 vezes: ILz (a), SiO_2/ILz (b), $[\text{C}_4\text{mim}]/\text{SiO}_2$ (c) e $[\text{C}_8\text{mim}]/\text{SiO}_2$ (d) para os HPAs.

Figura 9. Imagens da microscopia eletrônica de varredura com ampliação de 2000 vezes: a) GO e b) $\text{IL}/\text{Si@GO}$ para os pesticidas.

3.4.2.3 Difração de Raios X (DRX)

Foi obtido o espectro DRX para GO, Si@GO e IL/Si@GO (Figura 10). O pico em torno de 10° (Fig. 10a) é característico do plano (001) do GO, o que confirma que a síntese de Hummers utilizada foi bem-sucedida (3). O amplo pico de difração, observado a $2\theta = 22^\circ$ (*) na Figura 10b, está relacionado à funcionalização do GO com silano, também observada no perfil de IL/Si@GO, Figura 10c. Ambos os espectros são muito semelhantes, devido à estrutura cristalina do GO ser afetada após a funcionalização, diminuindo o pico agudo (001), o que nos permite concluir que partículas de IL foram adicionadas, embora o IL não possa ser observado por apresentar uma estrutura amorfa (18).

Figura 10. Espectros de DRX dos sorbentes para extração dos pesticidas.

3.4.2.4. Análise Termogravimétrica (TGA)

Por fim, as curvas TGA (Figura 11) foram obtidas utilizando massas de amostra de aproximadamente 3,0 mg a uma taxa de aquecimento de $10^\circ\text{C min}^{-1}$, da temperatura ambiente a 800°C , sob uma atmosfera de nitrogênio fluído para 50 ml min^{-1} e 800°C a 1000°C sob atmosfera dinâmica de ar fluído a 50 mL min^{-1} . Devido à pirólise dos grupos funcionais contendo oxigênio, a primeira perda de peso aparece perto de 100°C , o que pode

ser atribuído à perda de água fisissorvida pelo óxido de grafeno; entre 165-250 °C ocorre outra perda de massa devido à degradação dos grupos funcionais que contêm oxigênio na superfície do GO de forma que a 300 °C cerca de 50% da massa do GO já foi perdida (18). É evidente que Si@GO e IL/Si@GO apresentam estabilidade térmica muito boa. Em temperaturas abaixo de 250 °C, a perda total de massa do sorvente é de apenas 15%, somente após 400 °C é observada uma perda de massa significativa, devido à decomposição térmica do líquido iônico imobilizado na superfície do GO.

Figura 11. Curvas TGA dos materiais sorventes desenvolvidos para extração dos pesticidas.

3.4.3 Avaliação do material mais seletivo

A Figura 12 mostra uma comparação do % de recuperação dos sorventes avaliados neste trabalho para extração de pesticidas, realizada em triplicata. Observa-se, em geral, melhores resultados para Si@GO (método 1), Si@GO (método 2) e IL zwitteriônico, em comparação aos materiais suportados em SiO₂, GO não modificado, e SiO₂. A alta afinidade para OCPs pode ser devido ao sistema conjugado altamente deslocalizado de interações π -elétrons e π - π (19) do grafeno funcionalizado. Além disso, ao silanizar o GO, o número de grupos -OH foi diminuído, diminuindo sua polaridade, tornando-o mais parecido com analitos quando comparado ao GO, que apresenta altos valores de log K_{ow} (20), justificando assim as porcentagens semelhantes nesse caso. Com relação ao IL zwitteriônico, ocorrem interações

hidrofóbicas e π - π com os OCPs (21,22), dando bons resultados de extração quando comparados com os outros IIs. Além disso, a presença do cátion imidazol pode causar interações eletrostáticas com o OCP (22).

Figura 12. Avaliação %Recuperação dos sorventes empregados na extração dos pesticidas modelo.

3.4.4 Análise da capacidade de adsorção

Por último, foi realizado o estudo da capacidade de adsorção dos sorbentes de maior interesse por apresentar a melhor seletividade e o maior percentual de recuperação, os quais foram o ILz e o ILz/Si@GO. Os resultados podem ser vistos na Figura 13, na qual observa-se que ambos os materiais tiveram um rápido aumento na adsorção antes de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ultrapassada essa concentração, o aumento da adsorção passou a ser lento, até atingir a saturação ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$) a partir da qual não se percebe mais aumento significativo na extração. Os resultados obtidos conferem ao ILz/Si@GO maior capacidade de adsorção, o que ocorre devido a deposição de IL nas folhas do GO, funcionalizando-o com aumento dos sítios de ligação entre o material e os analitos, graças à presença do grupo aromático no IL (23).

Figura 13. Capacidade de adsorção estática do ILz e ILz/Si@GO para pesticidas.

4.5 Conclusão do capítulo

Uma vez sintetizada cada fase extratora, estas foram avaliadas como sorventes para serem utilizadas em microtécnicas de extração como MEPs, visando o estudo de analitos de interesse como HPAs e pesticidas em matrizes complexas. Dentre os materiais sintetizados (líquido iônico (IL), grafeno (G), óxido de grafeno funcionalizado (Si@GO) e IL ancorado a Si@GO) foi possível determinar, através de testes de seletividade, porcentagem de recuperação e capacidade de adsorção, que o IL apresentou maior afinidade pelas duas classes de compostos. Esta capacidade foi melhorando ainda mais quando ancorado a Si@GO, e comparado com os outros materiais sorventes como fases comerciais como sílica, polímeros como DVB-MMA e líquidos iônicos comerciais.

O IL ancorado a Si@GO, junto com cada material que compõe a fase (IL, GO, Si@GO) foram caracterizados por espectrometria vibracional no infravermelho (FTIR), microscopia eletrônica de varredura (MEV), Difração de Raios X (DRX) e Análise Termogravimétrica (TGA) para, posteriormente, ser utilizado como fase extratora em sistemas off-line.

Referências bibliográficas

1. Maciel EVS, Mejía-Carmona K, Jordan-Sinisterra M, da Silva LF, Vargas Medina DA, Lanças FM. The Current Role of Graphene-Based Nanomaterials in the Sample Preparation Arena. *Front Chem* [Internet]. 2020 Aug 11 [cited 2020 Aug 12];8:664. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fchem.2020.00664/full>
2. Qiao L, Dou A, Shi X, Li H, Shan Y, Lu X, et al. Development and evaluation of new imidazolium-based zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography. *J Chromatogr A*. 2013 Apr 19;1286:137–45.
3. Hummers WS, Offeman RE. Preparation of Graphitic Oxide. *J Am Chem Soc* [Internet]. 1958 Mar [cited 2019 Dec 10];80(6):1339–1339. Available from: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01539a017>
4. Hou S, Su S, Kasner ML, Shah P, Patel K, Madarang CJ. Formation of highly stable dispersions of silane-functionalized reduced graphene oxide. *Chem Phys Lett* [Internet]. 2010 Dec 6 [cited 2019 Sep 3];501(1–3):68–74. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009261410014326>
5. Liu Q, Shi J, Sun J, Wang T, Zeng L, Jiang G. Graphene and Graphene Oxide Sheets Supported on Silica as Versatile and High-Performance Adsorbents for Solid-Phase Extraction. *Angew Chemie Int Ed* [Internet]. 2011 Jun 20 [cited 2019 Dec 10];50(26):5913–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/anie.201007138>
6. Fumes BH, Lanças FM. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. *J Chromatogr A* [Internet]. 2017 Mar 3 [cited 2019 Sep 3];1487:64–71. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021967317301486>
7. Meng J, Wang X. Microextraction by packed molecularly imprinted polymer combined ultra-high-performance liquid chromatography for the determination of levofloxacin in human plasma. *J Chem*. 2019;2019.
8. Du W, Zhang B, Guo P, Chen G, Chang C, Fu Q. Facile preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for the selective extraction and determination of dexamethasone in skincare cosmetics using HPLC. *J Sep Sci* [Internet]. 2018 Jun 1 [cited 2019 Sep 4];41(11):2441–52. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.201701195>
9. Vidal L, Riekkola ML, Canals A. Ionic liquid-modified materials for solid-phase

- extraction and separation: A review. Vol. 715, *Analytica Chimica Acta*. 2012. p. 19–41.
10. Bai J, Li H, Shi Z, Yin J. An Eco-Friendly Scheme for the Cross-Linked Polybutadiene Elastomer via Thiol-Ene and Diels-Alder Click Chemistry. *Macromolecules*. 2015 Jun 9;48(11):3539–46.
 11. Sanchez Zayas M, Gaitor JC, Nestor ST, Minkowicz S, Sheng Y, Mirjafari A. Bifunctional hydrophobic ionic liquids: Facile synthesis by thiol-ene “click” chemistry. *Green Chem*. 2016 Apr 21;18(8):2443–52.
 12. Zhang P, Yang H, Chen T, Qin Y, Ye F. Facile one-pot preparation of a novel imidazolium-based monolith by thiol-ene click chemistry for capillary liquid chromatography. *Electrophoresis* [Internet]. 2017 Nov [cited 2020 Jan 27];38(22–23):3013–9. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/elps.201600288>
 13. Mirjafari A, O’Brien RA, West KN, Davis JH. Synthesis of New Lipid-Inspired Ionic Liquids by Thiol-ene Chemistry: Profound Solvent Effect on Reaction Pathway. *Chem - A Eur J* [Internet]. 2014 Jun 16 [cited 2020 Jan 27];20(25):7576–80. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/chem.201402863>
 14. dos Santos RR, Vidotti Leal LD, de Lourdes Cardeal Z, Menezes HC. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons and their nitrated and oxygenated derivatives in coffee brews using an efficient cold fiber-solid phase microextraction and gas chromatography mass spectrometry method. *J Chromatogr A*. 2019 Jan 11;1584:64–71.
 15. Jon CS, Meng LY, Li D. Recent review on carbon nanomaterials functionalized with ionic liquids in sample pretreatment application. Vol. 120, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 115641.
 16. Poh HL, Šaněk F, Ambrosi A, Zhao G, Sofer Z, Pumera M. Graphenes prepared by Staudenmaier, Hofmann and Hummers methods with consequent thermal exfoliation exhibit very different electrochemical properties. *Nanoscale*. 2012 Jun 7;4(11):3515–22.
 17. Kohantorabi M, Gholami MR. AgPt nanoparticles supported on magnetic graphene oxide nanosheets for catalytic reduction of 4-nitrophenol: Studies of kinetics and mechanism. *Appl Organomet Chem* [Internet]. 2017 Nov 1 [cited 2020 Mar 10];31(11):e3806. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/aoc.3806>
 18. Patel N, Katheriya D, Dadhanian H, Dadhanian A. Graphene oxide supported dicationic ionic liquid: an efficient catalyst for the synthesis of 1-carbamatoalkyl-2-naphthols.

- Res Chem Intermed. 2019 Nov 1;45(11):5595–607.
19. Ke Y, Zhu F, Zeng F, Luan T, Su C, Ouyang G. Preparation of graphene-coated solid-phase microextraction fiber and its application on organochlorine pesticides determination. *J Chromatogr A*. 2013 Jul 26;1300:187–92.
 20. Kucklick JR, Harvey HR, Baker JE, Ostrom PH, Ostrom NE. Organochlorine dynamics in the pelagic food web of lake baikal. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 1996 Aug 1 [cited 2020 Mar 17];15(8):1388–400. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/etc.5620150819>
 21. Gao Z, Li W, Liu B, Liang F, He H, Yang S, et al. Nano-structured polyaniline-ionic liquid composite film coated steel wire for headspace solid-phase microextraction of organochlorine pesticides in water. *J Chromatogr A* [Internet]. 2011 Sep 16 [cited 2020 Mar 17];1218(37):6285–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21821255>
 22. Gao X, Pan M, Fang G, Jing W, He S, Wang S. An ionic liquid modified dummy molecularly imprinted polymer as a solid-phase extraction material for the simultaneous determination of nine organochlorine pesticides in environmental and food samples. *Anal Methods*. 2013 Nov 7;5(21):6128–34.
 23. Bari R, Tamas G, Irin F, Aquino AJA, Green MJ, Quitevis EL. Direct exfoliation of graphene in ionic liquids with aromatic groups. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp*. 2014 Dec 5;463:63–9.

CAPÍTULO 4

Líquidos iônicos (Ils) suportados em sílica como sorventes para extração por MEPS de HPAs selecionados em amostras de café torrado

Parte deste Capítulo foi motivo da seguinte publicação:

Ionic liquids (Ils) supported on silica as sorbents for microextraction by packed sorbent of selected PAHs in roasted coffee samples

Marcela Jordan-Sinisterra and Fernando Mauro Lanças

Talanta, outubro (2020) – submitted.

4.1 Introdução

Este capítulo descreve aplicações da microtécnica com sorbente empacotado (MEPS) para determinação de hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (HPAs) em amostras de café. Como sorvente, empregou-se um líquido iônico zwitteriônico ancorado em sílica, desenvolvido neste trabalho.

4.1.1 Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) no café

Os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) vêm sendo estudados desde 1931 (1) com o isolamento do benzo(α)pireno do carvão. No ano 1952 o BaP foi identificado no meio ambiente (2), mas só após 1970 os HPAs em geral foram considerados prejudiciais à saúde (3).

