



Universidade Estadual de Campinas  
Instituto de Química  
Departamento de Química Analítica  
Programa de Pós-Graduação em Química

## **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**“Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa  
Bidimensional Abrangente: Aplicações em Lipidômica”**

**Candidato:** Leandro Wang Hantao  
**Orientador:** Prof. Dr. Fabio Augusto

**Campinas - SP  
2011**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE  
QUÍMICA DA UNICAMP**

H198m Hantao, Leandro Wang.  
Microextração em fase sólida e cromatografia  
gasosa bidimensional abrangente: aplicação em  
lipidômica / Leandro Wang Hantao. -- Campinas, SP:  
[s.n], 2011.

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto.

Mestrado - Universidade Estadual de Campinas,  
Instituto de Química.

1. Microextração em fase sólida. 2. Cromatografia  
gasosa bidimensional abrangente. 3. Lipidômica.  
I. Augusto, Fabio. II. Universidade Estadual de  
Campinas. Instituto de Química. III. Título.

**Título em inglês:** Solid phase microextraction and comprehensive two-dimensional gas chromatography: applications in lipidomics

**Palavras-chaves em inglês:** Solid phase microextraction, Comprehensive two-dimensional gas chromatography, Lipidomics

**Área de concentração:** Química Analítica

**Titulação:** Mestre em Química na área de Química Analítica

**Banca examinadora:** Prof. Dr. Fabio Augusto (orientador), Prof. Dr. Dosil Pereira de Jesus (IQ-UNICAMP), Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy (FEA-UNICAMP)

**Data de defesa:** 10/06/2011



*“True wisdom comes to each of us when we realize how little we understand about life, ourselves, and the world around us.”*

*Sócrates*



*Dedico o presente trabalho à minha família pelo apoio incondicional, carinho, confiança e compreensão.*



## Agradecimentos

- Aos meus pais, Lau e Wong, a minha irmã Daniela e meu cunhado Donald, a meus queridos sobrinhos, Julie e Carl, e a minha namorada, Bruna, pela paciência, compreensão, apoio e amor.
- Ao Prof. Dr. Fabio Augusto pela oportunidade de realização desse trabalho, pelas inúmeras contribuições para meu crescimento profissional e, principalmente, pessoal. Agradeço pela amizade e por servir como exemplo profissional.
- Aos Professores Doutores Álvaro J. S. Neto, Ana V. Simionato, Carla B. G. Bottoli, Carol H. Collins, Dosil P. de Jesus, Helena T. Godoy e Ivo M. Raimundo Jr., que participaram das bancas de qualificação e defesa. Obrigado pelas sugestões.
- Aos companheiros de laboratório Alex, Carla, Carlos, Daniele, Ernesto, Hugo, Gaby, Guilherme (Pinho), Gizelle, Karen, Karina, Lucília, Luiz (Galático), Marcio (Gauchinho), Maria (Mare), Mayra, Milena, Liane, Paulo (pH), Raquel (Zinha), Renata, Stanislau (Stanis), Sandra, Soraia e Valeska pelo agradável ambiente de trabalho.
- Aos companheiros da Favela: Danilo (Hulk), Felipe (Rato), Felipe (Gigio), Fernanda (Bertolazzi), Flávio (Muzza), Flaviane (Flavis), Franco (Smurf), Gabriela (Durães), Guilherme (Panetone), Gustavo (Sono), Henrique (Golias), Henrique (Piva), Hugo (Jovem), Ilton (Baiano), Jéssica (Borjess), Laura (Tia Lau), Luiz Guilherme (LG), Luiz Fernando (Cassapa), Lívia, Lucas (Carandi), Marcio (Ogrinho), Mário (King), Maurício (Fião), Miguel, Paulo Paiotti (Tio Fernando), Pablo (Grafitão), Pablo (Pablito), Pedro (Margarina), Stella (Tia Fernanda), Thiago (Burgo) e Vanessa Regina pela inestimável amizade e momentos de descontração.
- Aos companheiros de outras gerações: André (Gago), Eduardo (Bah), José Augusto (Guto), Juliano (Quem), e Júlio pelos ótimos conselhos.

-Ao Professor Paulo Rosa e sua aluna Katrina, pela colaboração científica. Agradeço pela oportunidade de conhecer as técnicas de metanólise supercrítica e pelo apoio ao longo do desenvolvimento da parte de catálise supercrítica desta dissertação.

- Ao Sr. Mário, do setor de mecânica fina – IQ / UNICAMP, e ao Sr. Marcelo, do setor de manutenção, pelo auxílio na manufatura das peças metálicas utilizadas na construção do modulador criogênico.

- Aos professores e funcionários do IQ – UNICAMP.

- Finalmente, às pessoas que contribuíram diretamente, e indiretamente, para o desenvolvimento deste trabalho, seja através de sugestões, conversas e ou até de discussões. Agradeço a todos parceiros e companheiros de trabalho!

## ***Curriculum vitae***

### **Formação Acadêmica/Titulação:**

2009 – Atual Mestrado em Química.

Universidade Estadual de Campinas. Título: Microextração em Fase Sólida e Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente: Aplicações em Lipidômica

Orientador: Fabio Augusto

Bolsista do: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

2005 – 2009 Graduação em Bacharelado em Química com Atribuições Tecnológica.

Universidade Estadual de Campinas.

### **Artigos aceitos para publicação:**

1. M. P. Pedroso, E. C. Ferreira, L. W. Hantao, S. Bogusz Jr., F. Augusto. Identification of Volatiles from Pineapple Pulp (*Ananas comosus*) by Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography and Gas Chromatography/Mass Spectrometry. *Journal of Separation Science*, **2011**.

2. L. A. F. de Godoy, L. W. Hantao, M. P. Pedroso, R. J. Poppi, F. Augusto. Quantitative Analysis of essential oils in perfume using multivariate curve resolution combined with comprehensive two-dimensional gas chromatography. *Analytica Chimica Acta*, **2011**.

### **Artigos completos publicados em periódicos:**

1. L. A. F. de Godoy, M. P. Pedroso, L. W. Hantao, R. J. Poppi, F. Augusto. Quantitative analysis by comprehensive two-dimensional gas chromatography using interval Multi-way Partial Least Squares calibration. *Talanta* (Oxford). v.83, p.1302 - 1307, **2011**.

2. F. Augusto, R. J. Poppi, M. P. Pedroso, L. A. F. Godoy Junior, L. W. Hantao.

GC×GC-FID for Qualitative and Quantitative Analysis of Perfumes. Chester: Advanstar House. v.23, p.01 - 05, **2010**.

### **Artigos em jornal de notícias:**

1. F. Augusto, M. P. Pedroso, S. Bogusz Junior, C. H. V. Fidelis, L. W. Hantao.  
Do pau-rosa à petroquímica. Jornal da UNICAMP. p.7 - 7, **2010**.

### **Apresentação de Trabalhos:**

Dez (10) trabalhos apresentados em eventos internacionais, sendo 3 apresentações na forma oral.

Oito (8) trabalhos apresentados em eventos nacionais na forma de posters.

### **Outras Informações**

2011 Programa Estágio Docente C , QA316 – Química Analítica III (Módulo de Cromatografia).

2010 Visita ao Instituto Max-Planck de Fisionomia Molecular de Plantas. Professor Joachim Kopka.

2010 Programa Estágio Docente C, QA582 – Química Analítica Instrumental I (Módulo de Cromatografia e Eletroquímica).

2010 Treinamento oferecido pela Sinc sobre a operação do equipamento comercial GC-MS QP2010 Plus.

2009 Participação da “XIII Disciplina Intersemestral: Aspectos conceituais e experimentais de dispositivos semicondutores – simulação computacional, síntese e caracterização”.

2008 Programa Auxiliar Didático, QI244 – Química Inorgânica Experimental.

2006 Bolsista SAE de iniciação científica.

## RESUMO

### MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA E CROMATOGRAFIA GASOSA BIDIMENSIONAL ABRANGENTE: APLICAÇÕES EM LIPIDÔMICA

Neste trabalho foram desenvolvidas metodologias para a análise de lipídios na forma de seus ésteres metílicos de ácido graxo (FAME) em diversas matrizes. Para isso foram empregadas e otimizadas de forma multivariada técnicas de derivatização dos lipídios por transesterificação por catálise básica, seu isolamento e concentração por Microextração em Fase Sólida (SPME) e análise por Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC). A partir do perfil de extração foi escolhida a fibra comercial com revestimento de poli(dimetilsiloxano) (PDMS) com espessura de filme de 7 µm. O tempo de extração escolhido foi de 10 min pois atingiu a condição de sistema estacionário. Os parâmetros cromatográficos, tais como a programação de temperatura do forno, período de modulação e tipo de fase estacionária das colunas utilizadas no protótipo GC×GC, foram também otimizados. Além disso, durante o progresso deste trabalho, foi desenvolvido o primeiro protótipo brasileiro de GC×GC acoplado a um Espectrômetro de Massas com Analizador Quadrupolar rápido (GC×GC-qMS). Dentre os parâmetros operacionais do qMS, foram otimizados o intervalo de varredura do analisador quadrupolar e sua frequência de aquisição. O sistema GC×GC-qMS foi empregado para a identificação dos FAME presentes nas amostras empregadas neste estudo, através do uso das informações obtidas pelos espectros de massas obtidos das amostras, com padrões analíticos e combinando o uso de índices de retenção (LTPRI) e da estrutura cromatográfica. Neste trabalho, devido ao incremento em detectabilidade e sensibilidade, foi possível observar diversos FAME comumente não detectados por Cromatografia Gasosa Convencional (GC), como FAME de comprimento ímpar de cadeia e a presença de agrupamento metila no carbono 2 (-br<sub>2</sub>). Além disso, em virtude da baixa abrangência do banco de dados disponíveis, foi possível, e necessário, criar um banco de dados com índices de retenção para análise de lipídios. Espera-se que estas metodologias desenvolvidas e os resultados apresentados possam ser empregados como ferramenta em estudos de lipidômica e aplicações correlatas.



## ABSTRACT

### SOLID PHASE MICROEXTRACTION AND COMPREHENSIVE TWO-DIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY: APPLICATIONS IN LIPIDOMICS

The aim of this project was to develop alternative methodologies for lipidomic studies and related applications. A method for the analysis of lipids in different samples such as waxes, edible oils and cheek cells was developed. The isolation and concentration of the analytes was performed by Solid Phase Microextraction (SPME) combined with Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography (GC×GC). Firstly, the base-catalysed transesterification of the lipids into their respective fatty acid methyl esters (FAME) was optimized according to a multivariate model. Thus, the sample preparation was optimized considering the thickness of the coating and their respective extraction profiles. The chosen commercial coating was a poly(dimethylsiloxane) (PDMS) with 7 μm film thickness, the extraction time was 10 min where stationary state conditions were achieved. Secondly, chromatographic parameters were also optimized, such as the temperature programming, modulation period, the identity of the first and second dimensional columns used in the GC×GC prototype. During the current study, the first brazilian prototype of a GC×GC coupled to a mass spectrometer with a rapid quadrupolar analyzer was developed (GC×GC-qMS). Also, the scan interval and acquisition frequency of the qMS were optimized. For the identification of the analytes similarity searches for mass spectra, analytical standards and the combination retention indexes with chromatographic structuration were used. Additionally it was possible to detect and identify FAME which couldn't be detected by conventional GC such as odd numbered chain length and branched FAME. Moreover, elution pattern of a branched FAME was reported, specifically the FAME with a methyl group in the carbon 2 (-br<sub>2</sub>). Because of the restricted content of the retention indexes and mass spectra database, the construction of a database with retention indexes for lipid analysis was built. Hence the ultimate goal of the current study is to present the potential and applicability of SPME for lipidomic studies and related applications.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	xix
LISTA DE TABELAS .....	xxi
LISTA DE FIGURAS .....	xxiii

### Índice

<b>1. Introdução.....</b>	<b>1</b>
<b>2. Objetivos .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Revisão Bibliográfica .....</b>	<b>17</b>
3.1 Lipídios.....	19
3.1.1. Nomenclatura e Miscelânea .....	19
3.1.2. Métodos de Derivatização de ácidos graxos para análise por GC .....	21
3.1.3. Separação Cromatográfica e Acoplamentos diversos .....	23
3.2. Microextração em Fase Sólida.....	25
3.3. Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (GC×GC) .....	28
3.3.1. Modulação .....	29
3.3.2. Teoria.....	30
3.3.3. Estrutura Cromatográfica: FAME.....	34
3.3.4. Desenvolvimento da GC×GC-qMS .....	36
<b>4. Materiais e Métodos .....</b>	<b>39</b>
4.1. Materiais, Reagentes e Amostras .....	41
4.2. Colunas Cromatográficas e Programação de Temperatura .....	41
4.3. GC-FID – Injeção Splitless: Transesterificação .....	42
4.3.1. Catálise Básica .....	42
4.4. Parâmetros Operacionais do GC×GC-FID .....	44
4.5. Protótipo GC×GC-qMS .....	45
4.6. Identificação dos analitos .....	47
4.7. Aquisição e Interpretação de Dados .....	47
4.9. Microextração em Fase Sólida: Extração Direta .....	48
<b>5. Resultados e Discussão .....</b>	<b>51</b>

5.1. GC-FID .....	53
5.1.1. Efeito Solvente .....	53
5.1.2. Catálise Básica .....	54
5.2. Microextração em Fase Sólida .....	56
5.3. Desenvolvimento do protótipo GC×GC-qMS .....	59
5.4. Colunas Cromatográficas .....	62
5.5. Análise de Lipídios.....	63
5.5.1. Estrutura Cromatográfica .....	63
5.5.2. Otimização dos parâmetros GC×GC-qMS .....	66
5.5.3. Identificações dos FAME.....	69
<b>6. Conclusão .....</b>	<b>83</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>87</b>
<b>8. Anexo I.....</b>	<b>94</b>
<b>9. Anexo II.....</b>	<b>96</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<sup>1</sup>D: primeira dimensão

1D-GC: Cromatografia Gasosa Monodimensional/Convencional (do inglês, “*Monodimensional/Conventional Gas Chromatography*”)

<sup>1</sup>t<sub>R</sub>: tempo de retenção na primeira dimensão

<sup>2</sup>D: segunda dimensão

<sup>2</sup>t<sub>R</sub>: tempo de retenção na segunda dimensão

<sup>2</sup>w<sub>b</sub>: largura de base do pico na segunda dimensão

AD/DA: conversor analógico-digital/digital-analógico

BHT: hidróxido de tolueno butilado (do inglês, “*butylated hydroxy toluene*”)

ECL: comprimento equivalente de cadeia (do inglês, “*equivalent chain-lengths*”)

d.e.: diâmetro externo

d.i.: diâmetro interno

DBWax: coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol

DC: Voltagem de corrente elétrica contínua (do inglês *direct current*)

DHA: ácido (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-docosaheptaenoico (do inglês *docosaheptaenoic acid*)

ECD: detector por captura de elétrons (do inglês, “*electron capture detector*”)

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

EPA: ácido (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosapentaenoico (do inglês *eicosapentaenoic acid*)

FAME: Ésteres metílicos derivados de ácidos graxos (do inglês, “*fatty acid methyl esters*”)

Fast GC: Cromatografia Gasosa Rápida (do inglês, “*Fast Gas Chromatography*”)

FID: detector por ionização em chama (do inglês, “*flame ionization detector*”)

GC-MS: Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometro de Massas (do inglês, “*Gas Chromatography coupled to a Mass Spectrometer*”)

GC: Cromatografia Gasosa (do inglês, “*Gas Chromatography*”)

GC×GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (do inglês, “*Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography*”)

GC×GC-FID: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente com detecção por ionização em chama

GC×GC-qMS: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometro de Massas com analisador quadrupolar

GC×GC-TOFMS: Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente acoplada à Espectrometro de Massas com analisador por tempo de voo

GC-GC: Cromatografia Gasosa Bidimensional de frações parciais (ou por *heartcut*)

HP-5: coluna capilar com fase estacionária de composição 5% fenil-95% dimetilsiloxano

HP-50: coluna capilar com fase estacionária de composição 50% fenil-50% dimetilsiloxano

HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês, "*high performance liquid chromatography*")

HS-SPME: Microextração em Fase Sólida através da extração do *headspace*

LCG: laboratório de cromatografia gasosa e microtécnicas de extração

LTPRI: índice de retenção com programação linear de temperatura (do inglês, "*linear temperature programming retention index*")

m/z: razão massa / carga

MS: espectrometria de massas (do inglês, "*mass spectrometer*")

PCB: bifenilas policloradas (do inglês, "*polychlorinated biphenyls*")

PM: período de modulação

PDMS: poli(dimetilsiloxano)

qMS: Espectrômetro de Massas com analisador quadrupolar (do inglês, "*mass spectrometer with quadrupolar analyzer*")

RF: Voltagem de corrente alternada (do inglês, "*radio frequency*")

SIM: monitoramento de íons selecionados (do inglês, "*selected ion monitoring*")

SPME: Microextração em Fase Sólida ( do inglês, "*solid phase microextraction*")

SPWax: coluna capilar com fase estacionária de polietilenoglicol

TOFMS: Espectrômetro de Massas com analisador por tempo de voo (do inglês, "*mass spectrometer with time of flight analyzer*")

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Nomenclatura de ácidos graxos segundo a comissão IUPAC-IUB, sua abreviatura e a nomenclatura utilizada usualmente. Tabela adaptada de Christie et al. [36]. .....	19
Tabela 2. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC×GC-qMS e -FID .....	41
Tabela 3. Codificação das variáveis no planejamento experimental. ....	43
Tabela 4. Planejamento experimental para ajuste do modelo quadrático para determinação da condição ótima do processo de transesterificação com catálise básica. ....	43
Tabela 5. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS em cera de abelha transesterificada. ....	77
Tabela 6. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS em cera de carnaúba amarela transesterificada. ....	78
Tabela 7. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS e óleo de peixe. ....	80
Tabela 8. Tempo de retenção relativo ( $r_{18:0}$ ) e LPTRI dos FAME encontrados e utilizados ao longo deste trabalho. ....	94



## Lista de Figuras

- Figura 1. Representação das estruturas dos ácidos graxos e seus respectivos espectros de massa obtidos por ionização por elétrons. A – Ácido Linolênico. B – Ácido Gamoleíco. Estruturas químicas e espectros de massas foram obtidos do banco de dados da NIST. ....7
- Figura 2. Cromatograma ilustrando os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) do esfregaço de bochecha, obtidos por GC-FID. A terminologia utilizada se refere aos ácidos graxos correspondentes aos FAME. As condições de preparo da amostra são segundo Connor et al. [24]. Programação de temperatura: de 170 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C por 25 min. Temperatura do injetor e detector: 280 °C. Coluna: HP-5. Gás de arraste: H<sub>2</sub> (0,6 mL·min<sup>-1</sup>). O cromatograma acima foi obtido no Laboratório de Cromatografia Gasosa e Microtécnicas de Extração – LCG – IQ/UNICAMP. ....8
- Figura 3. Região expandida do cromatograma de óleo essencial de folhas de macacaporanga (*Aniba fragrans*) por GC×GC-FID. Conjunto de colunas: HP-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25 μm) + SupelcoWax (1,0 m, 0,10 mm, 0,10 μm). Período de modulação 6 s. Taxa de aquisição 100 Hz. Programação de temperatura: 60 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C. 1. Monoterpenos não-oxigenados; 2. Monoterpenos oxigenados; 3. Sesquiterpenos não-oxigenados; 4. Sesquiterpenos oxigenados. Cromatograma produzido pelo grupo LCG e adaptado de Pedroso et al. ....10
- Figura 4. Ilustração do ácido (9Z, 12Z, 15Z)-octadecatrienoíco (ácido α-linolênico). Em azul está representada a contagem do sistema delta (Δ). Em vermelho a contagem do sistema ômega (ω). ....20
- Figura 5. Representações estruturais dos ácidos 24-metil-hexacosanoíco (*i*-C26:0), 23-metil-hexacosanoíco (*ai*-C26:0), 2-metil-hexacosanoíco (*br*<sub>2</sub>-C26:0). ....21
- Figura 6. Ilustrações retidas do livro *Handbook of Solid Phase Microextraction* editado por J. Pawliszyn. A – As geometrias dos três principais modos de extração em SPME (extração direta, através do *headspace*, e protegida por membrana). B – Modelo da camada estática (do inglês, “*boundary layer model*”) ilustrando as diferentes regiões consideradas e seus respectivos perfis de concentrações ao longo da distância radial (em relação ao centro do suporte do revestimento) considerando que a camada estática é a etapa determinante na cinética de transferência de massa. ....28
- Figura 7. A – Ilustração do processo de modulação básico para um modulador de 4 jatos - 1. Etapa de coleta; 2. Etapa de focagem; 3. Reinício do processo). B – 1. Ilustração de um pico cromatográfico composto por 3 analitos coeluídos; 2. Ilustração do pico cromatográfico modulado; 3. Visualização do cromatograma na forma de diagrama de contorno. Figura baseada em J. Dallüge et al. “Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography: a powerful and versatile analytical tool” J. Chromatogr. A 2003. ....30
- Figura 8. Cromatogramas teóricos utilizados para ilustrar o conceito de ortogonalidade num conjunto normal. 1A. Distribuição de uma série de n-alcenos: <sup>1</sup>D e <sup>2</sup>D – isoterma; 1B. Distribuição de n-alcenos: <sup>1</sup>D – isoterma, <sup>2</sup>D – programação de temperatura; 1C. Distribuição de n-alcenos: <sup>1</sup>D e <sup>2</sup>D – programação de temperatura; 1D. Distribuição de três séries homólogas com polaridade distintas: <sup>1</sup>D e <sup>2</sup>D – programação de temperatura. 2. Mecanismos de separação num conjunto dito normal. Ilustração modificada da original de Phillips et al., 1999 [66]. ....31

Figura 9. Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GC×GC. ....	33
Figura 10. Cromatograma GC×GC de um solvente aromático. Ilustração retirada de Phillips <i>et al.</i> [66]. ....	34
Figura 11. Cromatograma GC×GC-FID de óleo de peixe Savelha (“ <i>Menhaden oil</i> ”) retirado de Mondello <i>et al.</i> – “Detailed analysis and group type separation of natural fats and oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography” [101]. ....	35
Figura 12. Cromatograma de óleo de arenque (“ <i>herring oil</i> ”) retirado de Brinkman <i>et al.</i> [79]. Ilustração da estrutura cromatográfica para PUFA. ....	36
Figura 13. 1 - Comparação entre as abundância dos íons de um analito ao longo do pico cromatográfico obtido por GC×GC-qMS e GC×GC-TOFMS. I-) Cromatograma de íons totais (TIC) do analito analisado por GC×GC-qMS utilizando um intervalo de 42 – 235 Th a 19,36 Hz. II-) Cromatograma de íons totais do mesmo analitos obtido por GC×GC-TOFMS utilizando um intervalo de 40 – 900 Th a 50 Hz. A, B e C são os espectros de massas adquiridos no começo, ápice e fim do pico cromatográfico. Ilustração retirada de S. M. Song <i>et al.</i> [92]. 2 – Razão de massa entre os três pares de m/z 136/121 146/89 126/111. A) taxa de aquisição de 33 Hz; B) taxa de aquisição de 20 Hz. Ilustração modificada de M. Adahclour <i>et al.</i> [93]. ....	38
Figura 14. Diagrama geral do protótipo GC×GC-qMS. (1) sistema de controle de aquecimento, (2) sistema de aquecimento, (3) modulador de quatro jatos, (4) espectrômetro de massa com analisador quadrupolar, (5) conversor AD/DA, (6) relês de estado sólido, (7) Dewar, (8) válvulas solenóides 3 vias. ....	46
Figura 15. Interface do usuário do programa de controle de válvulas do GC×GC na plataforma LabVIEW versão 8.5 (modificação da versão desenvolvida pelo Doutor Ernesto Ferreira [96]). ....	47
Figura 16. A - Superfície de reposta para as variáveis temperatura e iso-octano (as variáveis derivatizante e tempo foram mantidas no nível 0). B - Diagrama de Pareto ilustrando as estimativas dos efeitos a um nível de confiança de 95 %. Imagem gerado pelo software Statistica versão 6.0. Legenda: (1) i-octano(L) – efeito linear do volume de iso-octano; (2) Derivatizante(L) – efeito linear do volume de solução de metóxido de sódio 2 M; (4) Temperatura(L) – efeito linear da temperatura do processo de transesterificação; i-octano(Q), Temperatura(Q) e Derivatizante(Q) correspondem, respectivamente, aos seus termos quadráticos; 1Lby3L, 3Lby4L e 2Lby3L correspondem à influencia dos efeitos mistos, ou seja, interações entre fatores (1 = volume de iso-octano, 2 = volume de derivatizante, 3 = tempo de reação e 4 = temperatura de reação). ....	55
Figura 17. Perfil de extração dos FAME da cera de abelha metilada. As fibras avaliadas foram PDMS de 100 µm e 7 µm de espessura. Os pontos foram obtidos em duplicata. Para os pontos de 5 min da fibra PDMS de 7 µm e 20 min para a fibra de PDMS de 100 µm, os desvios relativos foram de 10 e 15 %, respectivamente. ....	57
Figura 18. Gráfico ilustrando as duas cinéticas de transferência de massa teóricas consideradas na hipótese para explicar o perfil de extração para a fibra comercial de PDMS com espessura de 7 µm. ....	58
Figura 19. A. Foto do equipamento GC-qMS modelo QP2010 Plus sem alterações. B. Foto do controlador da interface GC×GC montado no laboratório. ....	59
Figura 20. Foto do equipamento GC-qMS QP2010 Plus após conversão para GC×GC-qMS. A. Isolamento dos tubos do modulador com lã de vidro e guia de acrílico. B.	

Interface GC×GC mostrando o sistema de resfriamento dos gases de N <sub>2</sub> , e ao fundo as válvulas solenóides e controladores de pressão.....	60
Figura 21. Cromatograma de querosene comercial adquirido no sistema GC×GC-qMS. Programação do forno cromatográfico: 40 °C a 3 °C·min <sup>-1</sup> até 240 °C. Período de modulação = 5 s. Gás de arraste H <sub>2</sub> (0,6 mL·min <sup>-1</sup> ). Taxa de aquisição 33 Hz com intervalo de varredura 40-284 Th. Modo de ionização EI (0,7 eV). Voltagem da multiplicadora 0,8 kV. Volume injetado 0,5 µL (razão de split 1:200). Temperatura do injetor e linha de transferência 250 °C. Temperatura da fonte de ionização 200 °C. Conjunto de colunas 1.....	61
Figura 22. A. Diagrama comparando o desempenho cromatográfico para três tipos de gás de arraste. Representado em vermelho, azul e verde estão ilustradas as curva de van Deemter para os gases hidrogênio, hélio e nitrogênio. B. Diagrama mostrando a variação da viscosidade dos gases hélio, nitrogênio e hidrogênio com relação à temperatura. Ilustração retiradas e adaptadas de J. V. Hinshaw [98]. .....	62
Figura 23. Ilustração genérica do comportamento de três classes de compostos: séries de alcanos alifáticos (BRANCO), ésteres metílicos alifáticos (CINZA) e álcoois alifáticos (PRETO). A. Conjunto de colunas ortogonais (HP-5+SPWax). B. Conjunto de colunas semi-ortogonal (HP-1+HP-50).....	63
Figura 24. Cromatograma de óleo de peixe adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C·min <sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma a 240 °C por 25 min; Período de modulação 6 s; vazão 0,6 mL·min <sup>-1</sup> ; taxa de aquisição 100 Hz; introdução da Amostra SPME; temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1.....	64
Figura 25 A. Região ampliada do cromatograma de óleo de peixe. Região utilizada para ilustrar a estrutura cromatográfica de PUFA em óleo de peixe. B. Cromatograma teórico ilustrando o perfil de eluição de grupos de FAME com o mesmo número de insaturação. ....	65
Figura 26. Cromatogramas de óleo de peixe adquiridos no sistema GC×GC-qMS. Programação de temperatura 170 °C a 3 °C·min <sup>-1</sup> até 240 °C, isoterma a 240 °C isoterma a 240 °C por 25 min. Vazão do gás de arraste 0,6 mL·min <sup>-1</sup> . Volume injetado 1 µL (razão de split de 1:50). Voltagem da multiplicadora de elétrons 700 V. Técnica de ionização EI (70 eV). A. Intervalo de varredura de 40- 284 Th, a 33 Hz. B. Intervalo de varredura programado para 40-284 Th (de 4 a 15 min), 70-314 Th (15-20 min), 100-344 Th (20-25 min) e 130-374 Th (25-48,33 min), a 33 Hz. ....	67
Figura 27. Espectros de massas do éster metílico do DHA. Técnica de ionização: EI (70 eV). Voltagem da multiplicadora de elétrons 700 V. A. Espectro adquirido a 33 Hz com intervalo fix de 40-284 Th. B. Espectro adquirido a 33 Hz com intervalo de varredura móvel – neste intervalo 100 – 344 Th. ....	68
Figura 28. Diagrama ilustrando o fenômeno de distorção do espectro de massa (do inglês, “ <i>mass spectral skewing</i> ”) para o pico do éster metílico do DHA, obtido no sistema GC×GC-qMS. Taxa de aquisição: A. 25 Hz; B. 33 Hz. ....	69
Figura 29. Cromatograma de cera de abelha obtida no protótipo GC×GC-qMS. Foi utilizada uma fibra comercial com revestimento de PDMS com espessura de 7 µm. Programação de temperatura: 170 °C → 3 °C·min <sup>-1</sup> → 240 °C por 35 minutos. Temperatura do injetor: 270 °C. Temperatura da linha de transferência: 250 °C. Temperatura da fonte de ionização: 200 °C. Vazão do gás de arraste: 0,6 mL·min <sup>-1</sup> . Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50- 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min.....	72

- Figura 30. Cromatograma de cera de carnauba amarela obtida no protótipo GC×GC-qMS. Transesterificação por catálise básica. Volume injetado 1  $\mu\text{L}$  (razão de split 1:50) de uma solução 100 ppm. Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos. Temperatura do injetor: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da linha de transferência: 250  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura do fonte de ionização: 200  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50 - 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min. .... 73
- Figura 31. Cromatograma de óleo de peixe obtida no protótipo GC×GC-qMS. Transesterificação por catálise básica. Foi utilizada uma fibra comercial com revestimento de PDMS com espessura de 7  $\mu\text{m}$ . Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  isoterma a 240  $^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos. Temperatura do injetor: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da linha de transferência: 250  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da fonte de ionização: 200  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50 - 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min. .... 74
- Figura 32. Cromatograma de lipídios obtidos pelo esfregaço de células de mucosa bucal obtido no equipamento GC×GC-FID. Transesterificação por catálise básica. Introdução e preparo da amostra por SPME (filme de PDMS de 7  $\mu\text{m}$  de espessura). Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  isoterma a 240  $^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos. Temperatura do injetor e detector: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste ( $\text{H}_2$ ): 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Taxa de aquisição: 100 Hz. .... 75

# Capítulo 1:

# INTRODUÇÃO



## 1. Introdução

Os lipídios apresentam uma variedade química muito grande, de forma que existem diversas definições a cerca de seu grupo. A definição utilizada ao longo deste trabalho restringe os lipídios aos ácidos graxos e seus derivados (triacilglicerídeos e fosfolipídios) [1,2]. Demais definições e sistemas de nomenclatura são citadas na seção “Revisão Bibliográfica”.

Os lipídios possuem um nicho de aplicações muito importante, principalmente no setor industrial e clínico.

Na área tecnológica, o conhecimento da composição química dos lipídios em matérias-primas como cera e óleos de origem animal e marinho, é de grande importância para a indústria química, farmacêutica e de alimentos, seja na seleção de fornecedores, na avaliação do produto acabado, ou nas inspeções desses pelos órgãos fiscalizadores oficiais [3]. Além disso, análises capazes de identificar a origem destas matérias-primas são fundamentais em protocolos de certificação, utilizados para garantir a qualidade e agregar valor comercial a estes produtos.

Neste contexto, a cera de carnaúba, produzida pelas folhas da *Copérnica prunifera*, ou Carnaúbeira, como mecanismo de defesa contra desidratação excessiva da planta em regiões semi-áridas, é utilizada industrialmente, na fabricação de vernizes, revestimentos, impermeabilizantes, e no revestimento de microchips. Além disso, depois de sofrer processos de refino pode também ser empregados na fabricação de produtos farmacêuticos, cosméticos, filmes plásticos, fotográficos e eventualmente, utilizados no processo de produção de obras artísticas (telas e esculturas, por exemplo).

