



Universidade de São Paulo
Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de
Ribeirão Preto.
Departamento de Química

Padronização e validação analítica do método de extração em fase sólida de levoglucosano em amostras de água de chuva com análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

Aluno: Marcelo Cardoso Ferreira

Dissertação apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ciências, Área: **Química**.

**Ribeirão Preto – SP
2012**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria Eugênia Queiroz Nassur

**Catálogo da Publicação
Biblioteca Central de Ribeirão Preto
Universidade de São Paulo**

Ferreira, Marcelo Cardoso

Padronização e validação analítica do método de extração em fase sólida de levoglucosano em amostras de água de chuva com análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

. Ribeirão Preto, 2012.
87 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Química.

Orientadora: Nassur, Maria Eugênia Queiroz.

1. Levoglucosano. 2. Amostras de água de chuva. 3. SPE. 4. Quitosana. 5. Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas. 6. Validação analítica.

DEDICATÓRIA

Agradeço a Deus e dedico esta tese a toda minha família pelo apoio e amor incondicional e aos amigos pelo carinho e paciência.

Em especial a minha irmã Aline e minha namorada Aruna.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre estar presente em minha vida.

Aos meus pais, Wilson e Célia, pelo carinho e amor incondicional, apoiando sempre minhas escolhas. Muitas vezes, abriram mão de seus sonhos para verem realizados os meus.

As minhas irmãs, Aline e Gabriela pelo amor, carinho e apoio que sempre me deram e por fazerem parte dos melhores momentos da minha vida.

A minha namorada Aruna, pelo amor, paciência e apoio durante esses anos.

A Prof.^ª Maria Eugênia e Prof.^ª Lucia Campos, pela dedicação, ensinamentos e contribuição para o meu crescimento profissional.

Ao Prof.^º Luiz Alberto pelas sugestões sempre valiosas e principalmente pela amizade conquistada durante estes anos.

Aos colegas de laboratório,

Andréa, Bruno José, Fernanda Salami, Lidervan, Juciene, Luana, Valéria, Diego e Míriam, pelo companheirismo, amizade, conselhos e pela ajuda indispensável na parte experimental e teórica deste trabalho além dos momentos de descontração. Em especial as alunas da Prof.^ª Lucia; Fernanda, Cristina, Caroline e Roberta pela enorme ajuda e paciência.

A todos os Professores do departamento e da banca que contribuíram para este trabalho.

Aos grandes amigos que tenho,
Sidney, Emily, Bruno Galete, Carlos, Flávio, André, Patrícia, Marina, Thiago
Magri, Marília e Fabrício. Muito obrigado por fazerem parte desta jornada,
desejo a vocês tudo de melhor que existe na vida.

Ao Departamento de química e a pós - graduação da Faculdade de Filosofia
Ciências e Letras de Ribeirão Preto

Aos funcionários do DQ-FFCLRP/USP.

A CAPES, CNPq e FAPESP, pelo apoio financeiro concedido durante a
realização do meu mestrado.

E a todos que contribuíram pelo desenvolvimento deste trabalho de
mestrado.

"É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se aos pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem a vitória nem a derrota." (Theodore Roosevelt)

RESUMO

Neste trabalho, o método de extração em fase sólida (SPE) com análises por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) foi desenvolvido para a determinação de levoglucosano em amostras de água de chuva da região de Ribeirão Preto-SP, Brasil. O monossacarídeo levoglucosano (1,6-Anidro- β -D-Glucopiranosose) foi proposto como um marcador específico para queima de biomassa, uma vez que o mesmo é liberado durante a pirólise da celulose em temperaturas acima de 300°C.

Após a otimização das variáveis SPE, as melhores condições dentre as avaliadas foram as seguintes: cartuchos SPE recheados com a fase extratora quitosana (1,0 g), volume de amostra igual a 5,0 mL, vazão de 1,0 mL min⁻¹, solvente de eluição: metanol (volume igual a 2,5 mL), sem a adição de sal.

O método SPE/GC-MS para a determinação de levoglucosano em amostras de chuva apresentou faixa linear no intervalo de concentração de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $r \geq 0,9967$, exatidão de 95 a 110% e precisão inter ensaios com coeficientes de variação (CV) menores que 15%, exceto para o limite de quantificação (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o qual apresentou CV inferior a 20%.

Segundo as determinações (SPE/GC-MS) de levoglucosano em amostras de água de chuva coletadas no período 03/08/2011 à 09/04/2012, as concentrações médias de levoglucosano na safra de cana-de-açúcar são aproximadamente quatro vezes superior ao período de entressafra. Este fato é justificado pela elevada taxa de queima da palha da cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP no período safra, e conseqüentemente, maior emissão de material particulado para a atmosfera incluindo levoglucosano, COD, entre outros.

ABSTRACT

In this work, the method of solid phase extraction (SPE) with gas chromatography - mass spectrometry (GC-MS) analysis was developed for the determination of levoglucosan in rainwater samples collected in the region of Ribeirão Preto-SP, Brazil. The monosaccharide levoglucosan (1,6-Anhydro- β -D- Glucopyranose) was proposed as a specific marker for biomass burning, since it is released during the pyrolysis of cellulose at temperatures above 300 °C.

After optimization of the SPE variables, the best conditions were found to be as follows: SPE cartridges filled with the extraction phase chitosan (1,0 g), sample volume equal to 5,0 mL, flow rate of 1,0 mL min⁻¹ and elution with methanol (volume of 2,5 mL) without added salt.

The use of the method SPE/GC-MS for to determination of levoglucosan in rainwater samples was in the range of concentration going from 0,05 to 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $r \geq 0,9967$. The accuracy was 95-110%, determination of the inter assay precision gave coefficients of variation (CV) less than 15%, except for the limit of quantification (0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$), for which CV was less than 20%.

According to SPE/GC-MS determinations of levoglucosan in rainwater samples collected between 03/08/2011 and 09/04/2012, the average concentrations of this compound found during the harvest of sugar cane were approximately four times those obtained during the off-season. This fact is explained by the high rate of sugar cane burning in Ribeirão Preto-SP during harvest, which culminates in larger emissions of particulate matter to the atmosphere, including levoglucosano and COD, among others.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Produção de cana-de-açúcar (milhões de toneladas) no Brasil e em São Paulo no período de 1990-2009 (União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA), 2011)	23
Figura 2. 1,6-Anidro- β -D-Glucopiranosose (levoglucosano – em destaque) é um produto abundante da combustão da celulose em temperaturas acima de 300 °C. Os estereoisômeros do levoglucosano, galactosano e manosano também são mostrados. (Extraído de Simoneit et al., ¹⁸)	26
Figura 3. Sistema de extração líquido-líquido (LLE). (Extraído de)	32
Figura 4. Sistema a vácuo de Extração em Fase Sólida. (Extraído de)	33
Figura 5. Processo de extração em fase sólida. a-) Condicionamento do cartucho b-) Adição de amostra c-) Eluição de interferentes com solvente fraco d-) Eluição do analito com solvente forte. (Extraído de)	35
Figura 6. Barra SBSE. 1: tubo magnético, 2: revestimento de vidro, 3: fase extratora, 4: oligômero de PDMS.(Extraído de ⁴⁸)	37
Figura 7. Microseringa utilizada na MEPS (adaptada da referência ⁵⁰).	39
Figura 8. Microseringa MEPS e fase extratora. (Extraído de ⁵⁴)	40
Figura 9. Coletor de chuva.	48
Figura 10. (a) Estrutura da quitosana e do (b) levoglucosano.	50
Figura 11. Fluxograma do processo de derivatização do levoglucosano. (Extraído da referência ²⁸).	52
Figura 12. Reação de sililação do levoglucosano.	52
Figura 13. Cromatograma do levoglucosano na concentração 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, $t_r = 21,7$ min.	55

Figura 14. Espectros de Massas do levoglucosano-TMS, m/z 378. (A) Produto da derivatização obtido e (B) espectro de massas do levoglucosano-TMS da literatura. (Extraído de referência ²⁸) _____ 56

Figura 15. Avaliação das fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE (1,0 g) na eficiência da SPE. Amostra com 50 mL de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de 0,02 µg mL⁻¹, eluição: metanol (2,5mL) a uma vazão aproximada de percolação e eluição da amostra igual a 1mL min⁻¹. Para cada análise n =3. _____ 57

Figura 16. Avaliação da vazão de percolação e eluição do analito. Amostra de 50 mL de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de 0,02 µg mL. Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE (1,0 g) com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 58

Figura 17. Avaliação do volume de amostra percolada através do cartucho SPE. Amostra percolada a uma vazão fixa de 1mL min⁻¹. Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de 0,2 µg mL⁻¹ (para volume de amostra igual a 5,0 mL) e 0,02 µg mL⁻¹(para volume de amostra igual a 50,0 mL) . Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE (1,0 g) com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 59

Figura 18. Avaliação do volume de amostra percolado através do cartucho SPE. Amostra percolada a uma vazão fixa de 5mL min⁻¹. Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de 0,2 µg mL⁻¹ (para volume de amostra igual a 5,0 mL) e 0,02 µg mL⁻¹(para volume de amostra igual a 50,0 mL) . Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e

CELULOSE (1,0 g) com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 60

Figura 19. Figura comparativa dos resultados obtidos com as otimizações das variáveis SPE. (fase extratora, vazão e volume de amostra) _____ 61

Figura 20. Avaliação da força iônica da amostra na eficiência da extração SPE com quitosana (1,0g). Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 63

Figura 21. Avaliação do solvente de eluição na extração SPE com quitosana (1,0g). Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 63

Figura 22. Avaliação da massa de adsorvente quitosana na eficiência da SPE. Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise n =3. _____ 64

Figura 23. Cromatogramas das amostras de água ultrapura (branco de referência) e de chuva, ambas enriquecidas com levoglucosano na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. _____ 66

Figura 24. Curva analítica do método SPE/GC-MS no modo SIM (m/z 191, 205 e 217). _____ 67

Figura 25. Concentração de levoglucosano e COD presente em amostras de água de chuvas coletadas em Ribeirão Preto-SP durante o período de safra e entressafra de cana-de-açúcar. _____ 71

Figura 26. Concentração de levoglucosano vs concentração de COD. _____ 72

Figura 27. Comparação da concentração média de levoglucosano e COD presente em amostras de água de chuvas coletadas em Ribeirão Preto-SP no período de safra e entressafra de cana-de-açúcar. _____ 74

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Produção de cana-de-açúcar em 2008 dos principais países produtores (extraído de Food and Agricultura)	21
Tabela 2. Métodos analíticos para determinação de levoglucosano e seus isômeros em amostras ambientais.	28
Tabela 3. Linearidade e coeficiente de correlação do método SPE/GC-MS para análise de levoglucosano em amostras de água de chuva.	67
Tabela 4. Precisão interensaios (coeficiente de variação, CV e exatidão) do método SPE/GC-MS para determinação de levoglucosano em amostras de água de chuva.	69
Tabela 5. Limite de detecção de levoglucosano em amostras de água de chuva.	69
Tabela 6. Média ponderada pelo volume para COD e levoglucosano para safra e entressafra	73

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

BSTFA – bis-(trimetilsilil)-trifluoroacetamida

C2 – Dissilano

C8 – Octilsilano

C18 – Octadecilsilano

CE – Eletroforese Capilar

CE-PAD – Eletroforese Capilar com Arranjo de Diodos

COD – Carbono Orgânico Dissolvido

CONAB – Companhia Nacional de Abastecimento

COV – Carbono Orgânico Volátil

CV – Coeficiente de Variação

DB5-MS – Coluna cromatográfica para GC - 5% fenil dimetilpolisiloxano

DCM – Diclorometano

DI – Inserida diretamente na amostra

EI – Impacto de Elétrons

eV – Elétron Volt

GC – Cromatografia Gasosa

GC-FID – Cromatografia Gasosa com detector de ionização de chama

GC-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas

GC-MS-MS – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas Bidimensional

IC-HPLC-PAD – Cromatografia Iônica com Detector de Pulso Amperométrico acoplada à Cromatografia Líquida de Alta Resolução

IEC-HPLC-PDA – Cromatografia de Exclusão Iônica com detector de Arranjo de Diodos Acoplada à Cromatografia Líquida de Alta Resolução

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia

H NMR – Ressonância Magnética Nuclear de prótons

INPE – Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais

K_{ow} – Coeficiente de distribuição octanol/água.

LC – Cromatografia Líquida

LEVOGLUCOSANO – 1,6-Anidro-β-D-Glicopiranosose

LEVOGLUCOSANO-TMS – 1,6-Anidro-β-D-Glicopiranosose trimetilsilano

LLE – Extração Líquido-Líquido

LOD – Limite de Detecção

LOQ – Limite de Quantificação

m/v – Razão massa volume

m/z – Razão massa carga

MeOH – Metanol

MEPS – Microextração em Sorvente Empacotado

MP – Material Particulado

MP2,5 – Material Particulado de tamanho inferior a 2,5 μm

MPV – Média Ponderada pelo Volume

MS – Espectrômetro de Massas

PDMS – Polidimetilsiloxano

PDMS OV-17-50% – DMS/50% metil, 50% fenil polisiloxano

PDMS OV-17OH (35%) – 65% de fenil polisiloxano e 35% de hidroxila

PES – Polietersulfona

r – Coeficiente de Correlação Linear

R – Recuperação

RSD – Desvio Padrão Relativo

s – Desvio Padrão Absoluto

S/R – Razão Sinal Ruído

SAX – Trocador de ânions forte

SBSE – Extração Sortiva em Barra de Agitação

SCAN – Escaneamento de uma faixa de m/z

SCX – Trocador de cátions forte

SEMA – Secretaria de Estado do Meio Ambiente

SIM – Monitoramento do Íon Selecionado

SPE – Extração em Fase Sólida

TMCS – Trimetilclorosilano

ÚNICA – União da Indústria de Cana-de-açúcar

USP-RP – Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto

v/v – Razão volume/volume

SUMÁRIO

Conteúdo

DEDICATÓRIA	2
AGRADECIMENTOS	3
RESUMO	6
ABSTRACT	7
ÍNDICE DE FIGURAS	8
ÍNDICE DE TABELAS	12
LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS	13
1. Introdução	18
1.1. Composição da atmosfera	18
1.2. Aerossóis atmosféricos	18
1.3. Deposições atmosféricas	20
1.4. A produção de cana-de-açúcar no Brasil	21
1.5. Marcadores de queima de biomassa – levoglucosano	24
1.6. Métodos analíticos para a determinação de levoglucosano em amostras ambientais	28
1.6.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	29
1.7. Técnicas de preparo de amostras	31
1.7.1. Técnicas Convencionais	31
1.7.2. Técnicas de Microextração	35
1.8. Validação analítica	40
1.8.1. Seletividade	41
1.8.2. Linearidade	41
1.8.3. Precisão	43
1.8.4. Exatidão	44
1.8.5. Limite de quantificação	45
1.8.6. Robustez	45
2. Objetivos	46
3. Parte Experimental	46
3.1. Reagentes, padrões e materiais	46
3.2. Amostras de água de chuva	47
3.3. Extração em fase sólida (SPE)	49
3.3.1. Extração em fase sólida com sorvente quitosana	49
3.4. Processo de Derivatização do levoglucosano	51
3.5. Análise Cromatográfica - GC/MS	52
3.6. Validação Analítica do método SPE/GC-MS	53

4. Resultados e Discussão	55
4.1. Análise Cromatográfica- GC-MS	55
4.2. Otimizações das variáveis SPE	56
4.2.1. Fases Extratoras	56
4.2.2. Vazão de percolação da amostra e do eluente	57
4.2.3. Volume de Amostra	58
4.2.4. Força Iônica	62
4.2.5. Solvente de Eluição	63
4.2.6. Massa de adsorvente	64
4.2.7. Outras técnicas de extração	65
4.3. Validação Analítica do método SPE/GC-MS	65
4.3.1. Seletividade do método SPE/GC-MS	65
4.3.2. Linearidade do método SPE/GC-MS	66
4.3.3. LOQ e precisão interensaios do método SPE/GC-MS	68
4.3.4. LOD do método SPE/GC-MS	69
4.4. Análise de levoglucosano em amostras de água de chuva utilizando o método SPE/GC-MS	70
5. Conclusões	76
6. Referências Bibliográfica	78

1. Introdução

1.1. Composição da atmosfera

A atmosfera mantém em suspensão partículas que são denominadas aerossóis que inclui uma mistura de partículas sólidas ou gotículas dispersas num gás com dimensões inferiores a 100 µm. Essas partículas provenientes de fontes naturais ou antrópicas influenciam fortemente o balanço radiativo da atmosfera e o clima ^{1, 2}. Portanto, a atmosfera é formada por gases e partículas, e constitui o principal meio de transporte e reservatório para os compostos orgânicos e inorgânicos provenientes de fontes naturais ou antrópicas. ^{1, 2, 3}

O impacto das emissões na atmosfera depende das fontes de emissão, como também de fatores climáticos e topográficos. As emissões antrópicas vêm provocando efeitos adversos ao meio atmosférico, que por sua vez podem gerar efeitos agudos de poluição do ar, caracterizados por eventos de curta duração, mas que podem resultar em graves consequências.