Os HPAs são compostos constituídos por carbono e hidrogênio, formados por dois ou mais anéis aromáticos condensados, cada um com cinco ou seis átomos de carbono com duplas ligações conjugadas (4), apresentando caráter lipofílico.

Na prática, todos os compostos que contem carbono e hidrogênio podem atuar como precursores de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs) em altas temperaturas (500–700 °C). Este grupo de compostos onipresentes é conhecido por sua toxicidade (5), que tem sido bastante controlada, já que sua fácil formação foi demonstrada durante o processamento de alimentos, como na torrefação do café (6). Fragmentos instáveis obtidos durante a pirólise, geralmente na forma de radicais, se recombinaem para dar HPAs relativamente estáveis (pirossíntese) (7). Estudos demonstraram que vários HPAs são genotóxicos e mutagênicos. Em contraste, outros HPAs, não definidos como cancerígenos, podem atuar como sinergistas, categorizando-os como prioritários. Nessa classe estão incluídos naftaleno, acenafteno, acenaftileno, fluoreno, benzo[α]pireno, fluoranteno (Figura 14), entre outros (7). Dentre os principais HPAs avaliados nos alimentos e reconhecidos por organizações internacionais como World Health Organization (WHO) e Food and Agriculture Organization (FAO), como potencialmente carcinogênicos, estão o benzo(α)pireno [BaP], e o benzo(b)fluoranteno [BbF] (8). Por esta razão, pesquisadores têm se esforçado para melhorar os métodos analíticos para determinar esses compostos em matrizes tão complexas como bebidas e alimentos (7).

Figura 14. Estrutura química dos HPAs estudados nesta pesquisa no café.

Dentro dessas matrizes complexas, destaca-se o café pois é uns dos principais produtos exportados pelo Brasil nos últimos anos (US\$ 3,2 bilhões), o qual se destaca como o maior produtor mundial segundo as informações do Ministério da Indústria, Comércio Exterior e Serviços (MDIC)(9), sendo a Colômbia, o terceiro produtor mundial, (US\$2,57 bilhões), de acordo com a classificação da International Coffee Organization (10,11).

Portanto, o café é uma matriz importante para ser estudada, considerada como uma bebida social, o que torna necessário identificar-se os inconvenientes que possam prejudicar seu consumo, além de atualizar as demandas que, dia a dia, surgem nos mercados existentes. Entre eles inclui-se, por exemplo, o controle de resíduos e contaminantes orgânicos presentes tais como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) ou poliaenos (12), detectados como prejudiciais para a saúde humana.

Atualmente, os níveis reportados de HPAs em café são considerados baixos (13) em relação aos grupos de alimentos tidos como prioritários para monitoramento destes contaminantes, como óleos, alimentos defumados e de origem marinha. Relatórios publicados pela European Food Standard Agency (EFSA) (13) destacam o café em relação à contaminação de alimentos por HPAs, para a qual não existem limites máximos regulamentados, tendo sido encontrados níveis acima de $10 \mu\text{g kg}^{-1}$ para o benzo(α)pireno, indicando a necessidade de maiores investigações sobre o assunto.

Especificamente para a matriz café torrado, não há muitos registros na literatura de métodos empregando espectrometria de massas para análise de outros HPAs, além do

benzo(α)pireno, o que é muito questionado pois, por ser o mais tóxico da classe, geralmente é usado como indicador da presença destes compostos em alimentos (13), mas os outros também precisam ser monitorados e controlados.

Dados analíticos não confiáveis podem conduzir a decisões desastrosas e a prejuízos para a saúde pública, e financeiros, irreparáveis (14). Assim, um monitoramento efetivo da contaminação do café produzido tanto no Brasil como na Colômbia por HPAs, precisa de uma metodologia devidamente validada.

4.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi utilizar o líquido iônico ancorado em sílica que apresentou a melhor seletividade dentre os sorbentes sintetizados, para extrair HPAs utilizando a microtécnica de extração em sorvente empacotado (MEPS). Além disso, desenvolver, otimizar e validar as condições de análise do sistema MEPS para extrair HPAs em amostras de café, empregando GC-MS.

4.3 Parte experimental

4.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Utilizaram-se padrões de HPAs da Supelco, (Bellefonte, USA), (acenaftileno, acenafteno, 5-nitroacenafteno, fluoranteno, 2-nitrofluoreno, 3-nitrofluoranteno, 1-nitropireno e benzo(α)pireno). A Figura 14 mostra a estrutura desses compostos. Os solventes acetato de etila, tolueno, metanol, acetonitrila e diclorometano foram adquiridos da Tedia (Fairfield, USA) e água deionizada preparada em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA).

4.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos

Uma solução estoque padrão de HPAs foi preparada com diclorometano na concentração de 100,0 mg L⁻¹ e armazenada a -7 °C. Essa solução foi usada para fortificação (“*spiking*”) do estrato do café. Finalmente, esta solução foi usada para a otimização e validação do método por diluição para a concentração adequada.

A extração, limpeza e enriquecimento das amostras foram feitas pela técnica de microextração em seringa empacotada (MEPS), conforme descrito originalmente por Abdel-Rehim e colaboradores (15); os extratos foram avaliados usando um método GC-MS, previamente desenvolvido e otimizado.

4.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação dos HPAs no sistema GC-MS

Para otimização dos parâmetros do sistema MEPS, e validação do método, utilizou-se um sistema GC-MS consistindo de um cromatógrafo de gás 7890A (GC) da Agilent (Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa Quattro da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização de elétrons (EI), Amostrador automático CombiPal e um software Waters massLynx V4.1 para gerenciar as condições dos instrumentos, aquisição e processamento de dados. A temperatura na fonte de íons foi de 300 °C. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) da Agilent (EUA). As condições utilizadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas foram as mesmas descritas na Tabela 1.

4.3.4 Avaliação multivariável das condições de extração empregando-se MEPS

O melhor material sorvente foi imobilizado na seringa por meio de duas fritas de polipropileno, conforme sugerido na literatura (16,17). A avaliação do melhor sorvente entre os estudados foi realizada utilizando o sistema GC-MS descrito e água Milli-Q enriquecida com 500 µg L⁻¹ da solução padrão de HPAs.

Após a escolha do melhor material sorvente, avaliamos a influência do solvente de dessorção, o volume do solvente de dessorção e o número de ciclos de cada uma das etapas de extração. Os solventes de dessorção avaliados foram metanol, acetonitrila e diclorometano. Três volumes diferentes foram avaliados para cada solvente: 50, 100 e 500 µL. A influência do número de ciclos em cada uma das etapas de extração foi avaliada individual e coletivamente, utilizando 5, 10, 15 e 20 ciclos.

A seringa empacotada foi condicionada primeiro com diclorometano (1 mL) antes de ser usada pela primeira vez. Durante a etapa de amostragem foram utilizados 5 ciclos de 1 mL (extração/ejeção), seguidos de uma etapa de lavagem, 5 ciclos de 1 mL com água destilada (extração/ejeção). Durante a etapa de eluição, foram utilizados 5 ciclos de 50 µL (extração/ejeção) do solvente de dessorção. Por fim, a seringa foi lavada quatro vezes, com 1 mL de acetonitrila e duas vezes com 1 mL de metanol.

4.3.5 Validação do método no sistema MEPS GC-MS

As figuras de mérito foram obtidas de acordo com as diretrizes da guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonization ICH* (18). Foram avaliados os parâmetros de

seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), linearidade, exatidão, precisão (intra e inter-dia) e recuperação.

A matriz empregada foi o café. O café foi previamente analisado para os analitos alvo e, portanto, considerado uma amostra em branco. A seletividade foi avaliada pela comparação de uma amostra em branco e uma amostra fortificada de $2,0 \mu\text{g L}^{-1}$, ambas previamente submetidas a um procedimento de extração por MEPS, para verificar possíveis interferências presentes nos tempos de retenção dos analitos de interesse.

Os limites de detecção (LOD) e de quantificação (LOQ) foram definidos como a concentração de analitos que produz um sinal 3 e 10 vezes maior que a relação sinal/ruído respectivamente, sendo adicionadas previamente concentrações conhecidas dos analitos na amostra de café até obter a menor concentração para cada analito devidamente detectada e quantificada.

A linearidade foi verificada através da análise da amostra de café fortificado (amostra em branco) antes de passar pelo processo de extração MEPS, seguido pela análise de GC-MS. A fortificação foi realizada em cinco níveis de concentração e repetida em triplicata, levando em consideração o valor LOQ de cada composto de interesse como primeiro ponto da curva de calibração. As curvas de calibração para cada composto foram obtidas por padronização externa.

A exatidão e a precisão do procedimento analítico foram avaliadas adicionando amostras em branco em três níveis de concentração diferentes, em triplicata. Esse procedimento foi repetido em dois dias diferentes para avaliar a precisão por meio do coeficiente de variação (CV%) dos ensaios intra e inter-dia.

Por fim, a recuperação dos analitos foi determinada como porcentagem ao comparar a concentração inicial (injeção direta) e a concentração real do analito que é obtida após sua extração da matriz pelo processo MEPS. Em ambas utilizou-se um volume de injeção da amostra de $5 \mu\text{L}$, mesmo padrão analítico e em triplicata para três concentrações.

4.3.6 Amostras

Foram pesados 2 g de amostra de café, (*Café Pacaembu Tradicional torrado e moído*) em um tubo falcom de 15 mL, completando o volume com água. A seguir a amostra foi colocada em agitação por 30 minutos, 3 horas, 5 horas e 7 horas. A amostra foi então centrifugada por 30 minutos a 5000 rpm, descartando o precipitado. O sobrenadante é centrifugado por 15 minutos a 5000 rpm, descartando o precipitado. O sobrenadante é filtrado

a vácuo e a solução filtrada é centrifugada por 10 minutos a 5000 rpm para que possíveis sólidos ainda contidos na amostra fossem removidos, evitando o entupimento do sorvente de MEPS. As amostras foram armazenadas a -4 °C, e fechadas, para sua posterior utilização.

4.4 Resultados e discussão

4.4.1 Sistema MEPS GC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas no modo SCAN e confirmadas no modo SIM (Figura 15), escolhendo os íons selecionados (Tabela 3) para cada um dos analitos estudados.

Figura 15. Monitoramento de cada analito estudado, modo SIM.

Tabela 3. Íons monitorados após a separação cromatográfica dos HPAs.

HPAs	Íons monitorados
Acenafteno	76,0 – 153,0 – 155,0
Acenaftileno	63,0 – 76,0 – 152,0
Fluoranteno	88,0 – 101,0 – 202,0
2-nitrofluoreno	185,0 – 194,0 – 211,0
5-nitroacemafteno	152,0 – 169,0 – 199,0
1-nitropireno	100,0 – 201,0 – 247,0
3-nitrofluoranteno	189,0 – 200,0 – 247,0
Benzo(α)pireno	113,0 – 125,0 – 252,0

*Em destaque os íon utilizados na quantificação

4.4.2 Otimização da extração empregando-se MEPS

A otimização das variáveis mais importantes do método resulta em maiores taxas de extração, aumento da sensibilidade analítica e diminuição do tempo de análise. Desta maneira os parâmetros: solvente de eluição, volumen do solvente, volumen da amostra, numero de ciclos em cada uma das etapas é fundamental para uma ótima extração.

4.4.2.1. Estudo do solvente de eluição

Foi estudado o solvente para melhorar a eluição dos analitos de interesse, avaliando três tipos de solventes com diferentes polaridades: metanol, acetonitrila e diclorometano. Assim, foi possível concluir que o melhor solvente foi o esperado, o mais apolar, pois os analitos apresentam anéis aromáticos conjugados sem hidrogênios ácidos que faz deles compostos apolares muito estáveis (Figura 16), dispensando avaliação do pH de o médio.

Figura 16. Comparação entre três tipos de solventes de diferentes polaridades para a eluição dos HPAs do líquido iônico zwitteriônico.

4.4.2.2. Estudo do volume do solvente de eluição

A Figura 17 apresenta uma comparação de volumes para obter o melhor fator de concentração (volume da amostra/volume do solvente de eluição), testando vários volumes de solvente de eluição (50, 100 e 500 μ L) para o material sorvente. Observou-se que quando esse volume aumenta, a diluição do analito é aumentada, levando a uma diminuição do seu sinal

cromatográfico conforme mostrado na Figura 17. Portanto, essa variável foi definida em 50 μL . Os testes foram realizados em quintuplicata para cada volume de eluição. As amostras foram previamente fortificadas com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos HPAs em estudo.

Figura 17. Comparação dos volumes do solvente de eluição.

4.4.2.3. Estudo do número de ciclos em cada uma das etapas de MEPS

Os ciclos de cada uma das etapas no processo MEPS (amostragem, lavagem e dessorção) apresentaram efeito significativo na extração; o aumento nesses ciclos levou a uma perda de sinal para todos os HPAs estudados. A combinação dos ciclos de lavagem e eluição foi verificada como muito significativa. Os melhores resultados foram obtidos empregando-se a menor quantidade de ciclos investigados em cada etapa (Figura 18). Então, 5 ciclos de amostragem (extração/ejeção), 5 ciclos de lavagem e 5 ciclos de eluição foram os parâmetros estabelecidos.