O estudo da composição de cera em obras de arte pode ser utilizado para fornecer informações a respeito do tipo de cera – naturais ou sintéticas - utilizadas em esculturas permitindo identificar se houve a presença de restaurações na peça, visto que o uso de cera sintética começou apenas a partir do século 19. Além disso, o estudo de sua composição pode identificar a autenticidade e origem da obra [4-6]. Entretanto, a aplicabilidade destas certificações irá depender, principalmente, da quantidade e disponibilidade da amostra.

Outro setor que vem se destacando é dos alimentos funcionais. Por definição, os alimentos funcionais são aqueles que além de exercer seu papel nutritivo, possuem efeitos benéficos no sistema fisiológico humano e/ou auxiliam na prevenção de doenças crônicas [7-9]. Como exemplo, o óleo de peixe é muito utilizado como suplemento alimentar devido ao seu alto teor de ácidos graxos poli-insaturados da classe ômega 3 ( $\omega$ 3), principalmente os ácidos  $\alpha$ -linoleico {(9Z,12Z,15Z)-octadecatrienoico}, ácido araquidônico {(5Z,8Z,11Z,14Z)-eicosatetraenoico}, ácido eicosa pentanóico (5Z,8Z,11Z,14Z,17Z)-eicosapentaenoico (do inglês “*eicosapentaenoic acid*”, EPA) e ácido docosahexanóico (4Z,7Z,10Z,13Z,16Z,19Z)-eicosahexaenoico (do inglês “*docosahexaenoic acid*”, DHA). O ácido  $\alpha$ -linoleico, por exemplo, é denominado de ácido graxo essencial, pois não é sintetizado no organismo humano, porém serve de precursor para a síntese dos ácidos poli-insaturados de cadeias mais longas, como o EPA e DHA [10-12]. Estudos mostraram que uma maior ingestão desses ácidos graxos diminui consideravelmente a incidência de doenças coronárias e auxilia no desenvolvimento de funções cognitivas de recém nascidos e crianças [10,12-15]. Dada esta importância, é fundamental a etapa de controle de qualidade de alimentos funcionais ricos nestes componentes [3].

No âmbito das ciências médicas e da química, temos a lipidômica. Esta é uma das mais recentes ciências “ômicas”, sendo um segmento da metabolômica [16,17]. Esta ciência interdisciplinar tem como alvo os lipídios, uma vez que estes apresentam diversas funções biológicas, abrangendo desde espécies armazenadoras de energia (gorduras e óleos), elementos estruturais de membranas biológicas (fosfolipídios e esteroídes), cofatores de enzimas, transportadores de elétrons, hormônios e mensageiros intracelulares [1]. Os fosfolipídios, por sua vez, vêm sendo utilizados como biomarcadores para diversas doenças tais como alguns tipos de diabetes, osteoartrite, Alzheimer e arterosclerose [18-22]. Além disso, devido ao fato dos lipídios serem, também, reguladores de processos de produção das proteínas, e de participarem de diversas rotas bioquímicas, o estudo do lipidoma pode prover informações complementares integrando a genômica, proteômica e metabolômica para a elucidação e tratamento de patologias diversas [23].

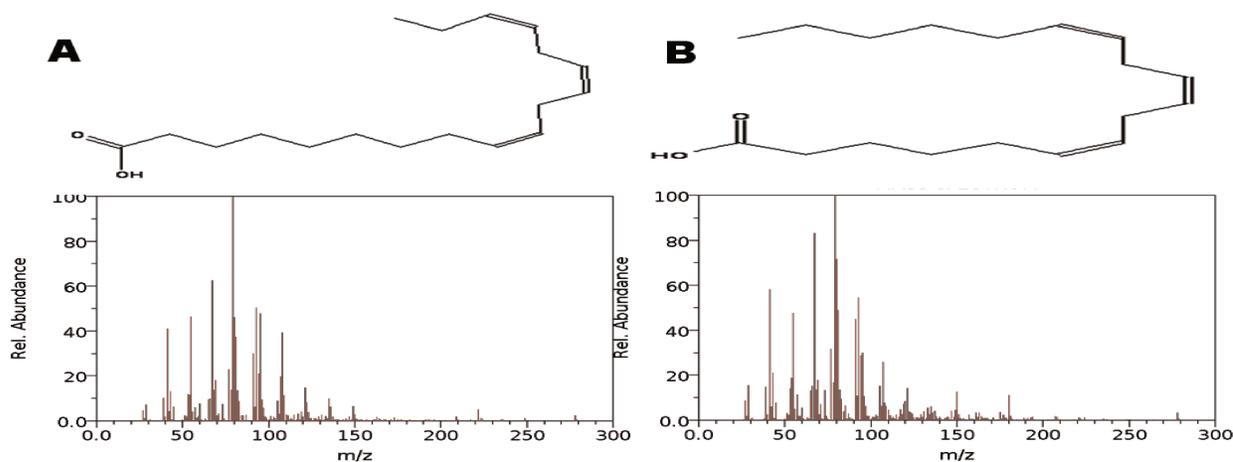
Os ácidos graxos poli-insaturados são armazenados, após sua ingestão, principalmente na forma de fosfolipídios. Os fosfolipídios, por sua vez, são os principais

elementos estruturais das membranas de células, principalmente do sistema nervoso central humano [18]. Conseqüentemente, a baixa ingestão destes ácidos graxos ao longo da gestação e durante os primeiros anos de vida do recém nascido ocasionarão fenótipos como baixa acuidade visual [10,12,13,18]. Por isso, os fosfolípidios vêm sendo utilizados, principalmente, como biomarcadores do estado nutricional de crianças, de forma a prevenir tais fenótipos. Estes lipídios podem ser coletados tanto de células vermelhas do sangue, plasma humano e tecidos adiposos quanto através de métodos não invasivos e menos desconfortáveis como a coleta de células do epitélio bucal já que seus perfis lipídicos são equivalentes [24,25]. Esta última, embora não invasiva, requer metodologias muito sensíveis devido à baixa quantidade de material – é estimado alguns milhares de células por esfregaço.

Uma vez situada a importância dos lipídios nas áreas clínica e tecnológica, torna-se crescente a necessidade de métodos analíticos com uma maior confiabilidade, que sejam tanto robustos quanto rápidos. Tipicamente, um método analítico consiste do preparo da amostra, separação de seus constituintes e a detecção em si. Na análise de lipídeos, as formas mais comuns de preparo de amostra são extração líquido-líquido (do inglês “*liquid-liquid extraction*”, LLE), extração em fase sólida (do inglês “*solid phase extraction*”, SPE), extração sólido-líquido contínuo (Soxhlet), extração utilizando um fluido supercrítico (do inglês “*supercritical fluid extraction*”, SFE) e extrações assistidas por micro-ondas (do inglês “*microwave-assisted extraction*”, MAE) [2,26]. Essas técnicas de isolamento são muito adequadas para análise de macroconstituintes e de lipídios saturados. Entretanto, quando a quantidade de material é muito pequena e sua estabilidade química baixa algumas dessas tecnologias convencionais passam a envolver manipulação da amostra e/ou condições experimentais, principalmente aquecimento, que favorecem a degradação e perda dos lipídios, principalmente dos poli-insaturados, levando a resultados menos confiáveis e de pouca sensibilidade [3,17-27]. Como exemplo, a taxa de degradação do ácido  $\alpha$ -linoléico é cerca de 20 vezes mais rápida do que o ácido oleico. Ademais, é estimado um incremento de duas vezes na taxa de decomposição de ácidos graxos por insaturação presente em sua cadeia [2,28]. Por isso, a crescente busca por metodologias mais rápidas, robustas, confiáveis e passíveis de automação na análise de lipídios insaturados em baixa quantidade.

Com relação aos métodos de separação, quando presentes na análise dos lipídios, temos usualmente a combinação entre duas técnicas cromatográficas, sejam elas a combinação da cromatografia planar (do inglês “*Thin Layer Chromatoraphy*”, TLC) com cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês “*High Performance Liquid Chromatography*”, HPLC), da TLC com a cromatografia gasosa (do inglês “*Gas Chromatography*”, GC) ou da Cromatografia Líquida com GC, principalmente quando na presença de uma coluna de HPLC dopada com íons prata. Devido à alta complexidade da matriz (amostras biológicas e ceras), torna-se necessário um maior poder de separação de seus constituintes. Por isso a combinação entre duas técnicas cromatográficas. Entretanto nestas análises são observadas transferências não quantitativas resultando em perdas ao longo do processo, e, portanto um decréscimo na detectabilidade do método. Uma vertente que alcançou o status de estado-da-arte em lipidômica é denominada de “*shotgun lipidomics*”, no qual a amostra é infudida diretamente no espectrômetro de massas. As amostras tornam-se passíveis de análise pelas técnicas infusão direta quando o fenômeno de supressão iônica não afeta os analitos alvo – fenômeno no qual demais espécies presentes na amostra competem com o analito alvo pelo agente ionizante. Conseqüentemente caso esse fenômeno esteja presente na metodologia, uma etapa adicional de preparo de amostra seria necessário. Já com relação ao poder de separação é muito comum o uso de espectrômetros de massas sequenciais (do inglês “*tandem mass spectrometry*”, MS<sup>n</sup>) [2,17,21,26]. Nas técnicas de MS tradicionais a sua principal limitação é a distinção entre isômeros, principalmente de posição. Isto ocorre principalmente porque, a princípio, nas técnicas convencionais de espectrometria de massas com ionização suave (do inglês, “*soft ionization*”), ou seja, sem fragmentação, as massas moleculares são idênticas, impossibilitando a sua distinção. E na técnica de ionização por elétrons, por exemplo, os fragmentos gerados pelos isômeros são extremamente similares, o que dificulta sua distinção em amostras mais complexas, conforme ilustrada na Figura 1 [2]. Para a distinção entre isômeros algumas possibilidades como medidas de mobilidade iônica e formação de adutos durante a ionização podem ser alternativas. Embora adequado a grande parcela dos estudos lipidômicos, as metodologias de “*shotgun*” se tornam restritas a aplicações acadêmicas, devido ao elevado custo dos equipamentos. Conseqüentemente o desenvolvimento de metodologias mais simples e baratas, porém

robustas e confiáveis, se torna necessário para assegurar o implemento e popularização dos estudos lipidômicos. Uma alternativa, das inúmeras disponíveis, é o uso da GC nestes estudos.

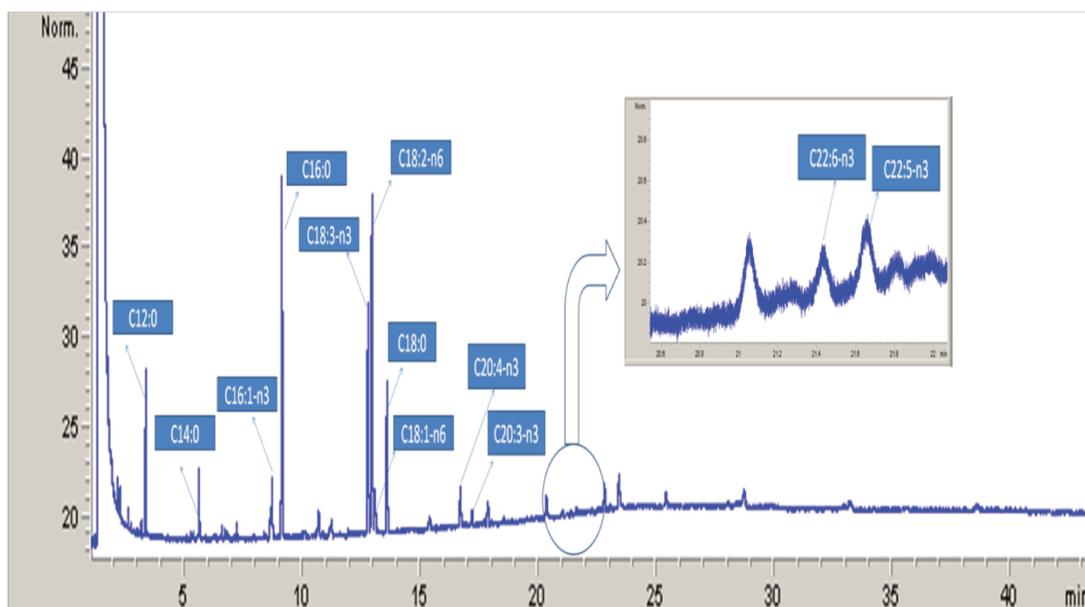


**Figura 1.** Representação das estruturas dos ácidos graxos e seus respectivos espectros de massa obtidos por ionização por elétrons. A – Ácido Linolênico. B – Ácido Gamoleíco. Estruturas químicas e espectros de massas foram obtidos do banco de dados da NIST.

A análise de lipídios por GC é dificultada pela baixa volatilidade dos analitos. Conseqüentemente é necessária a derivatização dos analitos para espécies com maior pressão de vapor – no caso a transesterificação (metanólise) de triacilglicerídeos e fosfolipídios. Por exemplo, a metodologia convencional para a análise de fosfolipídios em recém-nascidos e crianças, por Cromatografia Gasosa, consiste de uma metodologia não invasiva, no qual células do epitélio bucal são coletadas por uma escova citológica, o material lipídico é então extraído, derivatizados e analisados por GC [10]. Em seguida, os lipídios do esfregaço são isolados geralmente pelo método de Bligh and Dyer – extração de lipídios a frio – sob ultrassom. Logo, o extrato é reconcentrado, sob fluxo de gás nitrogênio seco, e aplicado em uma placa cromatográfica de sílica gel. Então é feita a separação por TLC dos lipídios neutros e dos fosfolipídios. A fração dos fosfolipídios é reconstituída e hidrolisada. Então, o meio é acidificado e extraído com um solvente apropriado, tal como n-hexano, e os ácidos graxos dos fosfolipídios são derivatizados por meio de uma reação de condensação com metanol, utilizando como catalizador um ácido de Lewis (trifluoreto de boro). No caso de amostras muito complexas, é muito comum encontrar relatos da utilização da Cromatografia Planar Bidimensional, garantindo a seletividade do método. Os ésteres

metílicos dos ácidos graxos (do inglês “*Fatty Acid Methyl Esters*”, FAME) são, então, analisados por Cromatografia Gasosa com detecção por ionização em chama (do inglês “*Gas Chromatography with flame ionization detection*”, GC-FID) [10,23,24][10],[13],[24].

A Figura 2 ilustra um cromatograma reproduzido das condições de Connor et al. [24]. O tempo de preparo da amostra, sem contar a corrida cromatográfica com o uso desta metodologia, leva cerca de 40 - 60 minutos e apresenta muita manipulação da amostra, resultando em perdas, transferências não quantitativas e possíveis degradações. Neste cromatograma pode ser observada a presença de possíveis coeluições e a baixa intensidade dos FAME, comprometendo a integridade dos resultados. Pode ser observado que os biomarcadores mais comuns, o DHA e EPA, se encontram no limite de detecção, dificultando as quantificações. Além disso, apenas 14 constituintes foram identificados.



**Figura 2.** Cromatograma ilustrando os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAME) do esfregaço de bochecha, obtidos por GC-FID. A terminologia utilizada se refere aos ácidos graxos correspondentes aos FAME. As condições de preparo da amostra são segundo Connor et al. [24]. Programação de temperatura: de 170 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C por 25 min. Temperatura do injetor e detector: 280 °C. Coluna: HP-5. Gás de arraste: H<sub>2</sub> (0,6 mL·min<sup>-1</sup>). O cromatograma acima foi obtido no Laboratório de Cromatografia Gasosa e Microtécnicas de Extração – LCG – IQ/UNICAMP.

Neste contexto, a introdução de tecnologias de microextração para manipulação de lipídios acoplada a uma técnica cromatográfica com alta sensibilidade e poder de separação é extremamente desejada. Portanto, a utilização da Microextração em Fase Sólida (do inglês “*Solid Phase Microextraction*”, SPME) junto a Cromatografia Gasosa

Bidimensional Abrangente (do inglês “*Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography*”, GC×GC) pode diminuir consideravelmente o tempo gasto com o preparo da amostra, e a manipulação da mesma, uma vez que o GC×GC apresenta uma elevada capacidade de pico, o que elimina a necessidade de combinar TLC com GC. Além disso, a utilização de uma microtécnica de extração apresenta a vantagem de préconcentrar os analitos, aumentando ainda mais a detectabilidade geral do método. Consequentemente este acoplamento poderá levar à detecção e quantificação de um número superior de constituintes e, por conseguinte, a possibilidade de se encontrar novos biomarcadores em estudos lipidômicos.

A GC×GC, descrita originalmente por Liu e Phillips [29], usa cromatógrafo a gás convencional modificado, com uso de duas colunas capilares conectadas em série; com um dispositivo entre elas denominado de modulador, dispositivo este que coleta, reconcentra e reinjeta contínua e periodicamente frações do eluato da primeira para a segunda coluna. Os conjuntos de colunas típicos em GC×GC consistem em uma coluna capilar convencional (30 m) conectada a outra coluna capilar (< 2 m) do tipo utilizado em Fast GC ( $d_c \leq 0,1$  mm), curta o suficiente para que o material coletado e reinjetado seja completamente eluído antes que a próxima fração seja nela introduzida. É altamente desejável (mas não imprescindível) que as fases estacionárias das colunas sejam diferentes, de forma que os mecanismos de separação sejam ortogonais entre si. Portanto espécies co-eluídas na primeira podem ser separadas na segunda eluição [30]. A capacidade de pico (número máximo de picos separáveis) de um GC×GC aumenta geometricamente em relação à GC. Se a capacidade de picos da primeira ( $^1D$ ) e da segunda dimensão ( $^2D$ ) forem, respectivamente,  $n_1$  e  $n_2$  picos, a capacidade de pico total de um sistema bidimensional será incrementado para  $n_1 \times n_2$  picos [30]. Como exemplo, pode-se citar o trabalho de Dallüge, onde cerca de 30.000 compostos foram separados e detectados pela técnica, em uma única análise [31].

A representação dos cromatogramas em GC×GC é diferente da GC convencional, pois a partir do registro do sinal do detector e conhecendo-se o período de modulação (intervalo constante de tempo de cada ciclo de modulação, da ordem de alguns segundos) pode-se construir cromatogramas tridimensionais Sinal x Tempo na 1ª Coluna ( $^1t_R$ ) x Tempo na 2ª Coluna ( $^2t_R$ ), normalmente representados por superfícies de resposta com escalas cromáticas de sinal (diagrama de cores). A Figura 3 mostra

um cromatograma obtido por GC×GC-FID para óleo essencial de folhas da planta amazônica macacaporanga (*Aniba fragrans*). No diagrama, cada mancha corresponde a um composto, e diversos eluatos perfeitamente resolvidos são visíveis, sendo que muitos destes coeluiriam em GC convencional ou não seriam detectados. Uma característica única e poderosa de GC×GC é a estrutura dos cromatogramas, como pode ser também observado no diagrama anterior. Substâncias relacionadas estruturalmente (séries homólogas, isômeros, etc.) encontram-se agrupadas em regiões claramente definidas, por exemplo, os picos dos monoterpenos agrupam-se sobre a superfície  $^1t_R \times ^2t_R$  em “ilhas” (clusters), cada um correspondente a monoterpenos não oxigenados ou oxigenados, bem como as sesquiterpenos não oxigenados e oxigenados. A estrutura cromatográfica é uma ferramenta qualitativa importante, pois, quando presente, a identificação dos analitos (e de sua classe) pode ser realizada visualmente, fornecendo uma ferramenta simples e rápida. A GC×GC acoplada ao espectrômetro de massas (GC×GC-MS) permite o uso desse recurso para auxiliar a identificação por MS.

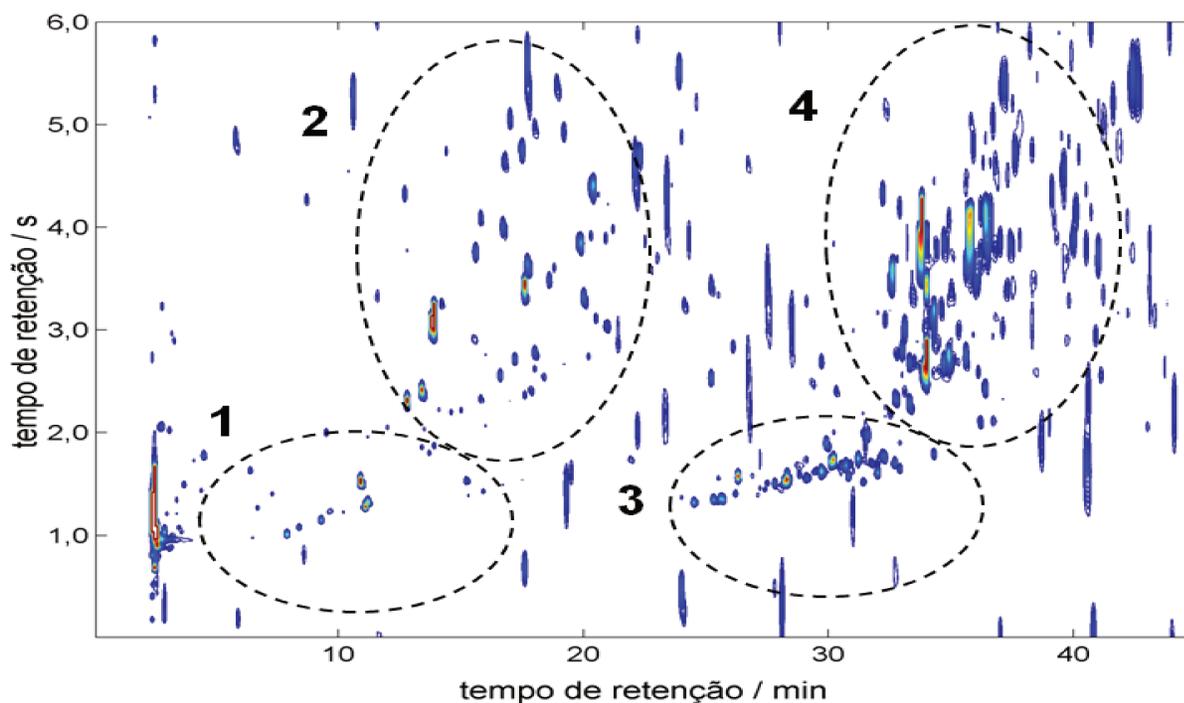


Figura 3. Região expandida do cromatograma de óleo essencial de folhas de macacaporanga (*Aniba fragrans*) por GC×GC-FID. Conjunto de colunas: HP-5 (30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$ ) + SupelcoWax (1,0 m, 0,10 mm, 0,10  $\mu\text{m}$ ). Período de modulação 6 s. Taxa de aquisição 100 Hz. Programação de temperatura: 60  $^{\circ}\text{C}$  a 3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$  até 240  $^{\circ}\text{C}$ . 1. Monoterpenos não-oxigenados; 2. Monoterpenos oxigenados; 3. Sesquiterpenos não-oxigenados; 4. Sesquiterpenos oxigenados. Cromatograma produzido pelo grupo LCG e adaptado de Pedroso et al.

A largura dos picos produzidos em GC×GC é da ordem de 100 – 600 ms por causa do efeito de compressão de banda e focalização (exceto em moduladores baseados em válvulas), conseqüentemente os detectores devem possuir baixas constantes de tempo, ou de maneira equivalente, elevadas taxas de digitalização. Com isso a demanda por detectores com baixo volume interno, e com um sistema eletrônico suficientemente veloz se tornou necessário, entretanto poucos detectores possuem estes requisitos. O detector por ionização de chama satisfaz esta demanda devido ao seu volume interno desprezível e aprimorada eletrônica, sendo um dos detectores mais utilizados desde sua introdução. Entretanto esse detector por si não fornece informações qualitativas, já o acoplamento com a espectrometria de massas permite obter outras informações devido aos padrões de fragmentação, dos analitos possibilitando extrair informações qualitativas (quando se utiliza ionização por elétrons). Um dos primeiros relatos deste acoplamento se deu com um espectrômetro de massas com analisador quadrupolar (qMS), entretanto, na época, esse apresentava uma frequência de aquisição muito baixa. O analisador por tempo de voo, por outro lado, permite uma coleta 500 espectros por segundo tornando-se o sistema ideal para a GC×GC, embora apresente a desvantagem do seu elevado custo (~ U\$ 350 mil) [32,33]. Nos últimos anos, com o aprimoramento do sistema eletrônico o analisador quadrupolar superou sua baixa velocidade de varredura alcançando velocidades de  $10.000 \text{ Th}\cdot\text{s}^{-1}$  e  $20.000 \text{ Th}\cdot\text{s}^{-1}$  permitindo taxas de digitalizações compatíveis com a GC×GC, tornando-se, então, uma alternativa viável aos sistemas TOFMS [34]. Esses instrumentos já foram testados como plataforma para GC×GC [35], e mesmo com algumas limitações, em comparação a sistemas GC×GC-TOFMS, a relação custo/benefício é atraente. Além disso, um GC×GC-qMS apresenta desempenho muito superior quando comparado com GC-qMS, visto que os sinais para os compostos são mais intensos e mais puros.

Neste contexto, foi proposto foi o desenvolvimento de uma metodologia rápida e eficiente para análise de lipídios para lipidômica e aplicações correlatas (adequado tanto a macro como a microconstituíntes) em um instrumento com elevada sensibilidade e poder de separação com a finalidade de simplificar os procedimentos experimentais sem prejudicar a integridade dos resultados. Portanto o uso da SPME combinada a

GC×GC-qMS para o estudo e caracterização de lipídios, abrangendo matrizes como cera, óleos e lipídios das membranas das células da mucosa bucal, foi desenvolvido. A metodologia desenvolvida para o estudo da composição das membranas de células do epitélio bucal foi feita em parceria com o Dr. Stanislau Bogusz Junior, durante o período de seu pós doutoramento. O procedimento de otimização do processo de transesterificação foi realizada em conjunto com a aluna de iniciação científica Mayra Fontes Furlan. Espera-se que estes métodos e dados possam ser empregados como ferramentas em estudos lipidômicos e afins, demonstrando o potencial e aplicabilidade da SPME a análise de FAME com elevada massa molecular.

# Capítulo 2:

# OBJETIVOS



## 2. Objetivos

Conforme apresentado na seção introdutória desse trabalho, para dar início aos estudos lipidômicos no grupo foi necessário primeiramente, dentre outros objetivos, desenvolver uma metodologia para análise de lipídeos poli-insaturados em baixíssima quantidade. Baseando-se nesse meta, os objetivos foram:

- i)* Desenvolver uma metodologia rápida e eficiente para análise de lipídios, sendo adequado tanto a macroconstituintes bem como microconstituintes.
- ii)* Empregando um método de derivatização brando sem a degradação dos analitos e introdução de artefatos.
- iii)* Miniaturização do processo de derivatização e simplificação da metodologia analítica para a utilização da Microextração em Fase Sólida.
- iv)* Adaptação e configuração de um modulador criogênico ao equipamento comercial GC-MS modelo QP2010 Plus.



# Capítulo 3:

# REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



### 3. Revisão Bibliográfica

#### 3.1. Lipídios

##### 3.1.1. Nomenclatura e Miscelânea

O grupo dos lipídios apresenta uma variedade química muito grande de forma que existem diversas definições a cerca de seu grupo. Apesar de suas inconsistências, a definição mais abrangente é a de que os lipídios são compostos insolúveis em meio aquoso [1]. Segundo Christie, o uso do termo lipídeo é restrito aos ácidos graxos e seus derivados, e substâncias relacionadas biossinteticamente ou funcionalmente a esses compostos [2,28]. A definição de Fahy contempla moléculas pequenas hidrofóbicas ou anfifílicas que podem ser originadas inteiramente, ou parcialmente, pela condensação de tioésteres e/ou pela condensação de unidades de isopreno [2]. Sob essa definição, os lipídios compreendidos são ácidos graxos, glicerolipídios, fosfolipídios, esfingolipídeos, lipídeos de esteróis, lipídios de prenóis, sacarolipídios e entre outros.

**Tabela 1.** Nomenclatura de ácidos graxos segundo a comissão IUPAC-IUB, sua abreviatura e a nomenclatura utilizada usualmente. Tabela adaptada de Christie et al. [36].

Nome IUPAC	Abreviatura	Usual	Nome IUPAC	Abreviatura	Usual
butanoíco	4:0	Butírico	pentadecanoíco	15:0	-
hexanoíco	6:0	Capríco	hexadecanoíco	16:0	palmitico
Octanoíco	8:0	Caprílico	heptadecanoíco	17:0	margárico
Nonanoíco	9:0	pelargônico	octadecanoíco	18:0	esteárico
Decanoíco	10:0	Cáprico	nonadecanoíco	19:0	-
Undecanoíco	11:0	-	eicosanoíco	20:0	araquídico
Dodecanoíco	12:0	Láurico	heneicosanoíco	21:0	-
Tridecanoíco	13:0	-	docosanoíco	22:0	behênico
tetradecanoíco	14:0	Mirístico	tetracosanoíco	24:0	lignocérico

Já os ácidos graxos são ácidos orgânicos cuja cadeia carbônica se estendem de 4 a 36 carbonos (C4 a C36), sendo encontrados principalmente de fontes animais, vegetais e de micro-organismos [1,36]. Nos tecidos animais, os ácidos graxos mais comuns possuem comprimento de cadeia com número par de carbonos variando entre 14 a 22 átomos de carbono. Entretanto, ocasionalmente ácidos graxos com número ímpar de átomos de carbonos também podem ser encontrados principalmente em tecidos de origem animal. Adicionalmente, em micro-organismo já houve relatos de

cadeias carbônicas com comprimento acima de 80 átomos de carbono, no entanto em espécies vegetais este comprimento é bastante reduzido [36,37]. A cerca de sua diversidade, ocasionalmente são encontrados ácidos graxos ramificados, com grupos hidroxila, cetona, éter, halogenados e variantes como, por exemplo, as oxilipinas (do inglês, *oxylipins*) [36-38]. Além disso, os ácidos graxos podem se encontrar na forma saturada ou insaturada, sendo que em espécies animais o número máximo de saturações observadas é de 6, ao passo que em espécies vegetais este número, dificilmente ultrapassa 3 [36].

A terminologia utilizada para indicar o comprimento da cadeia (X) e a quantidade de insaturações (Y) é CX:Y. Por exemplo, C18:3 é um ácido graxo com uma cadeia carbônica de 18 átomos com 3 insaturações. Com relação ao número de insaturações e suas respectivas posições, temos dois sistemas de nomenclatura: omêga ( $\omega$ ), e delta ( $\Delta$ ). O delta de inicia a contagem a partir do carbono 1, segundo a nomenclatura da IUPAC. Já o sistema omêga, inicia a contagem pelo carbono mais distante do agrupamento carbonila. Por exemplo, o ácido (9Z, 12Z, 15Z)-octadecatrienoico, também conhecido por ácido  $\alpha$ -linolênico, pode ser representado tanto por C18:3 $\Delta$ 9, quanto C18:3 $\omega$ 3. Usualmente, no sistema de contagem omêga, o símbolo “ $\omega$ ” pode, também, ser representado pelo caractere “n”. Por exemplo, o ácido linolênico pode ser representado como C18:3n-3.

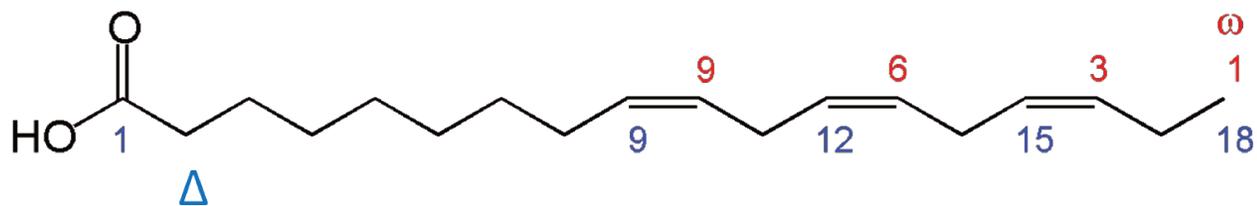


Figura 4. Ilustração do ácido (9Z, 12Z, 15Z)-octadecatrienoico (ácido  $\alpha$ -linolênico). Em azul está representada a contagem do sistema delta ( $\Delta$ ). Em vermelho a contagem do sistema omêga ( $\omega$ ).

