



UNICAMP

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE QUÍMICA**



 IQ
T/UNICAMP OL4e

TESE DE DOUTORADO

**Estudos preliminares e aplicações de
microextração em fase sólida (SPME) combinada
com cromatografia gasosa com detecção por
emissão atômica**

Ana Maria de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

**Campinas
Março de 2005**

UNIDADE	I. Q.	
Nº CHAMADA	T/UNICAMP	
	OL4e	
V	EX	
TOMBO BC/	65420	
PROC.	16-86-05	
C	☐	D ☒
PREÇO	11.00	
DATA	24-8-05	
Nº CPD	-	

Bib. id. 361728

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

OL4e

Oliveira, Ana Maria de.

Estudos preliminares e aplicações de microextração em fase sólida (SPME) combinada com cromatografia gasosa com detecção por emissão atômica. / Ana Maria de Oliveira. — Campinas, SP: [s.n], 2005.

Orientador: Fabio Augusto.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química.

1. Alquilpirazinas. 2. Organomercúricos.
3. SPME. 4. GC-AED. I. Augusto, Fábio.
II. Universidade Estadual de Campinas. III. Título.

Paciência e perseverança têm o efeito mágico de fazer as dificuldades desaparecerem e os obstáculos sumirem. (John Quincy Adams)

**Ao meu pai (*in memoriam*), a minha mãe e irmãos
Antônio, Carlos e Jorge pelo amor, compreensão e força.**

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual de Campinas, em especial ao Instituto de Química pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa.

Aos Profs. Antônio Luiz Pires Valente (*in memoriam*) e Fabio Augusto pela orientação, amizade, confiança e grandes ensinamentos.

Aos amigos do Laboratório de Cromatografia Gasosa: Gláucia, Raquel, Ernesto, Carlos, Gago, Sandra Rivellino, Sandra Zambello e Ana Cláudia pela boa convivência, risadas e amizade e em especial ao Alexandre, Rogério, Ana Lúcia e Gilmare.

Aos amigos Nilva, Raquel, Anísio e Alex pelo carinho e amizade.

Aos amigos do LabChrom que sempre nos socorreram nas maiores necessidades.

Aos funcionários das oficinas, vidraria, almoxarifado, troca de gases, GC-MS, que ajudaram de alguma forma na execução deste trabalho.

A toda minha família, em especial a minha mãe e irmãos pela compreensão, força, exemplo de vida e amor.

Ao meu pai e à minha vó Ana (*in memoriam*) que mesmo não estando mais presentes fisicamente, estão sempre ao meu lado me abençoando.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Curriculum Vitae

I – FORMAÇÃO ACADÊMICA

- **Mestrado em Agroquímica** - Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa – MG, 1996-1998.

Título : “Estudo do comportamento da formulação dissulfoton + triadimenol em solos, folhas e frutos do cafeeiro”. Orientadora: Profa. Dra. Maria Elina Lopes Ribeiro de Queiroz.

- **Bacharelado e Licenciatura em Química** - Universidade Federal de Viçosa (UFV) – Viçosa – MG, 1992-1996

II - INICIAÇÃO CIENTÍFICA

- **Iniciação Científica no Programa Institucional Convênio CNPq/UFV**

Departamento de Química (UFV), Viçosa – MG, 08/1994 a 07/1996.

III- ATIVIDADES DIDÁTICAS

- **Visita técnica no Laboratório de Toxicologia da EFOA/CEUPE**, referente ao projeto PQI/CAPES/2003, nº 00069/035 (Análise Química de Fármacos”) Escola de Farmácia e Odontologia de Alfenas (EFOA) - Alfenas – MG, 09/2004.

- **Monitora nível II no Programa de Incentivo à Docência na disciplina Química Analítica Instrumental Experimental**. Departamento de Química Analítica – UNICAMP, Campinas – SP, 08/2004 a 01/2005.

- **Monitora nível II no Programa de Incentivo à Docência na disciplina Química Analítica Qualitativa**. Departamento de Química Analítica – UNICAMP, Campinas – SP, 03/2003 a 07/2003.

- **Tutora no Programa de Treinamento para a Docência na disciplina Laboratório de Química Analítica Aplicada**. Departamento de Química – UFV, Viçosa – MG, 08/1997 a 10/1997.