Para os dois analitos com menor tempo de retenção, acenaftileno e acenafteno, a combinação dos ciclos de amostragem e lavagem foi muito significativa, mas para o 5-nitroacenafteno essa combinação não teve importância no processo de extração (Figura 18).

Dependendo do desenvolvimento analítico, um aumento nos ciclos de aspiração e lavagem pode, respectivamente, aumentar o número de interferentes retidos na fase estacionária e/ou fazer com que os analitos sejam removidos durante esta etapa.

Em resumo, as etapas de análise foram selecionadas como:

- Condicionamento: 2 mL de diclorometano (5 x 500 µL);
- Amostragem: 2 mL de extrato de café fortificado (5 x 500 µL);
- Lavagem: 1,5 mL Ultrapure H₂O (5 x 500 µL);
- Eluição: 50 µL de diclorometano (5 x 50 µL);
- Ciclos de lavagem da fase de extração para reutilização: 4 mL de acetonitrila e 1 mL de metanol.

Figura 18. Análise do efeito de cada etapa do processo MEPS para cada analito estudado.

4.4.3 Validação do método de extração

Para validar as principais características de desempenho do método proposto, após realizada a otimização das condições de análise por MEPS, foram obtidas as seguintes figuras analíticas de mérito: seletividade, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ), coeficiente de determinação (R^2), precisão intra e inter-dias, exatidão e %recuperação.

O método apresentou-se seletivo para os analitos do estudo, sendo assim possível determinar qualitativamente e quantitativamente cada composto.

A Figura 19 mostra a sobreposição de cromatogramas de amostra de café sem contaminação e a mesma fortificada com uma mistura de HPAs na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$. A amostra de café branco apresenta outros compostos interferentes e/ou componentes da matriz, mas não apresentou picos eluídos no mesmo (ou próximo do) tempo de retenção dos analitos de interesse. Com esses resultados, considera-se o método seletivo para a identificação e quantificação dos HPAs.

Figura 19. Cromatogramas do café isento dos analitos (branco) e o café fortificado com os HPAs em estudo na concentração de $2 \mu\text{g L}^{-1}$.

Na Tabela 4, são apresentados os limites de detecção e quantificação obtidos para os HPAs. O método desenvolvido apresentou um LOQ de $5 \mu\text{g L}^{-1}$ para a maioria dos HPAs avaliados; exceto para o primeiro analito, Ap, que apresentou um LOQ de $3 \mu\text{g L}^{-1}$. Este é o

analito menos retido na coluna cromatográfica e apresenta a menor temperatura de ebulição; bem como um LOD de $1 \mu\text{g L}^{-1}$ para Ap e de $1,5 \mu\text{g L}^{-1}$ para todos os outros HPAs.

Tabela 4. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para os HPAs.

Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Acenafteno	1,03	3,07
Acenaftileno	1,57	5,01
Fluoranteno	1,52	5,06
2-nitrofluoreno	1,53	5,04
5-nitroacenafteno	1,48	5,05
1-nitropireno	1,49	5,04
3-nitrofluoranteno	1,47	5,03
Benzo(α)pireno	1,46	5,08

As curvas de calibração foram obtidas pelo processamento de uma série de soluções padrão contendo os oito HPAs modelo em nove concentrações diferentes na matriz de café, de acordo com os procedimentos descritos na Seção 4.3.5. O método apresentou uma faixa linear variando do LOQ até $100 \mu\text{g L}^{-1}$, com todos os HPAs apresentando R^2 superior a 0,99 (Tabela 5), mostrando que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo da concentração especificada.

Quanto maior a resposta gerada pelo detector em função da concentração dos analitos, maior é a sensibilidade da metodologia desenvolvida e, conseqüentemente, pode-se trabalhar com baixas concentrações na faixa linear.

Os parâmetros precisão (intra e inter-dias), Tabela 6, e exatidão, Tabela 7, foram avaliados por triplicata em três níveis de fortificação ($5,0$; $40,0$ e $80,0 \mu\text{g L}^{-1}$). Como o guia ICH não apresenta um nível de aceitação para avaliar a precisão, levou-se em conta os critérios da ANVISA (19) (os valores devem ser menores de 5%) e do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) (20) (os valores devem apresentar um $\text{RSD} \leq 20\%$). Porém, os resultados obtidos apresentaram desvios baixos, inferiores a 10%, comprovando que o método empregado é preciso para ser usado no mesmo dia e também em dias diferentes.

Tabela 5. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada um dos HPAs obtidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.

Analitos	Equação regressão linear	R^2
Acenafteno	2960,9x-4976	0,99908
Acenaftileno	1015,8x-4195,7	0,99824
Fluoranteno	1658,5x+1672,2	0,99933
2-nitrofluoreno	1483,1x-4386,6	0,99946
5-nitroacenafteno	442,35x-806,8	0,99848
1-nitropireno	1264,3x-3174,8	0,99958
3-nitrofluoranteno	123,3x+626,2	0,99846
Benzo(α)pireno	185,16x-276,75	0,99933

Tabela 6. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.

Analitos	Repetitividade (% RSD)						Precisão intermediária (% RSD)		
	5 $\mu\text{g L}^{-1}$		40 $\mu\text{g L}^{-1}$		80 $\mu\text{g L}^{-1}$		5 $\mu\text{g L}^{-1}$	40 $\mu\text{g L}^{-1}$	80 $\mu\text{g L}^{-1}$
Acenafteno	1,16	4,55	0,21	1,24	1,22	7,90	1,16	0,22	1,23
Acenaftileno	11,50	0,26	2,89	5,21	1,18	5,86	11,52	2,90	1,19
Fluoranteno	4,11	3,86	3,42	3,90	1,70	4,74	4,12	3,44	1,71
2-nitrofluoreno	5,51	3,51	1,45	5,31	0,89	2,00	5,52	1,45	0,90
5-nitroacenafteno	0,22	3,80	4,57	4,57	2,00	2,38	0,84	4,57	2,38
1-nitropireno	8,77	2,63	6,16	4,23	4,56	9,66	8,78	6,17	4,60
3-nitrofluoranteno	9,66	4,02	2,83	7,69	1,69	1,07	9,70	2,84	1,70
Benzo(α)pireno	10,97	9,64	5,91	8,68	2,57	0,99	10,90	5,90	2,60

Para o parâmetro exatidão, o guia ICH e ANVISA não apresenta níveis claros de aceitação, pelo que o critério de aceitação trabalhado foi segundo o estabelecido pelo MAPA (20). O valor para aceitação neste caso é de 70 a 120%, em média para todos os analitos; neste trabalho foi possível obter-se os resultados dentro da faixa aceitável, nas três concentrações estudadas. A Tabela 8 mostra os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de

concentração para avaliar a recuperação da técnica *off-line*. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não avaliam o parâmetro recuperação. Por isso foi avaliado segundo os critérios do MAPA que considera a recuperação e a exatidão iguais. Assim, os valores obtidos estão próximo do esperado para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%.

Tabela 7. Resultados obtidos na validação para exatidão.

	Exatidão (%)		
	5 µg L ⁻¹	40 µg L ⁻¹	80 µg L ⁻¹
Acenafteno	103,17	101,96	110,63
Acenaftileno	105,05	102,06	118,66
Fluoranteno	82,50	94,39	98,22
2-nitrofluoreno	87,63	99,11	110,39
5-nitroacenafteno	99,24	97,48	109,53
1-nitropireno	109,39	95,02	103,16
3-nitrofluoranteno	73,07	97,45	88,51
Benzo(α)pireno	78,79	101,79	113,31

4.4.4 Análise das amostras de café

Após avaliação das figuras de mérito, aplicou-se o método à análise dos HPAs em matrizes de café coletadas em diferentes regiões do Brasil e da Colômbia. O BaP foi encontrado em níveis quantificáveis em todas as amostras avaliadas, levando-se em consideração que este composto é um dos mais questionados e tem sido utilizado como marcador por ser o mais tóxico dessa classe de analitos, considerando sua genotoxicidade e mutagenicidade (21). Outros HPAs, não definidos como cancerígenos, podendo atuar como sinérgicos, também estão começando a ser monitorados. Fl, outro composto marcado como prioritário, também foi encontrado na maioria dos cafés (7). 2NF, 1NP e 3NFl foram detectados em algumas das amostras, embora não em níveis quantificáveis; esses ainda não foram comunicados pela Agência de Proteção Ambiental (EPA) e pela União Europeia (UE) (7). A Tabela 9 mostra as concentrações encontradas em cada amostra avaliada.

Tabela 8. Resultados obtidos na validação para recuperação.

	Recuperação (%)		
	5 µg L ⁻¹	40 µg L ⁻¹	80 µg L ⁻¹
Acenafteno	116,33	90,65	81,06
Acenaftileno	107,35	94,61	81,72
Fluoranteno	106,74	91,40	91,71
2-nitrofluoreno	111,76	100,73	99,51
5-nitroacenafteno	91,70	101,55	99,09
1-nitropireno	107,81	97,00	81,51
3-nitrofluoranteno	118,81	95,94	84,89
Benzo(α)pireno	100,10	90,99	86,02

Tabela 9. Concentração de HPAs $\mu\text{g L}^{-1}$ nas amostras de café coletadas.

AMOSTRA	REGIÃO	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)							
		Ac	Ap	Fl	2NF	5NAc	1NP	3NFI	BaP
Amostra 1 Solúvel	Paraná, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.0051
Amostra 2 Classica	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12
Amostra 3 Gourmet	Quindío, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	14
Amostra 4 Classica	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.95
Amostra 5 Classica (torrado/moído)	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12
Amostra 6 Extra Forte	Rio Grande do Norte, Brasil	nd	nd	15	nd	nd	nd	nd	12
Amostra 7 Classica (torrado/moído)	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	0.76
Amostra 8 Classica	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	0.32	nd	nd	nd	nd	0.78
Amostra 9 Classica	Rio Grande do Norte, Brasil	nd	nd	22	nd	nd	nd	nd	46
Amostra 10 Solúvel liofilizado	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	0.49	nd	nd	nd	0.0061	13
Sample 11 Classica (torrado/moído)	Antioquia, Colombia	nd	nd	0.22	0.0022	nd	nd	nd	13
Amostra 12 liofilizado	São Paulo, Brasil	nd	nd	0.71	nd	nd	0.017	nd	14
Amostra 13 Descafeinado	Caldas, Colombia	nd	nd	0.22	nd	nd	nd	nd	0.85

nd - não detecta

4.5 Conclusão do capítulo

Foi desenvolvido, otimizado e validado um método *off-line* envolvendo MEPS e GC-MS utilizando como material sorvente um líquido iônico zwitteriônico ancorado em sílica, para análise de HPAs em amostra de café. O material de extração zwitteriônico demonstrou boa extração dos analitos favorecendo, assim, a extração de moléculas com anéis aromáticos em sua estrutura, como é o caso dos HPAs estudados.

O método apresentou limites de detecção entre 1,0-1,5 $\mu\text{g L}^{-1}$ (a legislação brasileira não estabelece limites máximos de HPAs em café, mas a Comissão da Comunidade Européia estabeleceu níveis máximos para benzo(α)pireno em alguns alimentos de 1,0 até 10,0 $\mu\text{g kg}^{-1}$) (CEC, 2005). Utilizando esses limites para comparação verifica-se que os valores apresentados são inferiores aos permitidos, apresentando o método alta sensibilidade e seletividade.

Nas amostras reais foi possível detectar BaP e Fl, dois analitos monitorados por serem potencialmente cancerogênicos, sendo o método proposto aplicado com sucesso na análise de HPAs em amostras reais.

A funcionalização entre materiais sorbentes evidencia que esta pode ser importante para o aprimoramento das técnicas de preparo de amostras.