As partículas em suspensão representam uma das principais contribuições para a poluição ambiental, sendo encontradas em diferentes tamanhos e produzidas por uma variedade de fontes, que inclui combustões incompletas, indústrias, construções, ressuspensão de solo, aerossol marinho, atividades vulcânicas e queima de biomassa. ²

1.2. Aerossóis atmosféricos

A composição do aerossol nos grandes centros urbanos é altamente complexa, pois são provenientes de diversas fontes que liberam grande quantidade de poluentes para a atmosfera. Segundo Castanho e Artaxo ⁴ em estudo realizado na região metropolitana de São Paulo em 1997 foi possível constatar que nas partículas finas, a composição mostrou-se dividida em diferentes grupos sendo que 28% originou-se de emissão veicular, 25% de ressuspensão do solo, 18% de uso de óleo combustível, 23% de sulfatos e 5% de emissões industriais. Para as partículas grossas a distribuição é menos complexa compreendendo 75% de ressuspensão de solo, 14% de emissões industriais e 11% de aerossol marinho.

Segundo Stanier et al. ⁵, as concentrações de partículas na área rural da Pensilvânia foi em média cerca de duas a três vezes menor do que na área urbana, uma vez que a área rural é menos impactada pelo tráfego de veículos e as concentrações encontradas são comparáveis com as encontradas em estudos de amostragem similares na Europa do Norte.

Na Amazônia a queima de florestas é uma das principais fontes de material particulado e emissões gasosas para a atmosfera. As partículas de aerossóis emitidos em regiões tropicais com queima de biomassa são ativas como núcleos de condensação de nuvens e exercem uma forte influência sobre as concentrações e tamanhos de gotículas de nuvem. ⁶

As principais fontes de aerossóis constituídos de carbono são: **1.** Queima de biomassa e de combustíveis fósseis; **2.** Oxidação atmosférica de compostos voláteis (COV) e **3.** Produção biogênica. Outras fontes primárias de material particulado em geral são poeiras provenientes de ressuspensão dos solos nas atividades agrícolas, emissões vulcânicas que são fontes

esporádicas de partículas e compostos sulfurosos para a atmosfera, partículas de sal marinho, partículas resultantes de atividades industriais e partículas biogênicas de componentes vegetais e matéria húmica ¹

1.3. Deposições atmosféricas

O material orgânico que é emitido na atmosfera, de forma natural ou antrópica, pode ser removido por mecanismos de deposição. As duas principais formas de deposição atmosférica são a úmida e a seca. A primeira compreende os processos de remoção de partículas e gases da atmosfera através principalmente pela chuva. A segunda engloba todos os processos de transferência de partículas e gases para todos os tipos de superfície (plantas, solos, rochas, água e materiais) por meio das partículas de aerossóis. Estudos de deposição atmosférica fornecem, portanto, informações sobre a variabilidade espacial e temporal da composição química atmosférica, além de ser um forte indicador de influências antrópicas ou naturais. A água de chuva tem um importante papel na remoção de gases e aerossóis presentes na atmosfera, sendo que a determinação da sua composição química auxilia a compreensão da dispersão local e regional de contaminantes atmosféricos e seu potencial impacto nos ecossistemas. ⁷

Os trabalhos de Campos et al.⁸ e Coelho et al.⁹, demonstraram que nas cidades de Araraquara e Ribeirão Preto há uma importante fonte regional de carbono orgânico solúvel para a atmosfera. Durante a época de safra da cana, as médias de COD (carbono orgânico dissolvido) nas chuvas de Ribeirão Preto e Araraquara foram duas vezes maiores que no período de entressafra. Esse

elevado conteúdo de carbono orgânico solúvel na chuva reflete a composição do aerossol atmosférico dessa região.

1.4. A produção de cana-de-açúcar no Brasil

O Brasil é o maior produtor mundial de cana-de-açúcar, seguido pela Índia (Tabela 1). Segundo a Companhia Nacional de Abastecimento (CONAB) a safra 2011/2012 deve alcançar uma produção de 641,98 milhões de toneladas, produção 1,8% menor que a safra 2010/2011 devido à estiagem prolongada. Desse montante, 48,1% é destinado à produção de açúcar e 51,9 % para a produção de etanol.

Tabela 1. Produção de cana-de-açúcar em 2008 dos principais países produtores (extraído de Food and Agricultura ¹⁰)

País	Produção (milhões toneladas)
Brasil	645
Índia	348
China	124
Tailândia	73,5
Paquistão	63,9

O maior produtor nacional de cana-de-açúcar é o estado de São Paulo que representa 52,8% da produção nacional, seguido do estado de Minas Gerais que representa 9% de acordo com a safra 2011/2012 (CONAB, 2011). O aumento da produção da cultura de cana-de-açúcar é reflexo do

programa Proálcool firmado em 1975, com a finalidade de substituição dos derivados de petróleo pelo etanol. Desde então é crescente a demanda por etanol, que vem estimulando o aumento das áreas plantadas com a cultura de cana, substituindo áreas de pastagens e agrícolas, que conseqüentemente repercute também no aumento do número de queimadas. O aumento da produção de cana-de-açúcar no período de 1991-2009 é decorrente do aumento do preço do petróleo e o estímulo aos biocombustíveis devido ao aumento de CO₂ e o aquecimento global (Figura 1).

A prática da queima da palha da cana-de-açúcar se dá devido à necessidade de aumento da capacidade diária de corte; redução no número de acidentes ocupacionais e por animais peçonhentos; redução na quantidade de matéria estranha como folhas e ervas daninhas; menor desgaste das moendas por operarem com matéria prima com menor teor de fibra e aumento no volume esmagado por unidade de tempo.¹¹

A queima da palha da cana-de-açúcar é responsável por grandes emissões de gases e partículas para a atmosfera. Ante esta situação, surge a necessidade de algumas medidas de controle de emissão destes compostos para a atmosfera. O projeto ambiental "Etanol Verde" baseado na Lei Estadual 11.241 de 2002 estabelece o fim da queima da cana-de-açúcar em 2021 para áreas mecanizáveis e 2031 para áreas não mecanizáveis. E mais recente em 2009 a Secretaria de Estado do Meio Ambiente (SEMA) firmou um acordo inédito por meio de um protocolo entre o governo do Estado de São Paulo e o setor sucroalcooleiro que estabelece uma antecipação do final da queima em 2014 e 2017 para áreas mecanizáveis e não mecanizáveis respectivamente.

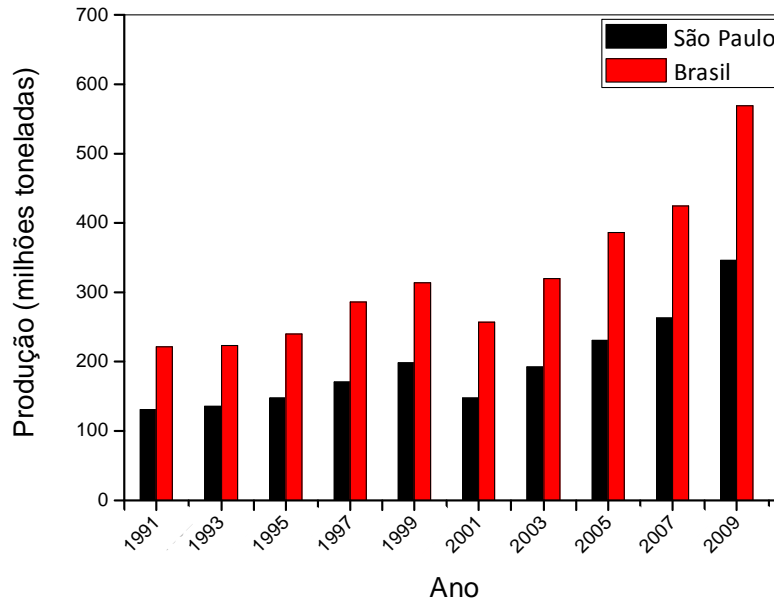


Figura 1. Produção de cana-de-açúcar (milhões de toneladas) no Brasil e em São Paulo no período de 1990-2009 (União da Indústria de Cana-de-açúcar (UNICA)¹², 2011)

Segundo o Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE)¹³, na cidade de Ribeirão Preto houve uma redução de 13% na queima da palha da cana antes da colheita em 2011. As massas provenientes da queima da palha da cana-de-açúcar são assim descrita pela Secretaria de Estado do Meio Ambiente:

“No Brasil, para cada tonelada de cana-de-açúcar são queimados 140 kg de palha, e, considerando a metodologia da Agência Ambiental dos Estados Unidos, para cada tonelada de cana queimada verifica-se a emissão de 3 kg de material particulado, 35 kg de monóxido de carbono e 5 kg de hidrocarbonetos.”¹⁴

Durante o período de safra da cana-de-açúcar (abril a novembro) no estado de São Paulo, a queima da palha da cana-de-açúcar tem uma

contribuição significativa no material particulado (incluindo concentrações entre 15 a 200 $\mu\text{g m}^{-3}$ em um total de 24 horas). Porém, durante o restante do ano, ou seja, no período de entressafra, a contribuição da queima é menor.¹⁵

Apesar das medidas de redução da prática da queima da palha da cana-de-açúcar no estado de São Paulo, esta ainda continuará a ser queimada no restante do país, e o “bagaço” continuará a ser queimado em usinas para geração de energia.

O nível de poluição atmosférica é medido pela quantidade de substâncias poluentes presentes no ar. A variedade das substâncias que podem ser encontradas na atmosfera é muito grande, portanto, a utilização de marcadores químicos emitidos por fontes específicas se torna importante para identificação da fonte de emissão e sua contribuição nos níveis de poluição.

1.5. Marcadores de queima de biomassa – levoglucosano

Uma das principais fontes de emissão de material particulado na atmosfera de regiões tipicamente canavieiras do estado de São Paulo é a queima de biomassa pois a queima da palha da cana-de-açúcar na época de safra (abril- novembro) ainda é muito praticada.

O íon potássio é utilizado como marcador da queima de biomassa^{16, 17}, porém sua aplicação é limitada. O potássio também é proveniente de outras fontes como indústrias, água marinha e nas regiões canavieiras tem-se a aplicação de potássio como fertilizante, o que dificulta identificar sua origem, existindo assim a necessidade de se utilizar um novo marcador.

Para diferentes fontes de carbono que é emitido para a atmosfera existe uma variedade de compostos orgânicos que foram propostos como marcadores de poluição ¹⁸. Dentre eles o monossacarídeo levoglucosano (1,6-Anidro-β-D-Glucopiranoose)¹⁹, é um marcador específico para queima de biomassa, pois é liberado durante a pirólise da celulose em temperaturas acima de 300°C²⁰ (Figura 2). Este é bastante estável na atmosfera quando exposto a condições ambientais e à luz solar, sendo que sua estabilidade foi confirmada pela sua presença em regiões polares. ²¹

Os monossacarídeos são gerados durante a combustão e pirólise de celulose e hemicelulose e são uma importante classe de compostos nos aerossóis orgânicos. ²² Outra possível fonte de emissão de levoglucosano se dá pela pirólise de carboidratos e amido, porém suas concentrações são negligenciáveis porque o processo de queima desses precursores ocorre em baixas temperaturas. A combustão de materiais que não sejam de biomassa, como combustíveis fósseis, ou biodegradação e hidrólise da celulose não produzem levoglucosano. ²³

Dado o exposto acima, pode-se afirmar que levoglucosano tem como única fonte a queima da celulose.

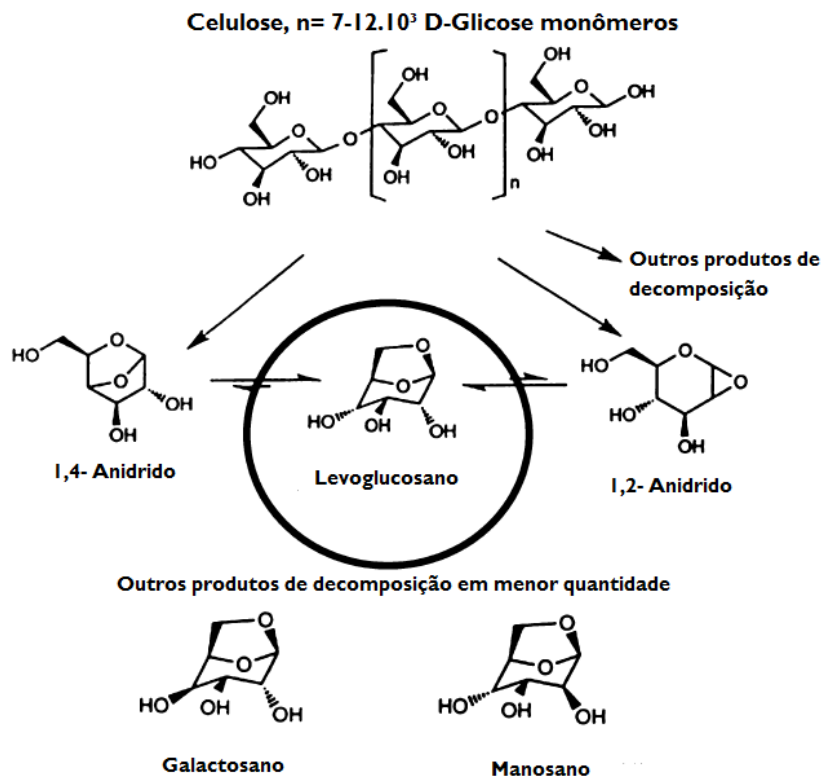


Figura 2. 1,6-Anidro- β -D-Glucopiranos (levoglucosano – em destaque) é um produto abundante da combustão da celulose em temperaturas acima de 300 °C. Os estereoisômeros do levoglucosano, galactosano e manosano também são mostrados. (Extraído de Simoneit et al. ¹⁸)

Este monossacarídeo é emitido em concentrações muito maiores (2 - 3 ordens de magnitude) do que outros possíveis marcadores da queima de biomassa, facilitando sua quantificação ¹⁸. A eficiência na formação deste composto depende da intensidade da chama, da aeração, da duração e temperatura do fogo e do tipo de vegetação queimada. O percentual de levoglucosano formado com relação à concentração total de componentes analisados na fumaça, proveniente da queima controlada de espécies representativas da vegetação da floresta amazônica, variou de 10 a 92% para gimnospermas, de 20 a 100% para angiospermas e de 22 a 100% para gramíneas ¹⁸.

Na Amazônia, durante a estação seca, as concentrações de levoglucosano no material particulado (MP_{2,5}) variaram de 0,08 a 5,9 µg m⁻³, caindo abaixo do limite de detecção durante a estação chuvosa, quando há menor número de focos de incêndio ²⁴.

Durante o período da queima de palha de trigo na China, foi determinada concentração de levoglucosano 4,0 µg m⁻³. Além do levoglucosano outros açúcares também foram encontrados, porém em menores proporções como a glicose 186 ng m⁻³, arabitol 195 ng m⁻³, manitol 123 ng m⁻³ e outros. ²⁵

Kleeman et al.²⁶ verificaram que o levoglucosano foi a substância orgânica mais abundante encontrada em partículas finas (1,8 µm) e ultrafinas (0,1 µm) de vários tipos de madeira, produzindo até 150 mg de levoglucosano por quilograma de madeira queimada.

Na cidade de Lausceston na Austrália, a concentração média de levoglucosano no material particulado fino (< 10 µm) com origem da queima de madeira foi de 133 ± 22 mg g⁻¹ ¹⁹.

Concentrações semelhantes foram observadas para partículas totais em suspensão, no entanto, durante o verão as concentrações - em ambos os tamanhos de partículas - caíram para cerca de 10% ¹⁹.

As concentrações de levoglucosano no MP_{2,5} medidas a partir de combustíveis foliares (de 2,8 a 3,6 mg g⁻¹) foram inferiores àquelas obtidas pela queima de madeira, mas ainda muito acima da concentração de outros mais de 100 compostos orgânicos avaliados individualmente ²⁷. Esses resultados foram confirmados por Jordan et al. ¹⁹ que observaram uma concentração

relativamente baixa de levoglucosano durante um incêndio florestal na Austrália.

A determinação do monossacarídeo levoglucosano por GC-MS ²⁸, em amostras de água de chuva ^{24,29}, permite identificar a origem pirogênica do aerossol, imprescindível para avaliar a correlação entre as espécies químicas presentes na atmosfera rural, tipicamente canavieira, e o clima da região.

1.6. Métodos analíticos para a determinação de levoglucosano em amostras ambientais

Diversas são as técnicas analíticas para determinação de levoglucosano e seus isômeros em amostras ambientais: cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) ^{30,31,32} cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas bidimensional (GC-MS-MS) ³³; cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (GC-FID) ³⁴; cromatografia líquida de troca iônica com detector de pulso amperométrico (IC-HPLC-PAD) ³⁵, cromatografia líquida de exclusão iônica com detector de arranjo de diodos (IEC-HPLC-PDA) ²⁴ dentre outras técnicas (Tabela 2).

Tabela 2. Métodos analíticos para determinação de levoglucosano e seus isômeros em amostras ambientais.

Preparo de Amostra	Técnica Analítica	LOD (LOQ) (µg/ml)	Referência
Extração sólido-líquido e SPE.	IEC-HPLC-PDA	0.5 (1.0)	Schkolnik et al. ²⁴
Extração sólido-líquido.	IC-HPLC-PAD	Não consta	Bauer et al. ³⁵

Tabela 2 continua...