IV – ATIVIDADES PROFISSIONAIS

- **Professora de química** nas escolas “Aplicação da FUPAC”, Fênix vestibulares e Escola Estadual “Professor Soares Ferreira”, Barbacena – MG, 03/1999 a 12/2000.
- **Estágio no Laboratório Central da Companhia Vale do Rio Doce**. Itabira – MG, 01/1996 a 02/1996.

V - RESUMOS PUBLICADOS EM CONGRESSOS

- **Nacionais:** 12
- **Internacionais:** 4

VI – ARTIGOS

- Oliveira, A M.; Pereira, N.R.; Marsaioli Jr., A.; Augusto, F. Studies on the aroma of cocoa and cupuassu products using SPME combined to GC-MS and GC-AED, J. Chromatogr. A 1025 (2004), 115.
- Costa, J.G., Oliveira, A.M., Augusto, F. Durrant, L.R. Noncometabolic PCB biodegradation: Does it occur in nature? In Situ and On-Site Bioremediation (7th International Symposium) (Orlando, FL; June 2003) ISBN 1-57477-139-6, published by Batelle Press, Columbus, OH, www.batelle.org/bookstore.

RESUMO

Estudos Preliminares e Aplicações de Microextração em Fase Sólida (SPME) Combinada com Cromatografia Gasosa com Detecção por Emissão Atômica

Autora: Ana Maria de Oliveira

Orientador: Prof. Dr. Fabio Augusto

Microextração em Fase Sólida (SPME) acoplada à Cromatografia Gasosa com Detecção por Emissão Atômica (GC-AED) foi utilizada em determinações de alquilpirazinas e organomercúricos. Estudos preliminares com o sistema GC-AED mostraram a necessidade de otimização de parâmetros como pressão da cavidade do plasma, do hélio de sustentação do plasma e dos gases reagentes para cada conjunto de elementos monitorados. O uso deste sistema possibilitou a utilização da calibração independente de composto para a quantificação de alguns analitos nitrogenados. Após estudos preliminares com o sistema GC-AED, ele foi usado para análises de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu e de organomercúricos. Nas análises de amostras de líquido de cupuaçu o sistema GC-AED foi usado para a identificação de compostos voláteis, juntamente com GC-MS, otimização de metodologia para extração de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu e quantificação destes analitos em amostras submetidas a diferentes tratamentos térmicos. O sistema GC-AED foi utilizado também na análise de organomercúricos. A otimização das análises destes compostos foi dividida em duas etapas. Primeiramente foram otimizados parâmetros relacionados à extração por SPME utilizando compostos de mercúrio neutros. Em seguida foram otimizados parâmetros relativos à derivatização de compostos iônicos de mercúrio com tetraalquilboratos de sódio. Estas otimizações mostraram que a derivatização com tetraetilborato de sódio e extração através do *headspace* com a fibra DVB é apropriada à determinação de metilmercúrio e etilmercúrio. Já a derivatização com tetrafenilborato de sódio e extração direta com a fibra P100 é indicada para a análise simultânea de etilmercúrio, metilmercúrio e mercúrio inorgânico.

ABSTRACT

Studies and Application of Solid Phase Microextraction (SPME) combined to Gas Chromatography with Atomic Emission Detection

Author: Ana Maria de Oliveira

Supervisor: Prof. Dr. Fabio Augusto

Solid Phase Microextraction (SPME) coupled to Gas Chromatography with Atomic Emission Detection (GC-AED) was used in determination of alkyldiazines and organomercurials. In the preliminary studies with the GC-AED system several modifications were performed in the commercial device, which showed the need for optimization of operational parameters such as pressure in the plasma cavity, pressure of make-up helium and reactive gases individually for each set of monitored elements. Atomic emission detection allowed the use of compound-independent calibration for several nitrogen compounds. With analysis of cupuassu liquor using GC-MS and GC-AED it was possible to identify the constituents of these samples. The optimization of a methodology for extraction of alkyldiazines in cupuassu liquor allowed analysis of samples submitted to different thermal treatments. The results of these analyses presented contents on alkyldiazines higher than those found in other different samples. The optimization of the analysis of organomercurials was divided in two steps. First, parameters related to SPME procedure were optimized using neutral mercury compounds. The second step was the optimization of operational parameters for derivatization of ionic mercury compounds with sodium alkylborates. This optimization showed that derivatization with sodium tetraethylborate followed by headspace extraction with DVB fiber is adequate to determination of methyl- and ethylmercury. Derivatization with sodium tetraphenylborate followed by headspace extraction followed by direct extraction with P100 fiber is recommended for simultaneous analysis of ethylmercury, methylmercury and inorganic mercury.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