Referências bibliográficas

1. Phillips DH. Fifty years of benzo(a)pyrene [Internet]. Vol. 303, Nature. Nature Publishing Group; 1983 [cited 2020 Aug 13]. p. 468–72. Available from: <https://www.nature.com/articles/303468a0>
2. Hoar WS. The Behaviour of Chum, Pink and Coho Salmon in Relation to their Seaward Migration. J Fish Res Board Canada [Internet]. 1951 Apr 1 [cited 2020 Aug 13];8b(4):241–63. Available from: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/10.1139/f50-015>
3. Grover PL, Sims P, Huberman E, Marquardt H, Kuroki T, Heidelberger C. In vitro transformation of rodent cells by K-region derivatives of polycyclic hydrocarbons. Proc Natl Acad Sci U S A [Internet]. 1971 Jun 1 [cited 2020 Aug 13];68(6):1098–101. Available from: <https://www.pnas.org/content/68/6/1098>
4. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos em alimentos: uma revisão | PUBVET [Internet]. [cited 2020 Aug 13]. Available from: <http://www.pubvet.com.br/artigo/1470/hidrocarbonetos-policiacuteclicos-aromaacuteticos-em-alimentos-uma-revisatildeo>
5. Paris A, Ledauphin J, Poinot P, Gaillard JL. Polycyclic aromatic hydrocarbons in fruits and vegetables: Origin, analysis, and occurrence. Vol. 234, Environmental Pollution. Elsevier Ltd; 2018. p. 96–106.
6. Sadowska-Rociek A, Surma M, Cieřlik E. Determination of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Coffee and Coffee Substitutes using Dispersive SPE and Gas Chromatography-Mass Spectrometry. Food Anal Methods. 2015 Jan 17;8(1):109–21.
7. Purcaro G, Moret S, Conte LS. Overview on polycyclic aromatic hydrocarbons: Occurrence, legislation and innovative determination in foods. Vol. 105, Talanta. Elsevier B.V.; 2013. p. 292–305.
8. Demeke M, Spinelli A, Croce S, Pernechele V, Stefanelli E, Jafari A, et al. Food and agriculture policy decisions: trends, emerging issues and policy alignments since the 2007/08 food security crisis. Food Agric policy Decis trends, Emerg issues policy alignments since 2007/08 food Secur Cris. 2014;
9. Invest & Export Brasil [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <http://www.investexportbrasil.gov.br/>
10. International Coffee Organization - What's New [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <http://www.ico.org/>

11. OEC - Colombia (COL) Exportaciones, Importaciones, y Socios comerciales [Internet]. [cited 2020 May 26]. Available from: <https://oec.world/es/profile/country/col/>
12. Zelinkova Z, Wenzl T. EU marker polycyclic aromatic hydrocarbons in food supplements: analytical approach and occurrence. Food Addit Contam Part A [Internet]. 2015 Nov 2 [cited 2020 Aug 13];32(11):1914–26. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/19440049.2015.1087059>
13. The 2014 European Union Report on Pesticide Residues in Food. EFSA J [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Mar 16];14(10):e04611. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4611>
14. Kumar Bhardwaj S. A Review: GC Method Development and validation [Internet]. 2016 [cited 2020 Aug 13]. Available from: <https://www.researchgate.net/publication/295363384>
15. Mahdi M, Abdel-rehim A, Abdel-rehim M. Microextraction by packed sorbent by packed sorbent (MEPS). Trends Anal Chem [Internet]. 2015 [cited 2019 Oct 21];67(April):34–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2014.12.003>
16. Fumes BH, Lanças FM. Use of graphene supported on aminopropyl silica for microextraction of parabens from water samples. J Chromatogr A. 2017 Mar 3;1487:64–71.
17. Meng J, Wang X. Microextraction by packed molecularly imprinted polymer combined ultra-high-performance liquid chromatography for the determination of levofloxacin in human plasma. J Chem. 2019;2019.
18. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).
19. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.
20. Manual de Garantia da Qualidade Analítica [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 13]. Available from: www.agricultura.gov.br
21. Opinion of the Scientific Committee on Food on the risks to human health of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in food (expressed on 4 December 2002) [Internet]. 2002 [cited 2019 Nov 25]. Available from: http://europa.eu.int/comm/food/fs/sc/scf/index_en.html

CAPÍTULO 5

ILz/Si@GO como sorvente para
extração por MEPS de Pesticidas
selecionados em amostras de café
torrado

Parte deste Capítulo foi motivo da seguinte publicação:

Microextraction by packed sorbent of selected pesticides in coffee samples employing ionic liquids supported on graphene nano-sheets as extraction phase

Marcela Jordan-Sinisterra and Fernando Mauro Lanças

Analytical and Bioanalytical Chemistry, outubro (2020) – submitted.

5.1 Introdução

Considerando que um dos maiores problemas que ameaçam a vida do planeta Terra é o aumento da população, sendo necessário aumentar a capacidade de produção do solo, neste capítulo foram estudados os agrotóxicos. Esses produtos químicos continuam sendo usados para manter o equilíbrio entre a qualidade dos produtos e o aumento da demanda do consumidor, sendo o emprego de muitos deles proibido em varias partes do mundo (1). O uso desses compostos tem gerado debates polêmicos desde tempos remotos, uma vez que os agrotóxicos afetam, direta ou indiretamente, o meio ambiente e a saúde dos seres vivos, causando poluição e problemas de contaminação (1). O uso dessas substâncias químicas na agricultura começou aproximadamente em meados do século XIX (2,3), mas até 1940 o uso de métodos mecânicos foi o principal mecanismo de proteção dos alimentos até que as propriedades inseticidas do DDT foram descobertas, dando início à chamada “revolução verde” (4), a qual trouxe grandes consequências sociais, sanitárias e ecológicas para o nosso tempo. No final da Segunda Guerra Mundial, o DDT tornou-se o foco de estudos devido ao seu potencial perigo para a humanidade (2), mas foi somente em 1969 que a conferência internacional de Estocolmo sugeriu, pela primeira vez, a substituição dos inseticidas organoclorados por compostos menos persistentes nos organismos vivos e no meio ambiente (3). Porém, compostos organofosforados e carbamatos foram amplamente utilizados na década de 1970, ainda existindo muitas formulações sintéticas fotoestáveis muito tóxicas à saúde e ao meio ambiente (4), gerando interesse em pesquisas para substituição desses produtos na agricultura e na vida cotidiana em geral.

Em cultivos como do café, os agrotóxicos são amplamente utilizados para controlar pragas e doenças em diferentes etapas do processo e, assim, evitar a diminuição da produtividade na coleta final (5). Uma praga de origem africana chamada *Hypothenemus hampei* Ferrari (Coleoptera: Curculionidae), mais comumente conhecida como "broca do café", é atualmente a praga de inseto mais prejudicial para o café no continente americano, a qual se espalhou por todo o continente por meio de sementes infestadas (6). Normalmente as fêmeas desses insetos colonizam as bagas que têm entre 8 e 32 semanas de maturação para desovar (7), reduzindo o rendimento e a qualidade do produto final, e prejudicando os agricultores em geral (8,9). Além disso, as lesões causadas por esses insetos nas sementes de café ajudam outros microorganismos como *Aspergillus niger* van Tieghem (Trichocomaceae) e *Erwinia stewartii* (Smith) a entrarem no café também (6).

O inconveniente é que o uso de tampas de etanol/metanol e fungos não tem sido eficaz (10) e os agricultores brasileiros têm precisado usar inseticidas para tentar reduzir o nível de infestação e a rápida disseminação do inseto nas lavouras. Uma vez que as fêmeas deixam os ovos sozinhos durante o período de coleta e vão na procura de novas bagas para pôr novos ovos, este é o momento apropriado para combatê-las, utilizando inseticidas como aldrin, dieldrin e endosulfan, os quais tem apresentado ótimos resultados (6). Portanto, esses inseticidas foram selecionados neste estudo entre vários outros; suas estruturas químicas são apresentadas na Figura 20. A principal desvantagem dessa classe é que os inseticidas podem ser ingeridos involuntariamente e causar neurotoxicidade, resultado que pode ser letal (11).

Figura 20. Estrutura química dos pesticidas estudados na matriz de café.

Portanto, o desenvolvimento e o aprimoramento de métodos analíticos, procedimentos de extração e materiais sorventes para determinar pesticidas em diferentes matrizes são desafios importantes. Tashakkori et al (12) usaram uma série de novos líquidos iônicos (brometo de 1- (3-aminopropil) -3-vinil imidazólio/tetrafluoroborato) enxertados em fios de aço inoxidável revestidos com óxido de grafeno por uma técnica de sol-gel, para serem utilizados como fibras de microextração em fase sólida (SPME) para a determinação de ésteres ftalatos (PAEs) em café pelo método de imersão direta-SPME-cromatografia gasosa-espectrometria de massas (DI-SPME-GC-MS).

O café, desde a semente até a bebida, passa por processos de secagem e torrefação para finalmente ser moído, experimentando uma variedade de temperaturas que dá origem a reações pirolíticas que, por sua vez, produzem reações colaterais de oxidação, redução,

hidrólise, polimerização, descarboxilação, entre muitas outras. Estudos têm mostrado que mesmo após esses processos térmicos, os agrotóxicos podem permanecer no café até ser bebido pelo humano (13,14), sendo muito importante o monitoramento constante dos resíduos desses agrotóxicos nesta bebida, em busca de a segurança da saúde do consumidor.

Apesar de apresentarem propriedades muito interessantes, o uso do grafeno e o GO como sorventes extratores não é muito adequado, devido à elevada área superficial que apresenta pela sua estrutura de folhas. Isto faz deles materiais pouco seletivos, além de apresentar outros tipos de inconvenientes para serem empregados como sorvente pois também levam a entupimentos nas colunas em sistemas automatizados. Neste capítulo, os pesticidas foram usados como analitos modelo para avaliar as propriedades de um material composto por um líquido iônico ligado covalentemente à superfície de Si@GO como sorbente em MEPS.

O método de extração foi otimizado e avaliado mediante as figuras de mérito seguindo protocolos internacionais, com o objetivo de empregar este método para a determinação de pesticidas em diferentes amostras de café.

5.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi avaliar o uso de líquido iônico ancorado a óxido de grafeno funcionalizado para extrair pesticidas utilizando a microtécnica de extração MEPS. Além disso, desenvolver, otimizar e validar as condições de análise do sistema MEPS para extrair os pesticidas em amostras de café, empregando GC-MS/MS.

5.3 Parte experimental

5.3.1 Padrões analíticos e reagentes

Diazinon, heptacloro, aldrina, dieldrina, endrina, endosulfan sulfato e metoxicloro, foram adquiridos na Chem Service (West Chester, PA, EUA). Tolueno, metanol, acetonitrila e diclorometano foram da Tedia (Fairfield, EUA) e água deionizada preparada em sistema Milli-Q da Millipore (Billerica, EUA).

5.3.2 Preparo das soluções contendo os padrões analíticos

Os padrões analíticos de pesticidas foram preparados empregando o mesmo procedimento descrito no Capítulo 4.

5.3.3 Instrumentação e condições cromatográficas para separação dos pesticidas no sistema MEPS GC-MS/MS

Para otimização dos parâmetros do sistema MEPS e validação do método utilizou-se um sistema GC-MS/MS, consistindo de um cromatógrafo a gás 7890A (GC) da Agilent (Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massa Quattro da Waters (Milford, MA, EUA) equipado com uma fonte de ionização de elétrons (EI), a Amostrador automático CombiPal e um software Waters massLynx V4.1 para gerenciar as condições dos instrumentos, aquisição e processamento de dados. A temperatura na fonte de íons foi de 300 °C. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna DB-5ms (30 m x 0,25 mm, 0,25 µm) da Agilent (EUA). As condições utilizadas no cromatógrafo gasoso acoplado ao detector de massas foram as mesmas descritas na seção 3.3.12.

5.3.4 Otimização do método de extração MEPS

Para otimizar as condições de extração dos pesticidas mediante MEPS, se empregou como sorbente IL/Si@GO. Embora um aumento nos ciclos de amostragem possa melhorar (não necessariamente) a área de um pico para um determinado sorvente, o objetivo deste trabalho foi demonstrar que, ao combinar as propriedades do grafeno e de um líquido iônico, se consegue uma ótima extração. Na Figura 21, observa-se que a melhor resposta é obtida com 20 ciclos de amostragem (extração / expulsão), 20 ciclos de lavagem e 20 ciclos de dessorção (diclorometano foi utilizado como solvente). Os ciclos de regeneração e secagem foram estabelecidos conforme descrito na Seção 4.4.2.3.

5.3.5 Validação do método MEPS GC-MS/MS

Para a validação do método foi utilizado o guia Q2(R1) da *International Conference on Harmonization* (ICH) (15) e as seguintes figuras de mérito foram avaliadas: seletividade, limites de detecção e quantificação, linearidade, precisão, exatidão e recuperação.

A seletividade foi avaliada comparando-se os cromatogramas obtidos na análise da amostra de café sem analitos com a mesma fortificada na concentração de 2,0 µg L⁻¹, fato que permitiu avaliar a existência ou não de possíveis interferentes no mesmo tempo de retenção dos analitos de interesse.

Figura 21. Otimização do número de ciclos em cada etapa do procedimento MEPS para pesticidas modelo.

Para avaliar a linearidade do método a curva analítica foi construída com oito níveis de concentrações diferentes sendo o primeiro ponto o valor obtido de LOQ dos pesticidas na amostra de café, sendo cada nível injetado em quintuplicata.

A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade e precisão intermediária, em três níveis de concentração por triplicata. A repetibilidade do método foi obtida injetando amostra fortificada em três diferentes níveis, baixo ($65,0 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($140,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($270,0 \mu\text{g L}^{-1}$), obtendo-se um total de 9 padrões injetados. O mesmo procedimento foi aplicado em dias diferentes para avaliar a precisão intermediária. Os resultados foram expressos em função do desvio padrão relativo das injeções (RSD (%)).

A exatidão foi determinada analisando-se amostra de café fortificada em três níveis de concentração, baixo ($65,0 \mu\text{g L}^{-1}$), médio ($140,0 \mu\text{g L}^{-1}$) e alto ($270,0 \mu\text{g L}^{-1}$), para todos os analitos, em triplicata.