Com relação às possíveis ramificações, as formas predominantes são de um agrupamento metila na posição 2 da cadeia carbônica, sendo designados por br<sub>2</sub> (do inglês, “*branched*”); e grupos metila posicionados no penúltimo e antepenúltimo átomo de carbono da cadeia, sendo denominados isômeros “anteiso” (*ai* – do inglês, “*anteiso*”) e “iso” (*i* – do inglês, “*iso*”). Por exemplo, o termo br<sub>2</sub>-C26:0 corresponde ao ácido 2-metil-hexacosanoico [37-39], já os termos *i*-C26:0 e *ai*-C26:0 se referem aos ácidos 24-

metil-hexacosanoíco e ao ácido 23-metil-hexacosanoíco, conforme ilustrada na Figura 5 [36].

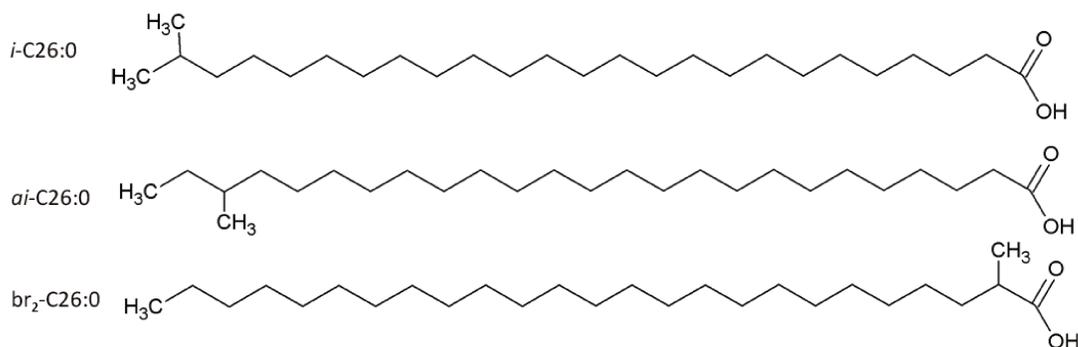


Figura 5. Representações estruturais dos ácidos 24-metil-hexacosanoíco (*i*-C<sub>26</sub>:0), 23-metil-hexacosanoíco (*ai*-C<sub>26</sub>:0), 2-metil-hexacosanoíco (*br*<sub>2</sub>-C<sub>26</sub>:0).

### 3.1.2. Métodos de Derivatização de ácidos graxos para análise por GC

Os métodos mais comuns de derivatização, para análises de ácidos graxos por GC, em seus respectivos ésteres metílicos são a transesterificação e a hidrólise seguida da condensação com alcoóis primários. O último método requer maior manipulação da amostra e requer no mínimo duas etapas (descritas abaixo), conseqüentemente transferências não quantitativas serão observadas quando do seu emprego. A primeira etapa consiste da hidrólise, sob refluxo (~ 1 hora), dos lipídios em uma solução alcalina e na presença de algum solvente apolar. Em seguida o solvente é separado do sistema e a solução é acidificada. Os ácidos graxos são, então, extraídos com algum solvente apolar como o *n*-hexano, por exemplo. Uma vez separados os ácidos graxos estes são condensados com metanol na presença de trifluoreto de boro para produzir os FAME. Entretanto, algumas limitações são observadas neste procedimento, tais como, lipídios com grupos epóxido e ciclopropeno são degradados em meio ácido e lipídios poli-insaturados podem ter suas insaturações oxidadas e/ou isomerizadas – ocasionando a introdução de isômeros *E* (comumente denominado isômero *trans*) [36,40].

Já a transesterificação requer uma única etapa, e os rendimentos de reação são elevados. A forma de catálise pode ser tanto ácida quanto básica. Na catálise ácida, os reagentes mais comuns são soluções em metanol, com ácido clorídrico, ácido sulfúrico e trifluoreto de boro. Entretanto devido a sua cinética lenta, nenhum destes reagentes é

utilizado a temperatura ambiente. Por exemplo, Morrison e Smith relataram a condição ótima para transesterificação de lipídios com uma solução de trifluoreto de boro (12-14% m/v) a 100 °C por 2 min para ácidos graxos livres, cerca de 10 min para fosfolipídios e 90 min para esfingomielinas [41,42]. Apesar de sua popularidade este reagente apresenta baixa estabilidade, impossibilitando o seu armazenamento por períodos muito longos. A formação de artefatos e baixos rendimentos foram relatados devido ao uso de soluções antigas deste reagente [41].

Uma alternativa seria o uso de soluções de ácido clorídrico ou sulfúrico em metanol. Relatos de transesterificações fazendo uso de soluções a 5 % de ácido clorídrico em metanol (v/v) podem ser encontradas na literatura, entretanto, nestes casos a amostra é submetida a refluxo por cerca de 8 horas a 50 °C. O uso de soluções de ácido sulfúrico concentrado em metanol (1-2 % v/v) também pode ser encontrado na literatura, entretanto o tempo excessivo e aquecimento são necessários para estas reações [40]. Na catálise ácida, assim como no processo de hidrólise e condensação, devido à elevada temperatura e longos tempos de reação a formação de artefatos é comum, assim como a deterioração de grupos epóxidos e ciclopropenos. Além disso, é comum o processo de auto-oxidação das insaturações presentes na amostra, uma vez que a presença de radical livre dá início à degradação das insaturações, sendo que, a presença de íons metálicos e incidência de luz irão acentuar este processo. Uma vez dado o início à auto-oxidação esta reação prossegue de forma autocatalítica [36]. O ácido linolênico é oxidado a uma taxa 20 vezes mais rápida do que o ácido oleico [2,28,40,41]. Por isso, recomenda-se o uso de antioxidantes, tal como o hidróxido de tolueno butilado (BHT, do inglês "*butylated hydroxy toluene*") quando o método escolhido for a transesterificação por catálise ácida. Além disso, comumente em amostras biológicas, a presença de plasmalógenos em meio ácido resulta na liberação de aldeídos que são convertidos em dimetilacetais, estes são muito difíceis de serem separados de alguns ésteres metílicos, tal como o metil palmitato, em uma única corrida por cromatografia convencional [41,43-45]. Outros reagentes tais como cloreto de alumínio e cloreto de acetila foram utilizados em processos de transesterificação, entretanto o cloreto de alumínio possui a desvantagem de não esterificar ácidos graxos livres [41,46,47].

Por outro lado, os reagentes mais utilizados em reações de transesterificação por catálise básica são o metóxido de sódio, e hidróxido de sódio em metanol [41,44,48]. A principal vantagem com relação ao uso deste tipo de catálise é que a reação procede a temperatura ambiente, conseqüentemente não é necessária a utilização de antioxidantes como tocoferol ou BHT, visto que o risco de decomposição dos ácidos graxos poli-insaturados (do inglês “*polyunsaturated fatty acids*”, PUFA) é muito reduzido. Entretanto uma limitação da transesterificação básica é a baixa cinética de conversão de ácidos graxos livres, assim este reagente é indicado para análise de lipídios tais como triacilglicerídeos e seus derivados [40,41]. Além disso, o BHT e seus derivados coeluem com os picos do miristato e palmitoleato de metila em GC [49]. Outra vantagem da catálise básica é a rápida cinética de transesterificação para fosfolipídios e triacilglicerídeos, que é da ordem de minutos. Entretanto para que o uso do metóxido de sódio seja eficiente o meio deve estar isento de umidade, uma vez que na presença de água o processo tende a saponificação [41,48]. Já o uso de hidróxido de potássio em metanol permite uma maior tolerância de água no meio reacional, de tal forma que o seu uso está relacionado a metanólise seletiva de fosfolipídios, devido a diferenças em cinéticas de reação [50]. Além disso, o uso de sal de alquil amônio, como hidróxido de tetrametilamônio, permitem a transesterificação *on-line* dos lipídios em cromatógrafos a gás com injetores pirolíticos [39,51,52]. Apesar de muito utilizado em análises de lipídios saturados, o seu uso para o estudo da composição de espécies insaturadas pode levar a formação de artefatos e degradação dos analitos.

### 3.1.3. Separação cromatográfica e Acoplamentos diversos

A separação de FAME por cromatografia gasosa convencional utiliza, basicamente, três tipos de filmes líquidos como fase estacionária: apolar, polar e muito polar. Os revestimentos apolares, tal com filme de metilsiloxanas (por exemplo, SPB-1, SPB-5, HP-5, DB-5, CP-Sil 8CB, DB-1, OV-1), são comumente empregados em análises de baixa complexidade devido às suas elevadas temperaturas de operação. A separação dos constituintes nestas colunas é baseada, essencialmente, nas diferenças de pressão de vapor. Conseqüentemente, a ordem de eluição dos FAME segue:  $t_R(\text{C18:0}) > t_R(\text{C18:1}) > t_R(\text{C18:2}) > t_R(\text{C18:3})$ . Para FAME com o mesmo número de

insaturações, porém com posições diferentes, a ordem esperada é:  $t_R(\text{C18:1 } \omega 3) > t_R(\text{C18:1 } \omega 6) > t_R(\text{C18:1 } \omega 7) > t_R(\text{C18:1 } \omega 9)$ . Entretanto, devido a sua baixa seletividade comumente são observadas coeluições parciais entre C18:2 $\omega$ 6 e 18:1 $\omega$ 9; C18: $\omega$ 6 e C13: $\omega$ 3, por exemplo. Esta limitação torna-se ainda mais complicada para os grupos C20 e C22 [36,41].

O uso de revestimentos polares como por exemplo, os derivados de etilenoglicol (DB-Wax, Supelcowax 10, Carbowax 20M), já são mais populares em análises de amostras biológicas, tais como tecidos adiposos, membranas e plasma sanguíneo. Nestas análises a ordem de eluição esperada é:  $t_R(\text{C18:3}) > t_R(\text{C18:2}) > t_R(\text{C18:1}) > t_R(\text{C18:0})$ . A ordem de eluição entre os isômeros de PUFA se mantém essencialmente a mesma, entretanto as diferenças entre os tempos retenção são acentuadas com o aumento da polaridade da coluna. Nestas colunas, por exemplo, é esperado que os constituintes insaturados do grupo C18 eluam antes do C19:0,  $t_R(\text{C18:0}) < t_R(\text{C18:1}\omega 9) < t_R(\text{C18:1}\omega 6) < t_R(\text{C18:1}\omega 3) < t_R(\text{C19:0})$ . Entretanto no uso de colunas com revestimento muito polar, tal como siloxanas com agrupamentos cianopropil (SP-2340, OV-275, CP-Sil 88) pode ser observado a eluição de FAME do grupo C18 após os constituintes do grupo C19. Por exemplo,  $t_R(\text{C18:3}\omega 3) > t_R(\text{C20:0})$ ;  $t_R(\text{C20:3}) > t_R(\text{C22:0})$  e  $t_R(\text{C22:4}) > t_R(\text{C24:0})$  [36,41,53]. No caso de isômeros “anteiso” e “iso”, em colunas polares, a forma “iso” elui antes da forma “anteiso”. Com relação aos isômeros *Z* e *E* (*cis* e *trans* são um caso particular de isômeros *Z* e *E*, respectivamente [54]), estes coeluem em colunas apolares, e, em colunas polares, o isômero *Z* (*z*) elui depois da forma *E* (*e*) [36,41]. Wolff reportou o padrão de eluição para todos isômeros do éster metílico do ácido linolênico em uma coluna CP-Sil 88 sob análise isotérmica por 45 min. A ordem de eluição observada foi *eee* (todas insaturações *E*) < *zee* < *eze* < *zze* < *eez* < *zez* < *ezz* < *zzz* (todas insaturações *Z*) [41,55].

Os principais acoplamentos com GC encontrados em análises de FAMEs são TLC-GC, LC-GC, GC-GC. O uso destes sistemas hifenados são pouco explorados em análises de rotina, devido a sua maior complexidade e sua restrição a aplicações específicas. O acoplamento entre TLC e GC é, na maioria dos casos, empregado visando um incremento na seletividade, permitindo estudar a composição de determinadas frações de lipídios. Por exemplo, o uso da TLC permite separar os lipídios neutros de fosfolipídios, dessa maneira realizando o seu acoplamento *off-line* com a GC

se torna possível o estudo da composição de cada fração destes lipídios [10,13,24,56]. O acoplamento LC-GC se deve, principalmente, à possibilidade de se utilizar colunas cromatográficas de HPLC dopadas com íons prata. Este acoplamento tem sido proposto em sua forma *on-line* de tal forma que apenas determinadas frações do eluato do LC são introduzido no GC. A vantagem seria que na LC a separação dos FAME seria pelo número de insaturações, e a fração introduzida no GC seria separada por pressão de vapor [56,57]. Já no uso de cromatografia gasosa de frações parciais comumente a primeira coluna é de caráter apolar, separando os constituintes em grupos (C18, C20, C22) e a segunda coluna possui um revestimento polar, permitindo a separação dos compostos poli-insaturados e seus respectivos isômeros [56,57]. Entretanto nestes acoplamentos apenas algumas frações são introduzidas a uma nova separação, sendo que estes sistemas requerem uma maior complexidade na instrumentação, principalmente na LC-GC e GC-GC [56,57]. Por outro lado, com a introdução da GC×GC foi possível a separação de centena de FAME em uma única análise, em óleo de peixe, por exemplo, sendo que para a GC convencional dificilmente isso seria observado. Além disso, devido ao fenômeno de compressão de banda e focalização, presentes em moduladores criogênicos, diversos FAME com comprimento de cadeia ímpar foram identificados, ao passo que na GC estes dificilmente seriam detectados [58].

### 3.2. Microextração em Fase Sólida

As técnicas empregadas no preparo da amostra podem ser classificadas segundo os modelos de transferência de massa utilizados para sua descrição – extração exaustiva e não exaustiva em estado estacionário (do inglês, “*steady state exhaustive and non-exhaustive*”), extração em pré-equilíbrio e equilíbrio em sistemas de fluxo (do inglês, “*flow through equilibrium and pre-equilibrium*”), extração em pré-equilíbrio e equilíbrio em batelada (do inglês, “*batch equilibrium and pre-equilibrium*”) [59]. Nesse contexto, a SPME é, essencialmente e na maioria das aplicações, uma microtécnica de extração não exaustiva cujos aspectos teóricos se assemelham aos fenômenos de transferência de massa em reatores em batelada (sistemas fechados) [59]. As modalidades de microextração em fase sólida são classificadas, basicamente,

segundo o seu meio de extração sendo, em sua maioria, através do *headspace* ou pela imersão da fibra na matriz. Quando utilizada no modo de imersão na amostra, geralmente líquidos, a fibra de SPME pode estar em contato íntimo com o meio, ou protegida por uma membrana, no qual é restringido o tamanho/massa molecular dos compostos extraídos [59]. O modo de extração é selecionado segundo algumas propriedades da matriz e dos analitos. Para compostos de média a alta pressão de vapor é recomendada a extração através do *headspace*, ao passo que para compostos de baixa volatilidade é recomendado o uso da imerção, seja ela direta ou protegida por membranas – esta última é usualmente empregada para matrizes com muitos interferentes e/ou particulados [60]. Por exemplo, foi relato o uso da SPME para análise de esteróides – brassicasterol, campésterol e  $\beta$ -sitosterol – em óleos vegetais por imersão direta da fibra, enquanto que a fração de triacilglicerídeos foi reconstituída da fibra, transesterificada e injetada no GC-MS, separadamente [61]. Entretanto, o uso da SPME para a caracterização dos FAME de lipídios ainda é incipiente [3].

O princípio fundamental comum a todas técnicas de extração no qual temos a distribuição de um analito entre duas fases - matriz e a fase extratora - é a constante de distribuição,  $K_{es}$ . Consequentemente, esta constante irá refletir a afinidade do analito alvo pela fase extratora, portanto a mudança da natureza química dessa fase irá alterar sua seletividade. Embora quando operada no modo de extração através do *headspace* a constante de Henry ( $K$ ) poderá apresentar um papel importante na seletividade [60]. A constante de distribuição é a razão entre as atividades do analito na fase extratora e na matriz,  $a_e$  e  $a_s$  respectivamente. Em situações na qual a força iônica é desprezível, o coeficiente de atividade pode ser aproximado a unidade [62], consequentemente a  $k_{es}$  pode ser descrita pela razão entre as concentrações do analito na fase extratora e na matriz,  $c_e$  e  $c_s$  respectivamente (Equação 1). Entretanto, quando a fase extratora for um sólido, os termos  $k_{es}$  e  $a_e$  deverão ser substituídos por  $k_{es}^s$  e  $s_e$ , respectivamente, no qual o primeiro se refere ao coeficiente de distribuição no qual a fase extratora é um sólido e o último a concentração superficial do analito adsorvido na superfície do extrator [63].

$$k_{es} = a_e/a_s = c_e/c_s$$

**Equação 1.** Representação da constante de distribuição ( $K_{es}$ ) de um analito entre duas fases em função da razão entre as atividades (“a”) e concentração (“c”) do analito (aproximação para quando o coeficiente de atividade for próximo de um) na fase extratora e matriz, indicados por “e” e “s” respectivamente.

A quantidade de analito extraído, no equilíbrio, pelo revestimento da fibra pode ser calculada a partir da condição de que os potenciais químicos do analito nas diversas fases do sistema são iguais, desta forma, utilizando a lei de Henry e as constantes de distribuição obtém-se a Equação 2. Onde os termos  $V_e$  e  $V_s$  se referem aos volumes da fase extratora e da amostra, respectivamente;  $C_0$  se refere à concentração analítica do analito;  $k_{is}$ ,  $V_i$  se referem à constante de distribuição do analito entre a  $i$ -ésima fase e a matriz e ao volume da  $i$ -ésima fase, respectivamente.

$$n = \frac{kV_e C_0 V_s}{k_{es}V_e + \sum_{i=1}^n k_{is}V_i + V_s}$$

**Equação 2.** Massa de um analito extraída pelo revestimento de uma matriz com diversas fases ( $i$  fases). Equação adaptada de *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice* por J. Pawliszyn [60]. A terminologia foi combinada com a de *Sample Preparation: Quo Vadis* [59].

Portanto para um sistema bifásico (matriz homogênea e a fase extratora) a quantidade de massa extraída será em função, principalmente, da constante de distribuição ( $k_{es}$ ) e os respectivos volumes das fases ( $V_e$  e  $V_s$ ). Além disso, para fibras com espessuras de recobrimentos variando entre 7 a 100  $\mu\text{m}$ , como as disponíveis comercialmente, são observados volumes de recobrimento da ordem de 0,03  $\mu\text{L}$  a 0,7  $\mu\text{L}$ . Consequentemente, para a condição de que o volume da amostra seja superior ao do recobrimento ( $V_s \gg V_e$ ) e que a quantidade extraída pelo revestimento não altera a composição do sistema, a quantidade de massa extraída para uma matriz homogênea será dada pela Equação 3.

$$n = k_{es}V_e C_0$$

**Equação 3.** Massa de analito extraída em função do coeficiente de distribuição do analito entre a matriz homogênea e a fase extratora, volume da fase extratora e da concentração analítica do analito. Equação adaptada de *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice* por J. Pawliszyn [60]. A terminologia foi combinada com a de *Sample Preparation: Quo Vadis* [59].

Neste contexto, em termos termodinâmicos, a quantidade extraída, no equilíbrio, dependerá principalmente da constante de distribuição do analito entre as duas fases – ou seja, da afinidade pela fase extratora. Entretanto, do ponto de vista cinético, o sistema apresenta uma certa resistência a transferência de massa, ou seja, a partir do momento em que as duas fases são postas em contato íntimo é necessário um intervalo de tempo para que o equilíbrio seja estabelecido no sistema. Em um sistema bifásico (modo de imersão direta de uma fibra com revestimento líquido em meio

aquoso) perfeitamente agitado a etapa limitante da cinética de transferência de massa será a difusão do analito através do revestimento da fibra, ou seja, a resistência a transferência de massa será proporcional a espessura do revestimento [60]. Entretanto, na realidade sempre existirá uma camada estática do fluido próxima à superfície do revestimento, e a medida que o fluido se distancia do revestimento este passa a apresentar um aumento gradual em seu movimento. Para modelar o fenômeno de transferência de massa neste sistema, é considerada a camada estática de *Prandtl*, ou simplesmente camada estática [64], onde dentro dos limites dessa camada não há fluxos convectivos, que favoreçam a transferência de massa, e fora destes limites é considerado um sistema perfeitamente agitado [60]. A espessura da camada estática irá depender, então, da velocidade de agitação e da viscosidade do meio. Na Figura 6 B está ilustrado o perfil de concentração (na amostra, através da camada estática, no revestimento) ao longo da distância radial (em relação ao centro do suporte do revestimento), no qual a cinética é limitada pela difusão do analito através da camada estática.

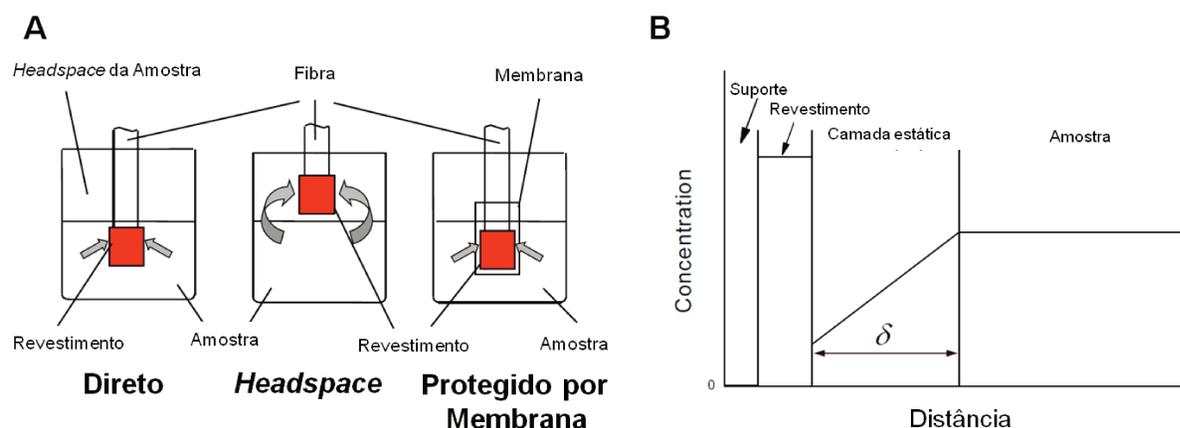


Figura 6. Ilustrações retidas do livro *Handbook of Solid Phase Microextraction* editado por J. Pawliszyn. A – As geometrias dos três principais modos de extração em SPME (extração direta, através do *headspace*, e protegida por membrana). B – Modelo da camada estática (do inglês, “*boundary layer model*”) ilustrando as diferentes regiões consideradas e seus respectivos perfis de concentrações ao longo da distância radial (em relação ao centro do suporte do revestimento) considerando que a camada estática é a etapa determinante na cinética de transferência de massa.

### 3.3. Cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GC×GC)

A Cromatografia Gasosa Bidimensional Abrangente (do inglês, *Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography* - GC×GC) foi introduzida e originalmente descrita em 1991 por Phillips e colaboradores [29]. Desde então esta vêm sendo

extensivamente aplicada a matrizes complexas, tais como derivados petroquímicos, óleos essenciais, fluidos biológicos, e amostras ambientais devido à sua elevada capacidade de pico [65]. Por exemplo, na época, nenhuma técnica convencional de cromatografia pôde resolver completamente os 209 cogêneros das bifenilas policloradas (do inglês, *polychlorinated biphenyls* – PCB) [66].

### 3.3.1. Modulação

A interface responsável pelo periódico, e contínuo, fracionamento (coleta) da banda cromatográfica eluente da <sup>1</sup>D, pela compressão (focalização) dessa e pela sua transferência para a <sup>2</sup>D é denominada modulador [65,66]. Consequentemente o modulador é responsável, embora demais parâmetros também influenciem, na eficiência dos picos da <sup>2</sup>D, porque neste processo de modulação os picos devem ser remobilizados de forma rápida sem que o efeito de alargamento dos picos esteja associados ao processo, apenas ao fenômeno de alargamento na <sup>2</sup>D. Os moduladores, desde o surgimento da GC×GC já assumiram diversas formas e geometrias embora o princípio de funcionamento destes seja essencialmente o mesmo (moduladores térmicos [29], moduladores baseados em válvulas [67], moduladores com peças resfriadas [68,69], moduladores com jatos resfriados e suas variantes [70-72]). Na Figura 7 pode ser observado o fundamento do processo de modulação e a visualização do cromatograma gerado.

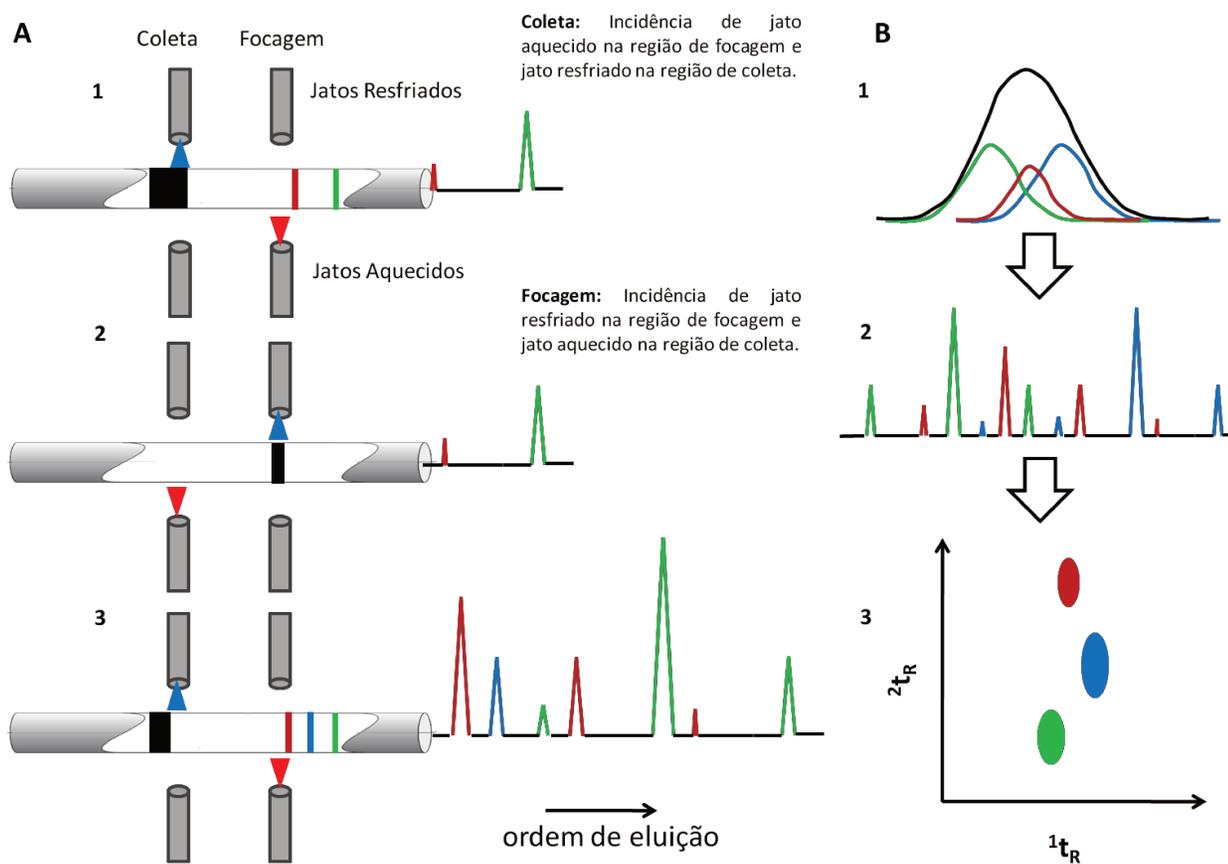
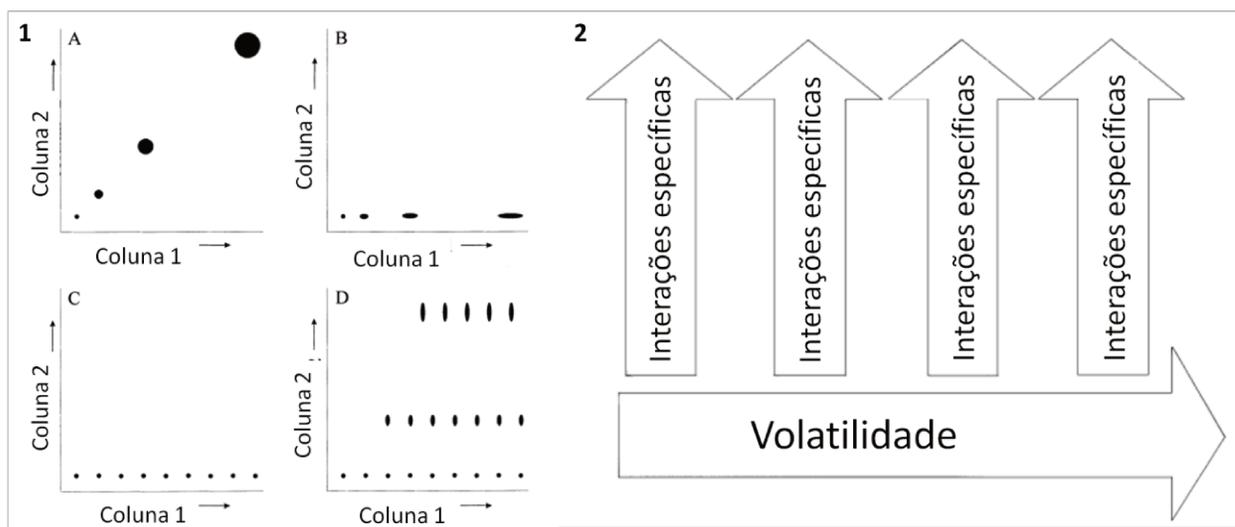


Figura 7. A – Ilustração do processo de modulação básico para um modulador de 4 jatos - 1. Etapa de coleta; 2. Etapa de focagem; 3. Reinício do processo). B – 1. Ilustração de um pico cromatográfico composto por 3 analitos coeluídos; 2. Ilustração do pico cromatográfico modulado; 3. Visualização do cromatograma na forma de diagrama de contorno. Figura baseada em J. Dallüge et al. “Comprehensive Two-dimensional Gas Chromatography: a powerful and versatile analytical tool” J. Chromatogr. A 2003.

### 3.3.2. Teoria

O mecanismo de separação no conjunto de colunas é dito ortogonal quando os seus mecanismos de separação são independentes, num equipamento GC×GC ajustado. Neste, o uso de duas colunas cromatográficas como  $1^D$  e  $2^D$  possibilita a total independência dos dois mecanismos de separação, por si. Por exemplo, o uso de um conjunto de colunas (dito normal), no qual uma coluna possui fase estacionária de poli(dimetilsiloxano) (HP-5) na  $1^D$  e poli(etilenoglicol) (SPWax) na  $2^D$ , apresenta como correlação a volatilidade, uma vez que o mecanismo de separação na  $1^D$  é por forças dispersivas e volatilidade e na  $2^D$  por interações específicas e volatilidade. A ortogonalidade será obtida quando as condições cromatográficas compensarem o fator em comum: volatilidade. Nestes sistemas, normalmente é utilizada a programação de

temperatura para ajustar o grau de ortogonalidade do sistema. Na Figura 8 item **1A** pode ser observado a injeção de 4 constituintes da série de n-alcenos num conjunto normal, sendo ambas dimensões mantidas a mesma isoterma. Os compostos estão distribuídos em uma diagonal, indicando a presença de correlação entre os mecanismos de separação: volatilidade. No item **1B e 1C** nota-se que o tempo de retenção na segunda dimensão ( ${}^2t_R$ ) se mantém o mesmo para a série de n-alcenos, ou seja, o mecanismo de separação na  ${}^2D$  passa a ser essencialmente a polaridade, ilustrada na porção **2** da figura. A diferença entre estes dois sistemas está no uso de uma programação de temperatura na  ${}^2D$ , pois a taxa de aquecimento ilustrada compensa exatamente o decréscimo na pressão de vapor a medida que observamos o aumento da cadeia do n-alceno. No item **1B** a  ${}^1D$  foi mantida em isoterma, e no item **1C** onde ambas dimensões possuem programação de temperatura, pode ser observada a diminuição da largura da base dos picos cromatográficos na  ${}^1D$  ( ${}^1w_b$ ). No item **1D** pode ser observada a distribuição de três séries homólogas no cromatograma, no qual, com o aumento da polaridade da série observa-se um aumento no  ${}^2t_R$ . Via de regra, compostos muito retidos pela fase estacionária da  ${}^1D$  são pouco retidos pela  ${}^2D$  [66].