23 DMP – 2,3-dimetilpirazina

25 DMP – 2,5-dimetilpirazina

26 DMP – 2,6-dimetilpirazina

a – inclinação ou coeficiente angular da curva analítica

AAS – Espectrometria de Absorção Atômica (*Atomic Absorption Spectrometry*)

ACN – acetonitrila

AED – Detector por Emissão Atômica (*Atomic Emission Detector*)

AFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica (*Atomic Fluorescence Spectrometry*)

B – benzeno

b – intercepto ou coeficiente linear da curva analítica

C₈-C₁₈ – octano a octadecano

CAR – Carboxen-polidimetilsiloxano

CIC – Calibração Independente de Composto (*Compound Independent Calibration*)

Cl NB – cloro-nitrobenzeno

ClB – clorobenzeno

CVAAS – Espectrometria de Absorção Atômica com Vapor Frio (*Cold Vapour Atomic Absorption Spectrometry*)

CVAFS – Espectrometria de Fluorescência Atômica com Vapor Frio (*Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry*)

d_f – diâmetro da fase estacionária

DHS – *headspace* dinâmico (*Dinamic Headspace*)

d_i – diâmetro interno

DVB – Divinilbenzeno-polidimetilsiloxano

E – etilbenzeno

ECD – Detector por Captura de Elétrons (*Electron Capture Detector*)

Et – etil

EtP – etilpirazina

FAPES – Espectrometria de Emissão em Plasma com Atomização Eletrotérmica (*Furnace Atomization Plasma Emission Spectrometry*)

F_{He} – vazão *make-up* hélio

FID – Detector por Ionização em Chama (*Flame Ionization Detector*)

GC – Cromatografia a Gás (*Gas Chromatography*)

HS – espaço confinante (*Headspace*)

ICP – Plasma Indutivamente Acoplado (*Inductively Coupled Plasma*)

ITMS – Espectrometria de massas com trapeamento de íons (*Ion Trap Mass Spectrometry*)

LD – limite de detecção

Me – metil

MIP – Plasma Induzido por Microondas (*Microwave Induced Plasma*)

MP – metilpirazina

MS – Espectrometria de Massas (*Mass Spectrometry*)

NB – nitrobenzeno

NNDMA – N,N-dimetilanilina

NPD – Detector de Fósforo e Nitrogênio (*Nitrogen Phosphorus Detector*)

P100 – PDMS 100 µm

PACR – poliacrilato

PDMS – polidimetilsiloxano

Ph – fenil

P_{H2} – pressão de H₂

PIR – pirazina

P_{O2} – pressão de O₂

PRD – piridina

r – correlação

SDE – Extração e Destilação Simultâneas (*Simultaneous Distillation Extraction*)

SHS – *headspace* estático (*Static Headspace*)

SPME – Microextração em Fase Sólida (*Solid Phase Microextraction*)

T – tolueno

T_{cav} – temperatura da cavidade do plasma

TetMP – tetrametilpirazina

T_{LT} – temperatura da linha de transferência

TriMP – 2,3,5-trimetilpirazina

TXRF - Fluorescência de Raio-X com Refletância Total (*Total X-Ray Reflectance Fluorescence*)