A recuperação dos analitos foi avaliada comparando a injeção do analito a uma concentração conhecida sem passar por MEPS e a injeção do analito na mesma concentração depois do processo MEPS. Utilizou-se para ambas injeções um volume de amostra de $5 \mu\text{L}$, mesmo padrão analítico e em triplicata para três concentrações ($65,0$; $140,0$ e $270,0 \mu\text{g L}^{-1}$), obtendo-se a porcentagem de recuperação do método de preparo da amostra.

5.3.6 Amostras

Amostras de café avaliadas com este método foram coletadas em diferentes regiões do Brasil e da Colômbia. As amostras foram previamente agitadas a 1.500 rpm em mesa agitadora (marca IKA e modelo VXR Basic Vibrax) por 30 min. Posteriormente, centrifugou-se a 5000 rpm por 30 min e, em seguida, filtrou-se para evitar obstrução da seringa durante o procedimento MEPS. A temperatura da água na qual as amostras de café foram dissolvidas foi mantida entre 70-80 ° C.

5.4 Resultados e discussão

5.4.1 Sistema MEPS GC-MS/MS

As análises cromatográficas foram realizadas no modo SCAN e confirmadas no modo SIM (Figura 22). Os íons selecionados para cada um dos analitos estudados estão listados na Tabela 10.

Foram monitoradas três transições para cada analito; como algumas delas ficaram muito próximas optou-se por utilizar a transição que apresentou melhor resolução dos picos. Portanto, utilizou-se as mesmas transições, para quantificação dos analitos, apresentadas no Capítulo 3. Para diazinon m/z 179,0 $\rightarrow$ m/z 137,0; heptacloro m/z 337,0 $\rightarrow$ m/z 266,0; aldrin m/z 293,0 $\rightarrow$ m/z 186,0; dieldrin m/z 277,0 $\rightarrow$ m/z 241,0; endrin m/z 279,0 $\rightarrow$ m/z 243,0; endosulfan sulfate m/z 272,0 $\rightarrow$ m/z 236,0 e para metoxicloro m/z 227,0 $\rightarrow$ m/z 141,0.

Figura 22. Monitoramento de cada analito estudado, modo SIM.

5.4.2 Otimização do sistema MEPS

Foi feita a otimização das principais variáveis para obter os melhores resultados empregando MEPS como método de preparo de amostra e, assim, aumentar a sensibilidade analítica e diminuir o tempo de análise. Os parâmetros avaliados foram: solvente de eluição, volume do solvente, volume da amostra, e número de ciclos em cada uma das etapas.

5.4.2.1. Estudo do solvente de eluição

O solvente de eluição foi escolhido a partir do estudo comparativo feito com quatro tipos de solventes com diferentes polaridades: metanol, etanol, acetonitrila e diclorometano. Assim, foi possível concluir que o melhor solvente foi o esperado, o mais apolar, pois os analitos apresentam baixa solubilidade na água mas alta lipossolubilidade. (Figura 23)

Figura 23. Comparação entre três tipos de solventes de diferentes polaridades para a eluição dos pesticidas com IL/Si@GO como sorbente.

5.4.2.2. Estudo do volume do solvente de eluição

O volume adequado de solvente para obter-se o melhor fator de concentração (volume da amostra/volume do solvente de eluição) foi avaliado para diferentes volumes de solvente de eluição (50, 100 e 200 μ L). Como esperado, quando esse volume aumenta, a diluição do

analito é aumentada, diminuindo o seu sinal cromatográfico (Figura 24). Portanto, o volume foi definido em 50 μL . Os testes foram realizados em quintuplicata para cada volume de eluição. As amostras foram previamente fortificadas com 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos pesticidas em estudo.

Figura 24. Comparação entre os volumes do solvente de eluição.

5.4.3 Validação do método MEPS GC-MS/MS

A validação da metodologia empregada foi realizada depois de otimizar as condições de trabalho da microtecnica MEPS. Foi possível mostrar que o método é seletivo para a extração dos analitos do estudo, sendo possível determinar qualitativamente e quantitativamente cada um deles. Foi observado que a cafeína e o heptacloro apresentam tempos de retenção muito próximos. Isto não apresenta problema, uma vez que a análise foi feita através do monitoramento de reações selecionadas (MRM), no modo MS/MS (Figura 25).

Desta maneira, o método mostrou-se seletivo para a identificação e quantificação dos pesticidas.

Figura 25. Cromatogramas MRM da amostra de café branca e a mesma fortificada com os pesticidas na concentração de $1 \mu\text{g L}^{-1}$

São apresentados na Tabela 10 os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) obtidos para cada pesticida. Observa-se que os valores obtidos são relativamente altos (principalmente os LOQ) comparados aos limites permitidos pelo EPA (16), União Européia (17), e CONAMA (18), mas suficientes neste momento para avaliar o método proposto visando melhoras nas outras etapas da análise.

As curvas de calibração foram obtidas pelo processamento de uma série de soluções padrão contendo os sete pesticidas modelo em nove concentrações diferentes na matriz de café, de acordo com os procedimentos descritos na Seção 4.3.5. O método apresentou uma faixa linear variando do LOQ até $300 \mu\text{g L}^{-1}$, com todos os pesticidas apresentando R^2 superior a 0,99 (Tabela 11), mostrando que há uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo da concentração especificada.

Tabela 10. Limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) do método para os pesticidas.

Analitos	LOD ($\mu\text{g L}^{-1}$)	LOQ ($\mu\text{g L}^{-1}$)
Diazinon	14,9	50,7
Heptacloro	18,7	65,7
Aldrin	17,1	63,8
Dieldrin	16,8	65,4
Endrin	20,1	64,90
Endosulfan Sulfate	16,0	65,20
Metoxicloro	13,8	65,30

Tabela 11. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada pesticidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.

Analitos	Equação regressão linear	R^2
Diazinon	$0,670x + 5,349$	0,993
Heptacloro	$0,724x - 9,859$	0,990
Aldrin	$0,749x - 24,539$	0,995
Dieldrin	$0,858x - 6,297$	0,994
Endrin	$0,854x - 36,108$	0,997
Endosulfan Sulfate	$0,849x - 45,037$	0,997
Metoxicloro	$0,661x - 13,491$	0,992

Os parâmetros precisão intra e inter-dias (Tabela 12), e exatidão (Tabela 13), foram avaliados por triplicata em três níveis de fortificação (65,0; 140,0 e 270,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Como o guia ICH não apresenta um nível de aceitação para avaliar a precisão, empregou-se os critérios da ANVISA (19) (os valores devem ser menores de 5%) e do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) (20) (os valores devem cumprir com um $\text{RSD} \leq 20\%$). Os resultados obtidos apresentaram desvios baixos e inferiores a 10%, comprovando que o método empregado é preciso para ser usado no mesmo dia e também em dias diferentes.

Tabela 12. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.

	Repetitividade (% RSD)						Precisão intermediária (% RSD)		
	65 µg L ⁻¹		140 µg L ⁻¹		270 µg L ⁻¹		65 µg L ⁻¹	140 µg L ⁻¹	270 µg L ⁻¹
Diazinon	4,69	3,57	3,06	3,77	3,00	2,36	4,69	3,06	3,00
Heptacloro	8,82	11,12	2,60	4,68	1,12	2,24	8,82	2,60	1,12
Aldrin	5,33	10,78	2,58	4,21	0,81	1,62	5,33	2,58	0,81
Dieldrin	5,75	5,68	3,47	2,43	1,29	1,38	5,75	3,47	1,29
Endrin	10,79	6,66	1,20	1,87	1,28	1,57	10,79	1,20	1,28
Endosulfan Sulfate	9,35	10,19	3,46	2,06	0,99	1,77	9,35	3,47	0,99
Metoxiclolo	7,10	3,81	3,58	8,22	1,21	1,83	7,10	3,58	1,21

Para o parâmetro exatidão, a guia ICH e ANVISA não apresentam níveis claros de aceitação; empregou-se o critério de aceitação estabelecido pelo MAPA (20), sendo este valor de 70 a 120% em média para todos os analitos. Os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa aceitável, nas três concentrações estudadas.

A Tabela 14 mostra os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de concentração para avaliar a recuperação da técnica *off-line*. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não avaliam o parâmetro recuperação. Por isso foi avaliado segundo os critérios do MAPA que considera a recuperação e a exatidão iguais. Assim, os valores obtidos estão próximo do esperado para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%.

5.4.4 Amostras

O material sorvente foi usado para extrair seletivamente um grupo representativo de pesticidas em amostras de café coletadas em diferentes regiões do Brasil e da Colômbia (Tabela 15). Aldrin e endrin foram proibidos no Brasil desde 1985 para uso agrícola (exceto para formigas e cupins), e o uso de dieldrin nunca foi registrado no Brasil (21), mas estudos mostraram que o aldrin por mecanismos biológicos e/ou abióticos se converte em dieldrin, que é significativamente mais persistente no meio ambiente (16). Neste estudo, o diazinon, o aldrin e o endosulfan sulfato não se apresentam em um nível quantificável, mas sua detecção mostra que foram usados no passado e ainda persistem no meio ambiente, conforme trabalho

relatado por Varona et al., no qual aldrin, dieldrin, entre outros pesticidas organoclorados, foram detectados em amostras de soro de agricultores em plantações ilegais na Colômbia (22).

Tabela 13. Resultados obtidos na validação para exatidão.

	Exatidão (%)					
	65 µg L ⁻¹		140 µg L ⁻¹		270 µg L ⁻¹	
Diazinon	110,93	116,29	82,06	85,26	71,48	72,40
Heptacloro	93,26	98,22	85,75	85,75	100,60	99,92
Aldrin	109,34	108,66	100,38	102,93	105,48	105,48
Dieldrin	93,80	90,82	91,85	91,58	105,20	103,04
Endrin	107,12	111,93	99,66	98,54	105,04	104,75
Endosulfan Sulfate	111,22	112,43	99,04	100,44	108,22	108,65
Metoxicloro	99,67	102,00	94,54	93,46	104,12	105,80

Tabela 14. Resultados obtidos na validação para recuperação.

	Recuperação (%)		
	65 µg L ⁻¹	140 µg L ⁻¹	270 µg L ⁻¹
Diazinon	115,52	81,35	71,66
Heptacloro	90,43	83,12	87,64
Aldrin	110,15	105,15	103,17
Dieldrin	103,37	105,18	102,04
Endrin	110,12	106,07	108,80
Endosulfan Sulfate	115,45	107,17	111,99
Metoxicloro	117,52	97,79	103,75

Além disso, o metoxicloro, um potencial genotóxico, foi detectado em níveis mensuráveis na maioria das amostras de café. Este tem sido usado como um inseticida e pesticida aprovado para substituir o DDT para aplicação em plantações agrícolas e pecuária desde sua produção comercial nos Estados Unidos em 1946 (23). Estudos em ratos mostraram que este pesticida também é potencialmente cancerígeno no fígado, testículos, ovários, baço, vasos sanguíneos, hipófise, glândulas supra-renais e glândulas mamárias em roedores (24). Isso pode ser devido à atividade hormonal de seus metabólitos pró-estrogênicos em mamíferos, porém, o estudo é insuficiente porque eles usaram uma dose única, possivelmente superior à dose máxima tolerada. Outro estudo em ratos examinou a toxicidade estrogênica e reprodutiva do metoxicloro e encontrou supressão de peso corporal, ciclos estrais prolongados, fertilidade reduzida, número reduzido de locais de implantação e recém-nascidos, peso diminuído dos ovários, aumento da incidência de ovário cístico, aumento do peso uterino, separação retardada do prepúcio, contagens de espermatozóides reduzidas e pesos alterados dos órgãos reprodutivos (25).

O estudo em humanos revelou efeitos de morte sistêmica (anemia aplástica), cardiovascular (pressão arterial baixa) e neurológica (visão turva, tonturas e parestesias) e câncer (leucemia) (25). Já em 1993, foi estabelecido um valor de referência provisório de 0,02 mg L⁻¹ para o metoxicloro na água potável, um valor atualmente mantido também para os alimentos pela AESA (21).

Tabela 15. Concentração de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de café coletadas em diferentes locais, incluindo diferentes países.

AMOSTRA	REGIÃO	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
		Diazinon	Heptacloro	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Endosulfan Sulfate	Metoxicloro
Amostra 1 Solúvel	Paraná, Brazil	<LOD	nd	nd	nd	nd	nd	<LOD
Amostra 2 Classica	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 3 Gourmet	Quindío, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	29.50
Amostra 4 Classica	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 5 Classica (torrado/moído)	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	46.13
Amostra 6 Extra Forte	Rio Grande do Norte, Brasil	<LOD	nd	<LOD	nd	nd	nd	37.05
Amostra 7 Classica (torrado/moído)	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	48.4
Amostra 8 Classica	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 9 Classica	Rio Grande do Norte, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	<LOD
Amostra 10 Solúvel liofilizado	Valle del Cauca, Colombia	<LOD	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 11 Classica (torrado/moído)	Antioquia, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 12 liofilizado	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 13 Descafeinado	Caldas, Colombia	<LOD	nd	nd	nd	nd	<LOD	180.02

nd – não detecta

5.5 Conclusão do capítulo

Neste capítulo foi apresentado um novo material baseado em grafeno funcionalizado ao qual foi aderido o líquido iônico zwitteriônico previamente sintetizado, para ser utilizado como sorvente em MEPS, levando em consideração as maravilhosas propriedades de GO e IL, podendo ser utilizado em um único material. Para isso, um grupo de pesticidas foi utilizado como compostos-modelo para avaliar ILz/Si@GO como fase sorvente em MEPS. Um método de extração para a determinação de pesticidas em diferentes amostras de café foi desenvolvido, otimizado, e aplicado com sucesso.