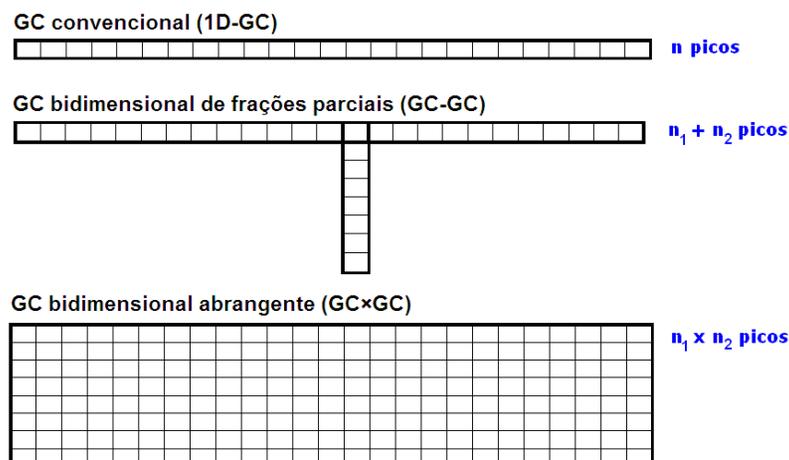
**Figura 8.** Cromatogramas teóricos utilizados para ilustrar o conceito de ortogonalidade num conjunto normal. 1A. Distribuição de uma série de n-alcenos:  ${}^1D$  e  ${}^2D$  – isoterma; 1B. Distribuição de n-alcenos:  ${}^1D$  – isoterma,  ${}^2D$  – programação de temperatura; 1C. Distribuição de n-alcenos:  ${}^1D$  e  ${}^2D$  – programação de temperatura; 1D. Distribuição de três séries homólogas com polaridade distintas:  ${}^1D$  e  ${}^2D$  – programação de temperatura. 2. Mecanismos de separação num conjunto dito normal. Ilustração modificada da original de Phillips et al., 1999 [66].

Na prática é observado que dependendo da temperatura inicial do forno cromatográfico, a temperatura em que os compostos mais leves eluem será maior do

que sua temperatura de eluição, ou seja, sua mobilidade será maior do que aquela apresentada pelos constituintes mais pesados de sua série homóloga. Consequentemente, o  $t_R^2$  será menor do que o previsto para os demais constituintes da série [29].

Uma das formas de se medir o grau de ortogonalidade foi proposta por Liu, no qual foram avaliados o ângulo de espalhamento dos picos de diferentes polaridades, tempo de retenção e fatores de capacidade para cada dimensão, permitindo então a definição de ortogonalidade por uma matriz de correlação, cuja resposta varia de 0 (sistema ortogonal) a 1 (sistema totalmente correlacionado) [73]. Demais modelos foram propostos por Slonecker baseados na teoria informacional [74,75].

A capacidade de pico de um sistema é definida como a quantidade máxima de picos de uma amostra de dimensionalidade 1 (por exemplo série de n-alcanos) que podem ser completamente resolvidos em uma única corrida. A capacidade de pico mínima que uma coluna deve apresentar para resolver os constituintes de uma amostra de dimensionalidade 1 com 100 picos será 100. Para uma amostra complexa, de dimensionalidade maior do que 2, de 100 constituintes será necessário uma capacidade de pico mínima de 10.000, ou equivalentemente um aumento de 10.000 vezes no número de pratos teóricos [76]. Para técnicas cromatográficas multidimensionais, em que os mecanismos de separação são, em teoria, ortogonais, a capacidade do sistema é o produto das capacidades das dimensões individuais. Para GC×GC, dadas duas colunas com capacidade de pico  $n_1$  e  $n_2$ , respectivamente, a capacidade de pico do conjunto de colunas será dado por  $n_1 \times n_2$ . Consequentemente, o uso de sistemas multidimensionais, tais como GC×GC, permite um aumento geométrico da capacidade de picos, auxiliando na resolução de problemas complexos de separação. Em 1993 foi relatado por Phillips uma capacidade de picos de 50.000 [77]. Porém, o simples acoplamento de duas colunas em série, sem a presença de um dispositivo de interfaceamento, resultará num único mecanismo de separação, porém misto. Consequentemente, sua capacidade de pico não será muito superior as capacidades das colunas individuais [29]. Na prática a utilização da capacidade de picos estará dependente do grau de ortogonalidade das dimensões. Quanto mais ortogonais forem as dimensões, maior a magnitude do espaço de separação utilizado, portanto mais próximo o valor real da capacidade de picos em relação ao teórico [78].



**Figura 9.** Comparação da capacidade de picos para 1D-GC, GC-GC para a transferência de uma fração e para GCxGC.

Giddings mostrou que a dimensionalidade de uma amostra é a quantidade mínima de parâmetros que são necessários para que seja observada a ordenação na separação de seus constituintes. Por exemplo, para a caracterização de uma série homóloga de ácidos graxos, ou seus derivados, é necessário apenas um parâmetro ou dimensão, no caso pressão de vapor. Em sua análise por 1D-GC é observada uma “ordem” nos cromatogramas, ou seja, os picos dos constituintes da séries homologas estarão distribuídos uniformemente ao longo do cromatograma [76]. No entanto, para análise de derivados petroquímicos, por exemplo, é observado que, muitas vezes, compostos alifáticos possuem temperaturas de ebulição próximas aos de compostos aromáticos, resultando em coeluição e dificilmente é observado algum padrão de separação em 1D-GC. Normamente são necessárias pelo menos 2 variáveis independentes para especificar os membros de uma mistura, e portanto 2 dimensões para que sejam observados ordenamentos nos cromatogramas. Por isso uma ferramenta exclusiva de técnicas cromatográficas multidimensionais, tal como GCxGC, é a estrutura cromatográfica, no qual compostos quimicamente semelhantes estão agrupados em “clusters” facilitando a sua identificação visual e conferindo uma maior confiabilidade em sua identificação já que estão disponíveis dois parâmetros independentes para sua caracterização ( $^1t_R$  e  $^2t_R$ ) [66]. Na Figura 10, pode ser observado o agrupamento de compostos quimicamente semelhantes no cromatograma bidimensional de um solvente aromático.

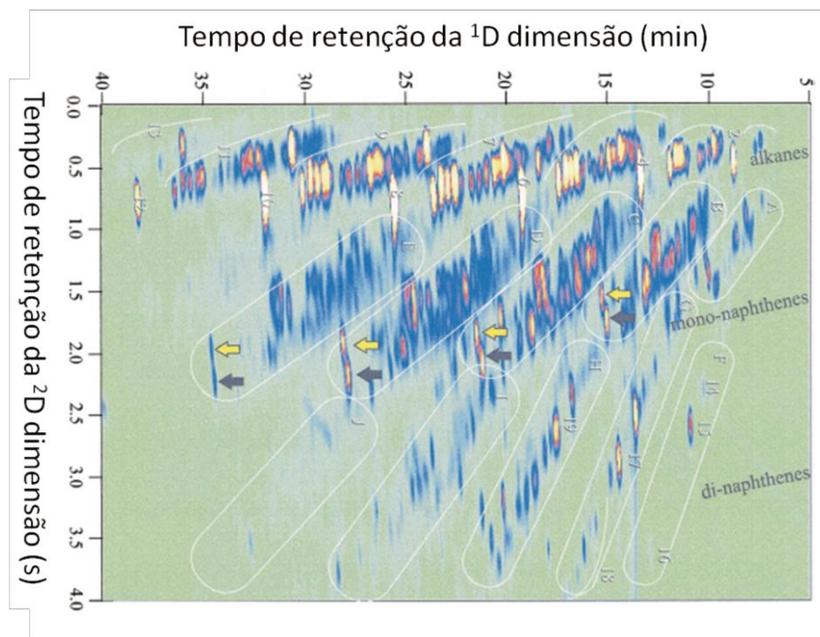
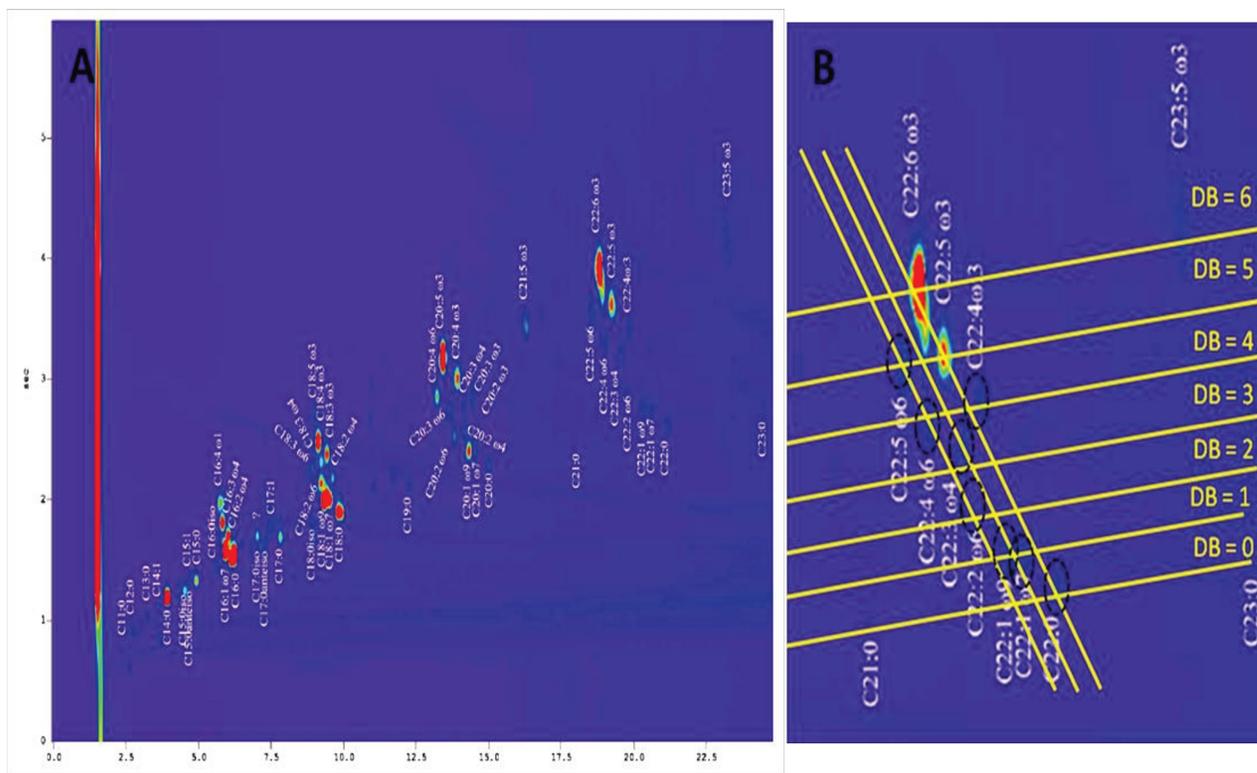


Figura 10. Cromatograma GCxGC de um solvente aromático. Ilustração retirada de Phillips *et al.* [66].

### 3.3.3. Estrutura Cromatográfica: FAME

Desde sua introdução, a GCxGC tornou possível a utilização da estruturação cromatográfica como uma ferramenta qualitativa, porém ainda existem algumas discrepâncias com relação às estruturações, principalmente em relação aos FAME. Os primeiros relatos de estruturação cromatográfica para FAME mostraram curvas de eluição para compostos com o mesmo número de insaturações [79,80].

Segundo Trachida *et al.*, a identificação dos compostos no cromatograma (Figura 11 A) foi feita com base apenas nos índices de retenção da <sup>1</sup>D, apresentando diferenças de mais de 20 unidades com relação aos índices da literatura. Conseqüentemente pode ser notada a identificação errônea de alguns compostos. No cromatograma expandido (Figura 11 B), pode ser observada a eluição de ésteres insaturados de  $\omega_4$ ,  $\omega_6$ ,  $\omega_9$  em um mesmo segmento de reta. Esta inconsistência foi observada na identificação tanto do grupo C20 quanto do grupo C22, mostrando a necessidade do uso de padrões na falta de espectros de massas. Além disso, ambos os autores mostraram a presença de curvas de eluição para FAME com o mesmo número de insaturações. Esta observação não é totalmente correta. Possivelmente por serem os primeiros relatos, os autores poderiam desconhecer da influência do ômega nas coordenadas de retenção.



**Figura 11. Cromatograma GCxGC-FID de óleo de peixe Savelha (“Menhaden oil”) retirado de Mondello et al. – “Detailed analysis and group type separation of natural fats and oils using comprehensive two-dimensional gas chromatography” [101].**

Nos casos em que é utilizado o conjunto de colunas denominado convencional (ou normal) irão ser observadas diferenças mais acentuadas de  $^2t_R$  entre os seus isômeros (por exemplo,  $^2t_{Rw3} > ^2t_{Rw6} > ^2t_{Rw9}$ ). Consequentemente, nestas condições de programação de temperatura ( $2-3\text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), dificilmente irá existir uma única curva que irá abranger todos isômeros, com o mesmo grau de insaturação, para os FAME. Na Figura 12 A foi possível ilustrar curvas que descrevem a eluição de compostos com o mesmo número de insaturações devido à ausência (ou não identificação) dos isômeros de posição. Uma alternativa para o uso destas curvas de eluição, em FAME, seria as posicionar entre os isômeros com o mesmo número de insaturações, ou com o aumento da programação linear de temperatura levando a perda de resolução entre os isômeros. Na realidade estas curvas podem ser observadas desde que tracadas para os mesmos isômeros, conforme ilustrado na Figura 12 B.

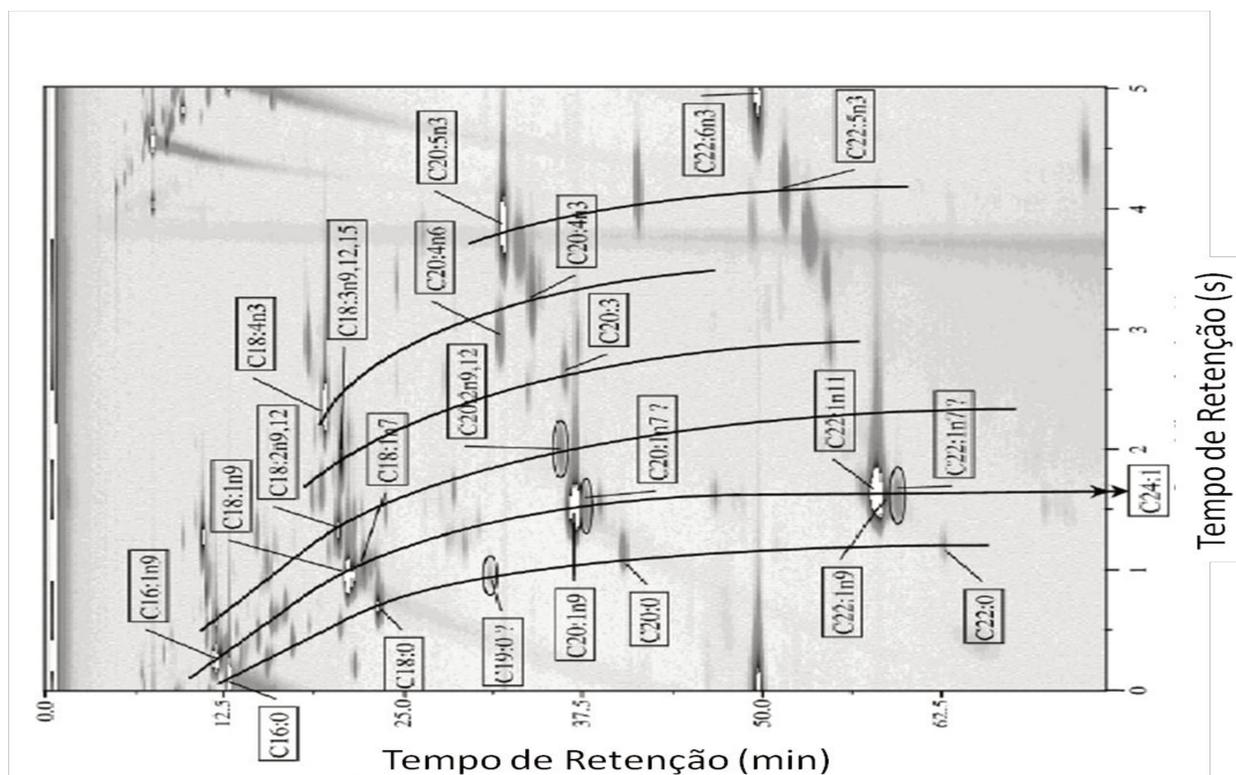


Figura 12. Cromatograma de óleo de arenque (“herring oil”) retirado de Brinkman et al. [79]. Ilustração da estrutura cromatográfica para PUFA.

### 3.3.4. Desenvolvimento da GC×GC-qMS

Uma característica marcante da GC×GC é o fenômeno de compressão de banda que ocorre em principalmente em moduladores criogênicos, e térmicos. Conseqüentemente larguras de picos de 100 – 600 ms são observados [79,80][81],[82]. Por isso os principais requisitos de detectores, para que sejam compatíveis com a GC×GC, é a presença de pequenos volumes internos e altas taxas de digitalização – ou baixas constantes de tempo [80,81]. O detector mais utilizado desde da introdução desta técnica é o FID, devido ao seu desprezível volume interno e elevada taxa de digitalização. Entretanto as análises que utilizam GC×GC-FID são geralmente ausentes de informação qualitativa (a não ser que se utilize injeções de padrões), sendo comumente observada a combinação de informações obtidas por GC×GC-FID e GC-MS [84]. Em meados de 2000 foi dado início ao acoplamento entre equipamentos de GC×GC e técnicas de MS, sendo que um dos primeiros relatos foi feito por Shellie e Marriott no uso de um sistema GC×GC-TOFMS para análise de óleo essencial [85]. Apesar de sua elevada e compatível taxa de aquisição do sistema TOFMS, que permite

a obtenção de espectros de massa de alta qualidade e a deconvolução dos mesmos [86], o seu custo o torna proibitivo para aplicações rotineiras. Em 1999, Frysinger e Gaines já relataram o uso do sistema GC×GC-qMS [87]. Entretanto o analisador quadrupolar utilizado possuía taxa de aquisição limitada a  $2,34 \text{ scans}\cdot\text{s}^{-1}$ , num intervalo de 45 – 350 Th. Consequentemente, neste estudo, foi propositalmente empregada condição cromatográfica que alargasse intencionalmente os picos na  ${}^2\text{D}$ , tornando-os mais compatíveis com a baixa taxa de aquisição, o que limitava o monitoramento e quantificação das bandas cromatográficas [82]. Já em 2003, Shellie e Marriott mostraram que o analisador quadrupolar operando num intervalo de  $m/z$  reduzido (41 – 228 Th) poderia alcançar taxas de aquisição de até 20 Hz para fins qualitativos [86,87]. Em 2004 Debonneville e Chaintreau propuseram o uso do analisador quadrupolar operando no modo de monitoramento de íons selecionados (SIM, do inglês “selected ion monitoring” [90]), apresentando taxas de 30,7 Hz, para quantificação de alergênicos. Segundo estes autores foi possível obter curvas analíticas com coeficiente de correlação entre 0,999 – 1,000, sendo que desvio padrão relativo não ultrapassou de 6,3 % nas análises [91]. Song e Marriott relataram o uso de GC×GC-qMS para fins qualitativos utilizando um intervalo reduzido de 42 – 235 Th, a 19,36 Hz. Entretanto apenas 26 % dos analitos apresentaram similaridades aceitáveis de espectro de massa, sendo relatada, também, a presença de deformação do espectro de massas em alguns analitos, conforme ilustrado na Figura 13 [92]. Este fenômeno é conhecido como “*mass spectral skewing*”, ou simplesmente “*peak skewing*”, consequência de uma alta variação no fluxo de massa no analisador durante uma varredura [82]. Enquanto, em 2005 Adahclour et al. relatou o uso de GC×GC-qMS operando a 33 Hz para fins qualitativos e quantitativos, e reportou que com esta taxa de aquisição não foi observado o fenômeno de “*peak skewing*”, apresentando boas buscas por similaridades espectrais e desvios padrões relativos inferiores a 5 % [93].

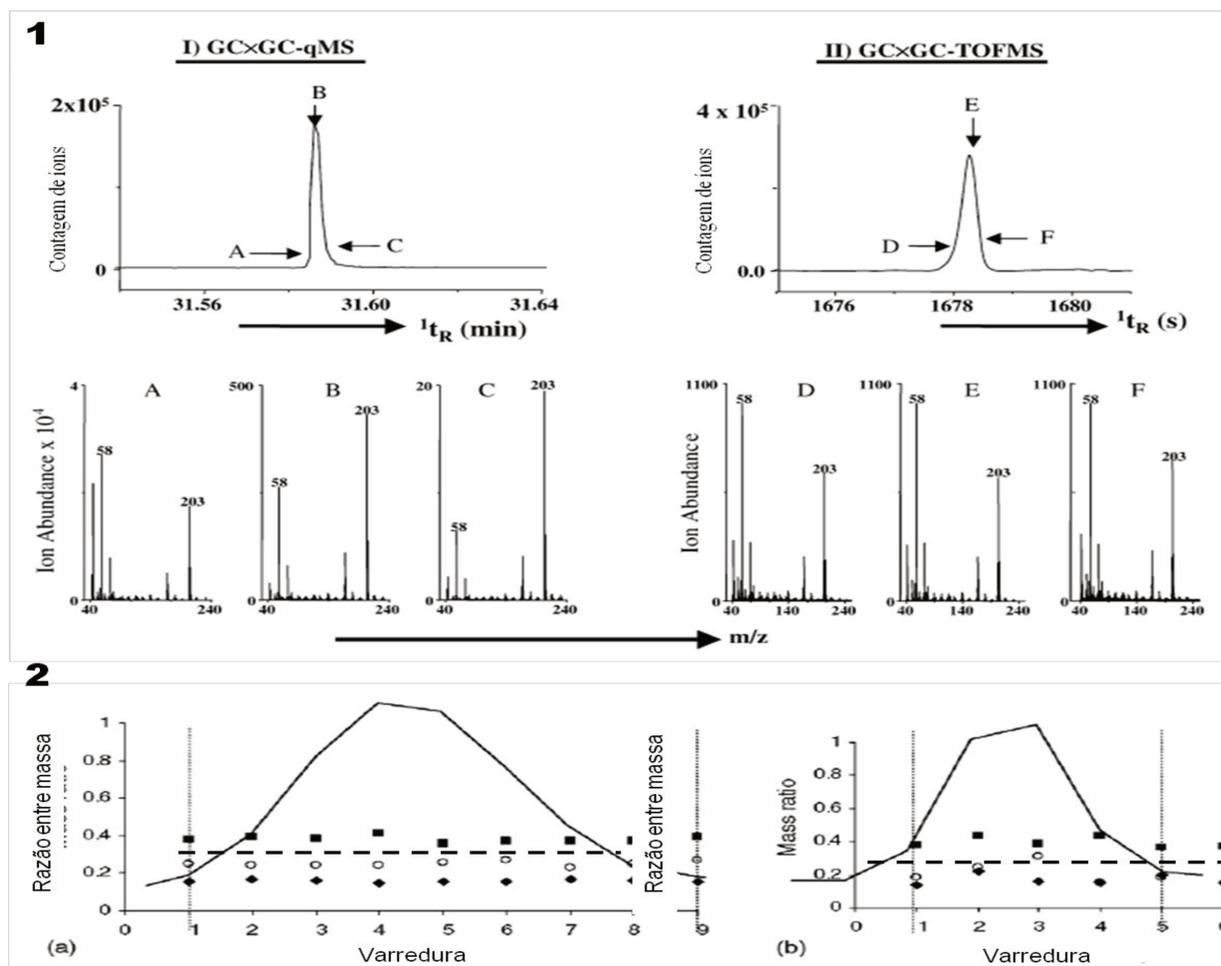


Figura 13.1 - Comparação entre as abundância dos íons de um analito ao longo do pico cromatográfico obtido por GCxGC-qMS e GCxGC-TOFMS. I-) Cromatograma de íons totais (TIC) do analito analisado por GCxGC-qMS utilizando um intervalo de 42 – 235 Th a 19,36 Hz. II-) Cromatograma de íons totais do mesmo analitos obtido por GCxGC-TOFMS utilizando um intervalo de 40 – 900 Th a 50 Hz. A, B e C são os espectros de massas adquiridos no começo, ápice e fim do pico cromatográfico. Ilustração retirada de S. M. Song et al. [92]. 2 – Razão de massa entre os três pares de  $m/z$  136/121 146/89 126/111. A) taxa de aquisição de 33 Hz; B) taxa de aquisição de 20 Hz. Ilustração modificada de M. Adahclour et al. [93].

# Capítulo 4:

# MATERIAIS E MÉTODOS



## 4. Materiais e métodos

### 4.1. Materiais, reagentes e amostras

Todos os reagentes empregados nesta pesquisa foram grau P.A. ou superior. As fibras de SPME foram poli(dimetilsiloxano) (PDMS) com espessura de 100 e 7  $\mu\text{m}$  adquiridas junto a Supelco (Bellefonte, Pensilvânia, EUA). A fibra foi condicionada de acordo com as recomendações do fornecedor antes de ser utilizada. O *holder*, frascos de extração, micro *vials* e o reagente de transesterificação, metóxido de sódio ( $\text{CH}_3\text{O}^- \text{Na}^+$ ), utilizados também foram adquiridos junto a Supelco. Para a obtenção dos LTPRI foi empregada a solução de alcanos lineares entre 8 e 40 átomos de carbono (Fluka, Steinheim, Suíça).

As amostras de cera de Carnaúba foram fornecidas pela EMBRAPA (Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária). As amostras de cera de abelha e óleo de peixe foram obtidas no comércio local de Campinas-SP.

### 4.2. Colunas Cromatográficas e Programação de Temperatura

Foram empregadas as colunas cromatográficas HP-5 (5% fenil-95% dimetilsiloxano) de dimensões 30 m, 0,25 mm, 0,25  $\mu\text{m}$  com 1 metro de *retention gap* desativado, para as análises por GC-FID, em um cromatógrafo a gás modelo HP 6850 com detector FID (Wilmington, DE, EUA). Para as análises feitas por GC $\times$ GC, os conjuntos de colunas empregados e as dimensões de cada coluna estão listados na Tabela 2.

Tabela 2. Conjuntos de colunas empregados para análises por GC $\times$ GC-qMS e -FID

Conjunto	<sup>1</sup> D	<sup>2</sup> D
1	HP-5 (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 $\mu\text{m}$ )	SPWax (1 m $\times$ 0,1 mm $\times$ 0,1 $\mu\text{m}$ )
2	HP-1 (30 m $\times$ 0,25 mm $\times$ 0,25 $\mu\text{m}$ )	HP-50 (1 m $\times$ 0,1 mm $\times$ 0,1 $\mu\text{m}$ )
3	DBWax (25 m $\times$ 0,20 mm $\times$ 0,20 $\mu\text{m}$ )	HP-5 (1 m $\times$ 0,1 mm $\times$ 0,1 $\mu\text{m}$ )

Durante o processo de otimização das condições cromatográficas do sistema GC×GC, na escolha do conjunto de colunas da Tabela 2 foi utilizada a seguinte programação de temperatura: 120 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 220 °C por 10 min a uma vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. O injetor e detector operaram a 250 °C. No processo de otimização da transesterificação GC-FID foi utilizada uma programação, otimizada, de 40 °C por 7 min seguido por 10 °C·min<sup>-1</sup> até 300 °C por 9 min. Quando utilizada a solução de n-alcenos o forno foi deixado a sua temperatura máxima até a eluição do alcano de maior massa molar (a 240 °C foi necessário aproximadamente 5 horas).

Para a obtenção dos resultados finais foi utilizada a programação de temperatura: 170 °C @ 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C por até 50 min.

### 4.3. GC-FID - Injeção Splitless: Transesterificação

O equipamento GC-FID utilizado para otimização dos processos de transesterificação e da microtécnica de extração foi o modelo HP 6850N (Wilmington, DE, EUA). O gás de arraste empregado foi Hélio com pureza de 99,999% (grau 5.0) a uma vazão de 1,0 mL·min<sup>-1</sup>.

Os métodos de transesterificação foram avaliados foram catálise básica com metóxido de sódio. O perfil cromatográfico foi obtido utilizando equipamento GC×GC-FID e -qMS.

A instalação de um *retention gap* no conjunto de coluna foi realizado utilizando um capilar desativado de sílica fundida de dimensões 1,0 m e d.i 0,20 mm. O método de injeção utilizado foi splitless. As condições cromatográficas foram otimizadas segundo a largura de pico (eliminação do efeito solvente).

#### 4.3.1. Catálise Básica

A otimização do processo de transesterificação por catálise básica foi realizada, em colaboração com a aluna M. F. Furlan, utilizando um delineamento composto central, com sete replicatas no ponto central Para o ajuste do modelo quadrático foi necessáriaa utilização de pontos axiais. Os parâmetros avaliados foram: volume de isooctano (i), volume de derivatizante (D), tempo de reação (t) e temperatura de reação

(T). A concentração do derivatizante foi  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , uma vez que esta é a concentração na qual o metanol está saturado com o reagente metóxido de sódio. Os níveis avaliados foram baseados em evidências experimentais já citadas na literatura [57]. A tabela de planejamento está ilustrada na Tabela 4. A massa pesada de cera de abelha foi 200 mg num frasco de 2 mL.

**Tabela 3. Codificação das variáveis no planejamento experimental.**

Nível	i ( $\mu\text{L}$ )	D ( $\mu\text{L}$ )	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	t (min)
-2	0	0	20	0
-1	250	50	30	5
0	500	100	40	10
1	750	150	50	15
2	1000	200	60	20

**Tabela 4. Planejamento experimental para ajuste do modelo quadrático para determinação da condição ótima do processo de transesterificação com catálise básica.**

Ponto	I	D	T	T	Resposta
1	-1	-1	-1	-1	173633
2	-1	-1	-1	1	79192.3
3	-1	-1	1	-1	140457.6
4	-1	-1	1	1	102410.5
5	-1	1	-1	-1	75826.7
6	-1	1	-1	1	77141.7
7	-1	1	1	-1	123440
8	-1	1	1	1	127561.6
9	1	-1	-1	-1	221815.3
10	1	-1	-1	1	179611.9
11	1	-1	1	-1	131666.7
12	1	-1	1	1	120330.1
13	1	1	-1	-1	215220.1
14	1	1	-1	1	93961.7
15	1	1	1	-1	121090
16	1	1	1	1	109557.2
17	-2	0	0	0	9045.5
18	2	0	0	0	101209
19	0	-2	0	0	141627.7
20	0	2	0	0	105716
21	0	0	-2	0	43443.5

(continuação da Tabela 4)

Ponto	I	D	T	t	Resposta
11	1	-1	1	-1	131666.7
12	1	-1	1	1	120330.1
13	1	1	-1	-1	215220.1
14	1	1	-1	1	93961.7
15	1	1	1	-1	121090
16	1	1	1	1	109557.2
17	-2	0	0	0	9045.5
18	2	0	0	0	101209
19	0	-2	0	0	141627.7
20	0	2	0	0	105716
21	0	0	-2	0	43443.5
22	0	0	2	0	138239.7
23	0	0	0	-2	132275.2
24	0	0	0	2	125705
25	0	0	0	0	129733.3
26	0	0	0	0	100691.9
27	0	0	0	0	102140.9
28	0	0	0	0	92244.4
29	0	0	0	0	111777.3
30	0	0	0	0	135026.2
31	0	0	0	0	129512.1

#### 4.4. Parâmetros Operacionais do GC×GC-FID

O protótipo GC×GC-FID foi utilizado ao longo do trabalho para a otimização de alguns parâmetros cromatográficos, tais como a escolha do período de modulação e a composição das fases estacionárias utilizadas na <sup>1</sup>D e <sup>2</sup>D, enquanto o protótipo GC×GC-qMS encontrava-se em desenvolvimento. O equipamento GC×GC empregado foi um cromatógrafo a gás HP 6890 (Wilmington, DE, EUA) com detector FID e equipado com injetor do tipo *split-splitless*. Foi utilizado N<sub>2</sub> (g) aquecido como gás quente. Os gases utilizados para a modulação foram controlados por duas válvulas solenóides de três vias (Ascoval Ind. e Com. Ltda, Brasil). O controle do sistema GC×GC foi baseado na plataforma LabView<sup>®</sup> versão 8.5 e foi utilizado o conversor AD/DA NI DAQPad 6015 de 16 bits da National Instruments (Austin, TX, EUA).