UV-VIS – ultravioleta-visível

X – o-xileno

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Diagrama de blocos do sistema GC-AED. Onde. 1: Cromatógrafo a gás, 2: linha de transferência, 3: cavidade ressonante, 4: fonte de microondas, 5: monocromador, 6: arranjo de diodos e 7: registro do sinal. 6
- Figura 2: Detector por emissão atômica disponível comercialmente. Onde A: linha de transferência, B: cavidade ressonante, C: fonte de microondas, D: espectrômetro ótico e E: arranjo de diodos [26]..... 8
- Figura 3: Detalhes do detector por emissão atômica. (a) entrada de gases e (b) cela de detecção com anilha de vespel [26]. 19
- Figura 4: Variação da resposta do detector por emissão atômica com a mudança da pressão do hélio de sustentação do plasma. (a) banda de emissão do C (193 nm), (b) banda de emissão do H (486 nm) e (c) banda de emissão do Cl (479 nm). Onde: ■: benzeno, ●: tolueno, ▽: clorobenzeno, △: etilbenzeno e ◆: o-xileno..... 20
- Figura 5: Variação da resposta do detector por emissão atômica em função da pressão da cavidade do plasma. (a) banda de emissão do C (193 nm), (b) banda de emissão do H (486 nm) e (c) banda de emissão do Cl (479 nm). Onde: ■: benzeno, ●: tolueno, ▽: clorobenzeno, △: etilbenzeno e ◆: o-xileno..... 22
- Figura 6: Variação da resposta do detector por emissão atômica dos compostos na banda de emissão do carbono com a alteração da pressão dos gases reagentes, oxigênio e hidrogênio. Onde: B: Benzeno, T: tolueno, ClB: clorobenzeno, E: etilbenzeno e X: o-xileno..... 23
- Figura 7: Variação da resposta com a alteração da pressão do gás reagente oxigênio. (a) banda de emissão do H (486 nm) e (b) banda de emissão do Cl (479 nm)..... 25

Figura 8: Estruturas de algumas alquilpirazinas.....	33
Figura 9: Rota de formação da 2,5-dimetilpirazina e da tetrametilpirazina [67].	34
Figura 10: Dispositivo Likens-Nickerson usado para extração e destilação simultâneas [77]. Onde: 1: frasco de amostra, 2: frasco com solvente, 3: coleta do extrato, 4: corpo do destilador, 5: entrada de água e 6: saída de água.....	39
Figura 11: Fibra (a) e aplicador (<i>holder</i>) (b) utilizados para a extração por SPME.....	41
Figura 12: Cromatogramas obtidos após extração de líquido de cupuaçu por (a) HS-SPME-GC-ITMS e (b) GC-AED com fibra CAR. Identificação dos picos: (1) dimetilsulfeto, (2) ácido acético, (3) 3-metilbutanal, (4) 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano, (5) dimetildissulfeto, (6) butirato de etila, (7) 3,5-dimetil-3-hexanol, (8) 3-metil-2-butanona, (9) 2,5-dimetilpirazina, (10) 2,3-dimetilpirazina, (11) benzaldeído, (12) 2,3,5-trimetilpirazina, (13) limoneno, (14) 3-metilbutirato de butila, (15) benzenoacetaldeído, (16) 3-etil-2,5-dimetilpirazina, (17) tetrametilpirazina, (18) β -linalol, (19) 3-metilbutirato de 3-metilbutila, (20) 2,3,5-trimetil-6-etilpirazina e (21) 2-metilpirazina.	54
Figura 13: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) em função da fibra utilizada na extração. Onde: MP: metilpirazina, 25 DMP: 2,5-dimetilpirazina, 23 DMP: 2,3-dimetilpirazina, TriMP: trimetilpirazina e TetMP: tetrametilpirazina.....	57
Figura 14: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) de acordo com a massa de amostra usada na análise.....	58
Figura 15: Resposta das alquilpirazinas nas linhas de emissão do N (388 nm) de acordo com a adição ou não de NaCl à amostra.	59
Figura 16: Influência da temperatura na extração de alquilpirazinas em amostras de líquido de cupuaçu. Onde: ■: MP, ○: 25 DMP, △: 23 DMP, ▼: TriMP e ◆: TetMP...	61

Figura 17: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) de acordo com o tempo de extração da amostra. Onde: ■: MP, ○: 25 DMP, △: 23 DMP, ▼: TriMP e ◆: TetMP. 62

Figura 18: Curvas analíticas obtidas por adição padrão de alquilpirazinas para as amostras de líquido de cupuaçu nas linhas de emissão do N. (a) 388 nm e (b) 174 nm. Onde: □= MP, ●= 25 DMP, ▲= 26 DMP, ▽= EtP, ◆= 23 DMP, ◇= TriMP e ■= TetMP. 64

Figura 19: Superfície de resposta para o dietilmercúrio obtida através do planejamento estrela usando a relação altura/ruído. 87