Continuação da **Tabela 2.**

Extração sólido- líquido.	H NMR	Não consta	Decesari et al. ³⁶ Graham et al. ³¹
Extração sólido- líquido.	ESI-MS + HPLC- PAD	0.06	Gao et al. ³⁷
Extração sólido- líquido.	GC-MS	Não consta	Simoneit and Elias ³⁰
Extração sólido- líquido.	GC-MS	(0.34)	Graham et al. ³⁸
Extração sólido- líquido.	GC-MS-MS	Não consta	Pashynska et al. ³³
Extração sólido- líquido.	GC-FID	Não consta	Zdrahal et al. ²⁹
Extração sólido- líquido.	GC-MS	0.1	Simpson et al. ³²
Extração sólido- líquido.	HPLC-ESI-HRMS	0.03	Dye and Yittry ²²
Extração sólido- líquido.	ESI-MS-MS	Não consta	Palma et al. ³⁹
Extração sólido- líquido.	CE-PAD	2.7	Garcia et al. ⁴⁰

1.6.1. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

A cromatografia gasosa tem sido ser empregada na determinação de levoglucosano em amostras ambientais devido ao seu elevado grau de desenvolvimento e especificidade de seus detectores.^{41, 42}

O mecanismo de separação se baseia na migração diferencial das substâncias de uma amostra entre uma fase estacionária (sólida ou líquida) e

uma fase móvel (gasosa). A técnica de cromatografia gasosa tem como característica elevada resolução, possui baixos limites de detecção, chegando a 10^{-12} g, e em alguns casos, a 10^{-14} g, dependendo do detector empregado, possui capacidade de separação de dezenas de substâncias presentes de uma amostra em uma única corrida cromatográfica. Os compostos a serem separados devem ser termicamente estáveis e voláteis (compostos não voláteis podem adquirir tal característica através de uma reação orgânica de derivatização).

A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-MS) apresenta-se como uma técnica analítica para análise de compostos em níveis de traços (baixa concentração). Um sistema GC-MS consiste basicamente de um cromatógrafo a gás com uma interface ligada a uma câmara de ionização (formação dos íons), um analisador de massas (separação dos íons de acordo com a relação massa e carga (m/z)) e também um sistema de detecção dos íons formados. O acoplamento da técnica de cromatografia gasosa com a espectrometria de massas oferece vantagens muito atraentes já que a mesma permite além da determinação quantitativa, informações valiosas para determinação estrutural dos compostos analisados. A combinação da cromatografia gasosa com a espectrometria de massas é relativamente simples, quando comparadas ao acoplamento da cromatografia líquida a espectrometria de massas, uma vez que as características de funcionamento do cromatógrafo a gás são suficientemente compatíveis com a necessidade do alto vácuo do espectrômetro de massas.⁴³

Um dos modos mais empregados no acoplamento da espectrometria de massas e a cromatografia gasosa é a ionização por impacto de elétrons (do

inglês, EI – electron impact). Nesse processo de ionização, o composto, em fase gasosa, é bombardeado com elétrons de alta energia (aproximadamente 70 eV), ocorrendo assim a formação de íons. O excesso de energia adquirida pelo íon promove a fragmentação total ou parcial do composto. A ionização por impacto de elétrons conquistou sua popularidade por produzir tanto o íon molecular como seus fragmentos, além de espectros reprodutíveis, estabilidade, fácil operação, ótima sensibilidade, e possuir vastas bibliotecas de espectros. A fragmentação excessiva ou demasiadamente rápida pode conduzir a não observação do íon molecular no espectro, perdendo-se assim uma das mais importantes informações analíticas oferecidas pela técnica.⁴³

1.7. Técnicas de preparo de amostras

1.7.1. Técnicas Convencionais

Dentre as etapas do método cromatográfico para análise de levoglucosano, destacamos o preparo da amostra, onde os interferentes da matriz são eliminados e o analito, presente quase sempre em níveis de traços, é concentrado em alíquota de solvente orgânico ou em fase extratora (sorvente). Desta forma, o preparo da amostra aumenta a seletividade e sensibilidade analítica dos métodos.

1.7.1.1. Extração líquido-líquido (LLE, “*Liquid-Liquid Extraction*”)

A **LLE** (Figura 3), baseada no equilíbrio de partição, apresenta desvantagens, tais como: consumo de solventes orgânicos de alta pureza, exposição do analista a compostos tóxicos, concentração da fase orgânica, várias etapas para sua execução e formação de emulsão entre as fases, o que resulta na perda do analito. Por isso, há uma busca pela utilização de técnicas de preparo de amostras mais rápidas e que consumam menores quantidades de solventes orgânicos. ⁴⁴

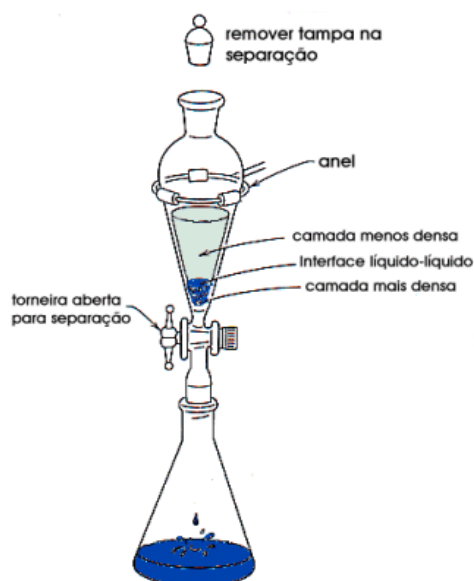


Figura 3. Sistema de extração líquido-líquido (LLE). (Extraído de ⁴⁵)

1.7.1.2. Extração em fase sólida (SPE, “Solid Phase Extraction”)

Um método analítico para determinação de micropoluentes deve ser rápido, de fácil execução, eficiente, requerer baixas quantidades de reagentes e amostras, proporcionar certo grau de seletividade para evitar etapas para a eliminação de interferentes.

A extração em fase sólida (SPE) é uma técnica de preparo de amostra seletiva, a qual permite a extração, concentração dos analitos (principalmente

não voláteis e semi voláteis) em fase sorvente (cartuchos SPE) e eliminação das impurezas presentes nas amostras. Na SPE os tempos de extração são curtos (aproximadamente 5min), além de uma grande variedade de fases extratoras, resultando em diferentes tipos de interações com os analitos. Este fato favorece a seletividade analítica, possibilitando a automação das análises (extração de várias amostras simultaneamente, Figura 4) e o acoplamento em linha com técnicas cromatográficas.



Figura 4. Sistema a vácuo de Extração em Fase Sólida. (Extraído de ⁴⁶)

Em SPE, o volume de resíduo gerado na forma de solvente orgânico é pequeno (alguns mL) quando comparado a extração líquido – líquido (cerca de 50 vezes menos).

A SPE pode ser usada para três importantes propósitos: extração e/ou concentração do analito, isolamento da matriz e estocagem da amostra. Assim, o primeiro propósito refere-se aos analitos que ficam retidos na fase extratora para posterior eluição, e o segundo, aos que são eluídos diretamente, enquanto as substâncias interferentes ficam retidas, sendo que, nesse caso, tem-se o *clean-up* da amostra e não a concentração do analito. Em geral, os procedimentos de extração em fase sólida contêm quatro etapas: 1) condicionamento do sorvente com solvente adequado para ajustar as forças do

solvente de eluição com o solvente da amostra; 2) introdução da amostra quando ocorre a retenção do analito e as vezes de alguns interferentes; 3) limpeza da coluna para retirar os interferentes menos retidos que o analito, etapa esta conhecida como lavagem com solvente ou *clean-up*; 4) eluição do analito.⁴⁷

O solvente empregado no condicionamento dependerá do solvente a ser ativado e da matriz a ser processada, optando-se por um solvente com características similares ao solvente no qual a amostra esta dissolvida. O volume da amostra utilizado pode variar de alguns μL a mL. A velocidade de aplicação da amostra pode ser crítica em alguns casos, sendo determinada pela velocidade desejada para análise. Idealmente, essa etapa deve ser lenta com vazão menor que 2 mL min^{-1} .

Na etapa de *clean-up*, deve-se utilizar um solvente que tenha força suficiente para arrastar os interferentes, porem não os analitos. O solvente ideal é o próprio solvente da amostra desde que eles não removam os analitos de interesse. Geralmente, a solução para eluição dos interferentes contém menos solvente orgânico, menor concentração salina ou encontra-se em um pH ideal para eluição apenas dos interferentes.

Para eluir o analito de interesse, deve-se utilizar um volume pequeno de eluente, de forma que a solução eluída já se encontre em concentração apropriada para análise; se isso for possível, utilizar um solvente volátil para eluição, de modo que ele possa ser facilmente evaporado e o extrato ressuspendido em um volume pequeno de fase móvel. O eluente deve eluir os analitos de interesse, mas não permitir a eluição dos interferentes que não tenham sido eliminados na etapa anterior, por estarem muito retidos no

sorvente o solvente de eluição deve ter maior força de eluição que o solvente usado na etapa anterior, *clean-up*, o que é obtido aumentando-se a quantidade de solvente orgânico ou a concentração salina ou ainda alterando-se o pH da solução de eluição. Na prática, observa-se que, na forma análoga à LLE, o uso de duas alíquotas do eluente, em vez de uma de volume maior aumenta a eficiência de extração. Na Figura 5, podem ser visualizadas as principais etapas envolvidas na SPE quando o objetivo é isolar e/ou concentrar o(s) analito(s) de interesse.

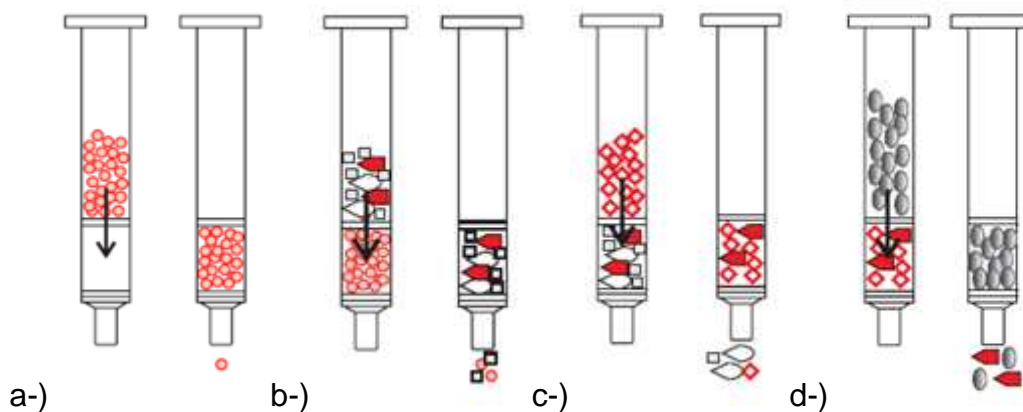


Figura 5. Processo de extração em fase sólida. a-) Condicionamento do cartucho b-) Adição de amostra c-) Eluição de interferentes com solvente fraco d-) Eluição do analito com solvente forte. (Extraído de ⁴⁷)

Em geral, os materiais usados como fase sólida ou sorvente em SPE são similares àqueles empregados em HPLC. A maioria dos sorventes disponíveis comercialmente baseia-se em grupos orgânicos, como C2, C8 e C18, cicloexil, fenil, cianopropil, aminopil, ligados quimicamente à sílica.

1.7.2. Técnicas de Microextração

A química analítica moderna tem sido direcionada para a simplificação através da hifenação de técnicas, miniaturização dos sistemas analíticos, minimização do consumo de solvente orgânico e do volume da amostra. Neste contexto, podemos destacar as técnicas de microextração, as quais não utilizam solvente orgânico. Estas técnicas integram a extração e concentração do soluto em única etapa e permitem a introdução do soluto extraído no sistema cromatográfico utilizando o mesmo dispositivo empregado na extração, reduzindo a perda do soluto e o tempo da análise.

A microextração é definida como técnica de preparo de amostra, onde o volume da fase extratora é bem menor quando comparado ao volume da amostra, apenas uma pequena fração do soluto presente na amostra é extraída. A extração é baseada no processo de partição (solubilidade) do soluto entre a fase aquosa (amostra) e a fase extratora. A extração não é um processo exaustivo, ou seja, quando o equilíbrio de partição do soluto entre as fases é atingido, o aumento no tempo de extração não resulta no aumento da massa de soluto extraída. Quanto maior o coeficiente de partição do soluto, semelhança entre as propriedades físico-químicas do soluto com a fase extratora, maior será a quantidade de soluto extraído. Dentre as técnicas de microextração, podemos destacar a extração sortiva em barra de agitação e a microextração em sorvente empacotado.

1.7.2.1. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE, “*Stir Bar Sorptive Extraction*”)

A extração sortiva em barra de agitação (SBSE), introduzida em 1999, baseia-se no equilíbrio de partição do soluto nas distintas fases presentes no

sistema analítico. No processo SBSE é utilizada uma barra de agitação magnética (pequeno tubo magnético encapsulado com vidro, 10 a 20 mm de comprimento) revestida com 25-125 μL (0,3-1,0 mm espessura) de polidimetilsiloxano (PDMS), (Figura 6). Para evitar a decomposição da fase polimérica em contato direto com o tubo metálico, este é encapsulado com vidro. As extremidades da barra não são revestidas com o polímero.

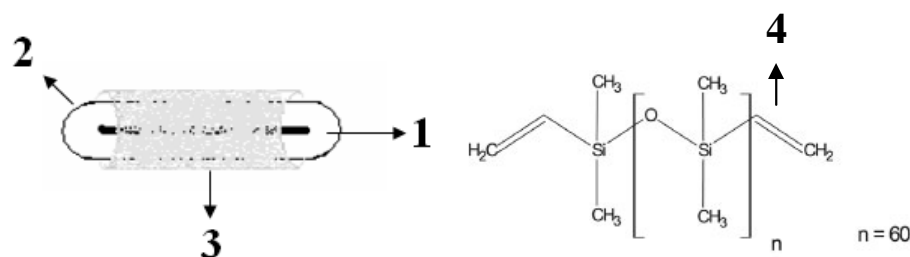


Figura 6. Barra SBSE. 1: tubo magnético, 2: revestimento de vidro, 3: fase extratora, 4: oligômero de PDMS. (Extraído de ⁴⁸)

O PDMS foi selecionado como fase extratora para SBSE, em razão de características específicas, tais como, boa estabilidade térmica, os fragmentos de massas da degradação do polímero são característicos do silicone, os quais podem ser facilmente discernidos com o uso de detector de massas, o mecanismo de extração dos solutos é baseado na absorção (processo de partição), ou seja, os solutos são solubilizados na fase polimérica.

A SBSE é controlada pelo coeficiente de partição dos solutos entre as fases, PDMS e aquosa. O coeficiente de partição tem sido correlacionado com o coeficiente de distribuição octanol/água ($K_{o/w}$). Embora não totalmente correto, o $K_{o/w}$ tem sido utilizado para estimar a eficiência do processo SBSE para um determinado soluto.

Para extrações SBSE, a barra de agitação magnética revestida com PDMS tem sido inserida diretamente na amostra (DI) ou no *headspace* do

frasco e agitada até atingir o equilíbrio de partição dos solutos entre a amostra e fase PDMS. Nas extrações DI, o frasco extrator (com tampa rosca) tem sido colocado sobre o agitador magnético e a amostra agitada cerca de 30 a 240 minutos, dependendo do volume de amostra. Após o processo de extração, a barra de PDMS é retirada do frasco, com o auxílio de uma pinça ou de uma haste metálica, enxaguada levemente com água pura e cuidadosamente seca com um lenço de papel macio, para remoção de possíveis moléculas de água, açúcares, proteínas ou outros componentes da amostra não voláteis.

Para as análises de compostos termolábeis ou de alta massa molar, o processo de dessorção SBSE tem sido realizado através da inserção da barra SBSE em um micro tubo contendo alguns μL de fase líquida, fase móvel ou solvente orgânico, com agitação magnética ou em banho de ultrassom, com ou sem controle da temperatura.

1.7.2.2. Microextração em sorvente empacotado (MEPS, “*Micro Extraction Packed Sorbent*”)

A microextração em sorvente empacotado (MEPS) é uma recente técnica no preparo de amostra, desenvolvida em 2004, na Suécia no laboratório de Mohamed Abdel-Rehim. Essa técnica consiste na miniaturização da técnica convencional de extração em fase sólida (SPE), na qual os volumes das amostras e dos solventes foram reduzidos de mililitros para microlitros.⁴⁹

Na MEPS, aproximadamente 1,0 – 2,0 mg de material sólido (sorvente) é empacotado e conectado à agulha de uma microseringa (100 – 250 μL) como um *plug* com filtros de polietileno em ambos os lados⁵⁰ (Figura 7).

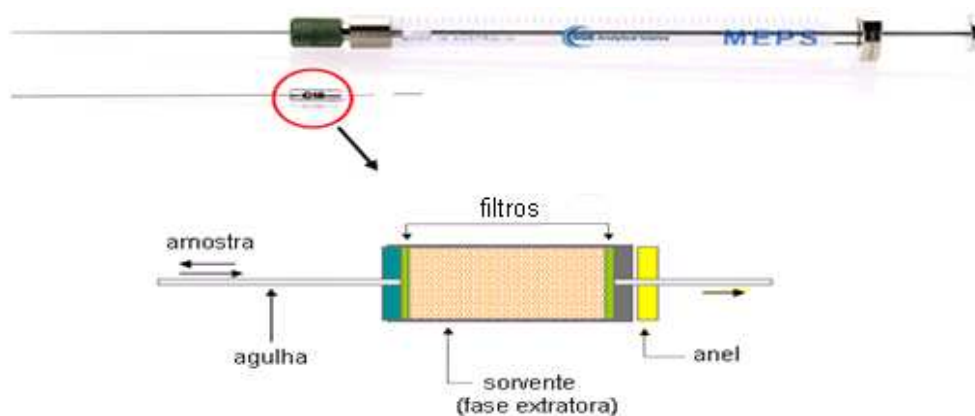


Figura 7. Microseringa utilizada na MEPS (adaptada da referência ⁵⁰).