GC×GC-FID: O injetor e detector operaram a 250 °C. O gás de arraste utilizado foi hidrogênio grau 5.0, a uma vazão de 0,6 mL·min. A temperatura do sistema de

aquecimento foi ajustado para 350 °C. As pressões de focagem e coleta foram de 12 e 10 psig, respectivamente. A porcentagem de quente na focagem e frio na coleta foram de 50 e 60 %, respectivamente.

#### **4.5. Protótipo GC×GC-qMS**

O desenvolvimento do protótipo GC×GC-qMS teve como base experiências prévias, obtidas pelo grupo de pesquisa ao desenvolver protótipos GC×GC-FID [94,95][94][95]. O equipamento comercial utilizado foi o GC-qMS modelo QP2010Plus (Shimadzu, Tokyo, Japão). O gás de arraste utilizado foi hélio (grau 6.0) a uma vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. As temperaturas do injetor e da linha de transferência foram 270 °C e 250 °C, respectivamente. A temperatura da fonte de íons foi de 200 °C. A voltagem da multiplicadora de elétrons foi ajustada de acordo com cada amostra. A temperatura do sistema de aquecimento foi ajustada para 350 °C. As pressões de focagem e coleta foram de 12 e 10 psig, respectivamente. A porcentagem de quente na focagem e frio na coleta foi de 50 e 60 %, respectivamente.

O processo de modulação neste sistema foi realizado pela incidência de jatos alternados de gás nitrogênio, frios e quentes. O gás frio foi resfriado pela sua passagem através de uma serpentina com cerca de 2 metros de comprimento, que se encontra dentro de um frasco de Dewar contendo nitrogênio líquido (-196 °C) para modulação de compostos de diferentes faixas de volatilidade. O gás quente foi aquecido ao percorrer uma serpentina de cerca de 5 metros de comprimento enroladas sobre num tarugo de aço inox em cujo centro se encontrava dois resistores de dissipação térmica de 400 W. Foi utilizado um controlador de temperatura da COEL modelo UWH 2000 (Coel, Brasil). O direcionamento dos gases para o sistema de aquecimento e de criogênia foram realizados por duas válvulas solenóides de 3 vias (Ascoval Ind. e Com. Ltda, Brasil). As válvulas, por sua vez, foram controladas por um software escrito pelo Dr. Ernesto C. Ferreira, em ambiente LabView versão 8.5, utilizando um conversor AD/DA de 14 bits National Instruments NI USB 6009 (Austin, TX, EUA) [96]. Além disso, o software foi responsável pela sincronização entre o início da operação das válvulas com o início da corrida cromatográfica. O diagrama genérico do protótipo GC×GC está mostrado na Figura 14.

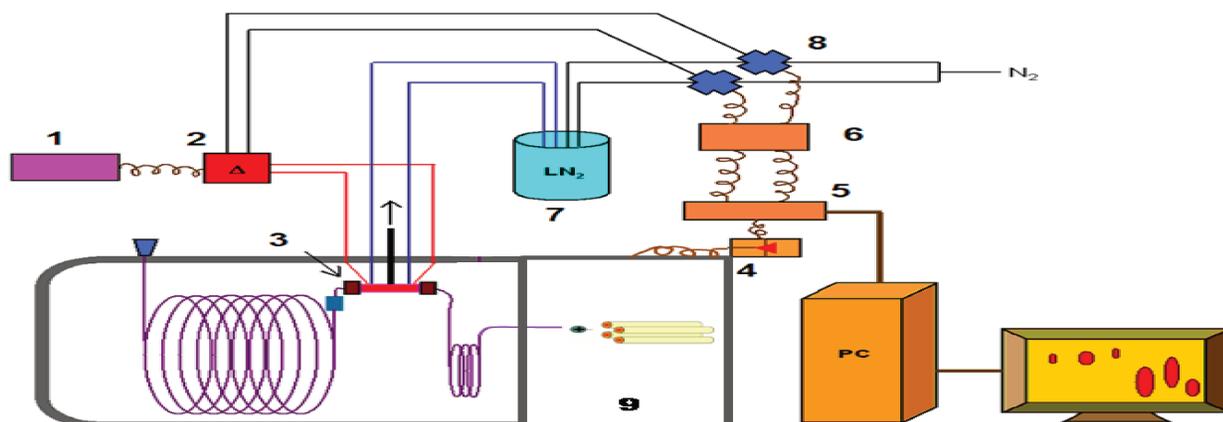


Figura 14. Diagrama geral do protótipo GCxGC-qMS. (1) sistema de controle de aquecimento, (2) sistema de aquecimento, (3) modificador de quatro jatos, (4) espectrômetro de massa com analisador quadrupolar, (5) conversor AD/DA, (6) relês de estado sólido, (7) Dewar, (8) válvulas solenóides 3 vias.

A interface do software encontra-se na Figura 15. Nesta interface gráfica o usuário pode informar a frequência de modulação, e a porcentagem do tempo na qual a válvula irá permanecer no modo quente ou frio. Esta porcentagem é calculada sobre o período de modulação. No canto esquerdo superior da tela está indicado o estado da válvula de focagem. Na região central superior temos o estado da válvula de coleta. O estado de cada válvula é monitorado em tempo real, e ilustrado por sinalizadores coloridos. Por exemplo, coloração vermelha na focagem significa que a válvula solenóide está direcionando o gás para a câmara de aquecimento, portanto incidindo gás quente sobre a região da coluna correspondente a focagem. Uma coloração azul na coleta indica a incidência de gás resfriado sobre a região da coluna correspondente a coleta. No canto direito da tela se encontra a janela denominada "lines", sendo esta responsável pelo canal no qual é adquirido o sinal de sincronia com o "start" do cromatógrafo a gás. Na região central à direita há uma janela ("physical channels") para a seleção do conversor AD/DA conectado, quando houver mais de um conectado ao microcomputador. Logo abaixo, na janela "source 2" é feita a escolha de qual fonte fará o monitoramento temporal dos eventos das válvulas. Este protótipo foi utilizado para realizar as caracterizações das amostras de óleos e cera.

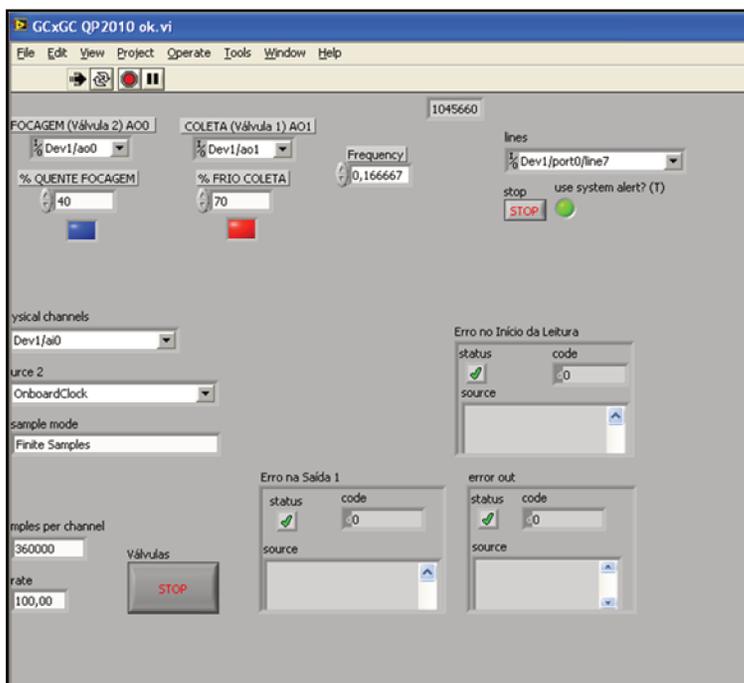


Figura 15. Interface do usuário do programa de controle de válvulas do GC×GC na plataforma LabVIEW versão 8.5 (modificação da versão desenvolvida pelo Doutor Ernesto Ferreira [96]).

#### 4.5.1. Identificação dos Analitos

A identificação dos compostos presentes nas cera de abelha e de carnaúba foram realizadas por GC×GC-qMS através da comparação entre os espectros de massas de cada eluato com os espectros da biblioteca *mainlib* do *National Institute of Standards and Technology* (NIST) de 2008, utilizando o programa GCImage (Zoex Corporation, Houston, USA). Foram considerados somente picos em que a similaridade entre os espectros foi maior que 80%. Além da similaridade entre os espectros de massas, os LTPRI foram obtidos para as análises com o jogo de colunas 1 da Tabela 2. Para obtenção dos LTPRI, foram injetadas as soluções transesterificadas das amostras, em n-hexano, e dopadas com a hidrocarbonetos lineares de C7 – C40.

#### 4.6. Aquisição e Interpretação de dados

O software comercial utilizado para a aquisição de dados e para o controle do cromatógrafo a gás foi a Chemstation (Agilent, Wilmington, EUA). A aquisição dos dados do espectrômetro de massa foi realizadas pelo software comercial GCMSsolution

versão 5.3 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Este software é responsável pelo controle do cromatógrafo e do espectrômetro de massas, sendo através deste a inserção dos parâmetros operacionais tais como programação de temperatura, vazão do gás de arraste, temperaturas do injetor, da linha de transferência e da fonte de ionização, intervalo de scan em Th, e assim por diante.

Dessa forma, os dados gerados do sistema GC×GC-FID e -qMS foram tratados pelo software comercial GC Image versão 2.0 (Zoex Corporation, Houston, USA). Neste software os cromatogramas brutos foram remodelados para sua visualização na forma de diagramas de contorno (“contour plot”) e os parâmetros qualitativos (por exemplo, processamento de espectros de massa, ajuste de linha base e métodos de alisamento de picos) e quantitativos (por exemplo, volume dos picos) são passíveis de serem tratados.

#### **4.7. Microextração em fase sólida: Extração Direta**

As fibras utilizadas foram poli(dimetilsiloxano) (PDMS) de espessuras de filme 100  $\mu\text{m}$  e 7  $\mu\text{m}$ . Para as análises cromatográficas foi utilizado um cromatógrafo a gás modelo HP 5890 (Wilmington, DE, EUA) dotado de uma coluna HP-5. Os picos monitorados foram previamente identificados no equipamento GC-qMS modelo QP2010 Plus. Para avaliar o perfil de extração foram realizados estudos de quantidade extraída representada pela área dos picos dos FAME (C16, C18 e C24) de cera de abelha. Os intervalos estudados foram 5, 10, 15, 20 e 30 minutos. A temperatura de extração foi ambiente.

A microextração foi realizada em vials de 200  $\mu\text{L}$ . Ao frasco de microextração foi adicionado 100  $\mu\text{L}$  de uma solução 200  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  de uma suspensão de cera de abelha em iso-octano e 50  $\mu\text{L}$  da solução saturada de metóxido de sódio em metanol. O frasco foi agitado por 2 min em vortex, e o solvente seco sob fluxo de nitrogênio seco por 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de ácido clorídrico 2  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  e 150  $\mu\text{L}$  de água destilada. Após o preparo a fibra de SPME foi exposta a solução aquosa. Antes da etapa de dessorção da fibra no injetor, esta foi seca delicadamente com papel toalha (foi necessário apenas um leve contato da região da

fibra na qual se encontrava a gotícula de água com o papel). As análises foram realizadas em duplicatas.

Também avaliou-se a hipótese de adsorção dos ésteres metílicos na parede do frasco e septo. O procedimento de preparo da amostra foi o mesmo adotado para a extração direta. Porém foram investigados dois grupos: referência e alvo. No grupo referência a extração dos FAME foi realizada imediatamente após o preparo da amostra, enquanto o grupo alvo a extração foi conduzida após 30 min do preparo da amostra, tempo que permite a adsorção de uma parcela considerável de FAME. As análises foram realizadas em 6 replicatas.



# Capítulo 5:

# RESULTADOS E DISCUSSÃO



## 5. Resultados e Discussão

Nesta seção serão discutidos primeiramente os aspectos envolvidos na otimização do processo de transesterificação e de preparo de amostra realizados no equipamento GC-FID. Junto com essa discussão serão abordados assuntos como a otimização dos parâmetros cromatográficos do GC-FID no modo “*splitless*” (efeito solvente), o planejamento experimental, e, por último, a otimização do preparo da amostra. Posteriormente, será abordada a montagem do protótipo GC×GC-qMS e, finalmente, a análise dos lipídios, onde serão considerados tópicos pertinentes ao desempenho analítico do protótipo (gás de arraste, conjunto de colunas utilizadas e taxa de aquisição), e as ferramentas qualitativas utilizadas ao longo da identificação dos constituintes dos lipídios.

### 5.1. GC-FID

#### 5.1.1. Efeito Solvente

O efeito solvente é um parâmetro importante a ser otimizado para que injeções operando no modo *splitless* apresentem a maior detectabilidade sem considerável alargamento da banda cromatográfica. Por isso, a escolha adequada do tempo no qual o forno foi mantido a temperatura inicial de 40 °C foi estudado no intervalos de 3 a 7 minutos, comparando-se as larguras dos pico na base. Para maiores fundamentações teóricas referir-se a seção Anexo II.

Com este sistema, foi observada uma diminuição geral da largura de base dos picos cromatográficos em relação ao *splitless* sem uso de *retention gap*. Por exemplo, para um pico que eluí a 300 °C, a uma programação de 40 °C (3 min) a 10 °C·min<sup>-1</sup> até 300 °C (9 min), sua largura de base foi de 8,0 s. A largura da base deste mesmo pico, a uma isoterma de 40 °C por 5 e 7 minutos, foi de 6,5 e 5,3 s, respectivamente. De forma geral, o intervalo de 5 e 7 minutos apresentaram uma diminuição na largura de base dos picos de 19 % e 33 %, respectivamente, em relação ao intervalo de 3 minutos. Portanto a programação utilizada para as demais análises que envolveram injeções no equipamento GC-FID modo *splitless* foi: 40 °C (7 min) a 10 °C·min<sup>-1</sup> até 300 °C (9 min).

### 5.1.2. Cátalise Básica

A otimização da catálise básica utilizando como reagente o metóxido de sódio foi realizada utilizando um planejamento experimental  $2^4$  com pontos centrais. O modelo ajustado foi o quadrático, sendo necessário o uso de pontos axiais. A matriz de planejamento está ilustrada na Tabela 4. A variável dependente foi escolhida como a razão entre a área total dos FAME sobre a massa de cera pesada ( $A_c$ ), de forma a eliminar a variação de pesagem da amostra.

Na Figura 12, pode ser observada a superfície de resposta que apresenta um formato de cela o que demonstra claramente a existência de interações entre as variáveis estudadas, e desta forma o uso de métodos univariados para otimização devem ser evitados uma vez que não permitiriam avaliar tais interações. A equação que modela o comportamento do processo de transesterificação em função da temperatura ( $T$ ), tempo de reação ( $t$ ), quantidade de derivatizante e volume de iso-octano é:

$$A_c = 113721 + 19913i - 9562i^2 - 11547D - 13605T + 8903T^2 - 19752it + 11180Dt + 12487Tt$$

**Equação 4.** Equação utilizada para modelar a influência dos parâmetros sobre o processo de transesterificação.  $A_c$  = Área total de FAME sobre a massa pesada de cera,  $i$  = volume de iso-octano,  $D$  = volume de derivatizante (solução 2 M metóxido de sódio em metanol),  $T$  = temperatura de reação,  $t$  = tempo de reação.

Os coeficientes da equação foram determinados a um nível de confiança de 95 %. Durante a modelagem optou-se por ignorar os efeitos lineares e quadráticos do tempo, uma vez que esse se mostrou não significativo. O modelo ajustado conseguiu explicar 64 % da variação observada ( $r^2 = 0,642$ ), esse valor foi considerado satisfatório uma vez que a variável homogeneidade da amostra não pode ser controlada, e este modelo não foi utilizado para fazer previsões de áreas, apenas para a determinação da condição ótima de transesterificação. A seguir, estão ilustradas algumas figuras de mérito do planejamento experimental.

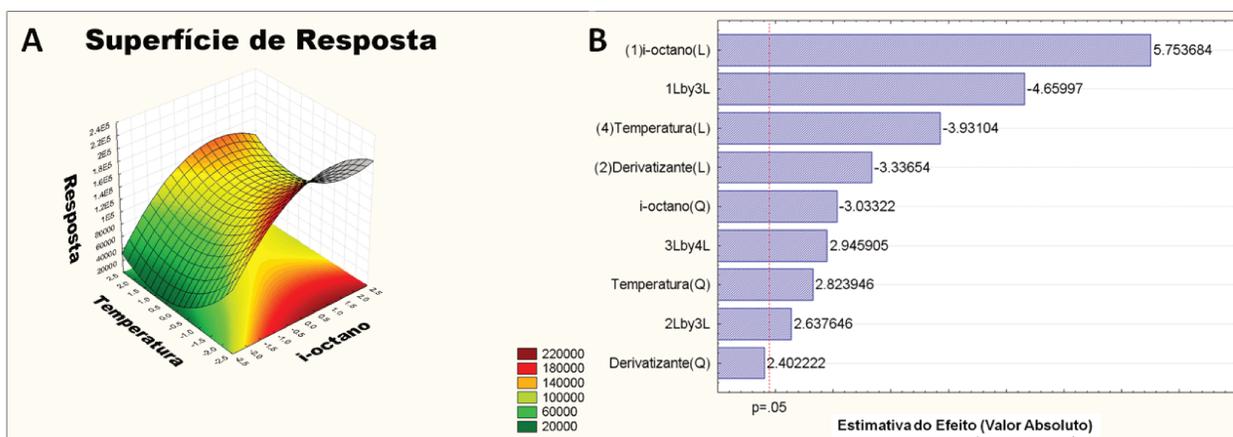


Figura 16. A - Superfície de resposta para as variáveis temperatura e iso-octano (as variáveis derivatizante e tempo foram mantidas no nível 0). B - Diagrama de Pareto ilustrando as estimativas dos efeitos a um nível de confiança de 95 %. Imagem gerado pelo software Statistica versão 6.0. Legenda: (1)i-octano(L) – efeito linear do volume de iso-octano; (2)Derivatizante(L) – efeito linear do volume de solução de metóxido de sódio 2 M; (4)Temperatura(L) – efeito linear da temperatura do processo de transesterificação; i-octano(Q), Temperatura(Q) e Derivatizante(Q) correspondem, respectivamente, aos seus termos quadráticos; 1Lby3L, 3Lby4L e 2Lby3L correspondem à influência dos efeitos mistos, ou seja, interações entre fatores (1 = volume de iso-octano, 2 = volume de derivatizante, 3 = tempo de reação e 4 = temperatura de reação).

A partir das somas quadráticas foi possível aplicar o teste F para a soma quadrática dos termos do modelo em relação à soma do erro puro. O valor calculado foi maior do que o valor do  $F_{\text{crítico}}$ , portanto, o modelo quadrático se mostrou válido [97]. No entanto, ao comparar a soma quadrática da falta de ajuste com o erro puro, o valor do teste F era superior ao  $F_{\text{crítico}}$ , conseqüentemente a previsão de respostas se tornou impossibilitada.

A partir da análise dos dados foi possível concluir que dentro dos valores testados, o tempo de reação não influencia no rendimento da reação, as variáveis iso-octano e derivatizante devem ser mantidas no nível 0, ao passo que a temperatura deve ser mantida no nível 0. Portanto a condição ótima para transesterificação foi de 200 mg de cera dissolvida em 500  $\mu\text{L}$  de iso-octano ( $400 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ), 100  $\mu\text{L}$  de solução metanólica de metóxido de sódio  $2 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  a temperatura de  $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$  com um tempo de reação de 5 min. No procedimento experimental da microtécnica de extração foi mantida a proporção entre os reagentes, de forma a manter a condição ótima. Além disso, foi observado que para a transesterificação de células de mucosa bucal e óleo de peixe a reação pode ser processada a temperatura ambiente, sendo que, provavelmente, para a cera de carnaúba uma temperatura maior é necessária devido a necessidade de maiores temperaturas para a sua completa dissolução em iso-octano.

## 5.2. Microextração em Fase Sólida

Ao longo do desenvolvimento do procedimento de microextração foi escolhida a fibra comercial com revestimento de PDMS. Porque este polímero apresenta um maior grau de entrecruzamento de suas cadeias poliméricas, conferindo a fibra uma maior estabilidade mecânica. Além disso, a fibra de PDMS com espessura de filme de 7  $\mu\text{m}$  possui seu revestimento quimicamente ligado ao suporte. Conseqüentemente, a fibra de PDMS de espessura de 7  $\mu\text{m}$  apresenta uma estabilidade química ainda maior do que a fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ . Ademais, devido à sua baixa temperatura de transição vítrea, ou seja, apresenta propriedades físico-químicas de um líquido e, portanto apresenta elevada faixa linear [59]. Conseqüentemente, devido a esta última propriedade o mecanismo de extração predominante será de partição (absorção) dos analitos entre o meio aquoso e o revestimento, de tal forma que não haverá competição, nem deslocamento, entre espécies presentes na matriz [63]. Além disso, como independentemente da polaridade do lipídio, uma vez convertido para em seus FAME, o coeficiente de distribuição do analito entre meio aquoso e revestimento será favorável, sugerindo uma maior eficiência de isolamento. A constante de distribuição pode ser estimada pelo modelo semi-empírico conhecido como a equação de Kamlet-Taft. Nessa equação, dentre outros termos, o “termo de cavidade” e de interações eletrostáticas sugerem uma constante de distribuição favorável a distribuição dos analitos no polímero. Porque os FAME possuem uma estrutura química semelhante a das cadeias poliméricas de PDMS e as interações entre os analitos e o revestimento extrator são favoráveis pois ambos possuem elevadas constantes de polarizabilidade ( $\alpha$ ) - o que aumenta as forças dispersivas (dipolo induzido/dipolo induzido  $\sim \alpha_1\alpha_2/r^6$ ). Além disso, ao utilizarmos a SPME para isolamento dos analitos é observado um maior valor na razão entre as fases ( $\beta$ ) pois os revestimento apresentam tipicamente volumes da ordem de microlitros.

O preparo da amostra consistiu, basicamente, na derivatização dos lipídios em FAME, evaporação do solvente orgânico, neutralização do excesso de reagente e introdução do meio microextrator no frasco de 200  $\mu\text{L}$ . A evaporação do solvente tem essencialmente duas finalidades: retirar o solvente orgânico para não alterar o

coeficiente de distribuição dos FAME entre meio aquoso e meio extrator, e ao evaporar o solvente a fim de criar um filme homogêneo de amostra sobre a parede interna do frasco. Com a distribuição da amostra na forma de um filme homogêneo, sua espessura é reduzida e o intervalo de tempo necessário para a difusão do analito através deste filme será menor tornando a etapa limitante da transferência de massa a difusão do analito através do revestimento da fibra, como pode ser observado na Figura 17.

Para avaliar a aplicabilidade da SPME na extração direta dos FAME de cera foram utilizadas as fibras comerciais de PDMS de 100 e 7  $\mu\text{m}$ . Teoricamente a cinética de transferência de massa para a fibra de menor espessura é mais rápida, em relação a fibras de maior espessura, porém a capacidade extratora aumenta com o aumento da espessura do filme. Na prática, pode ser observado que a fibra de 7  $\mu\text{m}$  atingiu o estado estacionário em 10 min, enquanto a fibra de 100  $\mu\text{m}$  no intervalo estudado não atingiu sua etapa de equilíbrio. Intervalos maiores poderiam ter sido avaliados, porém na prática o uso da fibra mais espessa iria aumentar demasiadamente o processo de preparo de amostra. Ao se observar a Figura 17 pode ser visto que entre o intervalo de 5 a 10 min a quantidade extraída aumenta proporcionalmente ao tempo de exposição, enquanto aos 10 minutos é atingido o estado estacionário seguido pela perda de FAME no sistema. Com um período de exposição de 10 min a quantidade extraída foi suficiente para a detecção e identificação dos compostos minoritários.

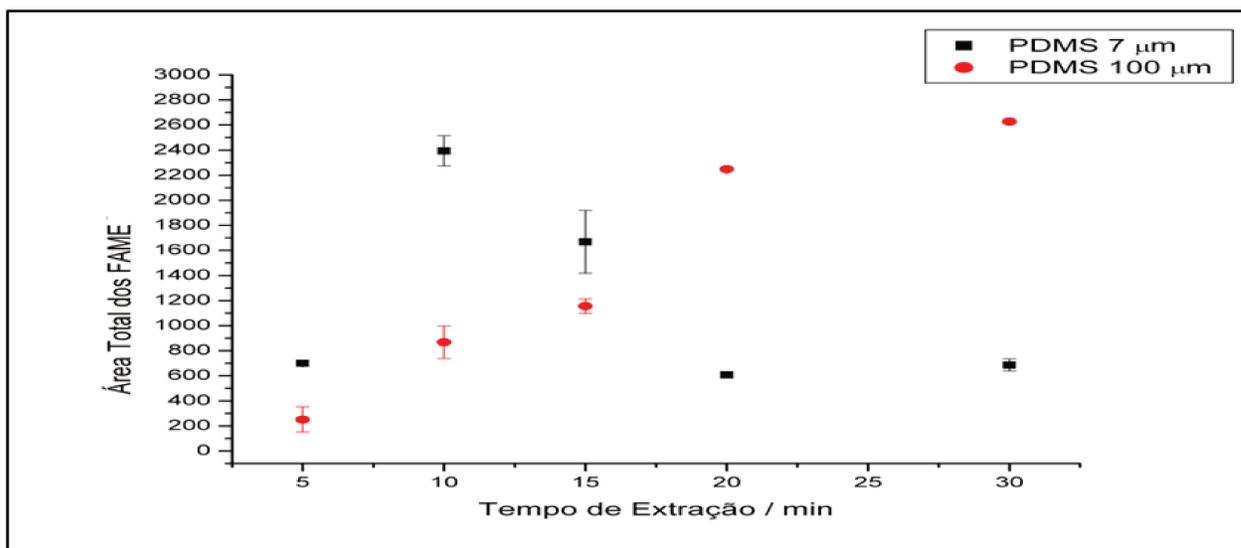


Figura 17. Perfil de extração dos FAME da cera de abelha metilada. As fibras avaliadas foram PDMS de 100  $\mu\text{m}$  e 7  $\mu\text{m}$  de espessura. Os pontos foram obtidos em duplicata. Para os pontos de 5 min da fibra PDMS de 7  $\mu\text{m}$  e 20 min para a fibra de PDMS de 100  $\mu\text{m}$ , os desvios relativos foram de 10 e 15 %, respectivamente.

O perfil de extração para a fibra de PDMS com espessura de 7  $\mu\text{m}$  sugeri a presença de dois processos que competem pelos analitos. O primeiro processo seria a partição dos analitos entre o revestimento de PDMS e meio aquoso. Ao passo que o segundo processo sugeri a adsorção dos analitos nas paredes do frasco e possivelmente no septo. Para ilustrar a hipótese, considerando o sistema aberto na interface do revestimento com meio aquoso, teríamos dois processos de transferência de massa. A primeira seria no sentido do meio aquoso para o revestimento – entrada do sistemas -  $+\delta m_1/\delta t$  (variação da massa pelo tempo), e a segunda no sentido de saída do sistema,  $-\delta m_2/\delta t$ , conforme ilustrada na Figura 18.

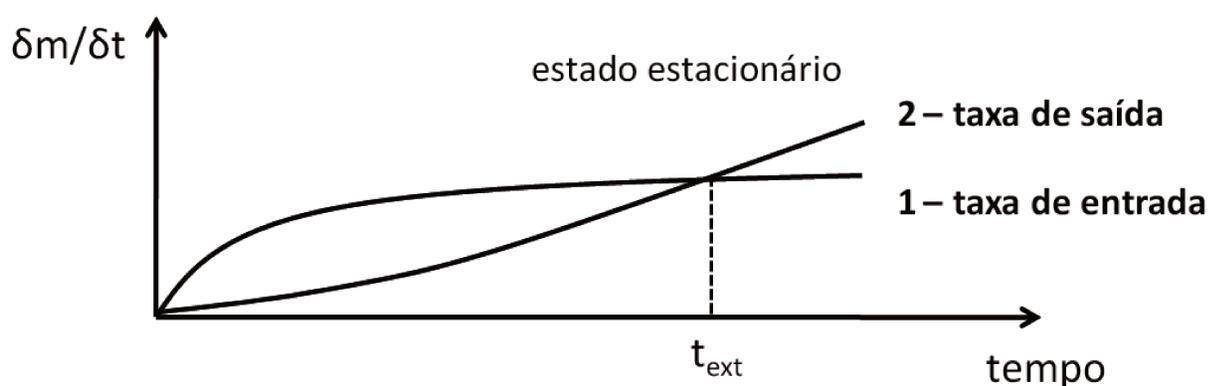


Figura 18. Gráfico ilustrando as duas cinéticas de transferência de massa teóricas consideradas na hipótese para explicar o perfil de extração para a fibra comercial de PDMS com espessura de 7  $\mu\text{m}$ .

Para ilustrar a presença destes processos “competitivos”, tal como a adsorção dos analitos nas parede do frasco e septo, foi avaliada a disponibilidade de FAME obtidos após o preparo da amostra. Foram avaliados dois grupos: de referência e alvo, diferindo apenas em seu tempo de exposição a solução aquosa. No grupo de referência, imediatamente após o preparo da amostra, foi realizada a extração dos analitos, ao passo que no grupo alvo a extração foi realizada após um período de 30 minutos. Deve ser ressaltado que o tempo de exposição foi mantido o mesmo em ambos casos (10 min). Foi possível observar que a disponibilidade dos FAME é cerca da metade com relação ao grupo de referência. Este resultado pode, portanto, ser utilizado como suporte da hipótese mesmo que parcialmente. Portanto, a taxa de saída do sistema,  $-\delta m_2/\delta t$ , pode ser atribuído a adsorção dos analitos nas paredes do frasco, septo e, demais, fenômenos não considerados pelo modelo.

### 5.3. Desenvolvimento do protótipo GC×GC-qMS

Foi escolhido o equipamento comercial GC-qMS modelo QP2010 Plus, pois este possui uma elevada velocidade de varredura ( $10.000 \text{ Th}\cdot\text{s}^{-1}$ ) podendo fornecer taxas de aquisição de até 33 Hz com uma faixa de varredura de até 244 unidades, ou 50 Hz operando no modo “*Single Ion Monitoring*” (SIM).

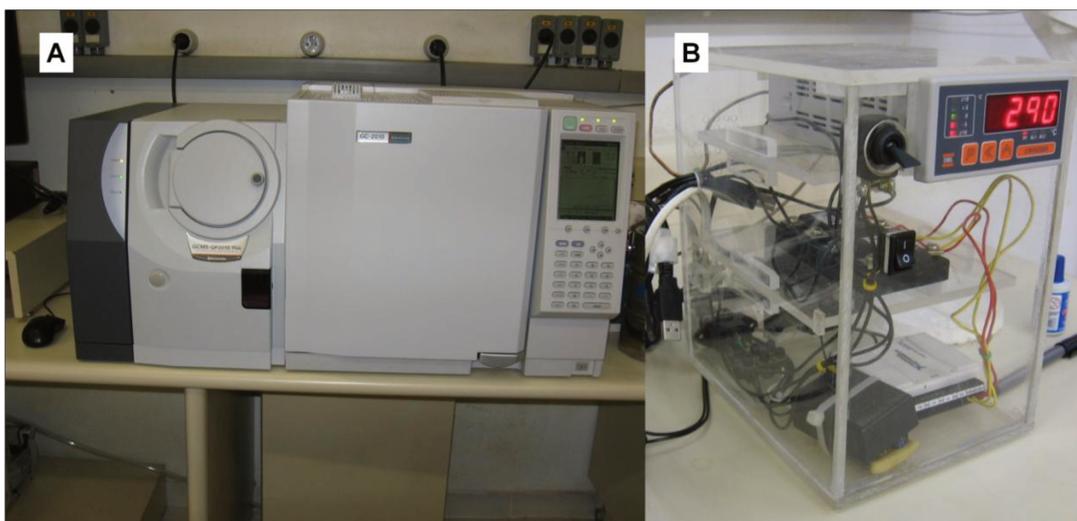


Figura 19. A. Foto do equipamento GC-qMS modelo QP2010 Plus sem alterações. B. Foto do controlador da interface GC×GC montado no laboratório.