Figura 20: Resposta de compostos organomercúricos após extração por SPME com diferentes fibras. (a) extração de *headspace* (b) extração direta. 90

Figura 21: Cromatogramas de alquilmercúricos submetidos à extrações no *headspace* da amostra com diferentes fibras. Picos: 1: Hg^0 , 2: Me_2Hg e 3: Et_2Hg 91

Figura 22: Variação da resposta dos compostos organomercúricos com a temperatura de dessorção. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me_2Hg , ●: Et_2Hg e △: Ph_2Hg 93

Figura 23: Cromatogramas obtidos a diferentes temperaturas de dessorção após extração de organomercúricos por SPME. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg^0 , 2: Me_2Hg , 3: Et_2Hg e 4: Ph_2Hg 95

Figura 24: Variação da resposta dos organomercúricos com a percentagem de NaCl adicionado à amostra. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me_2Hg , ●: Et_2Hg e △: Ph_2Hg 97

Figura 25: Variação da resposta dos organomercúricos com a temperatura de extração. (a) extração no *headspace* da amostra com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me₂Hg, ●: Et₂Hg e △: Ph₂Hg. 99

Figura 26: Perfis de extração de compostos organomercúricos. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me₂Hg, ●: Et₂Hg e △: Ph₂Hg. 101

Figura 27: Efeito da concentração de derivatizante na resposta de alquilmercúricos (a) derivatização com NaBEt₄ e extração com fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração com fibra P100. 103

Figura 28: Cromatogramas obtidos com diferentes concentrações de agente derivatizante. (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg⁰, 2: EtMeHg, 3: Et₂Hg, 4: PhMeHg, 5: EtPhHg e 6: Ph₂Hg. 105

Figura 29: Variação da resposta de organomercúricos submetidos à derivatização/extração em diferentes valores de acidez do meio. (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100. 107

Figura 30: Cromatogramas obtidos após reação de derivatização em diferentes valores de acidez do meio. (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg⁰, 2: EtMeHg, 3: Et₂Hg, 4: PhMeHg, 5: EtPhHg e 6: Ph₂Hg. 109

Figura 31: Efeito da temperatura de derivatização na determinação de compostos organomercúricos (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100. 111

Figura 32: Estudo da influência do tempo de reação de derivatização na determinação de compostos organomercúricos. (a) derivatização com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. 112

Figura 33: Cromatograma obtido na banda de emissão do Hg (254 nm) após derivatização de MeHg^+ e EtHg^+ com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB. Onde: 1: EtMeHg e 2: Et_2Hg . Dopagem com solução 6 ng mL^{-1} 114

Figura 34: Cromatograma obtido na banda de emissão do Hg (254 nm) após derivatização de Hg^{2+} , MeHg^+ e EtHg^+ com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: PhMeHg , 2: EtPhHg e 3: Ph_2Hg . Dopagem com solução 6 ng mL^{-1} 114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores de inclinação, intercepto e correlações observadas nas curvas analíticas de compostos nitrogenados.....	27
Tabela 2: Algumas fibras para SPME disponíveis comercialmente [78].....	44
Tabela 3: Condições de torração das amêndoas de cupuaçu.....	48
Tabela 4: Pressões dos gases utilizados nas análises das alquilpirazinas em líquido de cupuaçu no sistema GC-AED.....	50
Tabela 5: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas por adição padrão das alquilpirazinas.....	65
Tabela 6: Concentração das alquilpirazinas nas amostras de líquido de cupuaçu submetidos à diferentes tratamentos térmicos	66
Tabela 7: Valores de pressão de oxigênio e vazão de <i>make-up</i> hélio utilizados nos experimentos para a construção de uma superfície de resposta	79
Tabela 8: Efeitos obtidos para o dietilmercúrio utilizando um planejamento fatorial completo 2 ⁵ para otimização das variáveis de detecção por emissão atômica na banda de emissão do Hg (254 nm).....	86
Tabela 9: Parâmetros de validação obtidos para o MeHg ⁺ utilizando a derivatização com NaBEt ₄ e extração através do <i>headspace</i> com a fibra DVB	116