A técnica de MEPS pode ser acoplada (em linha) às técnicas de separação, cromatografia líquida (LC), cromatografia em fase gasosa (GC) ou à eletroforese capilar (CE), ou seja, os solutos sorvidos na microcoluna (fase extratora) poderão ser eluídos (dessorvidos), durante a etapa de introdução (injeção) da amostra no sistema analítico.

Diferentes fases seletivas de MEPS com diferentes mecanismos de extração, tais como sílica (fase normal), dissilano (C2), octilsilano (C8), octadecilsilano (C18) – fase reversa, trocador de ânions forte (SAX), trocador de cátions forte (SCX) e fase mista (C8 + SCX) estão disponíveis comercialmente. ^{51, 52}

Os materiais sorventes de MEPS, geralmente, apresentam partículas irregulares de aproximadamente 50 μ m e porosidade de 60Å. ⁴⁹

As microcolunas de MEPS podem ser reutilizadas varias vezes, enquanto que as colunas de SPE convencionais, geralmente são utilizadas uma única vez e descartadas. A técnica de MEPS também difere da SPE convencional pelo fato de que a fase extratora é integrada à microseringa e não empacotada em em cartuchos de SPE. ^{51,53}

A microcoluna de MEPS é facilmente conectada à microseringa (Figura 8) e a rotulagem individual da fase extratora assegura seu uso correto nas extrações.⁵⁴



Figura 8. Microseringa MEPS e fase extratora. (Extraído de⁵⁴)

Na MEPS, pelo movimento do embolo da microseringa, os analitos são sorvidos (pré - concentrados) na fase extratora por um ou mais ciclos aspirar/dispensar. Os analitos sorvidos na fase sólida são eluídos com aliquotas de solvente orgânico e diretamente injetados no sistema analítico.

1.8. Validação analítica

A validação de um método analítico inclui todos os procedimentos realizados para garantir a qualidade dos dados gerados. As agências reguladoras do Brasil e de outros países têm estabelecido documentos oficiais que contêm as diretrizes a serem adotadas no processo de validação^{55, 56, 57, 58} que possibilitem a obtenção, de forma clara e objetiva, de evidências de que um método analítico é adequado para o uso desejado. As variáveis utilizadas na validação de métodos são conhecidas como parâmetros analíticos de

validação, tais como: seletividade, linearidade, faixa linear, precisão, exatidão, limite de quantificação e robustez.⁵⁹

1.8.1. Seletividade

Um método analítico é considerado seletivo quando é capaz de produzir respostas para vários analitos, mas também é capaz de distinguir a resposta de um analito da dos outros.⁵⁶ A seletividade avalia o grau de interferência de espécies, como outro ingrediente ativo, substâncias endógenas, impurezas e produtos de degradação, bem como outros compostos de propriedades similares que podem estar presentes na amostra.⁵⁹ A seletividade de um método analítico pode ser avaliada de duas formas:

(A) comparando-se uma amostra de chuva de um período de entressafra com a mesma amostra enriquecida com levoglucosano para verificar a existência de coeluição do analito com possíveis interferentes da matriz;

(B) utilizando-se detectores modernos (arranjo de diodos e espectrômetros de massas) que permitam comparar o espectro do pico obtido na amostra com o espectro do padrão puro.

1.8.2. Linearidade

A linearidade refere-se à capacidade de um método analítico de produzir resultados que sejam diretamente proporcionais à concentração do analito, em uma dada faixa de concentração.⁵⁶

A faixa linear de um método é definida como o intervalo entre os níveis inferior e superior de concentração do analito no qual foi demonstrado ser possível a determinação com precisão, exatidão e linearidade exigidas sob as condições especificadas para o ensaio.⁵⁶

A linearidade é expressa através da correlação entre o sinal medido (área ou altura do pico cromatográfico) e a massa ou concentração da substância a ser quantificada.⁵⁹ Essa correlação pode ser expressa matematicamente como uma equação de reta denominada curva analítica. A estimativa dos coeficientes de uma curva analítica a partir de um conjunto de medições experimentais pode ser efetuada usando o método matemático conhecido como regressão linear.⁵⁹ A equação de reta que descreve uma curva analítica pode ser expressa pela Equação 1

$$y = ax + b \text{ (Equação 1)}$$

onde,

y é a resposta medida (altura ou área do pico)

x é a concentração do analito

a é o coeficiente angular (inclinação da curva)

b é o coeficiente linear (intersecção da curva com o eixo y)

A partir da regressão linear, além dos coeficientes de regressão **a** e **b**, também é possível calcular o coeficiente de correlação **r**. Este parâmetro permite avaliar a qualidade da curva obtida, pois quanto mais próximo de 1,0, menor a dispersão do conjunto de pontos experimentais e menor a incerteza dos coeficientes de regressão estimados.⁵⁹ A ANVISA⁵⁷ recomenda um

coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO⁵⁶, valores acima de 0,90.

As curvas analíticas podem ser construídas utilizando-se os seguintes métodos:

(A) Padronização Externa: compara a área da substância a ser quantificada na amostra com as áreas obtidas com soluções de concentrações conhecidas preparadas a partir de um padrão;

(B) Padronização Interna: consiste na preparação de soluções padrão de concentrações conhecidas da substância de interesse, às quais se adiciona a mesma quantidade conhecida de um composto chamado de padrão interno;

(C) Adição Padrão: é realizada adicionando-se quantidades conhecidas da substância de interesse que está sendo analisada à quantidades conhecidas da amostra, antes de seu preparo.⁵⁹

1.8.3. Precisão

A precisão é um termo geral para avaliar a dispersão de resultados entre ensaios independentes, repetidos de uma mesma amostra, amostras semelhantes ou padrões, em condições definidas.⁵⁶ A precisão é avaliada usualmente pela estimativa do desvio padrão absoluto (s) e através da estimativa do desvio padrão relativo (RSD), também conhecido como coeficiente de variação (CV). Em métodos de análise de traços ou impurezas são aceitos CV de até 20%, dependendo da complexidade da amostra.⁵⁹

O s e o CV podem ser obtidos utilizando-se a Equação 2 e a Equação 3, respectivamente.

$$s = \sqrt{\frac{\sum(x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

(Equação 2)

onde,

\bar{x} é a média aritmética de um pequeno número de medições

x_i é o valor individual de uma medição

n é o número de medições

$$RSD (\%) \text{ ou } CV (\%) = (s / \bar{x}) \times 100 \text{ (Equação 3)}$$

1.8.4. Exatidão

A exatidão de um método é definida como sendo a concordância entre o resultado de um ensaio e o valor de referência aceito como convencionalmente verdadeiro. ⁵⁶

Segundo a ANVISA ⁵⁷, a exatidão do método deve ser determinada após o estabelecimento da linearidade, do intervalo linear e da especificidade do mesmo, sendo verificada a partir de, no mínimo, 9 (nove) determinações contemplando o intervalo linear do procedimento, ou seja, 3 (três) concentrações, baixa, média e alta, com 3 (três) réplicas cada. A exatidão é expressa pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente e a concentração teórica correspondente: (Equação 4):

$$\text{Exatidão} = (C1 / C2) \times 100 \text{ (Equação 4)}$$

onde,

C1 é a concentração média determinada experimentalmente

C2 é a concentração adicionada à amostra (teórica)

1.8.5. Limite de quantificação

O limite de quantificação (LOQ) é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas.⁵⁷

O limite de quantificação pode ser determinado por meio do ruído. Neste caso, determina-se o ruído da linha de base e considera-se como limite de quantificação aquela concentração que produza relação sinal-ruído superior a 10:1, ou por meio da análise de soluções contendo concentrações decrescentes do fármaco até o menor nível determinável com precisão e exatidão aceitáveis. Pode ser expresso pela (Equação 5).⁵⁷

$$\text{LOQ} = 10 \times (s / a) \text{ (Equação 5)}$$

onde,

s é a estimativa do desvio padrão da resposta do coeficiente linear da equação da reta da curva analítica

a é a inclinação ou coeficiente angular da equação da reta da curva analítica

1.4.6. Robustez

Diz-se que um método é robusto quando ele se revelar praticamente insensível a pequenas variações que possam ocorrer quando esse está sendo

executado.⁵⁶ A robustez de um método cromatográfico que se utiliza da cromatografia gasosa pode ser avaliada pela variação de parâmetros como: diferentes lotes ou fabricantes de colunas, temperatura, velocidade do gás de arraste, etc.⁵⁷

2. Objetivos

- Padronização e validação analítica do método SPE/GC-MS para análise de levoglucosano em amostras de água de chuva,

- Aplicação do método para determinação de levoglucosano (marcador específico da queima de biomassa) em amostras de água de chuva na região de Ribeirão Preto. Desta forma pretende-se avaliar a influência da queima de biomassa na composição química da atmosfera de uma região tipicamente canavieira.

3. Parte Experimental

3.1. Reagentes, padrões e materiais

Os solventes orgânicos grau cromatografia utilizados foram os seguintes: metanol da J.T. Baker (Cidade do México, México), o hexano da Mallinckrodt CHEMICALS (Philipsburg, MT, USA) e a piridina da Pierce (Rockford, IL, USA). O padrão de levoglucosano, a fase extratora quitosana de peso molecular médio, o sistema de extração SPE a vácuo, o TMCS (Trimetilclorosilano) e o BSTFA [bis-(trimetilsilil)- trifluoroacetamida] foram

adquiridos da Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA). Já os cartuchos SPE com diferentes fases estacionárias, foram adquiridos da Agilent Technologies (Santa Clara, CA, USA) e os cilindros de gases nitrogênio (5.0 analítico) e hélio (6.0) da White Martins (Sertãozinho, SP, Brasil). A microsseringa de MEPS (250 µL, sorvente Si-OH) utilizada neste trabalho, foi adquirida SGE (Melbourne, Austrália). As barras de agitação magnéticas revestidas com PDMS Twister têm sido adquiridas no comércio, fabricadas por Gerstel GmbH (Mülheim na der Ruhr, Alemanha). A água utilizada nos ensaios foi purificada pelo sistema Milli-Q, Millipore.

As soluções padrões estoque de levoglucosano foram preparadas em metanol com concentrações variando de 0,10 µg mL⁻¹ a 100 µg mL⁻¹, sendo posteriormente armazenadas sob refrigeração, a uma temperatura de 4°C.

3.2. Amostras de água de chuva

As amostras de água de chuva foram coletadas na Universidade de São Paulo – USP, campus de Ribeirão Preto - SP durante a colheita de cana-de-açúcar (período de safra) e nos períodos onde não ocorrem as colheitas (período de entressafra). Todas as coletas realizadas correspondem ao evento todo, ou seja, do início ao término da chuva.

Foi coletado um total de 19 (dezenove) amostras de água de chuva na cidade de Ribeirão Preto-SP, entre o período 03/08/2011 à 09/04/2012. Deste total de amostras, 13 (treze) são do período da safra, ou seja, entre os meses de abril a novembro e 6 (seis) são amostras do período de entressafra, ou seja, entre os meses de dezembro a março.

O sistema de amostragem consiste de dois coletores com diâmetros diferentes e um sensor com sensibilidade para detectar de garoa a chuva (Figura 9). O sistema de amostragem permanece fechado protegendo os frascos de coleta até o momento que o sensor detecta o início da chuva, na sequência o sistema se abre permitindo a coleta do evento, fechando-se novamente, após o período de precipitação. Neste trabalho foi utilizado apenas o coletor de diâmetro maior contendo frascos de vidro âmbar a fim de maximizar o volume de chuva coletado. Após a coleta, a amostra foi pesada para ter seu volume estimado e filtrada com membrana de polietersulfona (PES) de diâmetro 0,2 μm .



Figura 9. Coletor de chuva.

3.3. Extração em fase sólida (SPE)

Para otimização do procedimento SPE foram avaliadas as seguintes variáveis:

- Sorventes polares: sílica, aminosilano, celulose e quitosana.
- Vazão de percolação da amostra e do eluente. (1 ml min^{-1} e 5 mL min^{-1})
- Volume de Amostra. (5,0 e 50,0 mL).
- Força Iônica: adição de sais (NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração 10% m/v)
- Solvente de eluição: metanol e diclorometano-metanol (4:1 v/v)
- Massa do adsorvente quitosana: 0,2 e 1,0g.

As otimizações das variáveis SPE foram realizadas com amostras de água ultrapura enriquecidas com levoglucosano (branco de referência) em diferentes concentrações ($0,05\ \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,50\ \mu\text{g mL}^{-1}$).

3.3.1. Extração em fase sólida com sorvente quitosana

A quitosana (Figura 10), em razão da similaridade de sua estrutura química com a do levoglucosano, foi utilizada com fase sorvente SPE neste estudo. Desta forma, o levoglucosano será extraído (sorvido) na fase de quitosana, através das interações intermoleculares principalmente do tipo ligações de hidrogênio.

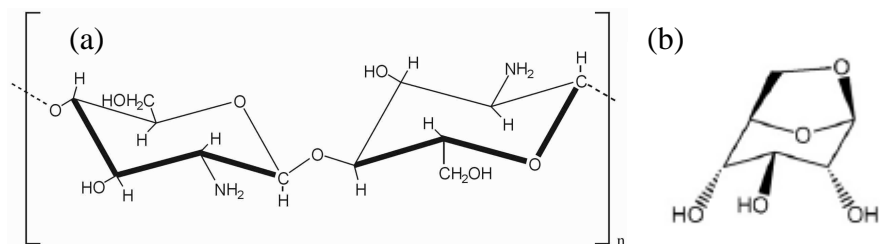


Figura 10. (a) Estrutura da quitosana e do (b) levoglucosano.

Inicialmente, os cartuchos SPE, previamente limpos e secos, foram recheados com fase extratora quitosana. Após este procedimento e condicionamento do cartucho, a amostra foi percolada pelo sorvente, e após a secagem do mesmo, o analito foi eluído com solvente orgânico, como segue detalhado a seguir:

1. Preparo do cartucho SPE com quitosana: Um cartucho de SPE vazio, previamente limpo e seco, foi recheado com quitosana. Antes da adição da quitosana, um *frit* (filtro) foi colocado na parte inferior do cartucho para sustentação da fase extratora e após adição da quitosana, o segundo *frit* foi adicionado na outra extremidade do cartucho. Desta forma, temos um cartucho SPE pronto para extração.
2. Condicionamento do cartucho: Esta etapa é válida para quaisquer cartuchos de SPE, os quais foram condicionados, previamente, com 5,0 mL de metanol e posteriormente com 5,0 mL de água ultrapura.
3. Adição da amostra: As amostras de água ultrapura (5,0 mL, branco de referência) foram enriquecidas com as seguintes massas de levoglucosano: 0,25; 0,50; 1,0; 1,50, 2,00 e 2,50 μg , resultando na faixa de concentração de 0,05 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 0,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Após preparo das amostras enriquecidas, estas foram percoladas através do cartucho SPE recheado com fase extratora quitosana.

4. Secagem do cartucho à vácuo: Por se tratar de uma amostra aquosa, a retirada do excesso de água do sorvente foi necessária, pois posteriormente o levoglucosano será derivatizado, caso exista pequenas quantidades de água este processo será demorado e ineficiente.
5. Eluição do analito: Nessa etapa 2,5 mL de metanol foram utilizados para eluição do levoglucosano.
6. Secagem dos Extratos: Os extratos metanólicos obtidos foram levados à secura sob fluxo de N₂.

As extrações em fase sólida foram realizadas em um sistema a vácuo (Figura 4) com vazão controlada de aproximadamente 1 ou 5 mL min⁻¹.

3.4. Processo de Derivatização do levoglucosano

Os extratos secos obtidos após a etapa de extração SPE, contendo levoglucosano, foram derivatizados para favorecer a detectabilidade nas análises por GC-MS, ou seja, tornando o analito mais volátil e menos polar²⁸. O procedimento de sililação (Figura 11) foi realizado com 30µL de solução de BSTFA [bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida] contendo 1% de TMCS [Trimetilclorosilano] e 10 µL de Piridina em um frasco âmbar com capacidade para 2,0 mL durante 60 min a 70°C. O produto da derivatização foi seco sob fluxo de N₂ em banho de gelo e redissolvido em 40 µL de hexano para posterior injeção, (Figura 12).

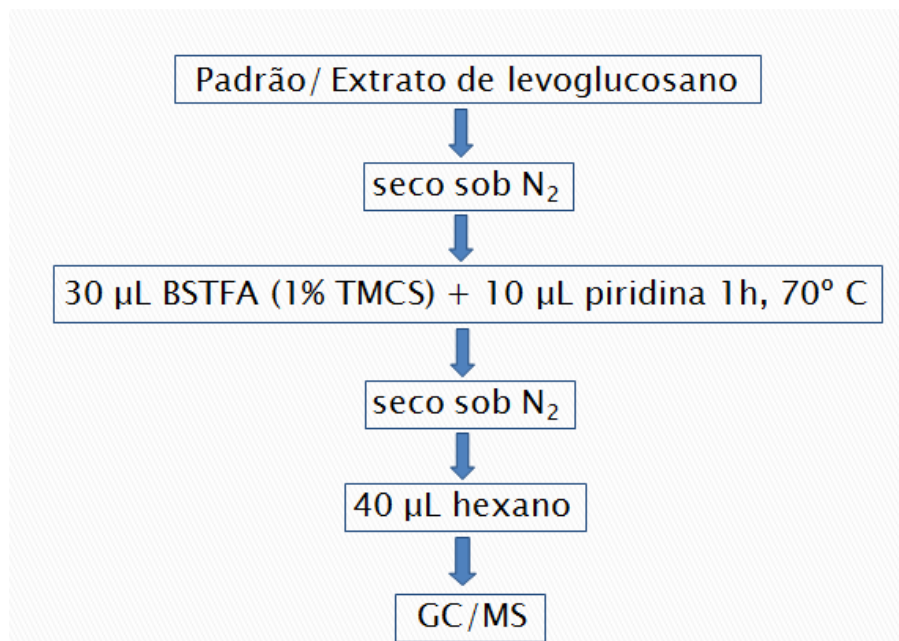


Figura 11. Fluxograma do processo de derivatização do levoglucosano. (Extraído da referência ²⁸).