Referências bibliográficas

1. An J, Rahn KL, Anderson JL. Headspace single drop microextraction versus dispersive liquid-liquid microextraction using magnetic ionic liquid extraction solvents. *Talanta*. 2017 May 15;167:268–78.
2. Cameron GR, Burgess F. The Toxicity of D.D.T. *Br Med J* [Internet]. 1945 Jun 23 [cited 2019 Aug 27];1(4407):865–71. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20786134>
3. Curtis CF, Lines JD. Should DDT be Banned by International Treaty? *Parasitol Today* [Internet]. 2000 Mar 1 [cited 2019 Aug 27];16(3):119–21. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169475899016051>
4. Ali U, Syed JH, Malik RN, Katsoyiannis A, Li J, Zhang G, et al. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: A review. Vols. 476–477, *Science of the Total Environment*. Elsevier; 2014. p. 705–17.
5. A. FSS, M. MDL, M. RVN. Environmental fate of pesticides applied on coffee crops in southeast of Brazil. *African J Environ Sci Technol*. 2017 Feb 28;11(2):103–12.
6. Infante F, Pérez J, Vega FE. The coffee berry borer: The centenary of a biological invasion in Brazil. *Brazilian J Biol*. 2014;74(3):125–6.
7. Carvalho CF, Carvalho SM, Souza B. Coffee. In: *Natural Enemies of Insect Pests in Neotropical Agroecosystems* [Internet]. Cham: Springer International Publishing; 2019 [cited 2020 Feb 29]. p. 277–91. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-3-030-24733-1_23
8. Fernandes FL, Picanço MC, Fernandes MES, Dângelo RAC, Souza FF, Guedes RNC. A new and highly effective sampling plan using attractant-baited traps for the coffee berry borer (*Hypothenemus hampei*). *J Pest Sci* (2004). 2015 Jun 18;88(2):289–99.
9. Steiner FM, Zettel H, Schlick-steiner BC, Dauber J, Drijfhout FP, Economo E, et al. Myrmecological News Ant-mediated (Hymenoptera: Formicidae) biological control of the coffee berry borer: diversity, ecological complexity, and conservation biocontrol. 2017;
10. Silva FC da, Ventura MU, Morales L. Capture of *hypothenemus hampei ferrari* (coleoptera, scolytidae) in response to trap characteristics. *Sci Agric* [Internet]. 2006 Dec [cited 2019 Sep 4];63(6):567–71. Available from:

- http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-90162006000600010&lng=en&tlng=en
11. Costa LG. The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides. In: Handbook of Clinical Neurology. Elsevier B.V.; 2015. p. 135–48.
 12. Tashakkori P, Erdem P, Merdivan M, Bozkurt SS. Determination of Phthalate Esters in Water and Coffee by Solid-Phase Microextraction Using Vinyl Terminated Imidazolium Based Ionic Liquid Grafted on Graphene Oxide Coatings. ChemistrySelect. 2019 Feb 28;4(8):2307–13.
 13. Reichert B, de Kok A, Pizzutti IR, Scholten J, Cardoso CD, Spanjer M. Simultaneous determination of 117 pesticides and 30 mycotoxins in raw coffee, without clean-up, by LC-ESI-MS/MS analysis. Anal Chim Acta. 2018 Apr 3;1004:40–50.
 14. Mekonen S, Ambelu A, Spanoghe P. Effect of Household Coffee Processing on Pesticide Residues as a Means of Ensuring Consumers' Safety. J Agric Food Chem. 2015 Sep 30;63(38):8568–73.
 15. INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE ICH HARMONISED TRIPARTITE GUIDELINE VALIDATION OF ANALYTICAL PROCEDURES: TEXT AND METHODOLOGY Q2(R1).
 16. Health Effects Support Document for Aldrin/Dieldrin [Internet]. [cited 2020 Mar 14]. Available from: www.epa.gov/safewater/
 17. The 2014 European Union Report on Pesticide Residues in Food. EFSA J [Internet]. 2016 Oct 1 [cited 2020 Mar 16];14(10):e04611. Available from: <http://doi.wiley.com/10.2903/j.efsa.2016.4611>
 18. (No Title) [Internet]. [cited 2020 Aug 14]. Available from: <http://www2.mma.gov.br/port/conama/>
 19. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.
 20. Manual de Garantia da Qualidade Analítica [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 13]. Available from: www.agricultura.gov.br
 21. Multiple Framework Contract FWC FPI PSF 2015 Mapping of applicable technical regulations, conformity assessment procedures and supporting standards in support of EU-Brazil business development DELIVERABLE 2 BRAZIL-CHEMICAL SECTOR-PESTICIDES A project implemented by Eurosupport Consortium-AESA.
 22. Varona ME, Díaz-Criollo SM, Lancheros-Bernal AR, Murcia-Orjuela AM, Henao-

- Londoño GL, Idrovo AJ. Organochlorine pesticide exposure among agricultural workers in Colombian regions with illegal crops: an exploration in a hidden and dangerous world. *Int J Environ Health Res* [Internet]. 2010 Dec 14 [cited 2020 Mar 14];20(6):407–14. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09603123.2010.491855>
23. Ware GW. Methoxychlor. In Springer, New York, NY; 1988 [cited 2020 Mar 16]. p. 161–71. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-4613-8785-5_13
24. Reuber MD. Carcinogenicity and toxicity of methoxychlor. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1980 Jun [cited 2020 Mar 16];36:205–19. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.8036205>
25. Manikkam M, Haque MM, Guerrero-Bosagna C, Nilsson EE, Skinner MK. Pesticide methoxychlor promotes the epigenetic transgenerational inheritance of adult-onset disease through the female germline. *PLoS One*. 2014 Jul 24;9(7).

CAPÍTULO 6

Desenvolvimento e aplicação de um sistema *on-line* automatizado SPME para extração de Pesticidas em amostras de café torrado

6.1 Introdução

Desde 1989 (1), a microextração em fase sólida (SPME) tem sido amplamente utilizada - principalmente devido à sua rapidez, simplicidade e sensibilidade - em diversas áreas da química analítica, como análise de alimentos (2), amostras de interesse ambiental (3–5) e biológica (6), dentre outras.

O dispositivo inicialmente desenvolvido, na forma de uma Fibra-SPME, ainda é a forma técnica mais utilizada (7). Nesta configuração, a fase extratora (geralmente um polímero) recobre parte do material fibroso (sílica fundida) que por sua vez é anexado a um êmbolo (Figura 26). Esta fibra está dentro de uma seringa que protege a fase de extração durante o transporte do dispositivo, seja para inseri-lo no frasco onde a amostra está localizada ou na porta de injeção do GC para realizar a dessorção dos analitos extraídos. No frasco onde se encontra a amostra, o revestimento é exposto para entrar em contato com os analitos de interesse, os quais geralmente se encontram dissolvidos em solução aquosa, distribuindo-se os analitos orgânicos entre a água e a fase de extração até o equilíbrio (8).

Figura 26. Etapas envolvidas em análises efetuadas por um sistema típico SPME. (a) dispositivo inserido no frasco que contem a amostra e a fibra é exposta, (b) a fibra é retraída para remover o dispositivo após o tempo de amostragem ser concluído, (c) introdução da fibra carregada no injetor GC para dessorção térmica dos analitos e (d) remoção da fibra para a seguinte extração.

A fibra pode então ser transportada diretamente para o pórtilho de injeção do GC ou para um instrumento analítico, conforme o caso, para realizar a dessorção térmica dos analitos. Graças ao formato semelhante da fibra com a seringa do amostrador automático clássico, a técnica é facilmente acoplada a equipamentos de GC ou LC (8).

As fases estacionárias mais comuns são poli(dimetilsiloxano) (9), poliacrilato de cristal líquido (10), polimida (11) ou, mesmo uma superfície de sílica fundida não revestida.

A automatização de um método analítico oferece uma série de vantagens indiscutíveis, como tempo reduzido de análise, rendimento da amostra e maior reprodutibilidade, ainda mais quando comparada às técnicas clássicas. A extração líquido-líquido clássica (LLE) é demorada e trabalhosa e não é compatível com a análise de compostos voláteis. A técnica denominada purga e a armadilha (“*purge-and-trap*”) foi automatizada, mas não pode funcionar com compostos semivoláteis, além de exigir um certo espaço, e requererem investimentos de custo elevado em equipamentos. A extração em fase sólida (SPE), para ser automatizada, requer válvulas sofisticadas e um robô, tornando o processo mais caro. Por outro lado, a automatização da SPME requer apenas uma pequena modificação no amostrador automático cromatográfico de GC, comumente usado (12).

6.2 Objetivo

O objetivo deste capítulo foi descrever a montagem de um sistema de extração SPME acoplado *on-line* a um equipamento GC-MS/MS para analisar pesticidas em amostras de café.

6.3 Parte experimental

6.3.1 Montagem do sistema SPME

Neste trabalho foi utilizado um injetor automático CombiPAL que aceita um dispositivo SPME, proveniente de um cromatógrafo gasoso Agilent 7890A (GC) (Santa Clara, CA, EUA) acoplado a um espectrômetro de massas Quattro da Waters (Miliford, MA, EUA).

A amostragem foi realizada estaticamente, mas com a opção de, no futuro, poder comparar com uma amostragem dinâmica e com controle de temperatura (8). O volume do frasco trabalhado é de 5mL, condição que na época era uma das limitações da técnica (8).

Embora em teoria qualquer amostrador automático possa ser facilmente modificável para SPME-GC automatizado, somente a partir de 1999 essa opção foi realmente introduzida (13), permitindo assim trabalhar com processos que lidam com controles de temperatura

(bandejas de amostras que podem ser aquecidas ou resfriadas e agitadas) ou, como no caso do equipamento trabalhado, o frasco poder ser transferido para um forno onde pode ser aquecido e agitado, e depois devolvido à bandeja de amostras (Figura 27).

Figura 27. Vial da amostra no forno para ser aquecido e agitado previamente à extração por SPME-GC-MS/MS automatizado.

Devido ao grande número de publicações que atualmente descrevem o emprego de SPME-GC “simples” – ou seja, em seu formato original - para a análise de diferentes matrizes (14–22), o uso do termo fibra automatizada SPME-GC é o suficiente para descrever o processo característico em uma aplicação determinada. Neste trabalho foram avaliadas as seguintes fibras comerciais: PDMS 100 μm (F1); PDMS 7 μm (F2); PA 85 μm (F3); PDMS/DVB (F4) e; CAR/PDMS 85 μm (F5). A partir dos dados obtidos, sumarizados na Figura 28, foi possível escolher a fibra F1 como sendo a que apresentou a maior seletividade para extrair os analitos modelo na matriz de café. Este fato deve-se, provavelmente, à baixa polaridade de PDMS, sendo uma fibra muito utilizada para extrair composto voláteis e apolares (23). A avaliação da seletividade foi realizada por triplicata para cada uma das fibras estudadas, sendo exposta na matriz por 60 minutos e com um tempo de desorção térmica de 3 minutos a 280 °C. Cada fibra foi previamente ativada segundo o tempo e a temperatura indicados pelo fabricante.

Figura 28. Avaliação da seletividade das fibras comerciais de SPME para a extração dos pesticidas investigados.

As etapas descritas por Pawlizyn (24) para o desenvolvimento de um método com SPME manual são praticamente as mesmas para o desenvolvimento de um método com SPME automatizado. Portanto, neste trabalho avaliou-se: (i) o tempo de exposição da fibra no frasco contendo a amostra; (ii) o tempo de dessorção térmica; e (iii) o tempo de exposição da fibra no injetor para garantir a limpeza da fibra entre as análises.

Uma vantagem que o trabalho com o processo estático pode ter frente ao dinâmico, tem sido demonstrado através de estudos nos quais o uso de barras agitadoras ou agitação na bandeja de amostras pode causar respingos da solução aquosa, contaminando a fibra SPME (8), parâmetro que no futuro, pode ser testado e comparado.

Atualmente existe um conjunto de fibras metálicas superelásticas robustas que permitem que centenas de análises sejam realizadas em sequência. As ligas inertes que compõem essas fibras têm excelente memória de forma e propriedades de resistência à tração, de modo que a fibra permanece reta mesmo após várias centenas de injeções. O objetivo a

mais longo prazo é poder obter fibras desse tipo feitas no laboratório (*lab-made*), usando-se *on-line* o mesmo material sorvente sintetizado nesta tese e empregado com MEPS em modo *off-line* para extrair pesticidas com SPME-GC. Este procedimento permitirá uma comparação entre os resultados, de forma a obter-se um procedimento experimental que gere os resultados promissores esperados.