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
OBJETIVOS.....	3
CAPÍTULO 1 - Estudos Preliminares.....	5
1.1 Introdução.....	5
1.1.1 Cromatografia gasosa com detecção por emissão atômica (GC-AED).....	5
1.1.1.1 Princípios de funcionamento	5
1.1.1.2 Potencialidades do sistema GC-AED	10
1.1.1.3 Fatores que afetam a detecção por emissão atômica	13
1.2 Materiais e métodos	15
1.2.1 Modificações realizadas no detector por emissão atômica	15
1.2.2 Operacionalização do sistema com testes em algumas linhas de emissão..	16
1.2.2.1 Otimização da pressão do hélio de sustentação do plasma.....	16
1.2.2.2 Otimização da pressão da cavidade do plasma	16
1.2.2.3 Determinação da pressão de gases reagentes	17
1.2.3 Potencialidade da calibração independente de composto	17
1.3 Resultados e Discussão	18
1.3.1 Modificações realizadas no detector por emissão atômica	18
1.3.2 Operacionalização do sistema com testes em algumas linhas de emissão..	19
1.3.2.1 Otimização da pressão do hélio de sustentação do plasma.....	19
1.3.2.2 Otimização da pressão da cavidade do plasma	21
1.3.2.3 Determinação da pressão dos gases reagentes	23
1.3.3 Potencialidade da calibração independente de composto	26

CAPÍTULO 2 - Determinação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED e HS-SPME-GC-ITMS	29
2.1 Introdução.....	29
2.1.1 A química dos aromas.....	29
2.1.2 Alquilpirazinas	32
2.1.3 Cupuaçu.....	37
2.1.4 Técnicas para extração e pré-concentração de compostos orgânicos voláteis associados a aromas	38
2.1.5 Microextração em Fase Sólida (SPME)	40
2.2 Materiais e métodos	47
2.2.1 Ensaios preliminares de <i>screening</i>	48
2.2.2 Otimização da metodologia para isolamento de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED	50
2.2.2.1 Seleção de fibra.....	51
2.2.2.2 Efeito da massa de amostra processada.....	51
2.2.2.3 Avaliação da força iônica do meio	51
2.2.2.4 Influência da temperatura de extração	52
2.2.2.5 Perfil de extração.....	52
2.2.3 Quantificação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu	52
2.3 Resultados e Discussão	53
2.3.1 Ensaios preliminares de <i>screening</i>	53
2.3.2 Otimização da metodologia para isolamento de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED	56
2.3.2.1 Seleção de fibra.....	56
2.3.2.2 Efeito da massa de amostra processada.....	57
2.3.2.3 Avaliação da força iônica do meio	58
2.3.2.4 Influência da temperatura de extração	60
2.3.2.5 Perfil de extração.....	62
2.3.3 Quantificação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu	63

<i>CAPÍTULO 3 - Determinação de compostos organomercúricos por GC-AED.....</i>	<i>69</i>
3.1 Introdução.....	69
3.1.1 Mercúrio: ocorrência e ciclo biológico	69
3.1.2 Métodos para análise de organomercúricos	72
3.2 Materiais e métodos	78
3.2.1 Otimização multivariada das variáveis de detecção de Hg por GC-AED	78
3.2.2 Derivatização de compostos mercúricos com tetraalquilboratos de sódio seguida de extração por SPME.....	80
3.2.2.1 Otimização da extração de dialquilmercúricos.....	80
3.2.2.2 Otimização da etapa de derivatização de compostos organomercúricos	82
3.3 Resultados e Discussão	85
3.3.1 Otimização multivariada das variáveis de detecção de Hg por GC-AED	85
3.3.2 Derivatização de compostos mercúricos com tetraalquilboratos de sódio seguida de extração por SPME.....	88
3.3.2.1 Otimização da extração de dialquilmercúricos.....	88
3.3.2.2 Otimização da etapa de derivatização de compostos organomercúricos	102
3.3.3 Verificação da exatidão do método com material certificado	116
 CONCLUSÕES.....	 119
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	 121