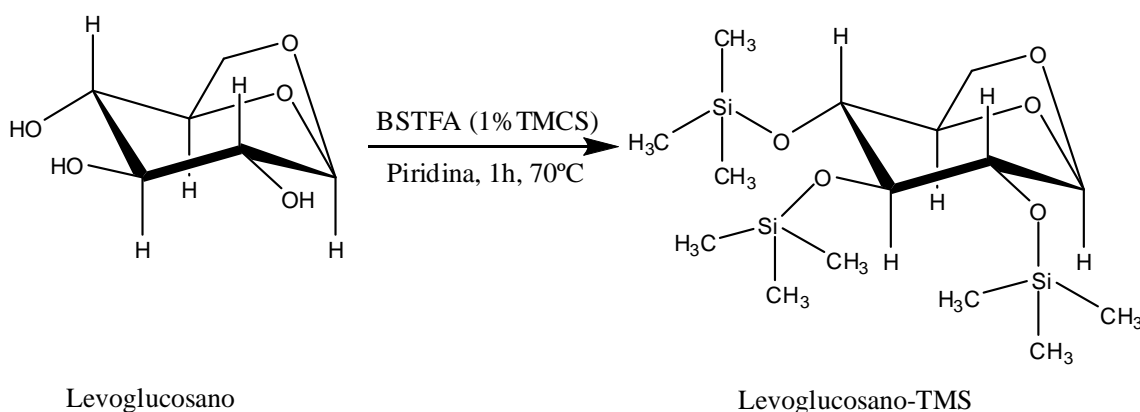


Figura 12. Reação de silição do levoglucosano.

3.5. Análise Cromatográfica - GC/MS

A partir do extrato de hexano obtido, uma alíquota de 1,0 µL contendo levoglucosano foi analisada por GC-MS (GCMS-QP2010 PLUS SHIMADZU) em coluna analítica capilar DB5-MS (5% fenil dimetilpolisiloxano, 30m ×

0,25mm × 0,25µm). As condições cromatográficas foram otimizadas para adequada resolução em pequeno intervalo de tempo. A análise qualitativa, modo SCAN, foi baseada no tempo de retenção do analito (varredura de m/z 50 a 650) e nos espectros de massas (intensidade versus razão massa/carga (m/z)). Já para as análises quantitativas foi utilizado o modo SIM (monitoramento do íon selecionado).

As análises cromatográficas foram realizadas nas seguintes condições: hélio como gás de arraste a uma vazão de 1,31 mL min⁻¹, temperatura do injetor (modo splitless, 30s) em 280°C e do espectrômetro de massas (fonte de íons e interface) em 230 °C. A temperatura inicial da coluna foi de 60 °C, rampa de 8 °C min⁻¹ até 270 °C, permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. O MS foi operado no modo impacto de elétrons (*EI*), energia de ionização de 70 eV e varredura de m/z 50 a 650 para análises no modo SCAN e selecionando os fragmentos de massa m/z 191, m/z 204 e m/z 217 para análises no modo SIM.

3.6. Validação Analítica do método SPE/GC-MS

Neste trabalho, os parâmetros de validação analítica foram avaliados segundo normas preconizadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA – Resolução RE nº 899) para métodos analíticos.⁵⁷

A validação do método SPE/GC-MS padronizado foi realizada com água ultrapura enriquecida com levoglucosano (branco de referência) em diferentes concentrações. Os parâmetros, linearidade, limite de quantificação, limite de detecção, seletividade, precisão, exatidão foram avaliados.

A faixa linear do método foi avaliada com amostras de água enriquecidas com seis diferentes concentrações de levoglucosano, em uma faixa variando entre 0,05 à 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O coeficiente de correlação linear deve ser igual ou superior a 0,99. A menor concentração da curva analítica representa o limite de quantificação (LOQ) do método desenvolvido.

O limite de quantificação foi estabelecido por meio de análise das amostras de água ultrapura enriquecida com levoglucosano (branco de referência) contendo concentrações conhecidas e decrescentes de levoglucosano até o menor nível quantificável com precisão e exatidão aceitável.

O limite de detecção (LOD), assim como o LOQ, foi estabelecido por meio de análises do branco de referência, contendo concentrações conhecidas e decrescentes de levoglucosano, até o menor nível detectável. Recomenda-se que o LOD seja de 2 a 3 vezes superior ao ruído da linha de base.

A precisão interensaios (ensaios realizados em dias diferentes) foi determinada por ensaios realizados em replicata de amostras de branco de referência enriquecida com o analito em três níveis de concentração (baixa, média e alta). Os coeficientes de variação (CV) destes ensaios devem ser inferiores ou iguais a 20% na menor concentração da curva, ou seja no LOQ e inferiores ou iguais a 15% nas demais concentrações.

Os valores de exatidão foram determinados com amostras de branco de referência enriquecidas com três diferentes concentrações de levoglucosano (baixa, média e alta), contemplando as faixas lineares dos métodos, realizando-se, no mínimo, 6 (seis) determinações por concentração. A exatidão foi

determinada pela relação entre a concentração média determinada experimentalmente (curva analítica) e a concentração teórica correspondente, ou seja, concentração de levoglucosano adicionado à amostra de água ultrapura enriquecida (branco de referência) de acordo com a (Equação 4).

Os desvios da exatidão não devem exceder 15%, exceto para o limite de quantificação, para o qual se admite desvios inferiores ou iguais a 20%.

4. Resultados e Discussão

4.1. Análise Cromatográfica- GC-MS

A Figura 13 ilustra um cromatograma típico das análises realizadas do padrão levoglucosano, na concentração de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, por GC/MS, no modo SCAN.

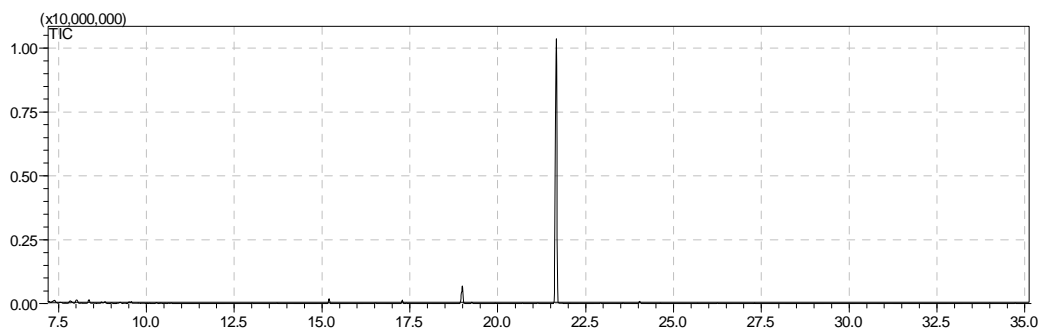
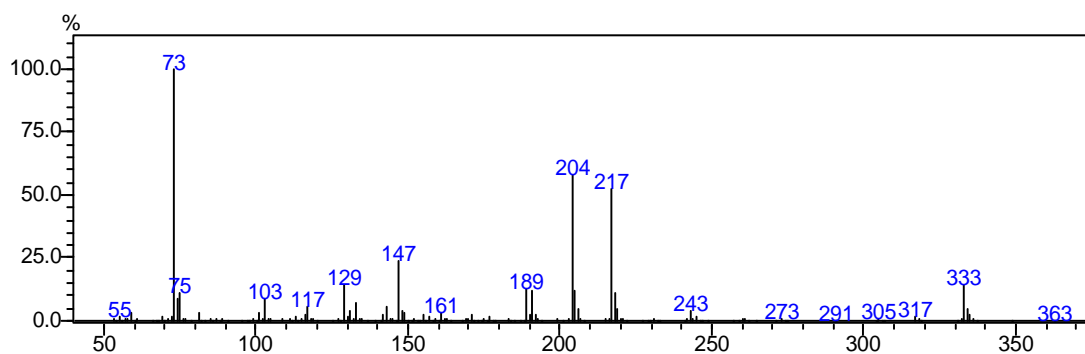


Figura 13. Cromatograma do levoglucosano na concentração $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $t_r = 21,7$ min.

O espectro de massas do produto obtido da derivatização foi comparado com os espectros de massas da literatura e da biblioteca NIST 05. O composto do produto da derivatização foi atribuído como sendo o levoglucosano – TMS (levoglucosano trimetilsilano), Figura 14.

(A)



(B)

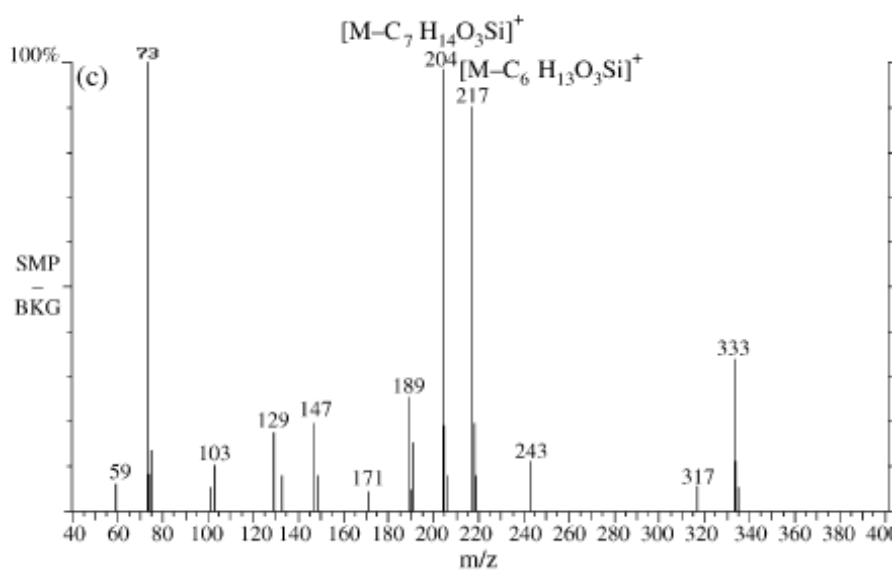


Figura 14. Espectros de Massas do levoglucosano-TMS, m/z 378. (A) Produto da derivatização obtido e (B) espectro de massas do levoglucosano-TMS da literatura. (Extraído de referência ²⁸⁾)

4.2. Otimizações das variáveis SPE

4.2.1. Fases Extratoras

Considerando a elevada polaridade do composto levoglucosano devido aos grupos hidroxila, diferentes sorventes polares, tais como sílica,

aminosilano, celulose e quitosana foram avaliadas como fases extratoras. (Figura 15)

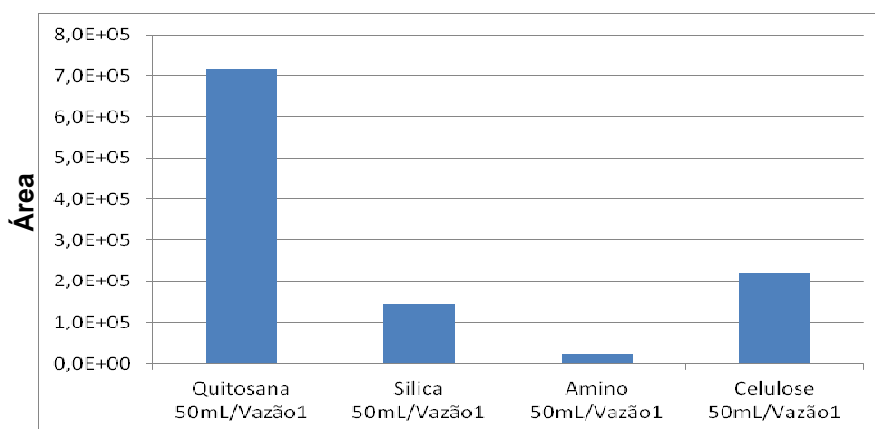


Figura 15. Avaliação das fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE (1,0 g) na eficiência da SPE. Amostra com 50 mL de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$, eluição: metanol (2,5mL) a uma vazão aproximada de percolação e eluição da amostra igual a 1mL min^{-1} . Para cada análise $n = 3$.

A quitosana apresentou as melhores taxas de extração (SPE), (Figura 15). O sorvente quitosana apresenta sítios de alta polaridade, tanto com grupos amino similares ao da fase aminosilano, quanto com os grupos hidroxilas das fases sílica e celulose, que favoreceram a extração.

4.2.2. Vazão de percolação da amostra e do eluente

Outro fator importante que afeta o rendimento da extração em SPE é a vazão de percolação da amostra, bem como a vazão de eluição do analito do cartucho SPE. Considerando esse fato, decidimos investigar a interferência da vazão na recuperação do levoglucosano em diferentes fases extratoras para cartuchos SPE. (Figura 16)

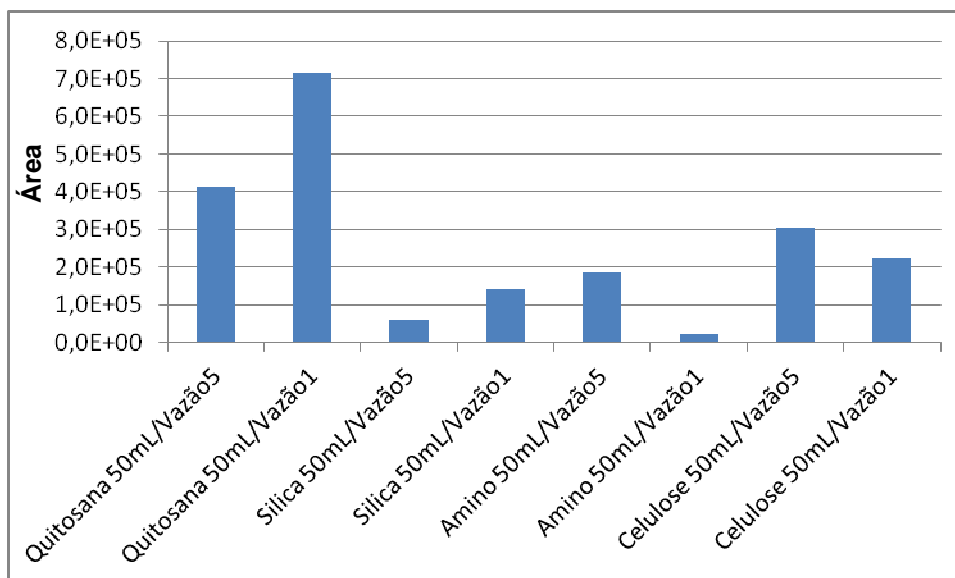


Figura 16. Avaliação da vazão de percolação e eluição do analito. Amostra de 50 mL de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,02 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE (1,0 g) com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise $n = 3$.

Em vazão reduzida, a interação entre o analito e a fase sorvente é mais intensa. As interações entre os sítios ativos das fases extratoras quitosana e sílica com o levoglucosano foram mais eficientes para vazão aproximadamente igual a $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, que consequentemente melhora o rendimento da extração. Por outro lado, devemos também levar em consideração o equilíbrio do analito com a água, pois esse maior tempo de contato entre o analito e fase sorvente resulta em uma redissolução do analito na água, gerada pela forte afinidade do mesmo com o solvente que esta sendo percolado, fato observado para as fases extratoras amino e celulose. (Figura 16)

4.2.3. Volume de Amostra

Uma vez analisando um carboidrato como o levoglucosano, devemos esperar uma elevada solubilidade do composto em água. Como o presente trabalho tem o objetivo de analisar tal analito em uma matriz aquosa, devemos levar em consideração que o volume da amostra percolada pode afetar os resultados de recuperação do levoglucosano na extração SPE, por isso foi avaliado o volume da amostra em vazões fixas. (Figura 17 e Figura 18)

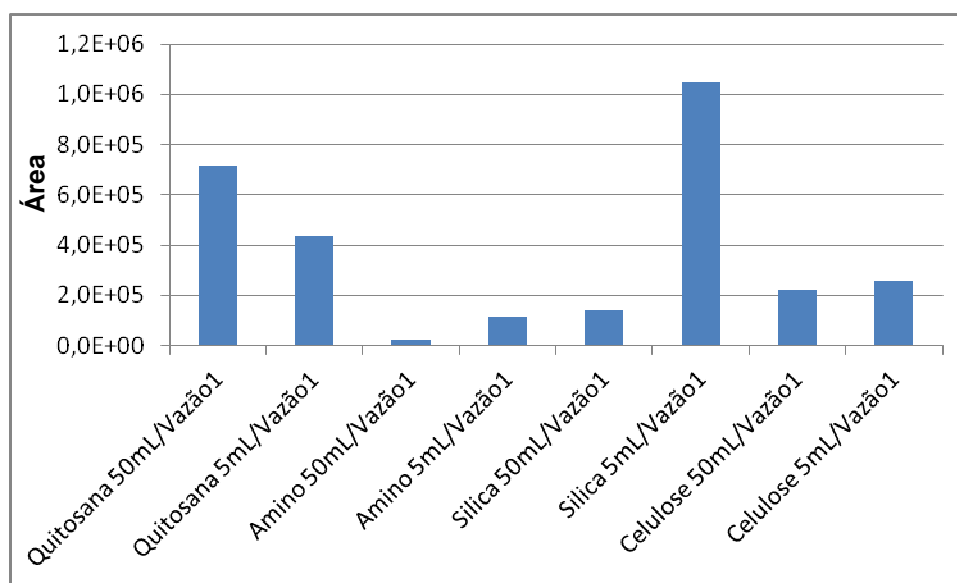


Figura 17. Avaliação do volume de amostra percolada através do cartucho SPE. Amostra percolada a uma vazão fixa de 1 mL min^{-1} . Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (para volume de amostra igual a $5,0\ \text{mL}$) e $0,02\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (para volume de amostra igual a $50,0\ \text{mL}$). Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE ($1,0\ \text{g}$) com metanol de solvente de eluição ($2,5\text{mL}$). Para cada análise $n=3$.