6.4 Resultados e discussão

6.4.1 Otimização dos principais parâmetros para o desenvolvimento do método automatizado SPME

Para obter uma alta sensibilidade analítica e um tempo de análises curto, a otimização das variáveis mais significativas do método automatizado é muito importante, pois assim resulta em maiores taxas de extração pela alta sensibilidade em poucos minutos. Desta maneira, os parâmetros (i) tempo de exposição da fibra no frasco contendo a amostra; (ii) o tempo de dessorção térmica; e (iii) o tempo de exposição da fibra no injetor para garantir a limpeza da fibra entre as análises, foram otimizados para esse sistema, com injeções em triplicata.

A microtécnica SPME baseia-se na partição dos analitos entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra (25), porém o processo de extração inicia quando os analitos são transportados da matriz à fibra extratora, até atingir a concentração do analito o equilíbrio de partição entre a fibra e a amostra. Os dois principais modos de extração são por imersão direta da fibra na amostra ou, como foi feita nesta pesquisa, no modo *headspace* (espaço da cabeça) (25).

No ano 1992 (26), foi apresentando o modelo matemático que explica a dinâmica do processo de sorção durante a imersão direta da fibra, demonstrando que existe uma relação linear entre a quantidade de analito sorbido na fibra no estado de equilíbrio e a concentração deste na amostra, Equação 6.1.

$$n = \frac{K_{fs} V_f C_o V_s}{K_{fs} V_f + V_s}$$

Equação 6.1

sendo:

n : moles do analito absorvidos pela fibra;

V_f e V_s : volume da fibra e da amostra respectivamente;

K_{fs} : coeficiente de partição dos analitos entre a fibra e a amostra;

C_o : a concentração inicial do analito na amostra.

Posteriormente, foi desenvolvido o modelo matemático para demonstrar o processo de extração de SPME no *headspace*, sendo as equações - e portanto as conclusões - similares às obtidas para o processo de extração por imersão, porém considerando uma terceira variável, a fase gasosa (25). Durante o processo de SPME, geralmente é possível considerar que $V_s \gg K_{fs}V_f$ pelo que geralmente V_f é muito menor que V_s , transformando a Equação 6.1. na Equação 6.2.

$$n = K_{fs}V_fC_o$$

Equação 6.2

Observando na Equação 6.2. que a quantidade de analito extraído (n) é diretamente proporcional à concentração do analito na amostra mas independente do volume da amostra, pelo que nesta pesquisa foi trabalhado um volume de 5 mL de amostra, tendo em conta a distância prudente entre a fibra e a solução de amostra para que a fibra não fosse contaminada.

Além disso, um aspecto muito importante a ser considerado é o fato que atualmente existem fibras nas quais o processo de extração é através de um processo de absorção (Equação 6.1.) mas também fibras que extraem por um processo de adsorção, pelo que o modelo matemático sofre certas alterações. Nesta pesquisa, a fibra PDMS extrai através de um processo de absorção (27). Adicionalmente recomenda-se, em geral, trabalhar com fibras de uma maior espessura quando os analitos apresentam coeficientes de partição baixos (como nesta pesquisa, pelo que a fibra empregada foi de 100 μm) (24).

Na Figura 28 se apresenta a otimização do tempo de exposição da fibra na amostra de café, observando que depois de 45 minutos, a concentração dos analitos diminui, possivelmente pela saturação da fibra ao atingir o equilíbrio de partição.

Figura 29. Avaliação do tempo ideal de exposição da fibra no frasco contendo a amostra de café.

A seguir foi otimizado o tempo de desorção térmica dos analitos no injetor do GC, como mostrado na Figura 30. Observa-se que quanto maior o tempo de exposição menor a quantidade obtida dos analitos,. Deve ainda ser considerada a temperatura máxima recomendada pelo fabricante, assim como a Equação 6.3. a qual mostra que ao aumentar-se a temperatura, a afinidade dos compostos pela fibra diminui. Tendo em conta todos esses fatos, e os resultados obtidos, a temperatura foi fixada em 280 °C.

$$\text{Log } K_{fs} = a \left(\frac{1}{T} \right) + b$$

Equação 6.3.

Sendo:

K_{fs} o coeficiente de partição do analito entre a fibra e a amostra líquida;

a y b as duas constantes

T a temperatura do injetor

Além disso, um maior tempo de desorção aumenta o risco de efeitos de memória, pelo que o tempo de desorção utilizado foi de 2 minutos, pois nesse tempo se consegue a desorção completa dos compostos estudados (24,25).

Figura 30. Otimização do tempo de dessorção térmica.

Nos injetores split/splitless e PTV, a válvula de divisão do fluxo (*split valve*) deve permanecer fechada durante o processo de dessorção para garantir que a totalidade dos analitos seja introduzida na coluna cromatográfica. O diâmetro do *insert (liner)* dos injetores deve ser muito próximo ao diâmetro da fibra para garantir a transferência rápida dos analitos do pórtilo de injeção à coluna (24). Finalmente, para obter reprodutibilidade no processo, a fibra deve ficar na metade do *insert* durante o processo de dessorção para que o aquecimento seja no menor tempo possível (24).

6.4.2 Validação do método SPME-GC-MS/MS

Depois de otimizar os principais parâmetros para o desenvolvimento do método automatizado SPME, o método foi validado através das figuras de mérito descritas na Seção 1.5. O método mostrou-se seletivo para a extração, identificação e quantificação dos pesticidas empregados como modelo para a avaliação do método de preparo a amostra. A Figura 31 ilustra o o perfil cromatográfico típico de cada analito no modo SIM.

Figura 31. Cromatograma dos pesticidas empregados no desenvolvimento do método automatizado SPME, modo SIM. A identidade dos analitos é a mesma da Figura 30, na mesma sequência.

Utilizando os parâmetros descritos na Seção 4.3.5. foram construídas as curvas de calibração para cada um dos compostos pelo processamento de uma série de soluções padrão contendo os sete pesticidas modelo em cinco concentrações diferentes (15; 25; 50; 75 e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) na matriz de café. As curvas de calibração exibiram linearidade satisfatória ($R^2 > 0,99$) (Tabela 16) de 15 a 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, havendo uma relação diretamente proporcional entre a concentração do analito na amostra e a intensidade do sinal diante do intervalo da concentração especificada. Os limites de detecção (LOD) e quantificação (LOQ) foram calculados como $\text{LOD} = S/N \text{ } 3:1$ e $\text{LOQ} = S/N \text{ } 10:1$ respectivamente. O LOD e o LOQ foi de 2.5 e 15.3 $\mu\text{g L}^{-1}$ respectivamente.

Os parâmetros precisão intra e inter-dias (Tabela 17), e exatidão (Tabela 18), foram avaliados por triplicata em três níveis de fortificação (15,0; 50,0 e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$). Como o guia ICH não apresenta um nível de aceitação para avaliar a precisão, empregou-se os critérios da ANVISA (28) (os valores devem ser menores de 5%) e do Manual de Garantia da Qualidade Analítica (MAPA) (29) (os valores devem cumprir com um $\text{RSD} \leq 20\%$). Os resultados obtidos apresentaram desvios baixos e inferiores a 10%, comprovando que o método empregado é preciso para ser usado no mesmo dia e também em dias diferentes.

Tabela 16. Equação de regressão linear e R^2 das curvas de calibração obtidas para cada pesticidas a partir do valor de LOQ de cada um dos analitos estudados.

Analitos	Equação regressão linear	R^2
Diazinon	$7935.9x + 242800$	0.996
Heptacloro	$1050.7x + 19260$	0.992
Aldrin	$956.62x + 28389$	0.991
Dieldrin	$8142.2x + 43208$	0.994
Endrin	$806.24x + 5784.5$	0.997
Endosulfan Sulfate	$759.36x + 15669$	0.995
Metoxicloro	$966.03x + 54236$	0.993

Para o parâmetro exatidão, a guia ICH e ANVISA não apresentam níveis claros de aceitação; empregou-se o critério de aceitação estabelecido pelo MAPA (29), sendo este valor de 70 a 120% em média para todos os analitos. Os resultados obtidos encontram-se dentro da faixa aceitável, nas três concentrações estudadas.

Tabela 17. Resultados obtidos na validação para repetitividade e precisão intermediária.

	Repetitividade (% RSD)						Precisão intermediária (% RSD)		
	15 $\mu\text{g L}^{-1}$		50 $\mu\text{g L}^{-1}$		100 $\mu\text{g L}^{-1}$		15 $\mu\text{g L}^{-1}$	50 $\mu\text{g L}^{-1}$	100 $\mu\text{g L}^{-1}$
Diazinon	2,79	5,92	1,65	1,68	1,03	1,90	2,79	1,65	1,03
Heptacloro	4,56	7,45	4,33	1,04	0,48	2,07	4,56	4,33	0,48
Aldrin	5,57	6,88	2,02	0,71	0,97	4,04	5,57	2,02	0,97
Dieldrin	1,86	0,97	8,21	4,64	1,55	2,55	1,86	8,21	1,55
Endrin	3,38	2,62	2,61	4,05	1,81	2,37	3,38	2,61	1,81
Endosulfan Sulfate	3,89	5,24	2,02	2,48	2,18	2,05	3,89	2,02	2,18
Metoxicloro	2,88	4,64	2,16	2,31	0,40	1,62	2,88	2,16	0,40

Tabela 18. Resultados obtidos na validação para exatidão.

	Exatidão (%)					
	15 µg L ⁻¹		50 µg L ⁻¹		100 µg L ⁻¹	
Diazinon	121,91	103,02	100,39	98,72	104,93	104,32
Heptacloro	94,17	82,29	105,57	101,57	100,32	100,79
Aldrin	108,89	117,20	100,88	93,35	101,35	97,06
Dieldrin	74,63	74,06	96,66	93,44	98,30	97,28
Endrin	99,11	78,88	89,59	103,26	100,27	102,17
Endosulfan Sulfate	88,11	96,58	104,49	94,83	100,68	100,22
Metoxicloro	75,67	68,63	104,12	106,33	97,94	93,99

A Tabela 19 mostra os valores obtidos na recuperação dos analitos em três níveis de concentração para avaliar a recuperação da técnica *on-line*. Tanto o guia do ICH quanto o guia de validação para métodos analíticos da ANVISA não avaliam o parâmetro recuperação. Por isso foi avaliado segundo os critérios do MAPA que considera a recuperação e a exatidão iguais. Assim, os valores obtidos estão próximo do esperado para os métodos *off-line* segundo o MAPA, os quais geralmente variam de 70 a 120%, pelo que o método *on-line* foi comparado segundo os critérios para os métodos *off-line*, conclui-se que os resultados obtidos satisfazem o critério de avaliação para a maioria das concentrações estudadas.

6.4.3 Amostras

A fibra SPME comercial (PDMS 100 µm) foi usada para extrair seletivamente, empregando um método automatizado, um grupo representativo de pesticidas, discutidos no capítulo 5, em amostras de café coletadas em diferentes regiões do Brasil e da Colômbia (Tabela 20). Neste estudo, o dieldrin não se apresentou em um nível quantificável, mas sua detecção mostra que foi usado no passado e ainda persiste no meio ambiente.

Tabela 19. Resultados obtidos na validação para recuperação.

	Recuperação (%)		
	15 µg L ⁻¹	50 µg L ⁻¹	100 µg L ⁻¹
Diazinon	104,51	96,88	99,83
Heptacloro	103,30	105,31	98,64
Aldrin	86,21	94,03	101,68
Dieldrin	76,00	95,78	96,89
Endrin	79,29	103,19	99,30
Endosulfan Sulfate	83,84	86,41	100,22
Metoxicloro	78,58	112,56	93,75

Os outros 6 pesticidas foram quantificados em diferentes amostras de café comerciais, ressaltando as amostras provenientes do estado de São Paulo, Brasil e do estado Valle del Cauca, Colômbia, as quais apresentam altas concentrações de heptacloro, aldrin e endrin. Embora eles estejam proibidos desde 1988, ainda são utilizados para o controle de pragas na agricultura (30,31).

O heptacloro é o único praguicida relacionado diretamente com o câncer de mama (32), sendo muito importante o controle desde composto em bebidas e alimentos, além de sua presença em amostras ambientais. O aldrin pode estar presente no solo agrícola por tempo prolongado devido a sua afinidade pelas partículas do solo, a insolubilidade na água, sua lenta degradação e a vida média prolongada que apresenta (33), sendo considerado como um disruptor endócrino, sendo também importante seu monitoramento.

Finalmente o endrin é considerado como um dos organoclorados mais tóxicos, com uma dose letal em ratos de (LD50) de 2,3 mg kg⁻¹ (34). É um composto persistente que pode magnificar-se, em níveis tróficos, por suas propriedades de bioacumulação.

Tabela 20. Concentração de pesticidas ($\mu\text{g L}^{-1}$) nas amostras de café coletadas em diferentes locais, incluindo diferentes países.