Primeiramente foi realizada a montagem do sistema conversor com base nos equipamentos previamente desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do LGC [95]. Após a montagem da interface GC×GC, esta foi instalada no GC-FID modelo 6890 para avaliar o desempenho eletrônico da interface. Foi observada compatibilidade dos tempos de resposta dos relês de estado sólido e do controlador AD/DA. Para avaliar o desempenho eletrônico foi injetada uma amostra de querosene para comparar o seu perfil cromatográfico com o de equipamentos previamente desenvolvidos no laboratório [95]. Foi observado no cromatograma paralelismo da série de alcanos com o eixo correspondente ao tempo de retenção da  $^1D$ . Isso indicou a ausência de atraso eletrônico. Caso houvesse estes atrasos, eles estariam presentes em cada modulação e ao final da corrida seria observada uma inclinação da série de alcanos correspondente ao acúmulo de atrasos. Conseqüentemente nesta série seria observado um aumento gradual dos tempos de retenção na  $^2D$ .

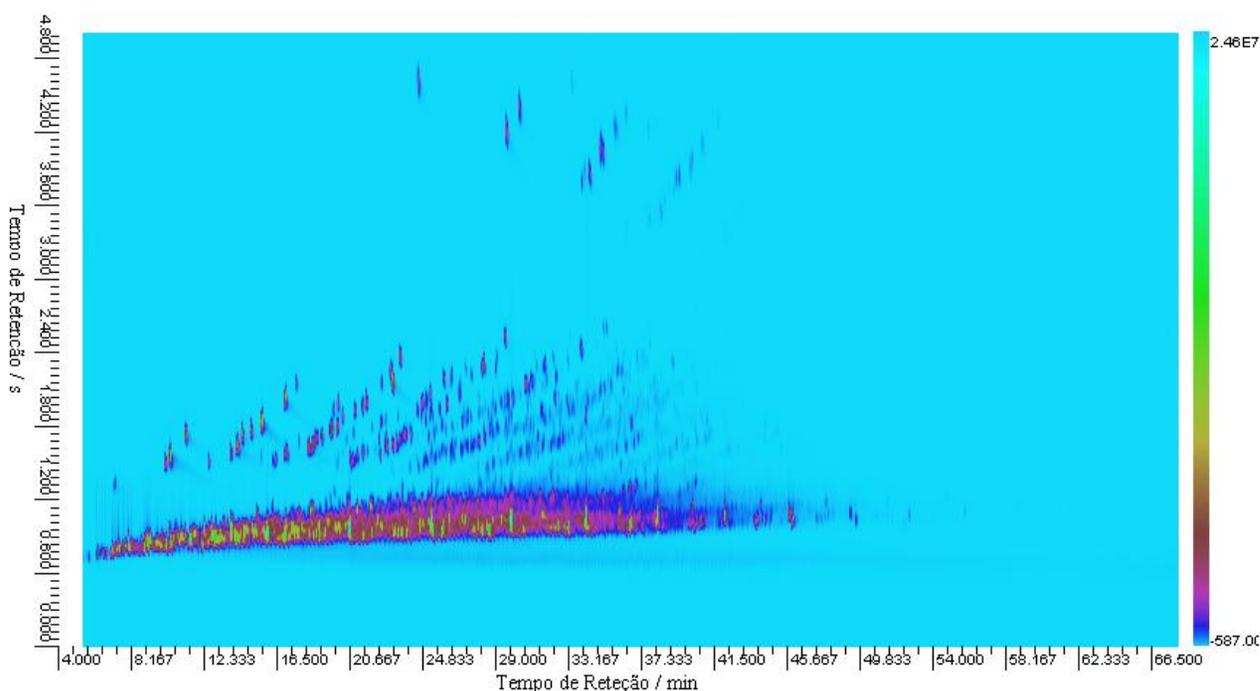
Então, a interface foi adaptada no equipamento QP2010 Plus. Durante a instalação foi necessário criar um isolamento que não permitisse queda de água na parte eletrônica do equipamento. Por isso, foi construído um guia de acrílico pelo qual os tubos de inox passariam, e ao seu redor lã de vidro para evitar eventuais trocas de calor. Esse equipamento GC×GC-qMS apresentou um isolamento térmico semelhante às versões previamente desenvolvidas no LCG [95], com um consumo de nitrogênio líquido de cerca de  $2,5 \text{ L}\cdot\text{h}^{-1}$ .



**Figura 20.** Foto do equipamento GC-qMS QP2010 Plus após conversão para GC×GC-qMS. A. Isolamento dos tubos do modulador com lã de vidro e guia de acrílico. B. Interface GC×GC mostrando o sistema de resfriamento dos gases de  $\text{N}_2$ , e ao fundo as válvulas solenóides e controladores de pressão.

Ao longo da utilização do equipamento foram observadas limitações, originalmente desconhecidas, que se mostraram cruciais ao longo de seu funcionamento. Estas serão apresentadas em suas respectivas ordens cronológicas. Primeiramente, o sistema de aquecimento era constituído por tubos de cobre aquecidos. Portanto, após contínua exposição a elevadas temperaturas ( $300 - 400 \text{ }^\circ\text{C}$ ) este material foi oxidado. Conseqüentemente, o modulador não era capaz de remobilizar os analitos durante o processo de modulação, causando, entre outros, o aprisionamento dos analitos na região do modulador. O segundo problema foi com os conectores de colunas utilizados, estes consistiam de material de vidro. Entretanto, como este equipamento utilizava como gás de arraste o hélio que apresenta alta viscosidade, o equipamento operava a pressões na cabeça da coluna da ordem de 250

– 600 kPa. Consequentemente, devido à elevada diferença de pressão o conector possuía tempo de vida curto, exigindo sua periódica substituição. Portanto, o material do sistema de aquecimento foi substituído por aço inox, um material mais resistente e inerte, assim como o conector das colunas cromatográficas foi substituído por um modelo metálico. Além disso, foi realizada a instalação de um sistema de exaustão interno do cromatógrafo para forçar fluxos convectivos que eliminassem qualquer humidade que poderia se depositar sobre a parte eletrônica do sistema. Na Figura 21, pode ser observado um cromatograma de querosene adquirido no sistema GC×GC-qMS.



**Figura 21.** Cromatograma de querosene comercial adquirido no sistema GC×GC-qMS. Programação do forno cromatográfico: 40 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C. Período de modulação = 5 s. Gás de arraste H<sub>2</sub> (0,6 mL·min<sup>-1</sup>). Taxa de aquisição 33 Hz com intervalo de varredura 40-284 Th. Modo de ionização EI (0,7 eV). Voltagem da multiplicadora 0,8 kV. Volume injetado 0,5 µL (razão de split 1:200). Temperatura do injetor e linha de transferência 250 °C. Temperatura da fonte de ionização 200 °C. Conjunto de colunas 1.

Outra mudança crucial no desempenho do sistema GC×GC-qMS foi a mudança do gás de arraste de hélio para hidrogênio, principalmente devido a sua menor viscosidade e menor perda de eficiência devido a mudanças de velocidades linear do gás de arraste [98]. Ilustrada na Figura 22. Comparativamente, o sistema GC×GC-qMS operava a uma pressão de 396 kPa para que fosse observada uma vazão de 0,6 mL·min<sup>-1</sup> operando com hélio, a 170 °C. Entretanto, com a mudança do gás para

hidrogênio o sistema passou a necessitar de cerca de 170 kPa para apresentar vazão de  $0,6 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Comumente, em sistemas GC×GC a primeira dimensão opera em condições próximas ao seu ótimo, ao passo que na segunda dimensão opera em velocidades lineares abaixo do seu ótimo [33,99,100]. Conseqüentemente, com o acoplamento ao qMS a saída da coluna de segunda dimensão está sob vácuo, de forma que sua queda de pressão na segunda coluna será ainda maior (em relação ao GC×GC-FID). Portanto, sua velocidade linear será maior na <sup>2</sup>D, passando a operar em condições mais próximas de sua velocidade linear ideal.

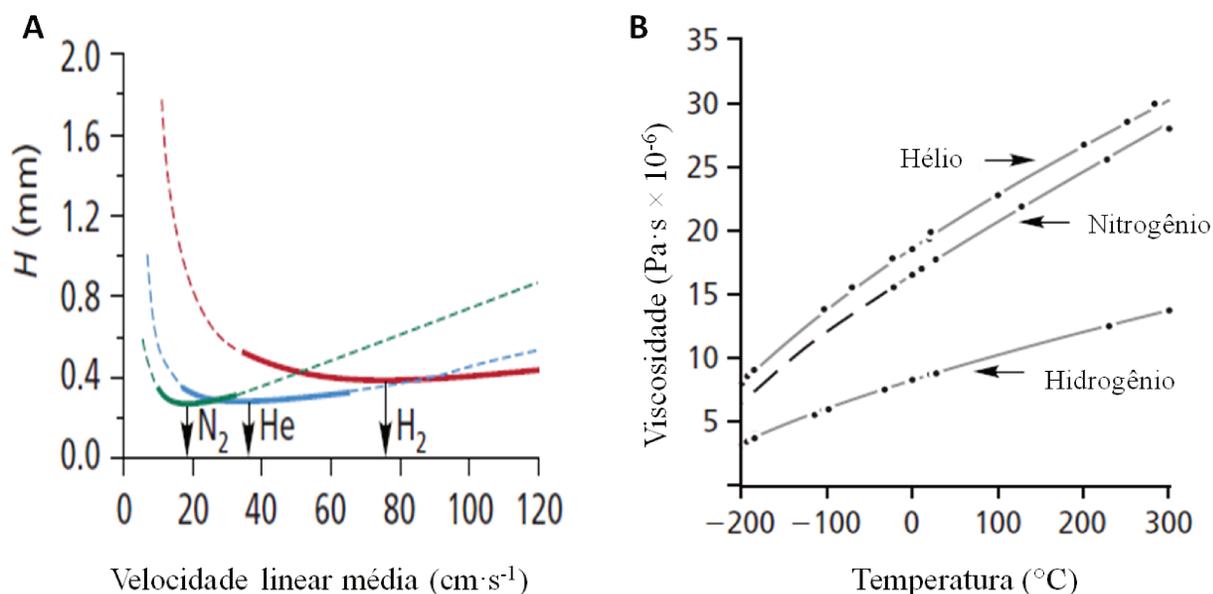


Figura 22. A. Diagrama comparando o desempenho cromatográfico para três tipos de gás de arraste. Representado em vermelho, azul e verde estão ilustradas as curva de van Deemter para os gases hidrogênio, hélio e nitrogênio. B. Diagrama mostrando a variação da viscosidade dos gases hélio, nitrogênio e hidrogênio com relação à temperatura. Ilustração retiradas e adaptadas de J. V. Hinshaw [98].

#### 5.4. Colunas cromatográficas

Para a escolha do conjunto de colunas foi utilizado o equipamento GC×GC-FID. A programação de temperatura utilizada foi 120 °C até 220 °C (10 min) a  $3 \text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ . Foram obtidos cromatogramas utilizando os conjuntos de colunas da Tabela 2. O critério utilizado para escolha do conjunto de colunas foi o aproveitamento do espaço cromatográfico e a temperatura máxima de operação. Foi observado que nos conjuntos de colunas HP-5+SPWax (**A**) e DBWax+DB-5 (**C**) os picos cromatográficos estavam bem distribuído no espaço de separação, ao passo que no conjunto HP-1+HP-50 os

picos se distribuíam numa região inferior ao observado em **A** e **C**. Por isso o conjunto **B** não foi escolhido pois a utilização do seu espaço de separação é menor em relação aos demais conjuntos, devido a sua menor ortogonalidade, ou seja os mecanismos de separação da  $^1D$  e  $^2D$  são parcialmente correlacionados. Visualmente as diagonais correspondentes aos alcanos, ésteres metílicos e álcoois estariam distribuídas numa região muito próxima umas das outras, conforme mostra a Figura 23. O conjunto **C** não foi utilizado devido a sua inferior temperatura máxima de trabalho. O limite da coluna DBWax é de 260 ° (250 °C operando em isoterma) enquanto a coluna SPWax possui um limite de 280 °C (270 °C operando em isoterma). Portanto o conjunto **A** foi escolhido, pois apresenta o maior grau de ortogonalidade e conseqüentemente a maior capacidade de pico, e devido à maior temperatura de operação. Conseqüentemente este conjunto é o mais adequado para a análise de matrizes mais complexas, pois teríamos uma maior distribuição dos seus constituintes no cromatograma, conforme ilustrado na Figura 23.

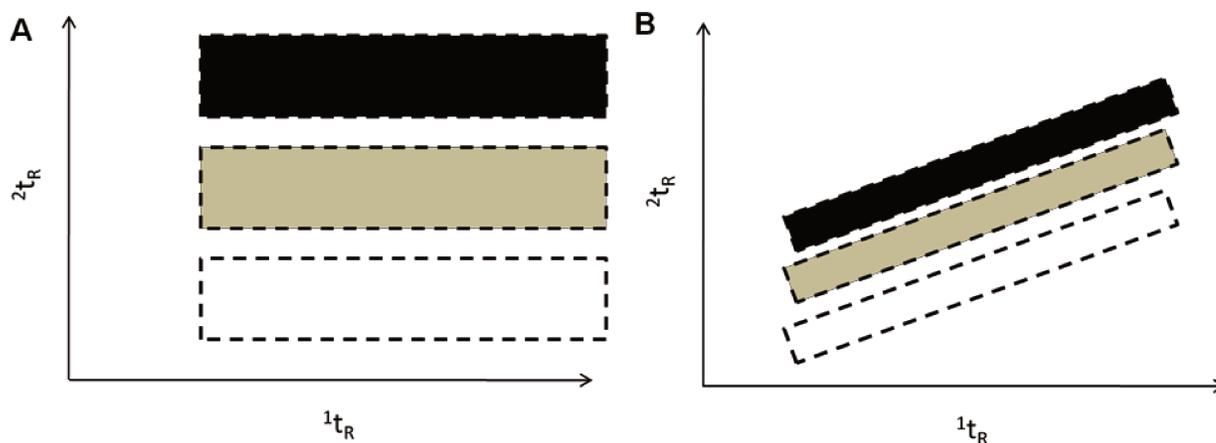


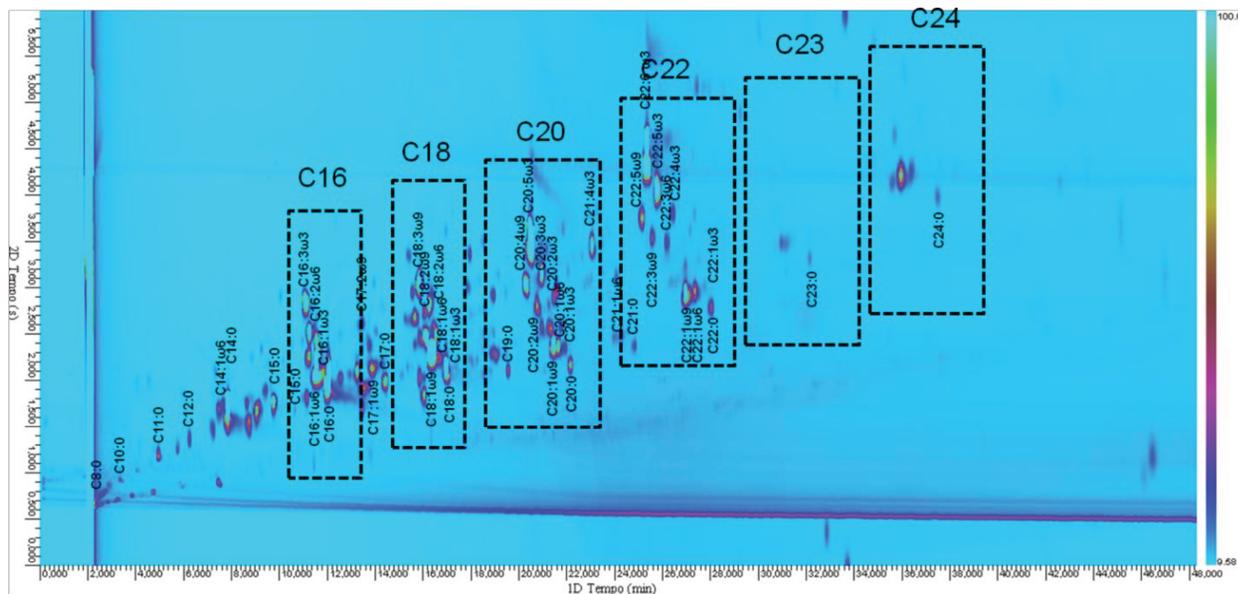
Figura 23. Ilustração genérica do comportamento de três classes de compostos: séries de alcanos alifáticos (BRANCO), ésteres metílicos alifáticos (CINZA) e álcoois alifáticos (PRETO). A. Conjunto de colunas ortogonais (HP-5+SPWax). B. Conjunto de colunas semi-ortogonal (HP-1+HP-50).

## 5.5. Análise de Lipídios

### 5.5.1. Estrutura Cromatográfica

A alternativa proposta neste trabalho é o uso da GC×GC para análise de FAME de seus respectivos lipídios. Com o uso do conjunto de colunas 1 e a programação de temperatura adequada, o mecanismo predominante na primeira dimensão é a separação por volatilidade e na segunda interações específicas. Pelo fato da segunda

dimensão se tratar de uma coluna com revestimento de poli(etilenoglicol), as interações específicas serão principalmente ligações de hidrogênio, interações entre dipolos permanentes, além das demais forças dispersivas. Na Figura 24 está ilustrado o cromatograma de óleo de peixe. Neste pode ser observada, principalmente, a separação por grupos, ou seja, na  $^1D$  os FAME estão agrupados em determinados intervalos de  $^1t_R$  de acordo com o comprimento de suas cadeias.



**Figura 24.** Cromatograma de óleo de peixe adquirido no sistema GC×GC-FID. Condições cromatográficas: 170 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C, seguido de isoterma a 240 °C por 25 min; Período de modulação 6 s; vazão 0,6 mL·min<sup>-1</sup>; taxa de aquisição 100 Hz; introdução da Amostra SPME; temperatura do injetor e detector 250 °C; conjunto de colunas 1.

Na Figura 25 pode ser observada uma região ampliada do cromatograma de óleo de peixe. Nesta região pode-se observar a estruturação de compostos quimicamente semelhantes e relacionados, característica de técnicas multidimensionais compreensivas. Nesta amostra, podem ser observadas duas características principais. A primeira é a influência do número de insaturações nas coordenadas de retenção. Com o aumento do número de insaturações a molécula de FAME passa a apresentar um caráter mais polar, conseqüentemente o seu  $^2t_R$  irá aumentar. Como na  $^1D$  o mecanismo de separação é essencialmente por volatilidade, as moléculas lineares (de maior superfície de contato) irão apresentar o maior tempo de retenção, devido a maior magnitude das interações intermoleculares. Então, com o aumento do número de insaturações o  $^1t_R$  irá sofrer um decréscimo devida diminuição de suas forças

intermoleculares. Por isso a eluição em uma diagonal PUFA, de mesmo ômega, em relação ao seu análogo saturado. A segunda característica é a influência da posição da insaturação na cadeia principal do FAME. Quanto menor for o valor de ômega, mais próxima da extremidade se encontra a insaturação e portanto maior sua interação intermolecular. Conseqüentemente o  $^1t_R$  aumenta com a diminuição de ômega. Já o  $^2t_R$  apresenta um acréscimo em seu valor devido ao aumento na polaridade da molécula, com a diminuição de ômega.

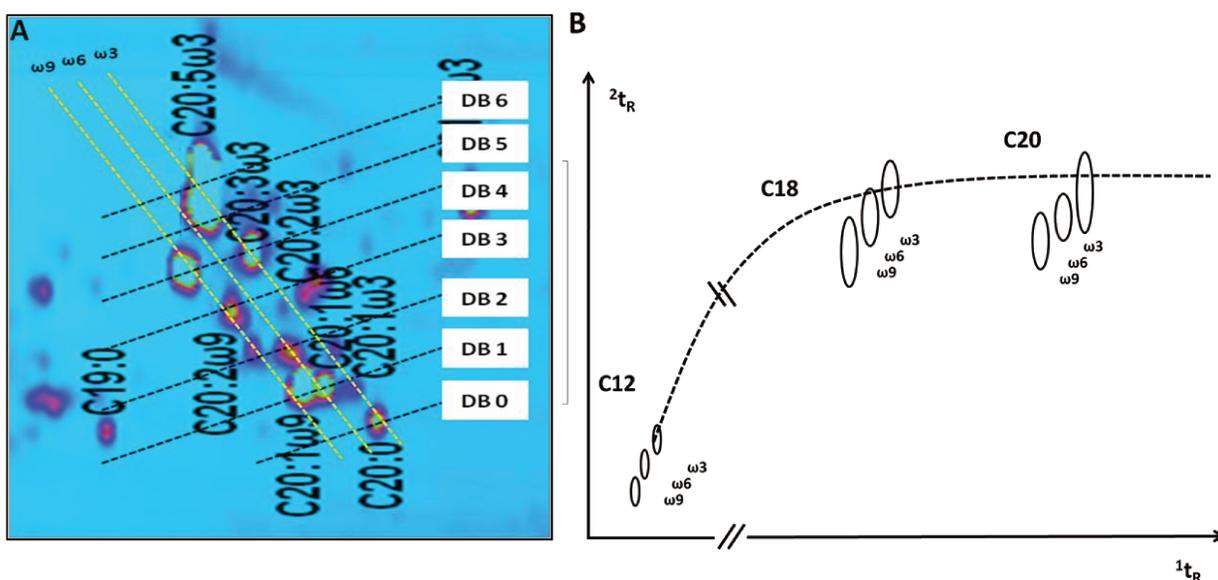


Figura 25 A. Região ampliada do cromatograma de óleo de peixe. Região utilizada para ilustrar a estrutura cromatográfica de PUFA em óleo de peixe. B. Cromatograma teórico ilustrando o perfil de eluição de grupos de FAME com o mesmo número de insaturação.

Conforme abordada na seção de revisão bibliográfica, os relatos iniciais de estruturação de PUFA afirmavam a presença de uma única curva que abrangesse todos analitos com mesmo número de insaturações. Entretanto, esta observação não é totalmente correta. Possivelmente por serem os primeiros relatos, os autores poderiam desconhecer da influência do ômega nas coordenadas de retenção.

Nos casos em que é utilizado o conjunto de colunas denominado convencional (ou normal) irão ser observadas diferenças mais acentuadas de  $^2t_R$  entre os seus isômeros (por exemplo,  $^2t_{R\omega3} > ^2t_{R\omega6} > ^2t_{R\omega9}$ ), conforme observado nos resultados desse trabalho. Conseqüentemente, nestas condições de programação de temperatura ( $2 - 3 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ ), dificilmente irá existir uma única curva que irá abranger todos isômeros, com o mesmo grau de insaturação, para os FAME. Na Figura 12 A foi possível ilustrar

curvas que descrevem a eluição de compostos com o mesmo número de insaturações devido à ausência (ou não identificação) dos isômeros de posição. Uma alternativa para o uso destas curvas de eluição, em FAME, seria as posicionar entre os isômeros com o mesmo número de insaturações, ou com o aumento da programação linear de temperatura levando a perda de resolução entre os isômeros. Na realidade estas curvas podem ser observadas desde que tracadas para os mesmos isômeros, conforme ilustrado na Figura 12 B. Ao longo do trabalho, durante as etapas de montagem das estruturas cromatográficas foi utilizada curvas posicionadas entre os isômeros. Além disso, foi possível observar que a necessidade de padrões analíticos para a “calibração” das curvas e retas de eluição é muito importante, principalmente para a construção das retas de eluição dos isômeros de posição ( $\omega$ ).

### **5.5.2. Otimização dos parâmetros do GC×GC-qMS**

A otimização dos parâmetros do espectrômetro de massas com analisador quadrupolar rápido foi necessário devido ao uso de intervalos de varredura limitados e também devido a necessidade de elevadas taxas de aquisição. Ao longo do trabalho foram avaliadas essencialmente três modalidades de varredura. A primeira cuja taxa de digitalização foi de 25 Hz, com um intervalo de varredura de 40 – 383 Th. A segunda foi a uma frequência de 33 Hz com um intervalo reduzido de 40 - 284 Th, e por último uma varredura programada de 40 - 284 Th (de 4 - 15 min), 70 - 314 Th (15 - 20 min), 100-344 Th (20 - 25 min) e 130 - 374 Th (25 - 48,33 min) sempre a uma taxa de 33 Hz. O motivo para tais programações foi, primeiramente, devido à necessidade de altas taxas de aquisição sem que se fosse observado o fenômeno de deformação do espectro de massa, e, segundo, devida a importância de se incluir no intervalo de varredura fragmentos chave que pudessem fornecer informação a respeito dos constituintes, tais como o íon molecular [92,93,101]. Por isso o intervalo de varredura foi ajustado e programado segundo a massa molecular do FAME saturado de cada grupo.

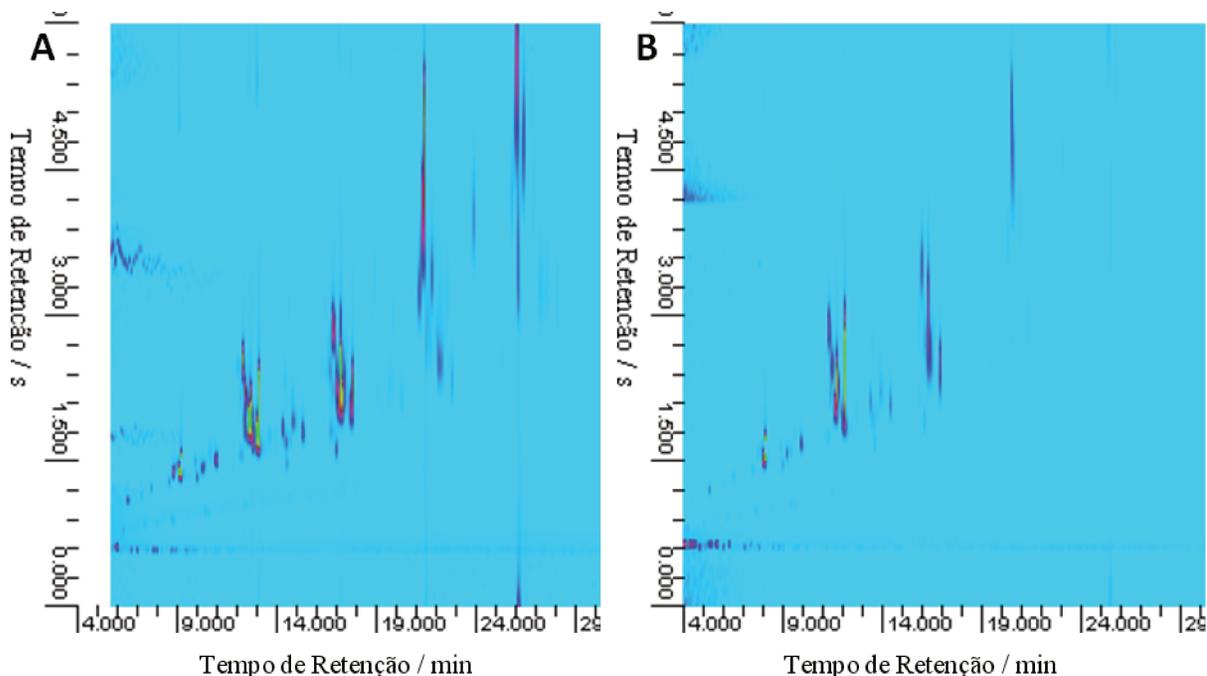
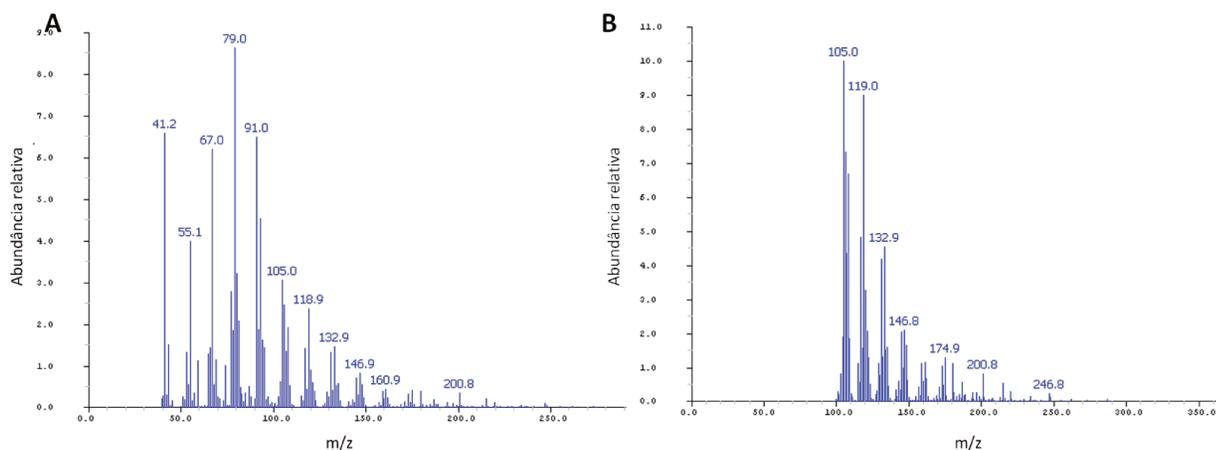


Figura 26. Cromatogramas de óleo de peixe adquiridos no sistema GC×GC-qMS. Programação de temperatura 170 °C a 3 °C·min<sup>-1</sup> até 240 °C, isoterma a 240 °C por 25 min. Vazão do gás de arraste 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. Volume injetado 1 µL (razão de split de 1:50). Voltagem da multiplicadora de elétrons 700 V. Técnica de ionização EI (70 eV). A. Intervalo de varredura de 40- 284 Th, a 33 Hz. B. Intervalo de varredura programado para 40-284 Th (de 4 a 15 min), 70-314 Th (15-20 min), 100-344 Th (20-25 min) e 130-374 Th (25-48,33 min), a 33 Hz.

Entretanto, conforme ilustrada na Figura 26, a utilização de um intervalo de varredura constante permite o melhor monitoramento dos compostos mais pesados (FAME acima do grupo C18), ao passo que utilizando a programação de varredura para os compostos do grupo C20 e C22 e principalmente C24 a intensidade dos picos cromatográficos diminuí drasticamente, ocasionando a não detecção dos mesmos. Com relação às similaridades dos espectros de massas, foi possível observar que a partir do grupo C20, utilizando a programação de varredura, não foi possível indentificar os compostos e, principalmente, para o grupo do C24 não foi possível atribuir o principal grupo funcional aos picos. Isto se deve principalmente a menor quantidade de informação contida nos espectros de massas, conforme ilustrada na Figura 27. Na Figura 27 A, pode-se observar o espectro de massas para o éster metílico do DHA. No entanto, ao usar a programação de varredura do analisador de massas, a região observada em B compreende apenas uma pequena parcela da informação contida em A, a região de 105 - 246 Th mostrada na Figura 27 B correspondente às regiões de menor intensidade do espectro mostrado em A, sendo que os íons/fragmentos mais

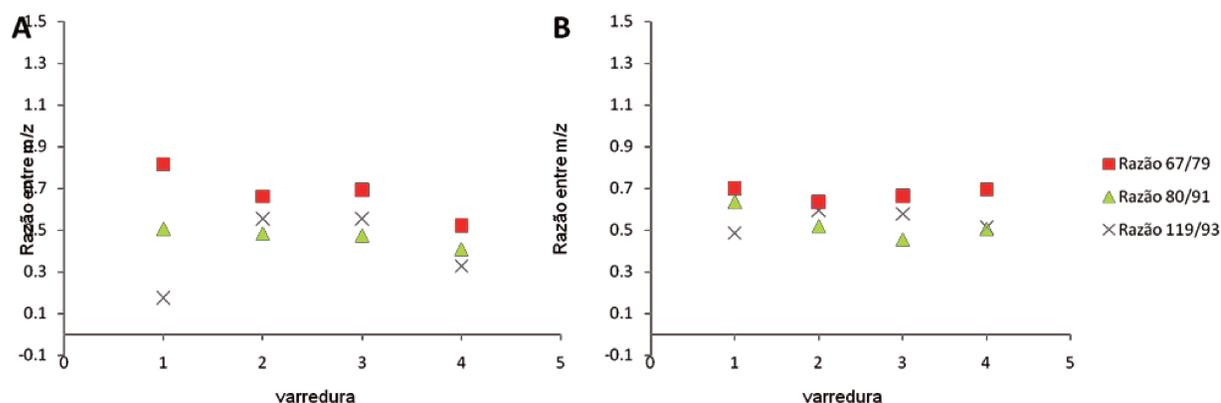
importantes como 67, 79 e 91 não foram monitorados. Consequentemente, a intensidade do seu pico cromatográfico irá diminuir, quando comparada com a varredura de intervalo fixo, pois a quantidade de fragmentos que serão utilizados para a construção do cromatograma de íons totais será menor.