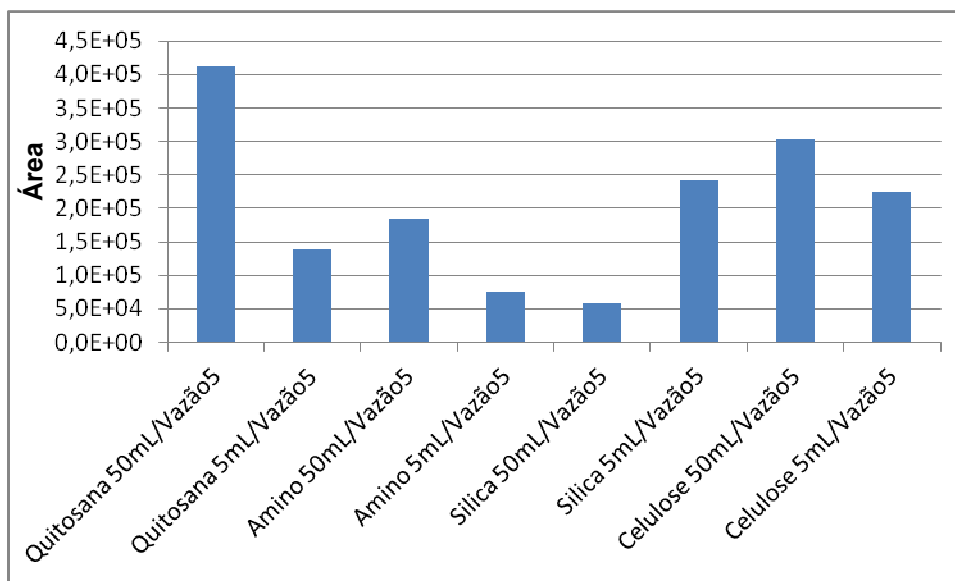


Figura 18. Avaliação do volume de amostra percolado através do cartucho SPE. Amostra percolada a uma vazão fixa de 5 mL min^{-1} . Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,2\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (para volume de amostra igual a $5,0\ \text{mL}$) e $0,02\ \mu\text{g mL}^{-1}$ (para volume de amostra igual a $50,0\ \text{mL}$). Fases extratoras QUITOSANA, SÍLICA, AMINO e CELULOSE ($1,0\ \text{g}$) com metanol de solvente de eluição ($2,5\ \text{mL}$). Para cada análise $n = 3$.

Como esperado, um elevado volume de amostra faz com que o levoglucosano adsorvido nos sítios ativos das fases extratoras amino, sílica e celulose seja desorvido posteriormente, resultado de sua forte interação com a água. Tal fato não foi observado para a fase quitosana, que por apresentar sítios ativos do tipo hidroxila e amino adsorvem melhor e mais eficientemente o composto. (Figura 17)

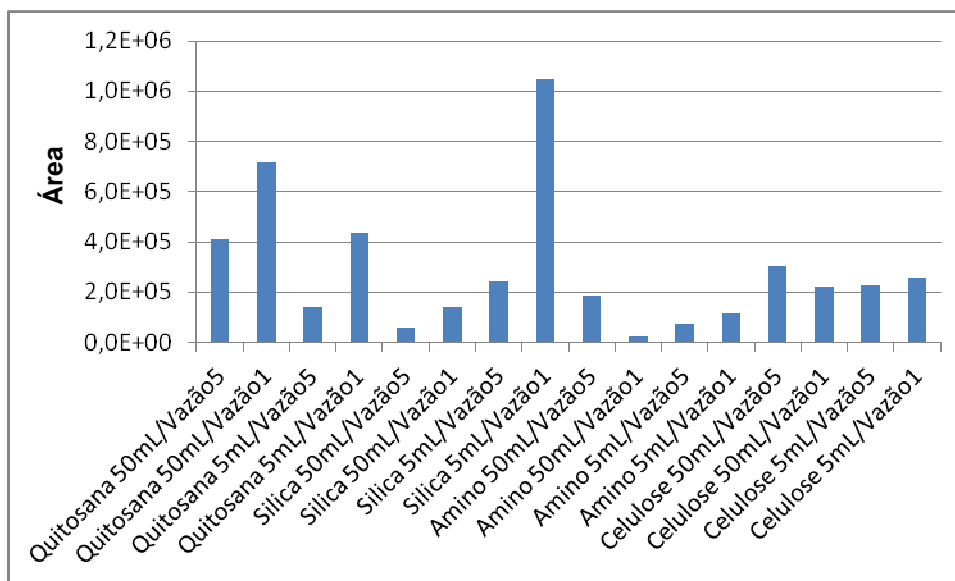


Figura 19. Figura comparativa dos resultados obtidos com as otimizações das variáveis SPE. (fase extratora, vazão e volume de amostra)

Segundo os resultados obtidos na otimização das variáveis SPE, o sorvente sílica apresentou as maiores taxas de extração (Figura 19). No entanto, a quitosana foi selecionada para as análises posteriores, por se tratar de um sorvente nunca antes utilizado como fase extratora em SPE e cartucho “*made in lab*”. Esse cartucho diminuiu o custo das análises SPE. Além destes fatos, o método SPE/GC-MS com a fase quitosana apresentou sensibilidade analítica adequada para a determinação de levoglucosano em amostras de água de chuvas.

Para os sorventes sílica e quitosana, observamos que extrações realizadas em baixas vazões ($1,0 \text{ mL min}^{-1}$) resultaram em maiores taxas de extração. Já quanto ao volume de amostra de água, para a quitosana, sorvente selecionado, a eficiência da extração foi maior quanto maior o volume da amostra. Porém, quando trabalhamos com volumes elevados, no caso 50 mL de amostra, a uma vazão de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, o tempo total de percolação da amostra foi de 50 minutos. Este tempo é considerado longo para a etapa do

preparo da amostra. Sabemos também que em alguns eventos de chuva cujo volume é pequeno, as concentrações de levoglucosano são mais elevadas (tal assunto será discutido posteriormente, quando tratarmos das análises das amostras de água de chuvas). Em razão destes fatos, o volume de 5,0 mL de amostra foi selecionado para ensaios posteriores.

4.2.4. Força Iônica

A influência da força iônica da amostra, efeito *salting out*, na eficiência da extração SPE (fase quitosana) também foi avaliada. Os sais, NaCl e $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ na concentração de 10%, foram adicionadas às amostras de água enriquecidas com o padrão levoglucosano. Para as análises com a adição de NaCl às amostras, em razão de seu coeficiente de solubilidade em água (35,9 g/100 mL; 25°C), observamos a cristalização do sal tanto no sistema de extração SPE (obstrução das conexões) quanto no frasco de derivatização, tornado a reação de sililação, que ocorre em 40 µL de solvente, inviável. Para as análises SPE/GC-MS realizadas com adição de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ às amostras de água, observamos diminuição das taxas de extração, Figura 20. Provavelmente o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ligou-se à quitosana (atração eletrostática), diminuindo os sítios ativos disponíveis do sorvente.

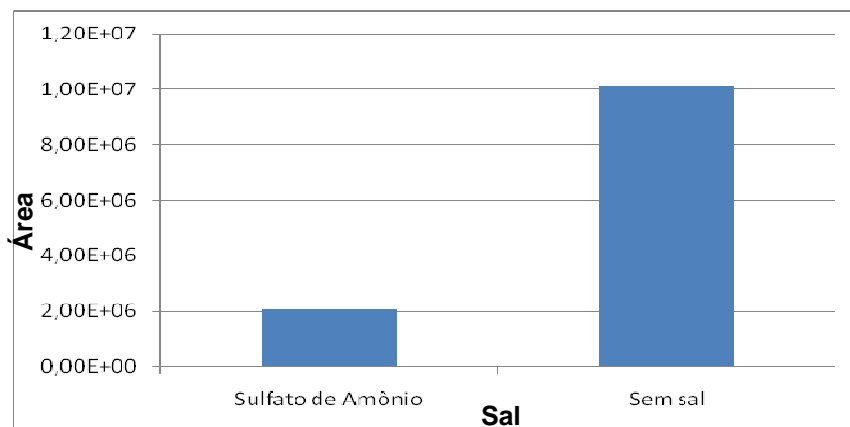


Figura 20. Avaliação da força iônica da amostra na eficiência da extração SPE com quitosana (1,0g). Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise $n = 3$.

4.2.5. Solvente de Eluição

O solvente metanol e a mistura dos solventes metanol e diclorometano: metanol (4:1 v/v) foram avaliados na eluição do levoglucosano, Figura 21. O metanol, em razão de sua maior polaridade apresentou as maiores taxas de extração.

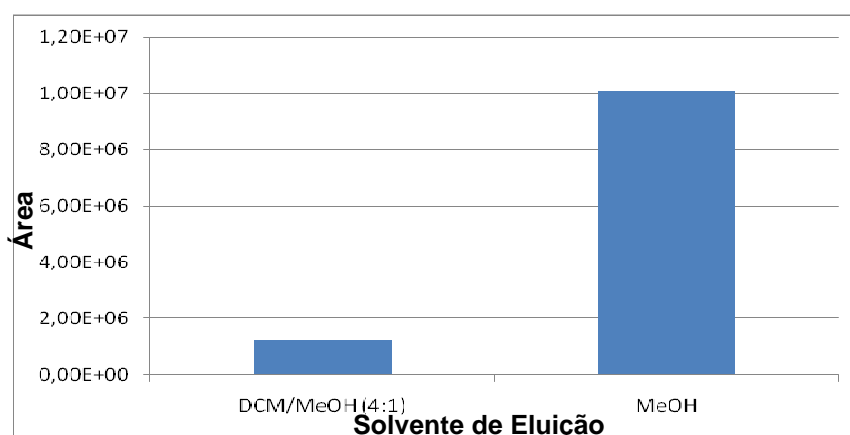


Figura 21. Avaliação do solvente de eluição na extração SPE com quitosana (1,0g). Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$

e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise $n = 3$.

A mistura metanol e diclorometano: metanol (4:1 v/v) foi utilizada uma vez que as extrações de levoglucosano em filtros de papel tiveram ótimos rendimentos com esse tipo de solvente de eluição.

4.2.6. Massa de adsorvente

A massa de adsorvente também foi avaliada. Para tal teste foram utilizados dois valores de massa de quitosana, 0,2g e 1,0g, os melhores resultados foram obtidos com cartuchos SPE recheados com 1,0g de quitosana, Figura 22.

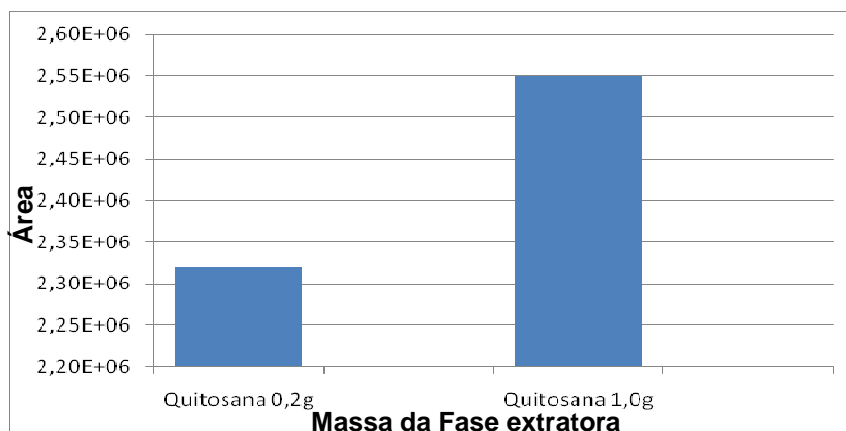


Figura 22. Avaliação da massa de adsorvente quitosana na eficiência da SPE. Amostra de água (branco de referência) enriquecida com levoglucosano na concentração de $0,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ e percolada a uma vazão fixa de 5mL min^{-1} , com metanol de solvente de eluição (2,5mL). Para cada análise $n = 3$.

O número de sítios ativos de quitosana aumenta juntamente com sua massa. Assim sendo, ocorre maior número de interações entre o analito e a fase estacionária, proporcionando melhor rendimento de extração SPE.

As melhores condições SPE dentre as avaliadas foram as seguintes: cartuchos SPE recheados com a fase extratora quitosana (1,0 g), volume de amostra igual a 5,0 mL, vazão de 1,0 mL min⁻¹, solvente de eluição: metanol (volume igual a 2,5 mL) sem a adição de sal.

4.2.7. Outras técnicas de extração

Outras técnicas de preparo de amostra, tais como as técnicas de microextração: extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e microextração em sorvente empacotado (MEPS, fase extratora de sílica) foram também avaliadas para a determinação de levoglucosano em amostras de água. Os estudos com SBSE foram realizados com diferentes tipos de fases extradoras, dentre elas se destacam PDMS/50% metil, 50% fenil polisiloxano (OV – 17 – 50%) e PDMS/OV – 17OH (35%), 65% de fenil polisiloxano e 35% de hidroxila. No entanto, ora em razão do pequeno volume das fases extradoras, ora pela baixa polaridade das fases sorventes não foi possível obter resultados satisfatórios.

4.3. Validação Analítica do método SPE/GC-MS

A validação do método SPE/GC-MS foi realizada para a minimização de erros, para assegurar a máxima qualidade do trabalho analítico e, conseqüentemente, a obtenção de resultados laboratoriais confiáveis.

4.3.1. Seletividade do método SPE/GC-MS

A seletividade do método SPE/GC-MS desenvolvida neste trabalho é demonstrada pelo cromatograma representativo da amostra de água ultrapura enriquecida com o padrão levoglucosano (branco de referência) juntamente com uma amostra de chuva enriquecida com o analito na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ Figura 23.

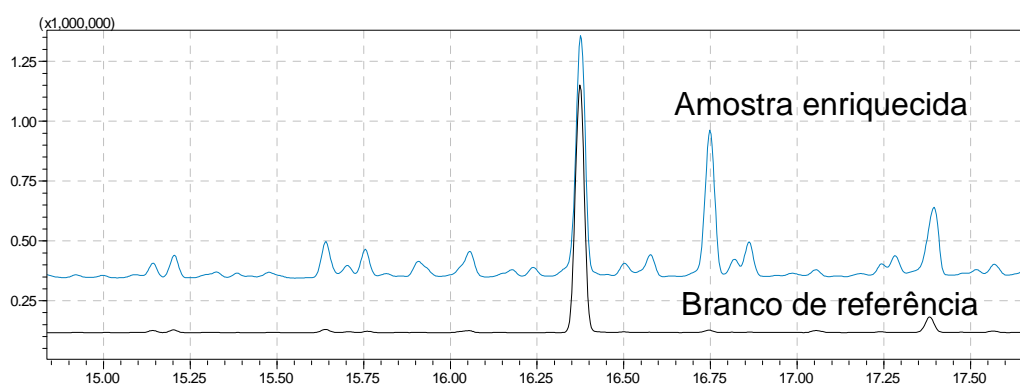


Figura 23. Cromatogramas das amostras de água ultrapura (branco de referência) e de chuva, ambas enriquecidas com levoglucosano na concentração de $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Como se pode observar no cromatograma da Figura 23, os compostos endógenos da amostra de chuva (impurezas, compostos de degradação ou componentes da matriz) não coeluíram com o levoglucosano.

4.3.2. Linearidade do método SPE/GC-MS

A linearidade do método SPE/GC-MS, desenvolvido neste trabalho, corresponde ao intervalo de concentração onde os resultados obtidos foram diretamente proporcionais às concentrações dos analitos nas amostras de

água ultrapura enriquecida com levoglucosano, com coeficiente de correlação (r) superior a 0,99 (Figura 24).