AMOSTRA	REGIÃO	Concentração ($\mu\text{g L}^{-1}$)						
		Diazinon	Heptacloro	Aldrin	Dieldrin	Endrin	Endosulfan Sulfate	Metoxicloro
Amostra 1 Solúvel	Paraná, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 2 Classica	São Paulo, Brasil	46,75	200,46	nd	nd	nd	88,28	nd
Amostra 3 Gourmet	Quindío, Colombia	nd	<LOQ	nd	nd	nd	70,54	nd
Amostra 4 Classica	Sao Paulo, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	58,58
Amostra 5 Classica (torrado/moído)	Valle del Cauca, Colombia	nd	<LOQ	nd	<LOD	<LOQ	95,21	<LOD
Amostra 6 Extra Forte	Rio Grande do Norte, Brasil	nd	<LOQ	nd	<LOQ	nd	<LOD	nd
Amostra 7 Solúvel	Paraná, Brasil	77,17	<LOQ	<LOD	nd	42,37	37,26	nd
Amostra 8 Classica	Valle del Cauca, Colombia	nd	nd	109,26	<LOD	109,61	nd	nd
Amostra 9 Classica	Rio Grande do Norte, Brasil	nd	nd	nd	nd	34,99	nd	<LOD
Amostra 10 Solúvel liofilizado	Valle del Cauca, Colombia	nd	<LOQ	nd	nd	nd	nd	<LOQ
Amostra 11 Classica (torrado/moído)	Antioquia, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 12 liofilizado	São Paulo, Brasil	nd	nd	113,89	nd	nd	nd	nd
Amostra 13 Descafeinado	Caldas, Colombia	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 14 Descafeinado	Mato Grosso, Brasil	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Amostra 15 Classica (torrado/moído)	São Paulo, Brasil	nd	nd	nd	<LOQ	nd	nd	nd

nd - não detectado

6.5 Conclusão

Neste capítulo descreveu-se a montagem e avaliação de um sistema SPME-GC-MS/MS, o qual foi posteriormente aplicado com êxito para análise de pesticidas em amostras de café. O objetivo original era empregar-se um material sorbente mais seletivo que melhora ainda mais os resultados obtidos com as fibras comerciais testadas, além de poder ser empregado na análise de outros tipos de analitos em diferentes amostras alimentícias e bebidas. Adicionalmente, pretendia-se comparar os resultados obtidos com esta técnica com a *off-line* objetivando posterior desenvolvimento de um sistema mais seletivo online empregando MEPS automatizado para a mesma finalidade. Infelizmente o início da pandemia, e sua posterior persistência, frustraram estas intenções, as quais ficarão para trabalhos futuros.

Referências bibliográficas

1. Belardi RP, Pawliszyn JB. Application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics from water matrix samples and their rapid transfer to capillary columns. *Water Pollut Res J Canada* [Internet]. 1989 Feb 1 [cited 2020 Aug 20];24(1):179–91. Available from: <https://iwaponline.com/wqrj/article-pdf/24/1/179/233230/wqrj0240179.pdf>
2. Xu CH, Chen GS, Xiong ZH, Fan YX, Wang XC, Liu Y. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. Vol. 80, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2016. p. 12–29.
3. Boonjob W. Automated sample preparation methods for the determination of trace level concentrations of environmental pollutants [Internet]. Universitat de les Illes Balears; 2012 Apr [cited 2020 Aug 20]. Available from: <http://dspace.uib.es/xmlui/handle/11201/151952>
4. Vallejo-Vargas OI, Beltrán L, Franco P, Montoya-Navarrete CH, Alzate-Rodríguez EJ, Reyes H. Determinação de trihalometanos na água para consumo humano por microextração em fase sólida -cromatografia em fase gasosa em Pereira, Colômbia. *Rev Colomb Quim* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2020 Aug 20];44(1):23–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.15446/rev.colomb.quim.v44n1.54041>
5. Lúcia De Toffoli A, Lancas FM. Recentes avanços da microextração em fase sólida no tubo (in-tube SPME) e sua aplicação em análises ambientais e alimentícias. [cited 2020 Aug 20]; Available from: <http://dx.doi.org/10.4322/sc.2016.011>
6. Kwon SM, Shin HS. Simple determination of fluoride in biological samples by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2015 Aug 14;1407:216–21.
7. Lord H, Pawliszyn J. Evolution of solid-phase microextraction technology. Vol. 885, *Journal of Chromatography A*. Elsevier; 2000. p. 153–93.
8. O'Reilly J, Wang Q, Setkova L, Hutchinson JP, Chen Y, Lord HL, et al. Automation of solid-phase microextraction. *J Sep Sci* [Internet]. 2005 Oct 1 [cited 2020 Aug 20];28(15):2010–22. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jssc.200500244>
9. Rodriguez-Lafuente A, Piri-Moghadam H, Lord HL, Obal T, Pawliszyn J. Inter-laboratory validation of automated SPME-GC/MS for determination of pesticides in

- surface and ground water samples: Sensitive and green alternative to liquid–liquid extraction. *Water Qual Res J Canada* [Internet]. 2016 Nov 1 [cited 2020 Aug 20];51(4):331–43. Available from: <https://iwaponline.com/wqrj/article-pdf/51/4/331/378700/wqrjc0510331.pdf>
10. Domínguez I, Arrebola FJ, Gavara R, Martínez Vidal JL, Frenich AG. Automated and simultaneous determination of priority substances and polychlorinated biphenyls in wastewater using headspace solid phase microextraction and high resolution mass spectrometry. *Anal Chim Acta*. 2018 Mar 9;1002:39–49.
 11. Wei S, Lin W, Xu J, Wang Y, Liu S, Zhu F, et al. Fabrication of a polymeric composite incorporating metal-organic framework nanosheets for solid-phase microextraction of polycyclic aromatic hydrocarbons from water samples. *Anal Chim Acta*. 2017 Jun 8;971:48–54.
 12. Merkle S, Kleeberg K, Fritsche J. Recent Developments and Applications of Solid Phase Microextraction (SPME) in Food and Environmental Analysis—A Review. *Chromatography*. 2015 Jun 30;2(3):293–381.
 13. Peñalver A, Pocurull E, Borrull F, Marcé RM. Trends in solid-phase microextraction for determining organic pollutants in environmental samples. *TrAC - Trends Anal Chem*. 1999 Aug 1;18(8):557–68.
 14. Souza-Silva ÉA, Jiang R, Rodríguez-Lafuente A, Gionfriddo E, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices I. Environmental analysis. Vol. 71, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2015. p. 224–35.
 15. Souza-Silva ÉA, Gionfriddo E, Pawliszyn J. A critical review of the state of the art of solid-phase microextraction of complex matrices II. Food analysis. Vol. 71, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2015. p. 236–48.
 16. Piri-Moghadam H, Ahmadi F, Pawliszyn J. A critical review of solid phase microextraction for analysis of water samples. Vol. 85, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2016. p. 133–43.
 17. Kataoka H, Ishizaki A, Saito K. Recent progress in solid-phase microextraction and its pharmaceutical and biomedical applications [Internet]. Vol. 8, *Analytical Methods*. Royal Society of Chemistry; 2016 [cited 2020 Aug 20]. p. 5773–88. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlehtml/2016/ay/c6ay00380j>
 18. Gherghel S, Morgan RM, Arrebola-Liébanas J, Romero-González R, Blackman CS,

- Garrido-Frenich A, et al. Development of a HS-SPME/GC–MS method for the analysis of volatile organic compounds from fabrics for forensic reconstruction applications. *Forensic Sci Int.* 2018 Sep 1;290:207–18.
19. Lashgari M, Singh V, Pawliszyn J. A critical review on regulatory sample preparation methods: Validating solid-phase microextraction techniques. Vol. 119, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 115618.
 20. Gorynski K. A critical review of solid-phase microextraction applied in drugs of abuse determinations and potential applications for targeted doping testing. Vol. 112, *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. Elsevier B.V.; 2019. p. 135–46.
 21. Jalili V, Barkhordari A, Norouzian Baghani A. The role of microextraction techniques in occupational exposure assessment. A review. Vol. 150, *Microchemical Journal*. Elsevier Inc.; 2019. p. 104086.
 22. Jalili V, Barkhordari A, Ghiasvand A. A comprehensive look at solid-phase microextraction technique: A review of reviews. Vol. 152, *Microchemical Journal*. Elsevier Inc.; 2020. p. 104319.
 23. Canada. The life science business of Merck KGaA, Darmstadt, Germany operates as MilliporeSigma in the.
 24. Solid Phase Microextraction: Theory and Practice - Janusz Pawliszyn - Google Livros [Internet]. [cited 2020 Aug 20]. Available from: https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=314NFMn6WQ8C&oi=fnd&pg=PA1&dq=Pawliszyn,+J.,+Solid-Phase+Microextraction:+Theory+and+Practice,+Wiley,+New+York+1997.&ots=_ApPlxjsdE&sig=oqKhaj0YME7_cokZ9WP2_5qfCuU#v=onepage&q=Pawliszyn%2CJ.%2CSolid-Phase+Microextraction%3A+Theory+and+Practice%2CWiley%2CNew+York+1997.&f=false
 25. Eisert R, Pawliszyn J. New trends in solid-phase microextraction [Internet]. Vol. 27, *Critical Reviews in Analytical Chemistry*. CRC Press LLC; 1997 [cited 2020 Sep 19]. p. 103–35. Available from: <https://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=batc20>
 26. Louch D, Motlagh S, Pawliszyn J. Dynamics of Organic Compound Extraction from Water Using Liquid-Coated Fused Silica Fibers [Internet]. Vol. 64, *J. Electroanal. Chem. Interfad. Elec-trochem.* 1992 [cited 2020 Sep 19]. Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>

27. Górecki T, Yu X, Pawliszyn J. Theory of analyte extraction by selected porous polymer SPME fibres. *Analyst* [Internet]. 1999 Jan 1 [cited 2020 Sep 19];124(5):643–9. Available from: <https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/1999/an/a808487d>
28. Ministério da Saúde-MS Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA.
29. Manual de Garantia da Qualidade Analítica [Internet]. 2015 [cited 2020 Aug 13]. Available from: www.agricultura.gov.br
30. Varona ME, Díaz-Criollo SM, Lancheros-Bernal AR, Murcia-Orjuela AM, Henao-Londoño GL, Idrovo AJ. Organochlorine pesticide exposure among agricultural workers in Colombian regions with illegal crops: an exploration in a hidden and dangerous world. *Int J Environ Health Res* [Internet]. 2010 Dec 14 [cited 2020 Mar 14];20(6):407–14. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/09603123.2010.491855>
31. Blanco-Muñoz J, Lacasaña M, López-Flores I, Rodríguez-Barranco M, González-Alzaga B, Bassol S, et al. Association between organochlorine pesticide exposure and thyroid hormones in floriculture workers. *Environ Res*. 2016 Oct 1;150:357–63.
32. KHANJANI N, HOVING JL, FORBES AB, SIM MR. Systematic Review and Meta-analysis of Cyclodiene Insecticides and Breast Cancer. *J Environ Sci Heal Part C* [Internet]. 2007 Mar 12 [cited 2020 Sep 19];25(1):23–52. Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10590500701201711>
33. Sharma N, Garg D, Deb R, Samtani R. Toxicological profile of organochlorines aldrin and dieldrin: An Indian perspective [Internet]. Vol. 32, *Reviews on Environmental Health*. Walter de Gruyter GmbH; 2017 [cited 2020 Sep 19]. p. 361–72. Available from: <https://www.degruyter.com/view/journals/reveh/32/4/article-p361.xml>
34. Walsh GM, Fink GB. Comparative toxicity and distribution of endrin and dieldrin after intravenous administration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1972 Nov 1;23(3):408–16.

CAPÍTULO 7

Conclusão geral e perspectivas
futuras

7.1 Conclusão geral

O desenvolvimento de novos materiais sorventes proporcionou uma maior eficiência na extração dos analitos de interesse com resultados adequados quando aplicados para extração em sistemas *off-line* usando a microtécnica de extração MEPS. O líquido iônico zwitterionico ancorado em suportes sólidos funcionalizados (sílica e GO) foram os materiais que se mostraram mais seletivos para a extração dos analitos estudados nesta tese. Para os pesticidas, o óxido de grafeno apresentou também resultados satisfatórios quanto a extração, porém com baixa porcentagem de recuperação (apesar deste parâmetro não ser usualmente avaliado pelas agências reguladoras). Isto sugere que o grafeno e seus derivados são bons para extrair, porém pouco seletivos, precisando da funcionalização com outros materiais que melhorem suas propriedades.

A utilização da microtécnica de extração, SPME, como preparo de amostra automatizado acoplado *on-line* com GC-MS/MS, apresentou resultados satisfatórios para extração dos pesticidas na matriz de café. Além disso, a mesma apresentou várias vantagens sobre métodos *off-line* (como MEPS) e métodos mais clássicos (como LLE e SPE) tais como simplicidade, menor números de etapas, menor custo, rapidez, quantidades de amostra e solvente reduzidas, reutilização da coluna de extração, entre outras.

7.2 Perspectivas futuras

A microtécnica de extração SPME acoplada *on-line* com GC-MS/MS para extração e pré-concentração dos analitos de interesse em amostras complexas apresentou resultados promissores e poderá ser testada com outros tipos de materiais (o sorbente sintetizado nesta pesquisa foi IL-Si@GO) para diferentes analitos em outras matrizes. Este avanço possibilitará o desenvolvimento de novas metodologias com elevada sensibilidade e seletividade para microtécnicas de extração acopladas com sistemas automatizados.