**Figura 27. Espectros de massas do éster metílico do DHA. Técnica de ionização: EI (70 eV). Voltagem da multiplicadora de elétrons 700 V. A. Espectro adquirido a 33 Hz com intervalo fixo de 40-284 Th. B. Espectro adquirido a 33 Hz com intervalo de varredura móvel – neste intervalo 100 – 344 Th.**

Portanto, ao longo do estudo optou-se pelo uso de intervalos de varredura constante. Consequentemente, foi necessário verificar a integridade dos espectros de massas. Para isso, monitorou-se a razão entre os fragmentos de  $m/z$  79 e 67; 91 e 80; 119 e 93. Adahclour e colaboradores haviam relatado que a uma taxa de aquisição de 20 Hz era observada a deformação dos espectros de massas de um mesmo analito em diferentes varreduras [93]. Por isso, foi estudada uma taxa de 25 Hz e 33 Hz para verificar este fenômeno. Como resultado, foi observado que a deformação dos espectros estava mais acentuada a uma taxa de aquisição de 25 Hz, conforme ilustrada na Figura 28 A. Enquanto que a uma taxa de 33 Hz este fenômeno praticamente não foi observado, conforme ilustrado na Figura 28 B e relatado por Adahclour. Consequentemente, para fins qualitativos se for necessário o uso de um intervalo de varredura maior uma taxa de 25 Hz pode ser considerada. Entretanto, a qualidade das buscas por similaridades serão prejudicadas, consequência que pode ser tolerada desde que se faça uso de índices de retenção e da estrutura cromatográfica, quando presente. Neste estudo, foi observado que para análise de FAME uma taxa de 33 Hz com intervalo reduzido foi suficiente para a identificação confiável dos picos. O intervalo

de varredura foi deslocado de 40 – 284 para 50 – 294 com a finalidade de se abranger uma maior número de íons moleculares ao longo da corrida cromatográfica, sem prejudicar a quantidade de informação presente nos espectros de massas. Entretanto, a identificação dos analitos de grupos ainda mais pesados como C23 dependerá principalmente de parâmetros como índice de retenção e estrutura cromatográfica, uma vez que fragmentos importantes mais pesados não foram monitorados durante a análise devido ao intervalo reduzido de varredura.



**Figura 28.** Diagrama ilustrando o fenômeno de distorção do espectro de massa (do inglês, “*mass spectral skewing*”) para o pico do éster metílico do DHA, obtido no sistema GCxGC-qMS. Taxa de aquisição: A. 25 Hz; B. 33 Hz.

Na prática, para análise de voláteis, fragrâncias e óleos essenciais um intervalo de varredura de 244 unidades a 33 Hz seria suficiente para cobrir os principais fragmentos produzidos por seus constituintes e forneceria espectros de massas de boa qualidade. No entanto, para análise de lipídios, portanto FAME, talvez uma taxa de digitalização de 25 Hz fosse mais aconselhado, entretanto, uma taxa de 33 Hz proporcionaria identificações mais exatas. Consequentemente, isso permitiria a identificação dos constituintes mais leves, e através da estrutura cromatográfica inferir a identidade dos constituintes mais pesados. Adicionalmente, o uso de índices de retenção para identificação é também necessário, especialmente devido aos padrões de fragmentação similares entre analitos de uma mesma série.

### 5.5.3. Identificações

Com o uso de um intervalo de varredura reduzido (50 – 294 Th), a 33 Hz, a identificação de compostos, por GCxGC-qMS, mais leves tais como FAME dos grupos

de C12 – C20 e alguns compostos do grupo C22, tal como o DHA, apresentou buscas por similaridade espectral variando entre de 837 a 934. No entanto, para compostos mais pesados, tal como o FAME C24:0, os espectros de massas permitiram apenas a identificação do grupo funcional, indicando se o composto seria um hidrocarboneto, álcool ou éster metílico, por exemplo. Porém, para tais compostos o uso da estruturação cromatográfica e índice de retenção permitiu a sua identificação. Além disso, quando disponível, foram realizadas buscas em referências para confirmação da presença de determinados analitos.

Os índices de retenção foram calculados segundo a equação de van den Dool e Kratz para programação linear de temperatura [102,103]. Para analitos cujos tempos de retenção se encontravam no intervalo no qual o forno cromatográfico operava em isoterma a 240 °C, o índice de retenção foi calculado segundo a equação de Kovats. O uso dos índices de retenção gerados em colunas de silicone apresenta baixas flutuações, quando determinadas em condições cromatográficas diferentes, entretanto colunas com revestimentos de CarboWax 20M apresentam flutuações, quando alteradas as condições cromatográfica, superando 50 unidades [104]. Na GC convencional, o uso de colunas polares para a total resolução de PUFA é mais tradicional, entretanto os índices gerados estão sujeitos a elevadas flutuações, porém com a introdução da GC×GC o uso de conjuntos normais, no qual a <sup>1</sup>D é uma coluna com revestimento de silicone e a <sup>2</sup>D é uma coluna curta de CarboWax, a separação de seus constituintes é possível sem que sejam observadas elevadas flutuações nos índices de retenção. Tipicamente, os índices de retenção obtidos por GC×GC, no conjunto normal, são comparados aos índices obtidos por GC, em fases apolares, entretanto para compostos muito polares, tais como álcoois, o índice obtido por GC×GC pode chegar a ser 50 unidades superior, quando comparado com o índice por GC, devido a maior retenção destes compostos no revestimento polar [105].

Os compostos identificados na cera de abelha estão registrados na Tabela 5 e numerados na Figura 29. Os principais constituintes detectados e identificados na cera de abelha por GC×GC-qMS foram FAME de saturados, sendo o C16, C18 e C24 os compostos majoritários, e hidróxi-FAME C16 e C18:1, sendo o último relatado em algumas espécies vegetais [106-108]. Um dos motivos pelos quais esse ainda não foi relatado em cera de abelha possivelmente deve-se a maior pureza e intensidade do

espectro de massas proporcionado pela GC×GC-qMS. No entanto, apesar de sua baixa incidência, alguns autores já relataram o isolamento de outros hidroxi-FAME insaturados [37,109]. Ao contrário desses, a ocorrência de hidroxi-FAME saturados já é mais comum [37,110]. Além disso, devido ao incremento em detectabilidade e sensibilidade, um maior número de FAME insaturados - C15:1, C18:1n-9 e C20:1n-9 – e de cadeia ímpar – C11, C15, C17, C19 e C23 – foram identificados, apesar de serem compostos minoritários. O composto C18:1n-9 foi identificado pela coinjeção de padrões, sendo que o C20:1n-9 foi identificado pela curva característica de FAME com 1 insaturação na posição  $\omega$ 9. Já a posição da insaturação no C15:1 foi determinada pelo índice de retenção da mesma espécie presente em óleo de peixe, sugerindo se tratar da posição  $\omega$ 9. Os FAME saturados de número ímpar foram identificados pela curva dos compostos saturados e pelos índices de retenção. De forma geral, os compostos majoritários identificados estão de acordo com a literatura [37,39]. Um grupo peculiar ainda pouco relatado em GC×GC são as coordenadas de eluição de  $br_2$ -FAME. Na cera de abelha foi possível identificar o  $br_2$ -C16:0 pois o espectro de massas sugeriu a presença de ramificações, e o índice de retenção confirmou sua identidade. Além disso, Asperger e colaboradores também relataram a presença destas espécies em cera de abelha [39], embora sua incidência em lipídios seja menos comum [36,37,111].

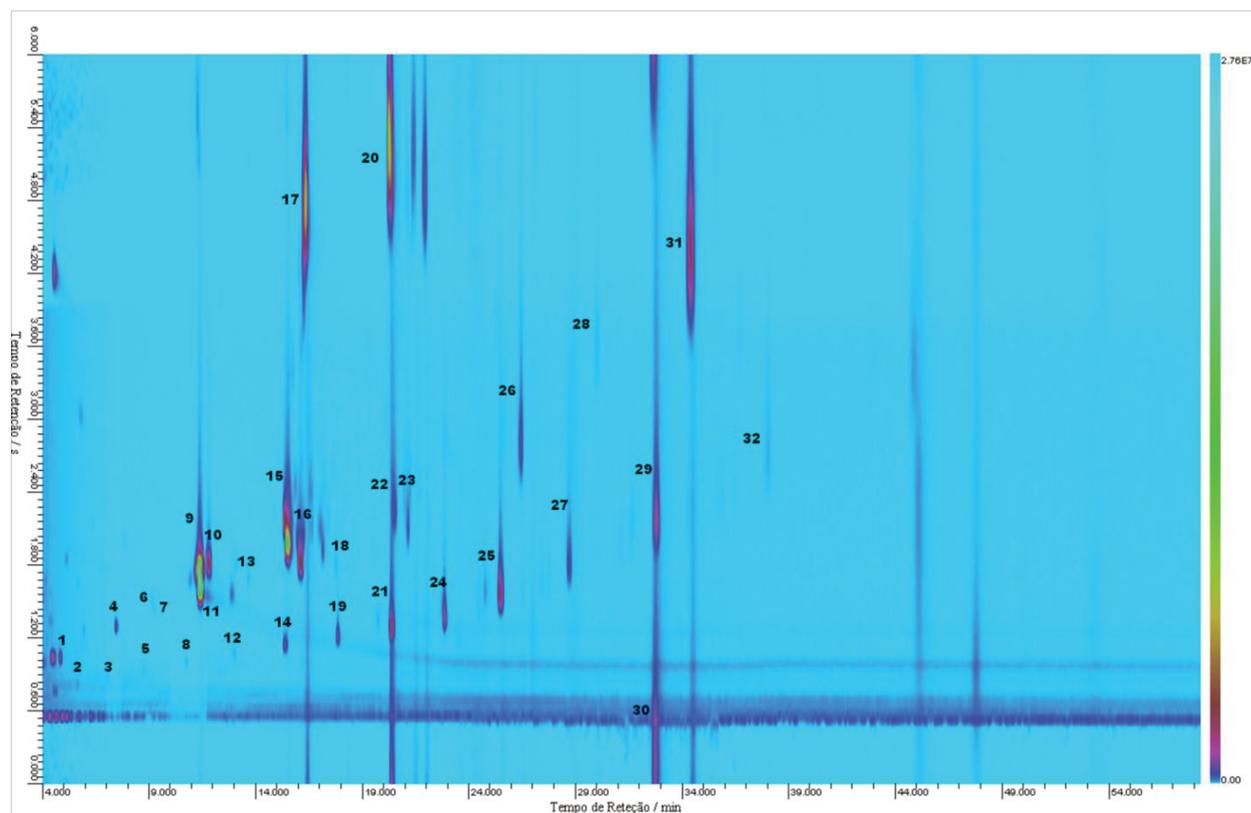


Figura 29. Cromatograma de cera de abelha obtida no protótipo GCxGC-qMS. Foi utilizada uma fibra comercial com revestimento de PDMS com espessura de 7  $\mu\text{m}$ . Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  por 35 minutos. Temperatura do injetor: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da linha de transferência: 250  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da fonte de ionização: 200  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50- 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min.

Os compostos identificados na cera de carnaúba do tipo amarela estão registrados na Tabela 6 e numerados na Figura 30. Os principais constituintes detectados e identificados na cera de carnaúba por GCxGC-qMS foram FAME saturados, sendo o C18, C20, C24, C26 e C28 os compostos majoritários, conforme reportado por Asperger e colaboradores [39].

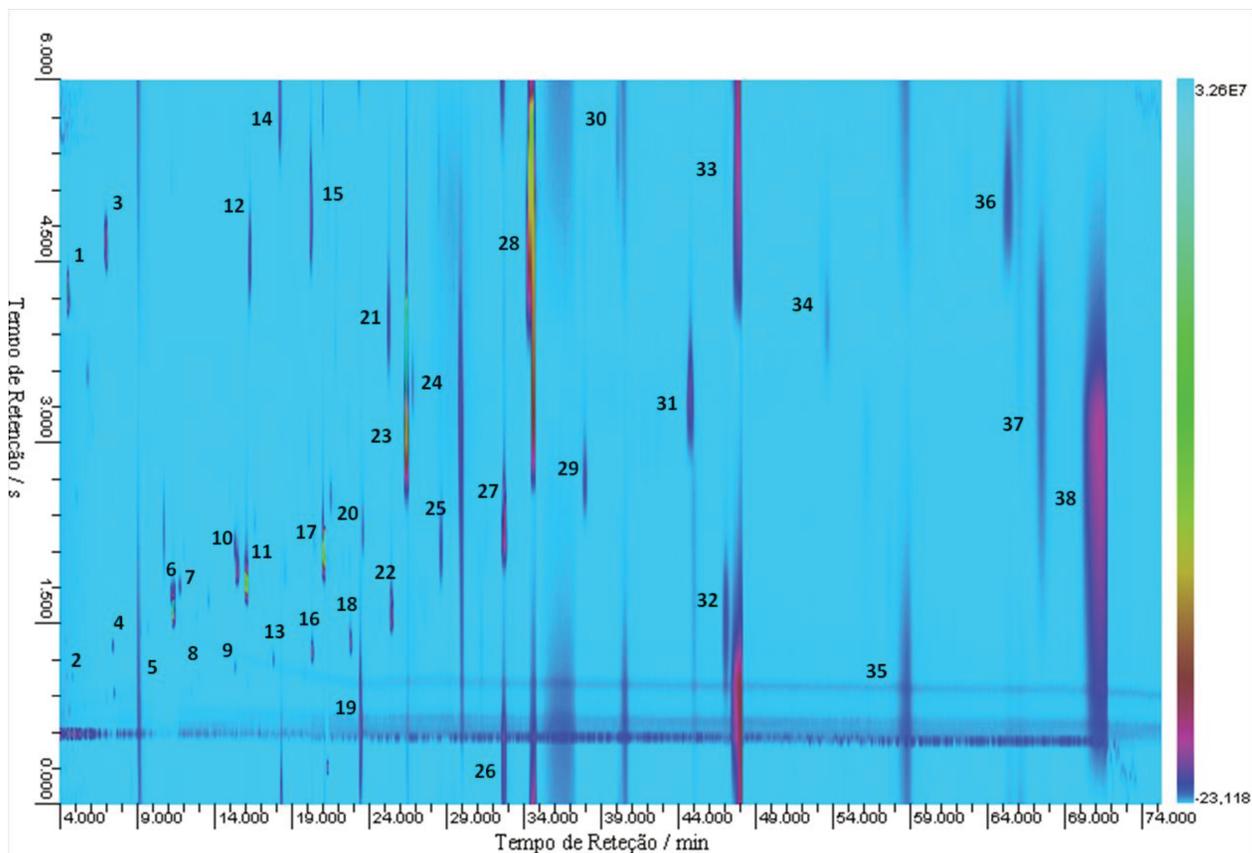


Figura 30. Cromatograma de cera de carnauba amarela obtida no protótipo GC×GC-qMS. Transesterificação por catálise básica. Volume injetado 1  $\mu\text{L}$  (razão de split 1:50) de uma solução 100 ppm. Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  por 50 minutos. Temperatura do injetor: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura da linha de transferência: 250  $^{\circ}\text{C}$ . Temperatura do fonte de ionização: 200  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste: 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50 - 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min.

Novamente, devido ao incremento em sensibilidade e detectabilidade, foram detectados e identificados FAME insaturados e saturados de cadeia ímpar, porém em baixas intensidades. No cromatograma pode ser observada a presença de cerca de cinco series homólogas – hidrocarbonetos lineares, ésteres metílicos saturados, ésteres metílicos com uma insaturação, e mais duas séries curtas representados pelos analitos indicados por 1, 3, 14 e 19; 12 e 15. A primeira consiste de uma série de álcoois e a segunda de hidroxí-FAME, sendo estas espécies encontradas em cera de carnaúbas e análogos [36,37,39,40,111]. Entretanto não foi possível identificar os constituintes dessa segunda série devido a baixa disponibilidade de índices de retenção e busca por espectros de massas.

Os compostos identificados no óleo de peixe estão registrados na Tabela 7 e numerados na Figura 31. Os principais constituintes detectados e identificados no óleo

de peixe por GC×GC-qMS foram FAME de poli-insaturados do grupo  $\omega$ 3, principalmente. Novamente devido ao incremento em sensibilidade foram detectados FAME de comprimento de cadeia ímpar saturados e poli-insaturados.

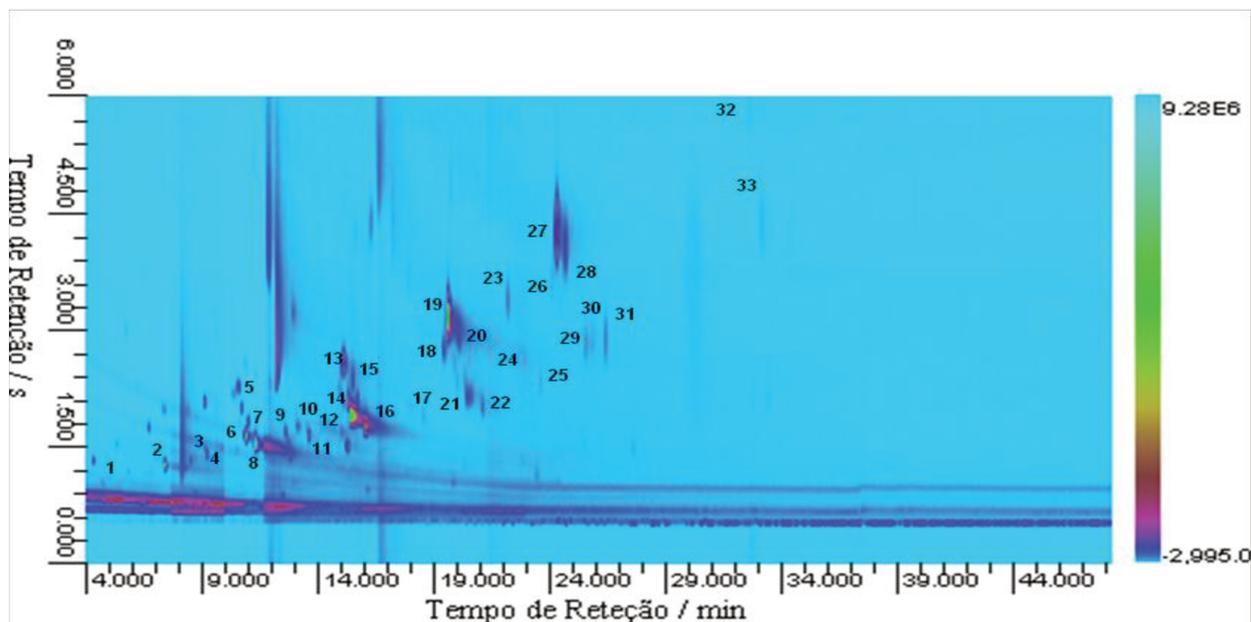
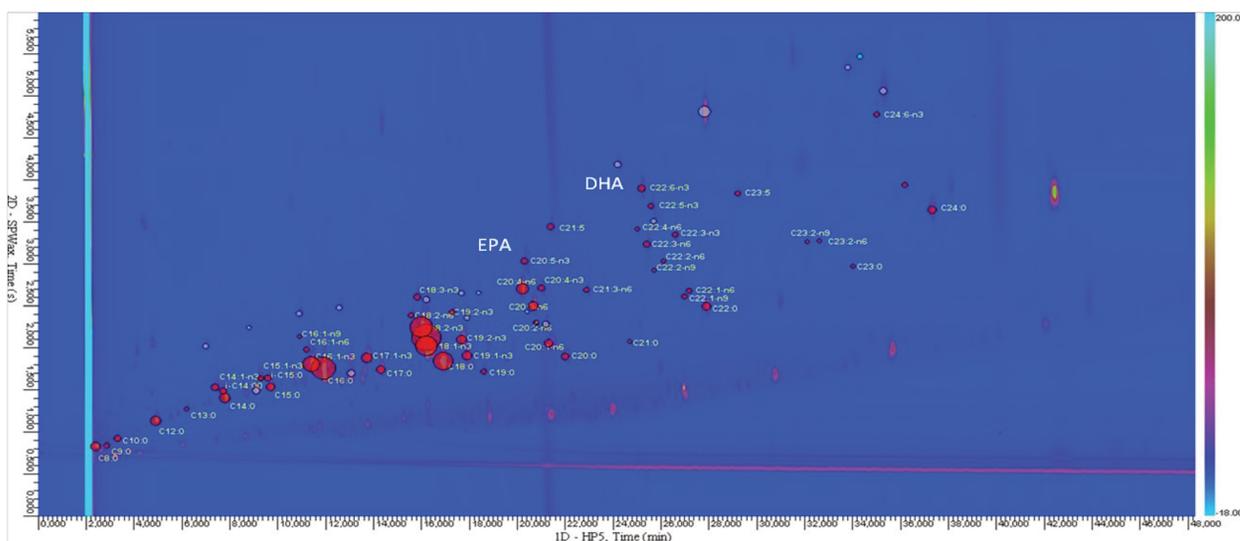


Figura 31. Cromatograma de óleo de peixe obtida no protótipo GC×GC-qMS. Transesterificação por catálise básica. Foi utilizada uma fibra comercial com revestimento de PDMS com espessura de 7  $\mu$ m. Programação de temperatura: 170 °C  $\rightarrow$  3 °C·min<sup>-1</sup>  $\rightarrow$  240 °C isoterma a 240 °C por 25 minutos. Temperatura do injetor: 270 °C. Temperatura da linha de transferência: 250 °C. Temperatura da fonte de ionização: 200 °C. Vazão do gás de arraste: 0,6 mL·min<sup>-1</sup>. Modo de ionização: EI (70 eV). Faixa de varredura: 50 - 294 Th. Taxa de aquisição: 33 Hz. Corte do Solvente: 4 min.

Ao longo das identificações foi observada a baixa disponibilidade de espectros de massas e índices de retenção para a identificação principalmente para espécies com comprimento ímpar de cadeias saturadas e insaturadas, ramificados, e de hidróxi-FAME; tornando ainda mais recorrente a necessidade da criação de um banco de dados com espectros de massas e índices de retenção para GC×GC-qMS.

Uma vez ilustrada a aplicabilidade da microextração em fase sólida combinada a cromatografia gasosa compreensiva para análise de lipídios essa metodologia foi aplicada para análise de células de mucosa bucal em recém-nascidos, em colaboração com o Dr. S. Bogusz Jr. O procedimento experimental consiste na coleta das células da mucosa bucal por esfregaços de bochecha, extraídos e transferidos ao vial de 200  $\mu$ L; no frasco foi adicionado o metóxido de sódio seguido de sua evaporação e neutralização; então o conteúdo do frasco é preenchido com água destilada para eliminar a presença de *headspace*, e a fibra com revestimento de PDMS de espessura

de 7  $\mu\text{m}$  é exposta a solução do frasco por 15 min seguido de sua introdução no equipamento GC $\times$ GC. Esta metodologia vinha sendo desenvolvida na área clínica devido, principalmente, ao seu caráter não-invasivo e indolor. Entretanto devido a limitação da GC convencional era necessário combina-lá a TLC para se obter uma capacidade de pico e seletividade necessárias as identificações e quantificações com emprego de GC convencional. Porém, o uso da GC $\times$ GC proporcionou um incremento no poder de separação permitindo, então, a eliminação da TLC do método. Além disso, com a combinação da SPME com esta técnica compreensiva foi possível obter um incremento considerável na detectabilidade dos FAME, conforme ilustrado na Figura 32, ao passo que na metodologia convencional poucos analitos eram detectados. Conseqüentemente à simplificação da metodologia o tempo gasto no preparo de amostra foi reduzido de 40 – 60 min para 5 – 10 min. No cromatograma pode ser observado claramente a presença do DHA e EPA, os principais marcadores de estado nutricional conhecidos. Espera-se que o coeficiente de correlação conhecido entre a quantidade de DHA em células da mucosa com a acuidade visual possa ser ainda mais expressivo do que os descrito na literatura ate então [112], visto que, na metodologia utilizada nestes trabalhos, era comum a presença de transferências não quantitativas, envolvendo as etapas de TLC e hidrólise, baixa pureza dos picos cromatográficos e pobre relação sinal/ruído especialmente aos compostos DHA e EPA.



**Figura 32.** Cromatograma de lipídios obtidos pelo esfregação de células de mucosa bucal obtido no equipamento GC $\times$ GC-FID. Transesterificação por catálise básica. Introdução e preparo da amostra por SPME (filme de PDMS de 7  $\mu\text{m}$  de espessura). Programação de temperatura: 170  $^{\circ}\text{C}$   $\rightarrow$  3  $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$   $\rightarrow$  240  $^{\circ}\text{C}$  isoterma a 240  $^{\circ}\text{C}$  por 25 minutos. Temperatura do injetor e detector: 270  $^{\circ}\text{C}$ . Vazão do gás de arraste ( $\text{H}_2$ ): 0,6  $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ . Taxa de aquisição: 100 Hz.

De forma geral, ao longo do desenvolvimento deste trabalho pode ser observado que para amostras de origem marinha os PUFA apresentavam como os principais isômeros de posição espécies  $\omega_3$ ,  $\omega_6$  e  $\omega_9$ , sendo ocasionalmente identificado isômeros de  $\omega_1$ . Já amostras de origem animal, e inclusive as células da mucosa bucal, a incidência de isômeros  $\omega_1$  era maior. Já em óleos de origem animal a incidência de isômeros  $\omega_4$ ,  $\omega_7$  e, eventualmente,  $\omega_{11}$  eram mais comuns. Apesar de haver certa dificuldade de se distinguir entre os isômeros  $\omega_4$  do  $\omega_3$ , e  $\omega_6$  do  $\omega_7$ . Com relação às ceras, a incidência de espécies saturadas é mais comum, apesar de terem sido detectados e identificados alguns FAME monoinsaturados. Com relação a presença de ramificações, no óleo de peixe e células de mucosa bucal foi comum observar a presença de ramificações do grupo “*iso*” e “*anteiso*”. Ao passo que em cera foi mais comum a presença de espécies com ramificações no carbono 2 (grupo “*br<sub>2</sub>*”). Além disso, em ceras foi detectada a presença de hidróxi-FAME.

Tabela 5. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS em cera de abelha transesterificada.

#	Identidade	Fórmula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Identificação		LTPRI		
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit	CAS
1	undecanotato de metila	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C11:0	4.80	1.02	851	894	X	-	-	1421	1731-86-8
2	n-hexadecano	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	C16	5.60	0.81	-	-	X	X	1600	1600	629-62-9
3	n-heptadecano	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	C17	7.00	0.87	-	-	X	X	1700	1700	544-76-3
4	tetradecanoato de metila	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C14:0	7.40	1.29	837	842	X	-	1724	1723	124-10-7
5	n-octadecano	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>	C18	8.70	0.93	-	-	X	X	1800	1800	629-78-7
6	pentadecenoato de metila	C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C15:1n-3	9.10	1.50	-	-	-	X	1820	-	-
7	pentadecanoato de metila	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C15:0	9.20	1.41	-	-	-	X	1825	1824	7132-64-1
8	n-nonadecano	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	C19	10.70	0.99	-	-	X	X	1900	1900	593-45-3
9	hexadecanoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C16:0	11.30	1.74	954	953	-	X	1927	1921	112-39-0
10	2-metil-hexadecanoato de metila	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	br <sub>2</sub> -C16:0	11.70	1.80	-	-	-	X	1945	1944	2490-53-1
11	?	-	-	11.70	1.80	-	-	X	-	1945	-	-
12	n-eicosano	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	C20	12.90	1.05	-	-	X	X	2000	2000	629-92-5
13	heptadecanoato de metila	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C17:0	13.60	1.68	-	-	-	X	2029	2030	1731-92-6
14	n-heneicosano	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	C21	15.30	1.14	873	874	-	X	2100	2100	112-95-8
15	9(Z)-octadecenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C18:1 n-9	15.40	1.98	-	-	X	X	2104	2103	112-62-9
16	octadecanoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C18:0	16.10	1.80	844	859	X	-	2132	2128	112-61-8
17	hidroxi-hexadecanoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>3</sub>	OH-C16:0	16.30	4.80	757	790	-	-	2140	-	-
18	18-metil-nonadecanoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	<i>i</i> -C19:0	17.70	1.80	-	-	-	X	2196	2197	1731-94-8
19	n-docosano	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	C22	17.80	1.20	-	-	-	X	2200	2200	629-94-7
20	12-hidroxi-9-octadecenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>3</sub>	12-OH-C18:1	20.20	5.28	899	901	-	-	2296	-	141-24-2
21	n-tricosano	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	C23	20.30	1.29	-	-	-	X	2300	2300	629-97-0
22	9(Z)-docosenoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C20:1 n-9	20.40	2.25	-	-	-	X	2304	-	2390-09
23	eicosanoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	C20:0	21.10	2.10	-	-	-	X	2332	2332	1120-28-1
24	n-tetracosano	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	C24	22.80	1.35	-	-	-	X	2400	2400	646-31-1
25	n-pentacosano	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	C25	25.40	1.56	-	-	-	X	2500	2500	629-99-2

## (continuação da Tabela 5)

#	Identidade	Fórmula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Ferramenta		LTPRI		
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit	CAS
26	docosanoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C22:0	26.40	2.79	848	858	X	X	2589	2530	929-771
27	n-hexacosano	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	C26	28.60	1.80	-	-	-	X	2600	2600	630-01-3
28	tricosanoato de metila	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	C23:0	30.00	3.63	-	-	-	X	2634	2628	2433-97-8
29	n-heptacosano	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	C27	32.70	2.16	-	-	-	X	2700	2700	593-49-7
30	n-heptacosanol	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O	C27-OH	32.70	0.51	-	-	-	X	2700	-	2004-39-9
31	tetracosanoato de metila	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	C24:0	34.30	4.38	-	-	X	X	2730	2731	2442-49-1
32	n-octacosano	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	C28	38.00	2.70	-	-	-	X	2800	2800	630-02-4

Tabela 6. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS em cera de carnaúba amarela transesterificada.