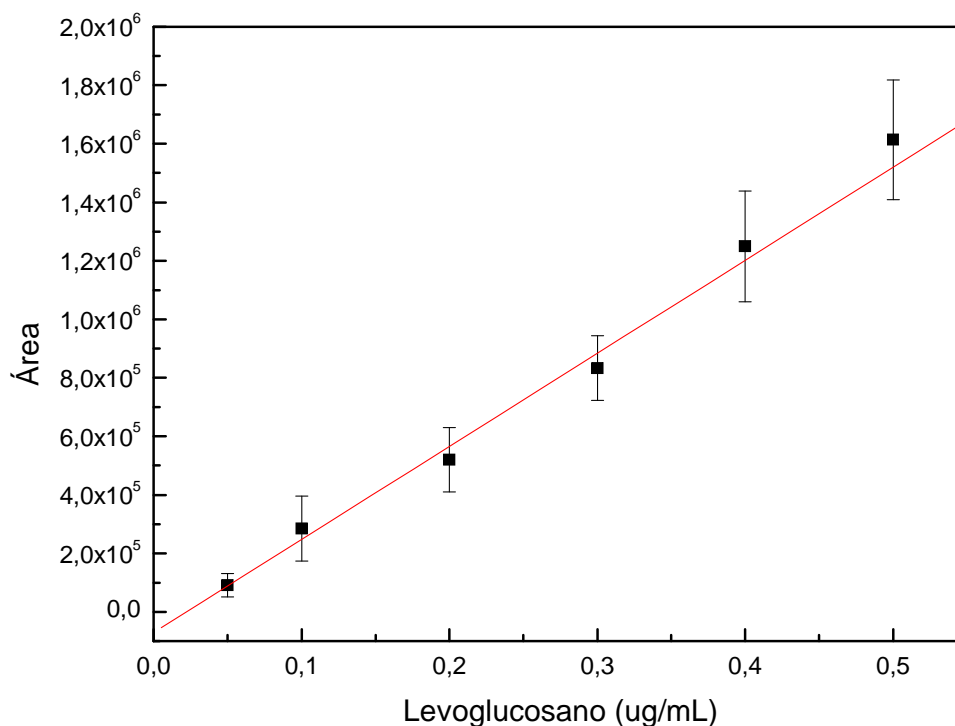


Figura 24. Curva analítica do método SPE/GC-MS no modo SIM (m/z 191, 204 e 217).

O método SPE/GC-MS para a determinação de levoglucosano em amostras de águas de chuva apresentou faixa linear no intervalo de concentração de $0,05 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $0,50 \mu\text{g mL}^{-1}$, onde cada ponto (concentração) da curva analítica foi realizado em replicata ($n=6$), com $r \geq 0,9967$ (Tabela 3).

Tabela 3. Linearidade e coeficiente de correlação do método SPE/GC-MS para análise de levoglucosano em amostras de água de chuva.

Modo de Análise (faixa de concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$)	Equação da reta (LOQ = 50 ng mL^{-1})	r
SIM (0,05; 0,1; 0,20; 0,30; 0,40 e 0,50)	$y = -70084,07 + 3,18\text{E}6.x$	0,9967

A Tabela 3 ilustra os parâmetros de linearidade para a metodologia SPE/GC-MS realizada em modo SIM (m/z 191, 204 e 217).

4.3.3. LOQ e precisão interensaios do método SPE/GC-MS

O limite de quantificação (LOQ) do método, para análise de levoglucosano em amostras de água de chuva, foi estabelecido como a menor concentração da curva analítica (50 ng mL^{-1}). A razão sinal/ruído igual a dez (sinal/ruído = 10), precisão interensaios com coeficientes de variação (CV) inferiores ou iguais a 20% e exatidão entre 95 e 110 %.

A precisão interensaios e exatidão ($n = 6$) do método SPE/GC-MS padronizado desenvolvido neste trabalho, foi determinada utilizando amostras de água ultrapura enriquecidas com levoglucosano (branco de referência) em diferentes níveis de concentrações (baixo, médio e alto). Os coeficientes de variação nas três concentrações analisadas foram menores que 20% para o LOQ e inferiores a 15% para os demais pontos analisados. Para os mesmos pontos, os valores de exatidão encontrados estão em uma faixa de 95 a 110 %, mostrando que o método SPE/GC-MS proposto pode ser utilizado na quantificação do levoglucosano em amostras de água de chuvas.

O resumo dos valores dos coeficientes de variação e exatidão obtidos na determinação de levoglucosano em amostras de água ultrapura enriquecida com o analito utilizando SPE/GC-MS é ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4. Precisão interensaios (coeficiente de variação, CV e exatidão) do método SPE/GC-MS para determinação de levoglucosano em amostras de água de chuva.

Analito	Concentração adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CV (%) (n=6)	Exatidão (%) (n=6)
	0,50	12	110
levoglucosano	0,30	12	95
	0,05	20	101

4.3.4. LOD do método SPE/GC-MS

A Tabela 5 apresenta os limites de detecção de levoglucosano em amostras de água de chuva. O limite de detecção (LOD), correspondente à concentração equivalente a três vezes o ruído da linha de base ($S/R = 3$).

Tabela 5. Limite de detecção de levoglucosano em amostras de água de chuva.

Analito	LOD (ng mL^{-1})
levoglucosano	1,5

O método proposto, SPE/GC-MS com fase extratora quitosana, comparado a outros métodos com técnicas de microextração, como a SBSE e a MEPS, apresentou melhores taxas de extração e tempo reduzido de extração (5 min). Fato justificado pela não disponibilidade comercial de fases sorventes altamente polares para SBSE e pelo pequeno volume de fase extratora dessas duas técnicas. A SPE desenvolvida, quando comparada à extração líquido-

líquido apresentou pequeno volume de amostra (5,0 mL) e baixo consumo de solvente orgânico (2,5 mL de metanol).

Ainda podemos destacar outras vantagens do método SPE/GC-MS desenvolvido, tais como o desenvolvimento de cartuchos SPE com fase quitosana reproduzíveis (CV inferiores a 15%), extração simultânea para 12 amostras e na etapa de secagem do solvente de eluição para posterior reação de derivatização um sistema desenvolvido com capacidade para 10 amostras que contribuíram para resultados precisos e tempo de análise satisfatório.

4.4. Análise de levoglucosano em amostras de água de chuva utilizando o método SPE/GC-MS

Para correlacionar as atividades agrícolas regionais com as espécies químicas presentes na atmosfera de Ribeirão Preto, amostras de água de chuvas foram avaliadas por meio do método padronizado SPE/GC-MS. Estas amostras foram coletadas em eventos ocorridos no período de 03/08/2011 a 09/04/2012 na cidade de Ribeirão Preto-SP, com o coletor localizado no campus da USP-RP ilustrado na Figura 9. O gráfico da Figura 25 representa a variação da concentração de levoglucosano e COD nessas amostras durante o período da safra (de abril a novembro) e no período de entressafra (de dezembro a março).

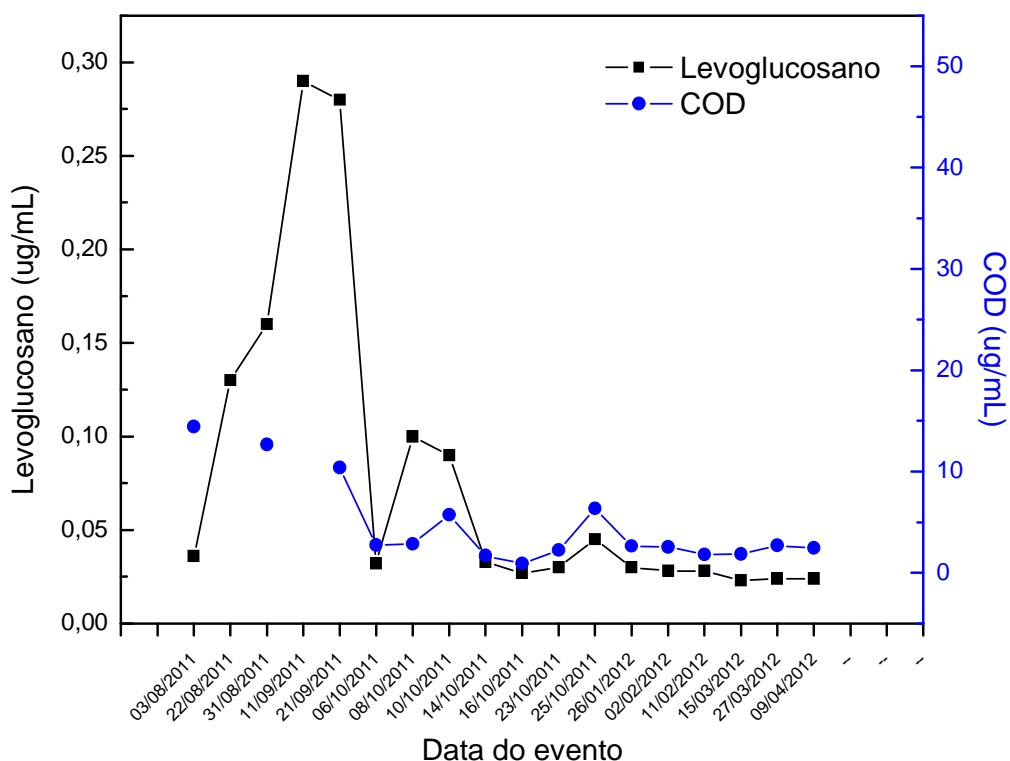


Figura 25. Concentração de levoglucosano e COD presente em amostras de água de chuva coletadas em Ribeirão Preto-SP durante o período de safra e entressafra de cana-de-açúcar.

As concentrações de levoglucosano variam de 0,023 a 0,29 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo que as maiores concentrações foram observadas de agosto a outubro, isto é, na época da safra da cana. No período de entressafra, ficaram abaixo do limite de quantificação, pontos inseridos no gráfico com valor de 0,036; 0,032; 0,033; 0,027; 0,045; 0,030; 0,028; 0,028; 0,023; 0,024 e 0,024 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Tal fato pode ser explicado pelo final da safra 2011/2012 ter sido antecipada para o começo de novembro devido às perdas da produção relacionadas ao grande período de estiagem na região sudeste, entre outros possíveis agravantes de produção como geadas, pragas e a falta de renovação dos canaviais. Com um período de entressafra maior, ou seja, com focos de queimada de palha da

cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto diminuindo, a emissão desse monossacarídeo é reduzida, uma vez que a principal fonte de levoglucosano para atmosfera na região é a queima da palha da cana-de-açúcar.

As maiores concentrações foram obtidas no mês de setembro, sendo iguais a $0,29 \mu\text{g mL}^{-1}$ (11/09/2011) e $0,28 \mu\text{g mL}^{-1}$ (21/09/2011). Tais meses coincidem com a intensa queimada da palha da cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP, e conseqüentemente com maior emissão de material particulado para a atmosfera incluindo levoglucosano, COD entre outros.

De maneira análoga à concentração de levoglucosano, as maiores concentrações de COD presente nestas amostras coincidem com o período de safra, onde a queimada da palha da cana é intensa na região de Ribeirão Preto. A maior concentração de COD foi obtida no mês de agosto, sendo igual a $14,41 \mu\text{g mL}^{-1}$ (03/08/2011). Para verificar a existência de correlação destas duas concentrações foi traçado o gráfico da Figura 26.

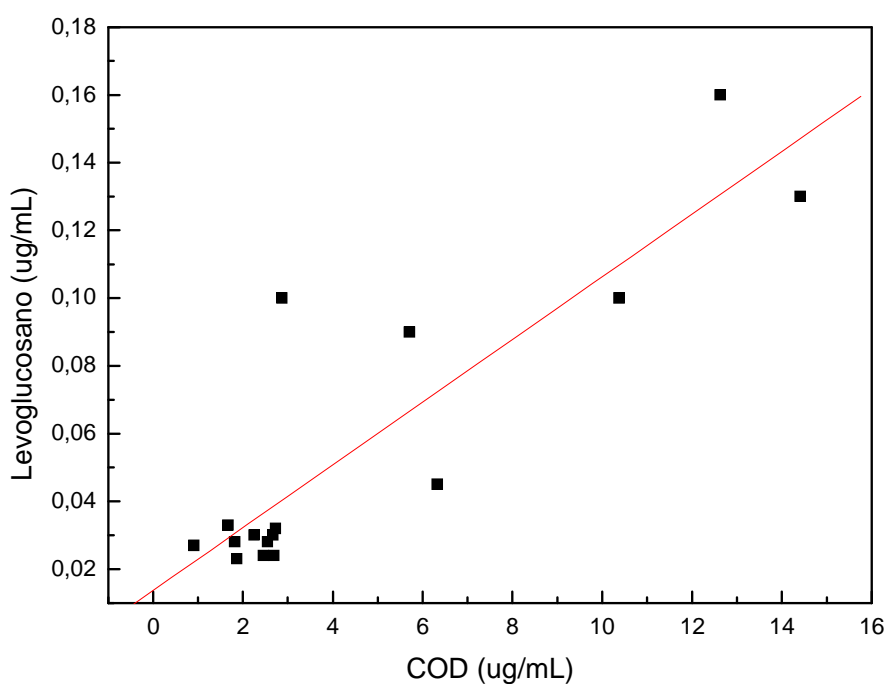


Figura 26. Concentração de levoglucosano vs concentração de COD.

O gráfico da Figura 26, nos permite afirmar que existe uma correlação linear entre as concentrações de levoglucosano e COD presente nestas amostras de água de chuva ($r = 0,88$) com 95% de confiança, o que indica que a queima de biomassa é uma importante fonte de COD para a atmosfera.

Outro fator importante, e que deve ser ressaltado, é que as maiores concentrações de COD e levoglucosano geralmente coincidem com eventos de pequena profundidade, ou seja, com pequeno volume de chuva. Eventos com maior profundidade diluem estes compostos das amostras. Para normalizar esse efeito do volume da amostra foi realizado o cálculo da média ponderada pelo volume (MPV) para COD e levoglucosano, (Tabela 6).

Tabela 6. Média ponderada pelo volume para COD e levoglucosano para safra e entressafra

MP	Período	MPV ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	RSD (%)	n
Levoglucosano	safra	$0,09 \pm 0,03$	32	12
	entressafra	$0,03 \pm 0,01$	19	6
COD	safra	$6,32 \pm 2,61$	41	10
	entressafra	$2,30 \pm 0,41$	18	6

Podemos verificar que no período de safra a concentração de levoglucosano foi superior ao período de entressafra (test t; $P = 0,05$).

Da mesma maneira para COD, de acordo com Coelho et al. ⁹, em períodos de safra, onde a queimada da palha da cana-de-açúcar é maior, a quantidade de material orgânico emitido para a atmosfera é superior aos períodos de entressafra. O gráfico da Figura 27 exhibe a concentração de COD e de levoglucosano nestes períodos.

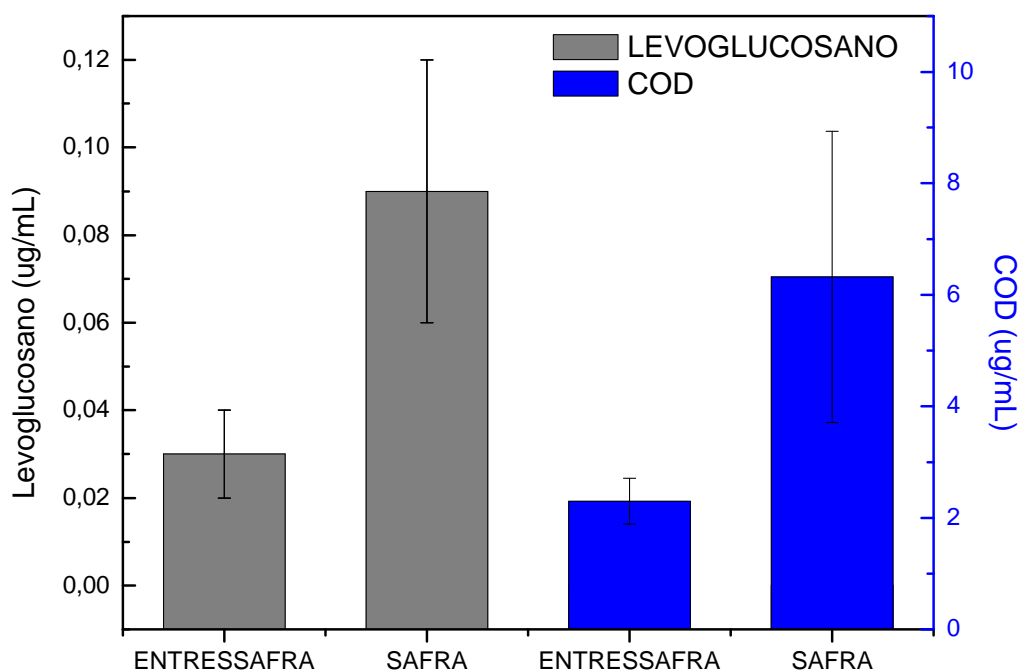


Figura 27. Comparação da concentração média de levoglucosano e COD presente em amostras de água de chuvas coletadas em Ribeirão Preto-SP no período de safra e entressafra de cana-de-açúcar.

Apesar do pequeno número de amostras com as análises de COD, essa tendência já foi observada para um número muito maior de amostras na cidade de Ribeirão Preto – SP, Coelho et. al.,⁹.

No período de safra a concentração média de COD e levoglucosano presente nas amostras de água de chuvas coletadas são superiores ao período de entressafra, confirmando a correlação estabelecida anteriormente.

O único trabalho da literatura encontrado sobre determinação de levoglucosano em amostras de água de chuva foi para amostras coletadas no Instituto de Física da Universidade de São Paulo, São Paulo, sendo que a concentração variou de 0,4 a 1,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ²⁴. Os autores afirmam que esse

resultado é apenas qualitativo, uma vez que alegam que houve a evaporação da amostra durante seu transporte.

Neste presente trabalho, apresentamos um método com linearidade, precisão e exatidão para análise quantitativa de levoglucosano em amostras de água de chuva. A comparação entre as concentrações de levoglucosano nas amostras de água de chuva de Ribeirão Preto e São Paulo devem ser comparadas com cautela uma vez que Schkolnik et al.²⁴ interpreta seus resultados como qualitativos. Uma completa validação analítica para água de chuva se faz necessário.

5. Conclusões

As otimizações das variáveis do processo de extração SPE, tais como fase extratora, vazão de percolação da amostra do eluente, volume de amostra, força iônica, solvente de eluição, massa do sorvente, resultaram em maiores taxas de extração e menor tempo de análise.

O método proposto, SPE/GC-MS com sorvente quitosana, comparado a outros métodos com técnicas de microextração, como a SBSE e a MEPS, apresentou maiores taxas de extração e menor tempo de extração (5 min).

Ja o método padronizado comparado com outros métodos da literatura que empregam a técnica de LLE para a extração de levoglucosano, apresentou baixo consumo de solvente orgânico (2,5 mL de metanol). Ainda podemos destacar outras vantagens do método SPE/GC-MS desenvolvido, tais como o desenvolvimento de cartuchos SPE (quitosana) reproduzíveis (CV inferiores a 15%) e de baixo custo, assim como extração simultânea para 12 amostras que contribuíram para resultados precisos e tempo de análise satisfatório.

O método SPE/GC-MS com fase extratora quitosana é um método inovador de análise de levoglucosano em amostras de água de chuva, uma vez que até presente momento nenhum outro trabalho tem realizado a análise quantitativa deste analito em matrizes aquosas. A maioria dos trabalhos apresentam resultados de medidas de levoglucosano realizadas em filtros que retêm o material particulado presente na atmosfera.

Para as análises de amostras de água de chuva observamos que a concentração MPV de levoglucosano na safra foi superior ao de entressafra ($0,09 \pm 0,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para safra e $0,03 \pm 0,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ para entressafra), ou

seja, levoglucosano tem emissão sazonal que pode ser identificado pela análise de amostras de água de chuva. Tal fato é justificado pela queimada da palha da cana-de-açúcar na região de Ribeirão Preto-SP.

O método SPE/GC-MS padronizado apresentou linearidade, precisão e exatidão adequadas, além de um preparo de amostra eficiente que permitiram a este trabalho trazer os primeiros resultados quantitativos de determinação de levoglucosano em amostras de água de chuva.

6. Referências Bibliográficas

- ¹ ALVES, C. Aerossóis atmosféricos: perspectiva histórica, fontes, processos químicos de formação e composição orgânica. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 859-870, 2005.
- ² ARTAXO, P.; OLIVEIRA, P. H.; LARA, L. L.; PAULIQUEVIS, T. M.; RIZZO, L. V.; PIRES JUNIOR, C.; PAIXÃO, M. A.; LONGO, K. M.; FREITAS, S.; CORREIA, A. L. Efeitos climáticos de partículas de aerossóis biogênicos e emitidos em queimadas na Amazônia. **Revista Brasileira de Meteorologia**, v. 21, n. 3a, p. 168-189, 2006.
- ³ RAM, K.; SARIN, M. M. Spatio-temporal variability in atmospheric abundances of EC, OC and WSOC over Northern India. **Journal of Aerosol Science**, v. 41 p. 88-98, 2010.
- ⁴ CASTANHO, A. D. A.; ARTAXO, P. Wintertime and summertime São Paulo aerosol source apportionment study. **Atmospheric Environment**, v. 35, p. 4889-4902, 2001.
- ⁵ STANIER, C. O.; KHLYSTOV, A. Y.; PANDIS, S. N. Ambient aerosol size distributions and number concentrations measured during the Pittsburgh air quality study (PAQS). **Atmospheric Environment**, v. 38, p. 3275-3284, 2004.
- ⁶ ARTAXO, P.; GERAB, F.; RABELLO, M. L. C. Elemental composition of aerosol particles from two atmospheric monitoring stations in the Amazon basin. **Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B**, v. 75, p. 277-281, 1993.

⁷ MOULI, P. C.; MOHAN, S. V.; REDDY, S. J. Rainwater chemistry at a regional representative urban site: influence of terrestrial sources on ionic composition. **Atmospheric Environment**, v. 39, n. 6, p. 999-1008, 2005.

⁸ CAMPOS, M. L. A. M.; NOGUEIRA, R. F. P.; DAMETTO, P. R.; FRANCISO, J. G.; COELHO, C. H. Dissolved organic carbon in rainwater: glassware decontamination and sample preservation and volatile organic carbon. **Atmospheric Environment**, v. 41, p. 8924-8931, 2007.

⁹ COELHO, C. H.; FRANCISCO, J. G.; NOGUEIRA, R. F. P.; CAMPOS, M. L. A. M. Dissolved organic carbon in rainwater from areas heavily impacted by sugar cane burning. **Atmospheric Environment**, v. 42, p. 7115-7121, 2008.

¹⁰ FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Informações estatísticas sobre a produção de cana-de-açúcar mundial. Disponível em: < <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>. Acesso em: 08 jun. 2011.

¹¹ ARBEX, A. A. Avaliação dos efeitos do material particulado proveniente da queima da plantação de cana-de-açúcar sobre a morbidade respiratória na cidade de Araraquara – SP. 2001. 204 f. Tese (Doutorado em Medicina) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2001.

¹² UNIÃO DA INDÚSTRIA DE CANA- DE- AÇÚCAR. Informações estatísticas sobre a produção de cana-de-açúcar. Disponível em: <<http://www.unica.com.br/dadosCotacao/estatistica/>>. Acesso em: 08 jun. 2011.

¹³ INPE: Disponível em: www.dsr.inpe.br/laf/canasat/colheita.html. Acesso em: 25 de agosto de 2012

¹⁴ SÃO PAULO (Estado). Secretaria de Estado do Meio Ambiente. Emissão de poluentes durante a queima da palha da cana-de-açúcar. Disponível em: <[http://homologa.ambiente.sp.gov.br/etanolverde/relatorio_etanol_verde_2009 A.pdf](http://homologa.ambiente.sp.gov.br/etanolverde/relatorio_etanol_verde_2009_A.pdf)>. Acesso em: 30 set. 2009.

¹⁵ LARA, L.; ARTAXO, P.; MARTINELLI, L. A.; CAMARGO, P. B.; VICTORIA, R. L.; FERRAZ, E. S. B. Properties of aerosols from sugar-cane burning emissions in Southeastern Brazil. **Atmospheric Environment**, v. 35, p. 4627-4637, 2005.

¹⁶ ANDREAE, M. O.; ANDREAE, T. W.; ANNEGARN, H.; BEER, J.; CACHIER, H.; LE CANUT, P.; ELBERT, W.; MAENHAUT, W.; SALMA, I.; WIENHOLD, F. G.; ZENKER, T. Airborne studies of aerosol emissions from savanna fires in southern Africa: 2. Aerosol chemical composition. **Journal Geophysical Research**, v. 103 (D24), p. 32,119-32,128, 1998.

¹⁷ ECHALAR, F.; GAUDICHET, A.; CACHIER, H.; ARTAXO, P. Aerosol emissions by biomass burning in Africa and in the Amazon basin: characteristic trace and fluxes. **Geophysical Research Letters**, v. 22, p. 3039-3042, 1995.

¹⁸ SIMONEIT, B. R. T. Biomass burning: a review of organic tracers for smoke from incomplete combustion. **Applied Geochemistry**, v. 17, p. 129-162, 2002.

¹⁹ JORDAN, T. B.; SEEN, A. J.; JACOBSEN, G. E. Levoglucosan as an atmospheric tracer for woodsmoke. **Atmospheric Environment**, v. 40, p. 5316-5321, 2006.

²⁰ SIMONEIT, B. R. T.; SCHAUER, J. J.; NOLTE, C. G.; OROS, D. R.; ELIAS, V. O.; FRASER, M. P.; ROGGE, W. F.; CASS, G. R. Levoglucosan, a tracer for cellulose in biomass burning and atmospheric particles. **Atmospheric Environment**, v. 33, p. 173-182, 1999.

²¹ MOCHIDA, M.; KAWAMURA, K.; FU, P.; TAKEMURA, T. Seasonal variation of levoglucosan in aerosols over the western North Pacific and its assessment as a biomass-burning. **Atmospheric Environment**, v. 44, p. 3511-3518, 2010.

²² DYE, C.; YTTTRI, K. E. Determination of monosaccharide anhydrides in atmospheric aerosols by use of high-performance liquid chromatography combined with high-resolution mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v. 77, n. 6, p. 1853-1858, 2005.

²³ FRASER, M. P.; LAKSHMANAN, K. Using levoglucosan as a molecular marker for the long-range transport of biomass combustion aerosols. **Environmental Science & Technology**, v. 34, p. 4560-4564, 2000.

²⁴ SCHKOLNIK, G.; FALKOVICH, A. H.; RUDICH, Y.; MAENHAUT, W.; ARTAXO, P. New Analytical Method for the Determination of Levoglucosan, Polyhydroxy Compounds, and 2-Methylerythritol and Its Application to Smoke and Rainwater Samples. **Environmental Science & Technology**, v. 39, p. 2744-2752, 2005.

²⁵ WANG, G.; CHEN, C.; LI, J.; ZHOU, B.; XIE, M.; HU, S.; KAWAMURA, Y. C. Molecular composition and size distribution of sugars, sugar-alcohols and carboxylic acids in airborne particles during a severe urban haze event caused

by wheat straw burning. **Atmospheric Environment**, v. 45, p. 2473-2479, 2011.

²⁶ KLEEMAN, M. J.; ROBERT, M. A.; RIDDLE, S. G.; FINE, P. M.; HAYS, M. D.; SCHAUER J. J.; HANNIGAN, M. P. Size Distribution of Trace Organic Species Emitted from Biomass Combustion and Meat Charbroiling; **Atmospheric Environment**, v. 42, p. 3059-3075, 2008.

²⁷ HAYS, M. D., C. D. GERON, K. J. LINNA, N. D. SMITH, AND J. J. SCHAUER. Speciation of gas-phase and fine particle emissions from burning of foliar fuels. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 2281-2295, 2002.

²⁸ MEDEIROS, P. M.; SIMONEIT, B. R. T. Analysis of sugars in environmental samples by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1141, p. 271-278, 2007.

²⁹ ZDRAHAL, Z.; OLIVEIRA, J.; VERMEYLEN, R.; CLAEYS, M.; MAENHAUT, W. Determination of levoglucosan and related monosaccharide anhydrides in atmospheric aerosols from urban and tropical locations. **Environmental Science & Technology**, v. 36, p. 747-753, 2002.

³⁰ SIMONEIT, B.R.T.; ELIAS, V.O. Detecting organic tracers from biomass burning in the atmosphere. **Marine Pollution Bulletin**, v. 42, p. 805-810, 2001.

³¹ GRAHAM, B.; MAYOL-BRACERO, O.L.; GUYON, P.; ROBERTS, G.C.; DECESARI, S.; FACCHINI, M.C.; ARTAXO, P.; MAENHAUT, W.; KOLL, P.; ANDREAE, M.O. Water-soluble organic compounds in biomass burning aerosols over Amazonia - 1. Characterization by NMR and GC-MS. **Journal Geophysical Research**, v. 107(D20), p. 8047, 2002.

³² SIMPSON, C.D.; DILLS, R.L.; KATZ, B.S.; KALMAN, D.A. Determination of levoglucosan in atmospheric fine particulate matter. **Journal of the Air & Waste Management Association**, v. 54, p. 689–694, 2004.

³³ PASHYNSKA, V., VERMEYLEN, R., VAS, G., MAENHAUT, W.; CLAEYS, M. Development of a gas chromatographic/ion trap mass spectrometric method for the determination of levoglucosan and saccharidic compounds in atmospheric aerosols. Application to urban aerosols. **Journal Mass Spectrometry**, v. 37, p. 1249–1257, 2002.

³⁴ ZDRÁHAL, Z.; OLIVEIRA, J.; VERMEYLEN, R.; CLAEYS, M.; MAENHAUT, W. Determination of levoglucosan and related monosaccharide anhydrides in atmospheric aerosols from urban and tropical locations. **Environmental Science Technology**, v. 36, p. 747-753, 2002.

³⁵ BAUER, H.; CLAEYS, M.; VERMEYLEN, R.; SCHUELLER, E.; WEINKE, G.; BERGER, A.; PUXBAUM, H. Arabitol and mannitol as tracers for the quantification of airborne fungal spores. **Atmospheric Environment**, v. 42, p. 588–593, 2008.

³⁶ DECESARI, S.; FACCHINI, M.C.; FUZZI, S.; TAGLIAVINI, E. Characterization of water soluble organic compounds in atmospheric aerosol: a new approach. **Journal Geophysical Research**, v.105, p. 1481-1489, 2000.

³⁷ GAO, S.; HEGG, D.A.; HOBBS, P.V.; KIRCHSTETTER, T.W.; MAGI, B.I.; SADILEK, M. Emissions of trace gases and particles from savanna fires in southern Africa. **Journal Geophysical Research**, v. 108, p.8487,2003.

³⁸ GRAHAM, B.; GUYON, P.; TAYLOR, P. E.; ARTAXO, P.; MAENHAUT, W.; GLOVSKY, M. M.; FLAGAN, R. C.; ANDREAE, M. O. Organic compounds

present in the natural Amazonian aerosol: Characterization by gas chromatography–mass spectrometry, **Journal Geophysical Research**, v. 108, p. 4766, 2003.

³⁹ PALMA, P.; CAPPIELLO, A.; DE SIMIONI, E.; MANGANI, F.; TRUFELLI, H.; DECESARI, S.; FACCHINI, M. C.; FUZZI, S. Identification of Levoglucosan and Related Stereoisomers in Fog Water as a Biomass Combustion Tracer by ESI-MS/MS, **Annali di Chimica (ROME)**, v. 94, p. 911- 919, 2004.

⁴⁰ GARCIA, C. D.; ENGLING, G.; HERCKES, P.; COLLETT, J. L.; HENRY, C. S. Determination of levoglucosan from smoke samples using microchip capillary electrophoresis with pulsed amperometric detection, **Science Technology**, v. 39, p. 618–623, 2005.

⁴¹ COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de Cromatografia, Edd. Unicamp, Campinas, 2006.

⁴² SOARES, L. V.; Curso Básico de Instrumentação para análise de alimentos e fármacos, Barueri – SP: Editora Malone. p. 224-227, 2006.

⁴³ MCNAIR, H. M.; MILLER, J. M; Basic Gas Chromatography. A Wiley-Interscience Publication. 2002.

⁴⁴ LANÇAS, F. M; QUEIROZ, M. E. C.; GROSSI, P.; OLIVARES, I.R.B. Recent developments and applications of stir bar sorptive extraction. **Journal Separation Science**, v. 32, p. 813-824, 2009.

⁴⁵ EXTRAÇÃO LIQUIDO-LIQUIDO. Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Catarina. <http://www.qmc.ufsc.br/organica/exp7/liquido.html>. Acessado em Agosto/2012

⁴⁶ SIGMA ALDRICH.

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/supelco/57030u?lang=pt®ion=BR>. Acessado em agosto/2012.

⁴⁷ I.C.S.F., JARDIM, Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, Fac. 1, p.13-25, 2010.

⁴⁸ A. R. CHAVES, M. E. C. QUEIROZ, Extração sortiva em barra de agitação para análise de fármacos em fluidos biológicos. **Química Nova**, v. 31, nº7, p. 1814-1819, 2008.

⁴⁹ M. E. C. Queiroz, Microextração em sorvente empacotado (MEPS) para a determinação de fármacos em fluidos biológicos. **Scientia Chromatographica**, v.3, p. 223, 2011.

⁵⁰ M. ABDEL-REHIM, Recent advances in microextraction by packed sorbent for bioanalysis. **Journal of Chromatography A**, v.1217, p. 2569, 2010.

⁵¹ M. ABDEL-REHIM, 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. **Journal of Chromatography B**, v. 801, p.317, 2004.

⁵² A. R. CHAVES, F. Z. LEANDRO, J. A. CARIS, M. E. C. QUEIROZ, Microextraction in packed sorbent for analysis of antidepressants in human plasma by liquid chromatography and spectrophotometric detection. **Journal of Chromatography B**, v. 878, p.2123, 2010.

⁵³ M. ABDEL-REHIM, Microextraction by packed sorbent (MEPS): A tutorial. **Analytica Chimica Acta**, v. 701, p. 119, 2011.

⁵⁴ MEPS™ - Micro Extraction by Packed Sorbent Online SPE for GC and LC sample preparation - Extraction to injection in a single process. Disponível em <http://www.sge.com/uploads/ee/2d/ee2d67d6c1e51fbc9c5016c4dfed5a0/BR-0238-M.pdf>. Acesso em: 27/10/2011.

⁵⁵ INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). Harmonized Guidelines for Single-laboratory Validation of Methods of Analysis. **Pure Applied Chemistry**, v. 74(5), p. 835-855, 2002.

⁵⁶ BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE METROLOGIA, NORMALIZAÇÃO E QUALIDADE INDUSTRIAL (INMETRO); Orientação sobre Validação de Métodos de Ensaio Químicos, DOQ-CGCRE-008, 2007.

⁵⁷ AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Resolução – RE nº 899, de 29 de maio de 2003. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 jun. 2003. Seção 1, p. 56 – 59.

⁵⁸ INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONISATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE (ICH); Harmonised Tripartite Guideline – Validation Analytical Procedures: Text and Methodology, Q2(R1), 2005.

⁵⁹ RIBANI, M.; BOTTOLI, C. B. G.; COLLINS, C.H.; JARDIM, I.C.S.F.; MELO, L. F. C.; Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos, **Química Nova**, v. 27(5),p.771-780, 2004.