#	Identidade	Formula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Identificação		LTPRI			CAS	T	S
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit				
1	?	-	-	4.50	4.23	-	-	-	-	-	-	-	x	X	
2	undecanotato de metila	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C11:0	4.80	1.05	-	-	X	-	-	1421	1731-86-8	x	X	
3	?	-	-	7.00	4.62	-	-	-	-	-	-	-	x	X	
4	tetradecanoato de metila	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C14:0	7.40	1.29	-	-	X	-	1702	1723	124-10-7	x	X	
5	n-nonadecano	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>	C19	10.70	0.99	-	-	-	X	1900	1900	593-45-3	x	X	
6	hexadecanoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C16:0	11.30	1.62	948	951	X	-	1927	1921	112-39-0	x	X	
7	2-metil-hexadecanoato de metila	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	br <sub>2</sub> -C16:0	11.70	1.80	-	-	-	X	1945	1944	2490-53-1	x	X	
8	n-eicosano	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>	C20	12.90	1.08	901	905	-	X	2000	2000	629-92-5	x	X	
9	n-heneicosano	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>	C21	15.30	1.11	874	877	-	X	2100	2100	112-95-8	x	X	
10	9(Z)-octadecenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C18:1 n-9	15.40	1.92	-	-	X	-	2104	2103	112-62-9	x	X	
11	octadecanoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C18:0	16.00	1.83	895	896	X	-	2128	2128	112-61-8	x	X	
12	?	-	-	16.30	4.53	-	-	-	-	2140	-	-	x	X	
13	n-docosano	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>	C22	17.80	1.20	-	-	-	X	2200	2200	629-94-7	x	X	
14	hidroxi-octadecanoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>3</sub>	OH-C18:0	18.20	5.85	-	-	-	X	2216	-	-	X	X	

## (continuação da Tabela 6)

#	Identidade	Formula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Identificação		LTPRI		CAS
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit	
15	?			20.20	4.89	-	-	-	-	2296	-	-
16	n-tricosano	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>	C23	20.30	1.26	-	-		X	2300	2300	629-97-0
17	eicosanoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	C20:0	21.10	2.19	837	839	X		2332	2332	1120-28-1
18	n-tetracosano	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>	C24	22.80	1.32	-	-		X	2400	2400	646-31-1
19	hidroxi-eicosanoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>3</sub>	OH-C20:0	23.30	6.57	-	-		X	2419	-	-
20	heneicosanoato de metila	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	C21:0	23.60	2.22	-	-		X	2431	2428	6064-90-0
21	n-tetracosanol	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub> O	OH-C24	25.20	3.99	868	868		X	2492	2456	506-51-4
22	n-pentacosano	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>	C25	25.40	1.59	-	-			2500	2500	629-99-2
23	docosanoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C22:0	26.40	3.78	824	826	X		2531	2530	929-771
24	2-metil-docosanoato de metila	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	br <sub>2</sub> -C22:0	26.80	3.45				X	2544	-	-
25	n-hexacosano	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>	C26	28.60	2.07	-	-		X	2600	2600	630-01-3
26	n-pentadocosanol	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> O	OH-C25	32.60	6.36	-	-		X	2698	-	26040-98-2
27	n-heptacosano	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub>	C27	32.70	2.37	-	-		X	2700	2700	593-49-7
28	tetracosanoato de metila	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	C24:0	34.60	5.31	800	801	X		2738	2731	2442-49-1
29	n-octacosano	C <sub>28</sub> H <sub>58</sub>	C28	37.90	2.67	-	-		X	2800	2800	630-02-4
30	pentacosanoato de metila	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	C25:0	40.10	5.40	-	-		X	2834	2823	55373-89-2
31	n-nonacosano	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub>	C29	44.80	3.42	-	-		X	2900	2900	630-03-5
32	hexacosanoato de metila	C <sub>27</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	C26:1	47.10	1.53	-	-		X	2928	-	-
33	hexacosanoato de metila	C <sub>27</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub>	C26:0	47.90	6.54	-	-		X	2937	2934	5802-82-4
34	n-triacontano	C <sub>30</sub> H <sub>62</sub>	C30	53.60	3.96	-	-		X	3000	3000	638-68-6
35	2-metil-heptacosanoato de metila	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	br <sub>2</sub> -C27:0	58.70	6.51	-	-		X	3046		
36	n-hentriacontano	C <sub>31</sub> H <sub>64</sub>	C31	65.40	5.07	-	-		X	3100	3100	630-04-6
37	octacosanoato de metila	C <sub>29</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	C28:1	67.50	3.21	-	-		X	-	-	-
38	octacosanoato de metila	C <sub>29</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub>	C28:0	71.30	2.97	-	-		X	-	3121	55682-92-3

Tabela 7. Compostos identificados com uso de SPME-GC×GC-qMS e óleo de peixe.

#	Identidade	Fórmula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Identificação		LTPRI		CAS
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit.	
1	undecanotato de metila	C <sub>12</sub> H <sub>24</sub> O <sub>2</sub>	C11:0	4.70	1.02	-	-	X	-	1525	1421	1731-86-8
2	tetradecanoato de metila	C <sub>15</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C14:0	7.40	1.26	898	904	X	-	1724	1723	124-10-7
3	13-pentadecenoato de metila	C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C15:1n-3	9.10	1.50	-	-	-	X	1818	-	-
4	pentadecanoato de metila	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C15:0	9.20	1.38	759	797	-	X	1825	1824	7132-64-1
5	8,11,14 - hexadecatrienoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub>	C16:3n-3	10.60	2.25	-	-	-	X	1892	-	-
6	11(Z) - hexadecenoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C16:1n-6 Z	10.90	1.62	899	910	X	-	1911	-	5000-42-5
7	11(E) - hexadecenoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C16:1n-6 E	11.00	1.83	-	-	-	X	1925	-	-
8	hexadecanoato de metila	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C16:0	11.30	1.53	934	936	X	-	1927	1921	112-39-0
9	16-metil-heptadecanoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	<i>i</i> -C17:0	12.60	1.68	-	-	-	X	1983	-	5129-61-3
10	12-heptadecenoato de metila	C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C17:1n-6	13.10	1.77	-	-	-	X	2003	-	-
11	heptadecanoato de metila	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C17:0	13.60	1.62	836	857	-	X	2029	2030	1731-92-6
12	17-metil-octadecanoato de metila	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	<i>i</i> -C18	14.40	1.74	-	-	-	X	2083	-	-
13	7,10,13,16 - octadecatetraenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>30</sub> O <sub>2</sub>	C18:4n-3	15.10	2.55	854	855	X	-	2080	-	-
14	9,12 - octadecadienoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C18:2n-6	15.40	1.89	910	911	X	-	2096	2092	112-63-0
15	12-octadecenoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C18:1n-6	15.50	2.34	-	-	-	X	2103	-	-
16	octadecanoato de metila	C <sub>19</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C18:0	16.00	1.77	842	866	X	-	2132	2128	112-61-8
17	nonadecanoato de metila	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C19:0	18.60	1.86	-	-	-	X	2196	2197	1731-94-8
18	5,8,11,14 - eicosatetraenoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C20:4n-6	19.40	2.76	736	736	-	X	2254	2274	2566-89-4
19	5,8,11,14,17 - eicosapentaenoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	C20:5n-3	19.60	3.15	918	919	X	-	2254	2282	-
20	8,11,14,17 - eicosatetraenoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C20:4n-3	20.10	2.94	818	818	-	X	2258	-	-
21	14 - eicosenoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C20:1n-6	20.40	2.13	-	-	-	X	2310	-	-
22	eicosanoato de metila	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub>	C20:0	21.10	2.01	-	-	X	-	2332	2332	1120-28-1
23	9,12,15,18 - heneicosapentaenoato de metila	C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C21:4n-3	22.20	3.33	754	759	-	X	2379	-	28874-58-0

## (continuação da Tabela 7)

#	Identidade	Fórmula	Símbolo	<sup>1</sup> t <sub>R</sub> /min	<sup>2</sup> t <sub>R</sub> /s	Similaridade		Identificação		LTPRI		CAS
						Match	R. Match	Padrão	Estrut	Exp	Lit.	
24	13,16 - docasadienoato de metila	C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	C21:2n-6	22.90	2.61	-	-	-	X	2397	-	7370-49-2
25	heneicosanoato de metila	C <sub>22</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	C21:0	23.60	2.34	-	-	-	X	2428	2428	6064-90-0
26	4,7,10,13 - docosatetraenoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C22:4n-9	24.10	3.63	-	-	-	X	2451	-	-
27	4,7,10,13,16,19 - docosahexaenoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	C22:6n-3	24.30	4.23	867	867	x	-	2470	2470	2566-90-7
28	7,10,13,16,19 - docosapentaenoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	C22:5n-3	24.70	4.02	-	-	x	-	2458	2426	-
29	13-docosenoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	C22:1n-9	25.50	2.79	-	-	x	-	2500	2507	1120-34-9
30	16-docosenoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub>	C22:1n-6	25.80	2.88	-	-	-	X	2505	-	-
31	docosanoato de metila	C <sub>23</sub> H <sub>46</sub> O <sub>2</sub>	C22:0	26.40	2.85	-	-	-	X	2589	2530	929-771
32	4,7,10,13,16,19 - tetacosahexaenoato de metila	C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	C24:6n-3	32.60	5.79	-	-	-	X	2673	-	-
33	tetracosanoato de metila	C <sub>25</sub> H <sub>50</sub> O <sub>2</sub>	C24:0	33.10	4.38	-	-	x	-	2730	2731	2442-49-1



---

# Capítulo 6: CONCLUSÕES



## 6. Conclusões

Os objetivos propostos no início desse trabalho foram alcançados com sucesso. Ao longo desta pesquisa foi possível otimizar a forma de derivatização para análise de lipídios insaturados em baixa quantidade. De forma a reduzir a manipulação da amostra, o consumo de tempo e prevenindo a formação de artefatos, sendo escolhida a transesterificação por catálise básica. Este processo de transesterificação foi otimizado segundo uma metodologia multivariada de delineamento composto central que permitiu identificar as condições experimentais que proporcionassem o maior rendimento reacional.

A utilização de curvas de eluição para o monitoramento das coordenadas de retenção de PUFA constituíram um recurso inestimável para identificação destes constituintes, se mostrando uma ferramenta poderosa na identificação séries homólogas. Entretanto, é necessário a utilização de padrões analíticos para a construção inicial das estruturas cromatográficas.

A montagem e configuração do modulador criogênico de quatro jatos ao equipamento GC-qMS comercial QP-2010 Plus foi realizado com êxito. Neste protótipo foi necessário modificar determinados módulos do sistema GC×GC, tais como material do sistema de aquecimento e conectores de colunas. Além disso, outras adaptações como o sistema de isolamento térmico e de exaustão adicional no equipamento, foram necessárias. Ao longo do desenvolvimento foi possível substituir o hélio como gás de arraste por hidrogênio devido a suas inúmeras vantagens, sem a introdução de riscos operacionais aos usuários do equipamento. O analisador quadrupolar, modelo 2010 Plus, permitiu uma velocidade de varredura máxima de  $10.000 \text{ Th}\cdot\text{s}^{-1}$  resultando em taxas de aquisição de comumente 25 Hz (intervalo de 343 unidades), 33 Hz (intervalo de 244 unidades) e até 50 Hz (intervalo de 50 unidades). Neste estudo, foi verificado que com uma taxa de digitalização de 33 unidades foi possível a identificação de FAME sem a deformação do espectro de massas. No mercado já se encontram disponíveis equipamentos com analisadores quadrupolares ainda mais rápidos ( $20.000 \text{ Th}\cdot\text{s}^{-1}$ ) permitindo, possivelmente, intervalos de varreduras de 488 unidades a 33 Hz ou de 343 unidades a 50 Hz. Consequentemente a modernização destes analisadores viabilizará o

uso da GC×GC-qMS como uma potencial alternativa aos equipamentos GC×GC-TOFMS.

Finalmente, foi possível desenvolver ao longo deste trabalho uma metodologia rápida e eficiente para análise de lipídios que é adequado tanto a macroconstituintes assim como a microconstituintes. Os constituintes majoritários presentes em cera de abelha e carnaúba foram FAME saturados com comprimento de cadeia par, havendo também a incidência de hidroxil-FAME. Nas amostras de óleo de peixe foram detectados e identificados FAME saturados tanto de cadeia com comprimento par quanto ímpar além de PUFA de predominância  $\omega_3$ . Além disso, foi possível identificar espécies insaturadas de cadeia ímpar, devido ao incremento em sensibilidade, com relação à GC-MS. De forma geral, com o emprego da GC×GC-qMS foi possível detectar e identificar compostos pouco relatados, tais como FAME de comprimento de cadeia ímpar tanto saturados e insaturados. Além disso, foi possível observar novos padrões de eluição para FAME com ramificações, principalmente do grupo  $br_2$ ,  $i$ -,  $ai$ -FAME.

No âmbito dos microconstituintes, esta metodologia foi aplicada em segmentos da lipidômica com sucesso. Com a combinação da GC×GC com SPME foi possível simplificar a metodologia utilizada para análise de células de bochecha, eliminando etapas tais como separação em placas preparativas e processos de extração líquido-líquido. Em geral o método apresentou um incremento na detectabilidade e sensibilidade possibilitando a detecção e identificação de diversos FAME e PUFA, além do DHA e EPA. Conseqüentemente existe uma possibilidade de que estes demais analitos venham a ser novos marcadores para se avaliar o estado nutricional de recém-nascidos e de sua acuidade visual. Atualmente esta nova metodologia vem sendo aprimorada, e mais estudos a cerca de sua seletividade vem sendo realizadas.

Capítulo 7:  
REFERÊNCIAS  
BIBLIOGRÁFICAS



## 7. Referências bibliográficas

- [1] D. L. Nelson, M. M. Cox, *Lehninger Principles of Biochemistry*, W H Freeman & Co, 2004, 4th ed., 343.
- [2] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadroz-Rodríguez, *Trends in Anal. Chem.* 3 (2009) 263.
- [3] I. Bruheim, *LC GC Europe* 22 (2009).
- [4] L. Campanella, F. Chicco, M. Colapietro, T. Gatta, E. Gregori, M. Panfili, M. V. Russo, *Annali di Chimica* 95 (2005).
- [5] M. Regert, J. Langlois, S. Colinart, *J. Chromatogr. A* 1091 (2005) 124.
- [6] J. Peris-Vincente, J. V. G. Adelantado, M. T. D. Carbó, R. M. Castro, F. B. Reig, *J. Chromatogr. A* 1101 (2006) 254.
- [7] National Research Council (USA). Committee on Diet and Health. *Diet and Health: implications for reducing chronic disease risk*. Washington, National Press, 1989.
- [8] S. U. Kadam, P. Prabshasankar, *Food Research International* 43 (2010) 1975.
- [9] W. Verbeke, *Food Quality and Preference* 16 (2005) 45.
- [10] B. Koletzko, B. Knoppke, U. Von Schenck, H. Demmelmair, A. Damli, *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 29 (1999) 467.
- [11] T. U. Sauerwald, D. L. Hachey, C. L. Jensen, H. Chen, R. E. Anderson, W. C. Heird, *Pediatr. Res.* 41 (1997) 183.
- [12] B. Holub (editor) DHA EPA Omega 3 Institute – University of Ghelpe (acessado em 15/04/2011).
- [13] E. E. Birch, D. Hoffman, R. D. Uauy, D. R. Birch, C. Presidge, *Pediatr. Res.* 44 (1998) 201.
- [14] Chow, C. K., *Fatty acids in foods and their health implications*, Marcel Dekker, New York, 2000.
- [15] Guerra, A., Demmelnair, H., Toschke, A. M., Koletzko, B., *Ann. Nutr. Metab.* 2007, 51, 433-438.
- [16] X. Han, *J. Chromatog. B* 877 (2009) 2663.
- [17] D. Armstrong, *Lipidomics Volume 1: Methods and Protocols*, Humana Press, 2009, New York.
- [18] P. Guesnet, J. Alessandri, *Biochimie* 93 (2011) 7.
- [19] J. M. Castro-Perez, J. Kamphorst, J. DeGroot, F. Labefer, J. Goshawk, K. Yu, J. Shockcor, R. J. Vreeken, T. Hankemeter, *Journal of Proteome Research* 9 (2010) 2377.
- [20] X. Han, *Journal of Neurochemistry* 103 (2007) 171.
- [21] X. Han, *Biochimica et Biophysica Acta* 1801 (2010) 774.
- [22] K. Ekroos, M. Jänis, K. Tarasov, R. Hurne, R. Laaksonen, *Curr. Atheroscler. Rep.* DOI 10.1007/s11883-010-0110-y.
- [23] M. W. Buczynski, D. S. Dumlao, E. A. Dennis, *Journal of Lipid Research* 50 (2009) 1015.

- [24] S. L. Connor, N. Zhu, G. J. Anderson, D. Hamill, E. Jaffe, J. Carlson, W. Connor, *Am. J. Clin. Nutr.* 71 (2000) 21.
- [25] J. Miller, D. R. Landes, *J. Agric. Food Chem.* 24 (1976) 499.
- [26] A. Carrasco-Pancorbo, N. Navas-Iglesias, L. Cuadroz-Rodríguez, *Trends in Anal. Chem.* 4 (2009) 393.
- [27] K. Eder, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 113.
- [28] W. W. Christie, *Lipid Analysis: Isolation, Separation, Identification and Structural Analysis of Lipids*, 3rd edition, The Oily Press, Bridgewater (2003).
- [29] Z. Liu, J. B. Phillips *J. Chromatogr. Sci.* 29 (1991) 227.
- [30] J. C. Giddings, *Anal. Chem.* 56 (1984) 1258A.
- [31] J. Dallüge, L. L. P. van Stee, X. Xu, J. Williams, J. Beens, R. J. J. Vreuls, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 974 (2002) 169.
- [32] P. Koritár, H. G. Janssen, E. Matisová, U. A. Th. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 21 (2002) 558.
- [33] J. Dallüge, J. Beens, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1000 (2003) 69.
- [34] QP2010 Ultra: Instrument Specifications C146-E134 Shimadzu, Kyoto.
- [35] L. Mondello, A. Casilli, P. Q. Tranchida, M. Lo Presti, P. Dugo, G. Dugo, *Anal. Bioanal. Chem.* 389 (2007) 155.
- [36] W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, First edition, The Oily Press, BridgeWater (1990).
- [37] T. Řezanka, K. Sigler, *Progress in Lipid Research* 48 (2009) 206.
- [38] C. Göbel, I. Feussner, *Phytochemistry* 70 (2009) 1485.
- [39] A. Asperger, W. Engewald, G. Fabian, *Journal of Analytical and Applied Pyrolysis* 52 (1999) 51.
- [40] W. W. Christie, *Gas Chromatography and Lipids*, The Oily Press LTD, First Edition, 1989.
- [41] K. Eder, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 113.
- [42] W. R. Morrison, L. M. Smith, *J. Lipid Res.* 5 (1964) 600.
- [43] M. D. Laryea, P. Cieslicki, E. Diekmann, U. Wendel, *Clinica Chimica Acta* 171 (1988) 11.
- [44] K. Eder, A. M. Reichlmayr-Lais, M. Kirchgessner, *J. Chromatogr.* 607 (1992) 55.
- [45] L. R. Alexander, J. B. Justice Jr., J. Madden, *J. Chromatogr.* 342 (1985) 1.
- [46] J. Bitman, *J. Am. Oil Chem.* 64 (1987) 637.
- [47] R. Segura, *J. Chromatogr.* 441 (1988) 99.
- [48] C. D. Bannon, G. J. Breen, J. D. Craske, N. T. Hai, N. L. Harper, K. L. O'Rourke, *J. Chromatogr.* 247 (1982) 71.
- [49] W. Stoffel, F. Chu, E. H. Ahrens Jr., *Anal. Chem.* 31 (1959) 307.
- [50] K. Ichihara, C. Yamaguchi, Y. Araya, A. Sakamoto, K. Yoneda, *Lipids* 45 (2010) 367.
- [51] L. D. Metcalfe, C. N. Wang, *J. Chromatogr. Sci.* 19 (1981) 530.
- [52] R. Misir, B. Laarveld, R. Blair, *J. Chromatogr.* 331 (1985) 141.
- [53] J. B. Brown, W. C. Ault, *J. boil. Chem.* 89 (1930) 167.

- [54] F. A. Carey, R. C. Atkins, *Organic Chemistry*, MacGraw-Hill Company, 5 ed. 2004.
- [55] R.L. Wolff, *J. Chromatogr. Sci.* 30 (1992) 17.
- [56] J. J. Myher, A. Kuksis, *J. Chromatogr. B* 671 (1995) 3.
- [57] S. de Koning, H. Janssen, U. A. T. Brinkman, *LCGC Europe* 19 (2006).
- [58] P. Q. Tranchida, P. Donato, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *Trends Anal. Chem.* 26 (2007) 191.
- [59] J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 75 (2003) 2543.
- [60] J. Pawliszyn, *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice* Wiley-VCH, First Edition, 1997.
- [61] T. Mikuma, T. Kaneko, *Forensic Science International* 198 (2010) 79.
- [62] J. N. Butler, *Ionic Equilibrium: A Mathematical Approach*, Addison-Wesley Publish Company, 1964.
- [63] T. Gorécki, J. Pawliszyn, *Analyst* 124 (1999) 643.
- [64] A. L. P. Valente, F. Augusto, *Química Nova* 23 (2000) 523.
- [65] M. P. Pedroso, L. A. F. Godoy, C. H. V. Fidélis, E. C. Ferreira, R. J. Poppi, F. Augusto, *Química Nova* 32 (2009) 421.
- [66] J. B. Phillips, J. Beens *J Chromatogr. A* 856 (1999) 331.
- [67] C. A. Brukner, B. J. Prazen, R. E. Synovec, *Anal. Chem.* 70 (1998) 2796.
- [68] P. J. Marriot, R. M. Kinghorn, *Anal. Chem.* 69 (1997) 2582.
- [69] R. M. Kinghorn, P. J. Marriot, *J. High Resol. Chromatogr.* 21 (1998) 620.
- [70] E. B. Ledford, C. Billesbach, *J. High Resol. Chromatogr.* 23 (2000) 202.
- [71] J. Beens, M. Adahclour, R. J. J. Vreuls, K. van Altena, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 127.
- [72] M. Pursch, P. Eckerle, J. Biel, R. Streck, H. Cortes, K. Sun, B. Winniford, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 43.
- [73] Z. Liu, D. G. Patterson Jr., M. L. Lee *Anal. Chem.* 67 (1995) 3840.
- [74] M. Gray, G. R. Dennis, P. Wormell, R. A. Shalliker, P. Slonecker *J. Chromatogr. A* 975 (2002) 285.
- [75] P. J. Slonecker, X. Li, T. H. Ridgway, J. G. Dorsey *Anal. Chem.* 68 (1996) 682.
- [76] J. C. Giddings *J. Chromatogr. A* 703 (1995) 3.
- [77] J. B. Phillips, C. J. Venkatramani, *J. Microcol. Sep.* 5 (1993) 511.
- [78] D. Ryan, P. Morrison, P. Marriott *J. Chromatogr. A* 1071 (2005) 47.
- [79] H. de Geus, I. Aidos, J. de Boer, J. B. Luten, U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 910 (2001) 95.
- [80] P. Q. Tranchida, R. Costa, P. Donato, D. Sciarrone, C. Ragonese, P. Dugo, G. Dugo, L. Mondello, *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 3347.
- [81] W. Bertsch, *J. High Resolut. Chromatogr.* 22 (1999) 647.
- [82] M. Adahchour, J. Beens, R. J. J. Vreuls, U. A. T. Brinkman, *Trends Anal. Chem.* 25 (2006) 540.
- [83] H. M. Macnair, J. M. Miller, *Basic Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Second editions, 2009, 109.
- [84] R. Shellie, L. Mondello, P. Marriott, G. Dugo, *J. Chromatogr. A* 970 (2002) 225.

- [85] R. Shellie, P. Marriott, P. Morrison, *Anal. Chem.* 73 (2001) 1336.
- [86] J. Dallüge, R. J. J. Vreuls, J. Beens, U. A. T. Brinkman, *J. Sep. Sci.* 25 (2002) 201.
- [87] G. S. Frysinger, R. B. Gaines, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 251.
- [88] R. A. Shellie, P. J. Marriott, *Analyst* 128 (2003) 879.
- [89] R. A. Shellie, P. J. Marriott, C. W. Huie, *J. Sep. Sci.* 26 2003.
- [90] E. Hoffman, V. Stroobant, *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, John Wiley & Sons, Third Edition, 2007, 95.
- [91] C. Debonneville, A. Chaintreau, *J. Chromatogr. A* 1027 (2004) 109.
- [92] S. M. Song, P. Marriott, P. Wynne, *J. Chromatogr. A* 1058 (2004) 223.
- [93] M. Adahclour, M. Brandt, H. Baier, R. J. J. Vreuls, A. M. Batenburg, U. A. T. Brinkman, *J. Chromatogr. A* 1067 (2005) 245.
- [94] C. H. V. Fidélis, Desenvolvimento de um sistema de cromatografia gasosa bidimensional compreensiva, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2008.
- [95] M. P. Pedroso, Projeto e avaliação de um modulador criogênico para cromatografia gasosa bidimensional abrangente, Tese de Doutorado, UNICAMP, 2009.
- [96] E. C. Ferreira, Softwares para cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC), Tese de Doutorado, 2010.
- [97] J. C. Miller, J. N. Miller, *Statistics for Analytical Chemistry*, Ellis Horwood Series, Second Edition, 1988.
- [98] J. V. Hinshaw, *LCGC Asia Pacific* 05 (2002).
- [99] J. Harynuk, T. Gorécki, *J. Chromatogr. A* 1086 (2005) 135.
- [100] J. V. Hinshaw, *LCGC Europe* February (2003).
- [101] L. Mondello, A. Casilli, P. Q. Tranchida, P. Dugo, G. Dugo, *J. Chromatogr. A* 1019 (2003) 187.
- [102] H. van den Dool, P. D. Kratz, *J. Chromatogr.* 11 (1963) 463.
- [103] R. L. Grob, E. F. Barry, *Modern Practice of Gas Chromatography*, John Wiley & Sons, Fourth edition, 2004.
- [104] N. W. Davies, *J. Chromatogr.* 503 (1990) 1.
- [105] R. Shellie, P. Marriott, G. Zappia, L. Mondello, G. Dugo, *J. Essent. Oil Res.* 15 (2003) 305.
- [106] M. M. Jenderek, D. A. Dierig, T. A. Osbell, *Industrial Crops and Products* 29 (2009) 154.
- [107] K. Yamamoto, A. Kinoshita, A. Shibaraha, *Lipids* 43 (2008) 457.
- [108] C. Franzmann, J. Wächter, N. Dittmer, H. Humpf, *J. Agric. Food Chem.* 58 (2010) 4223.
- [109] S. A. Siddigi, L. Z. Mistra, *Naturforschung C* 55 (2000) 843.
- [110] D. L. Chance, K. O. Gerhalt, T. P. Mawhinney, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 91.
- [111] R. O. Adlof em: R. E. McDonald, M. M. Mossoba, *New Techniques and Applications in Lipid Analysis*, AOAC Press, Champaign, 1997.
- [112] D. R. Hoffman, E. E. Birch, D. G. Birch, R. Uauy, *Lipids* 34 (1999) 337.

# Capítulo 8:

# ANEXOS

## 8. Anexo I: Tabela com Índices de Retenção (LTPRI) para identificação de lipídios

Na análise de lipídios por cromatografia gasosa existem três principais ferramentas qualitativas: o índice de retenção (índice de Kovats, para análises em isoterma, e índice de van den Dool e Kratz, para programação linear de temperatura), comprimento equivalente de cadeia e tempo de retenção relativo. Apesar do índice de retenção ser amplamente utilizado por usuários da cromatografia gasosa, o seu uso em análise de lipídios ainda é limitado [40]. O uso de um análogo ao índice de retenção seria o comprimento equivalente de cadeia (ECL, do inglês “equivalent chain-lengths”), no qual o “índice de retenção” é medido com relação a uma série ácidos graxo livres, ao invés de uma série de hidrocarbonetos. E uma segunda vertente é o tempo de retenção relativo ao éster metílico do ácido graxo C18:0 ( $r_{18:0}$ ). Entretanto, o  $r_{18:0}$  quando utilizado para identificar analitos em condições cromatográfica muito diferentes deve apresentar um desvio maior do que o LTPRI e ECL. Com o objetivo de disponibilizar e integrar estas formas de identificação foi construída a Tabela 8, na qual está disponível o índice de retenção e o tempo de retenção relativo para os analitos identificados e para os padrões utilizados ao longo deste trabalho.

Tabela 8. Tempo de retenção relativo ( $r_{18:0}$ ) e LTPRI dos FAME encontrados e utilizados ao longo deste trabalho.

Símbolo	LTPRI	$R_{18:0}$	Símbolo	LTPRI	$R_{18:0}$	Símbolo	LTPRI	$R_{18:0}$
<b>C10:0</b>	1340	0.1868	<b>C18:1n-9</b>	2100	0.9639	<b>OH-C20:0</b>	2419	1.4563
<b>C11:0</b>	1525	0.2892	<b>C18:1n-6</b>	2103	0.9688	<b>C21:0</b>	2428	1.4699
<b>C14:0</b>	1722	0.4578	<b>C18:1n-7</b>	2104	0.9699	<b>C22:5n-9</b>	2438	1.4880
<b>ai-C15:0</b>	1767	0.5060	<b>C18:0</b>	2124	1.0000	<b>C22:6n-3</b>	2445	1.5000
<b>i-C15:0</b>	1783	0.5241	<b>OH-C16:0</b>	2140	1.0124	<b>C22:4n-9</b>	2451	1.5121
<b>C15:1n-3</b>	1818	0.5688	<b>C19:5n-3</b>	2164	1.0602	<b>C22:5n-3</b>	2458	1.5241
<b>C15:0</b>	1824	0.5723	<b>ai-C19:0</b>	2172	1.0723	<b>C22:6n-3</b>	2470	1.5188
<b>i-C16:0</b>	1886	0.6506	<b>C19:0</b>	2196	1.0994	<b>C22:6n-1</b>	2474	1.5542
<b>C16:4n-3</b>	1886	0.6506	<b>OH-C18:0</b>	2216	1.1375	<b>C22:4n-3</b>	2478	1.5602

## (continuação da Tabela 8)

Símbolo	LTPRI	R <sub>18:0</sub>	Símbolo	LTPRI	R <sub>18:0</sub>	Símbolo	LTPRI	R <sub>18:0</sub>
C16:2n-6 Z	1890	0.6566	C19:0	2227	1.1566	C22:1n-11	2478	1.5602
C16:2n-6 E	1890	0.6566	C20:5n-3	2254	1.1988	C22:1n-9	2500	1.6024
C16:3n-3	1892	0.6625	C20:4n-6	2254	1.1988	C22:1n-6	2505	1.6125
C16:1n-6	1904	0.6747	C20:3n-9	2254	1.1988	C22:0	2526	1.6566
C16:0	1925	0.7048	C20:4n-6	2254	1.2125	br <sub>2</sub> -C22:0	2544	1.6750
br <sub>2</sub> -C16:0	1945	0.7267	C20:5n-3	2254	1.2250	C22:0	2589	1.6398
ai-C17:0	1971	0.7711	C20:4n-3	2258	1.2563	C23:0	2634	1.8634
i-C17:0	1983	0.7892	C20:3n-6	2273	1.2289	C24:6n-3	2673	2.0375
C17:3n-3	1983	0.7892	C20:4n-3	2277	1.2349	OH-C25	2698	2.0375
C17:2n-6	2000	0.8133	C20:2n-9	2281	1.2410	C24:1n-9 E	2702	2.1145
C17:0	2020	0.8434	C20:5n-1	2285	1.2470	C24:1n-9 Z	2703	2.1205
ai-C18:0	2068	0.9157	12-OH-C18:1	2296	1.2547	C24:0	2729	2.2108
C18:3n-6	2072	0.9217	C20:1 n-9	2304	1.2671	C25:0	2834	2.5063
C18:4n-3	2080	0.9438	C20:1n-6	2310	1.2750	C26:1	2928	2.9438
C18:4n-3	2080	0.9337	C20:0	2328	1.3133	C26:0	2937	2.9938
i-C18	2083	0.9000	C21:5n-3	2364	1.3675	br <sub>2</sub> -C27:0	3046	3.6688
C18:2n-6	2096	0.9625	ai-C21:0	2372	1.3795	C28:1	-	4.2188
C18:2n-6 E	2096	0.9578	i-C21:0	2376	1.3855	C28:0	-	4.4563
C18:2n-6 Z	2100	0.9639	C21:4n-3	2379	1.3875	-	-	-
C18:3n-3	2100	0.9639	C21:2n-6	2397	1.4313	-	-	-

## 9. Anexo II: Injeção Splitless

A vantagem de se realizar análises utilizando o injetor do GC no modo splitless é o fato de aumentar a detectabilidade dos compostos minoritários, já que estes podem ser importantes para o desenvolvimento de protocolos de certificação de cera ou identificação de metabólitos importantes em estudos lipidômicos. No entanto, quando tal modo é empregado, observa-se um maior alargamento dos picos cromatográficos devido, dentre outros fatores, a velocidade de transferência do *plug* de vapor para a coluna capilar. Tipicamente são utilizados volumes de injeção da ordem de 1  $\mu\text{L}$ , e quando vaporizados a transferência do *plug* de vapor chega a levar algumas centenas de milisegundos. O uso de *retention gap* é uma forma de eliminar tal fenômeno de alargamento de banda. O *plug* de vapor depois de introduzido no *retention gap* irá condensar, uma vez que o forno do GC estará operando a uma temperatura de cerca de 25 °C abaixo da temperatura de ebulição do solvente. Então no capilar desativado o solvente irá formar um filme homogêneo sobre a parede interna do mesmo, atuando como uma pseudo fase estacionária retendo os analitos nele dissolvidos. Este filme espesso de solvente irá diminuir a razão entre o volume de fase móvel e fase estacionária ( $\beta$ ), levando a um aumento do coeficiente de partição. À medida que o gás de arraste passa sobre o filme, o solvente é evaporado enquanto a fração líquida remanescente é arrastada no mesmo sentido do fluxo. No momento em que quase todo solvente é evaporado os analitos estarão retidos no início da fase estacionária na forma de um *plug* muito estreito. A partir de então é dado início ao aquecimento do forno.

Referência:

[113] K. J. Hyver, P. Sandra, *High Resolution Gas Chromatography*, Hewlett-Packard, Third Edition 1989.