INTRODUÇÃO

A cromatografia gasosa é uma técnica bastante utilizada na pesquisa de compostos de uso agrônomo, farmacêutico, contaminantes ambientais, etc. A ela podem estar acoplados vários tipos de detectores seletivos ou universais. Dentre eles pode-se citar o detector por captura de elétrons (ECD – *Electron Capture Detector*), o detector por ionização em chama (FID – *Flame Ionization Detector*), o detector de fósforo e nitrogênio (NPD – *Nitrogen Phosphorus Detector*), o detector de massas (MS – *Mass Spectrometer*) e o detector por emissão atômica (AED – *Atomic Emission Detector*), cujo primeiro protótipo monocanal foi descrito em 1965 [1]. A primeira versão comercial deste equipamento foi disponibilizada no mercado em 1989. Ele é um detector seletivo que apresenta grande potencialidade, podendo analisar compostos contendo elementos metálicos e não-metálicos. Além disto, sua detecção elemento-seletiva permite a diferenciação dos elementos constituintes da amostra por gerar cromatogramas para cada elemento monitorado. Este sistema tem sido utilizado na determinação dos mais variados tipos de compostos. Além da detecção de vários elementos ele é capaz de diferenciar isótopos de C, H e N, o que amplia sua aplicação.

Para realizar uma análise por cromatografia gasosa, geralmente é necessária uma etapa de preparo de amostra. Dentre as técnicas de preparo de amostra para análises cromatográficas a Microextração em Fase Sólida (SPME – *Solid Phase Microextraction*) tem se mostrado eficiente na análise de compostos voláteis e não-voláteis. Ela foi introduzida em 1990 e apresenta vantagens, como a não utilização

de solvente e a facilidade de uso. Estas características têm tornando a SPME uma técnica de grande aplicação, sendo muitas vezes escolhida ao invés de técnicas tradicionais, como a extração líquido-líquido e a extração em fase sólida. A sua simplicidade tem atraído pesquisadores das mais diferentes áreas de conhecimento, fazendo com que ela seja utilizada em determinações dos mais diversos compostos em matrizes líquidas, sólidas e gasosas de origem biológica e ambiental, em trabalhos no laboratório e em campo.

A associação SPME-GC-AED une as facilidades e vantagens do preparo de amostra por SPME e a alta detectabilidade e seletividade da Cromatografia Gasosa com Detecção por Emissão Atômica.

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho foram operacionalizar e aplicar um sistema de Cromatografia Gasosa com Detecção por Emissão Atômica (GC-AED) na análise de compostos variados após extração por SPME. Para isto, foi dada especial atenção a analitos contendo um não-metal, nitrogênio (alquilpirazinas) e um metal, mercúrio (organomercúricos). Tendo em vista estes objetivos foram realizadas as seguintes etapas:

- Operacionalização do sistema GC-AED ;
- Desenvolvimento de metodologias para identificar e quantificar constituintes nitrogenados em *líquor* de cupuaçu por GC-AED com uso complementar de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas com Ion Trap (GC-ITMS - *Gas Chromatography Ion trap Mass Spectrometry*);
- Desenvolvimento de metodologias para identificar e quantificar compostos organomercúricos por GC-AED em matrizes variadas.

CAPÍTULO 1 - Estudos Preliminares

1.1 Introdução

1.1.1 Cromatografia gasosa com detecção por emissão atômica (GC-AED)

1.1.1.1 Princípios de funcionamento

Na Cromatografia Gasosa com Detecção por Emissão Atômica (GC-AED – *Gas Chromatography with Atomic Emission Detection*) o sinal é gerado após fragmentação dos compostos eluídos da coluna e excitação dos fragmentos atômicos/moleculares em um plasma de hélio (que induz emissões atômicas tanto em metais quanto em não-metais). Esta técnica proporciona grande sensibilidade para analitos contendo elementos como cloro, bromo, flúor, nitrogênio e oxigênio [2-5]. Em princípio, estes sistemas são capazes de detectar qualquer elemento separadamente com exceção do hélio, devido à sua habilidade multicanal, tornando-os mais seletivos que outros detectores para cromatografia gasosa [6, 7]. Esta especificidade auxilia muito na identificação dos analitos pelo menor número de picos

no cromatograma [8, 9]. Quando monitorando comprimentos de onda característicos para carbono e hidrogênio, o detector por emissão atômica fornece cromatogramas universais e não-seletivos, similares aos obtidos com a detecção por ionização em chama [10].

Um esquema do detector por emissão atômica é mostrado na Figura 1.

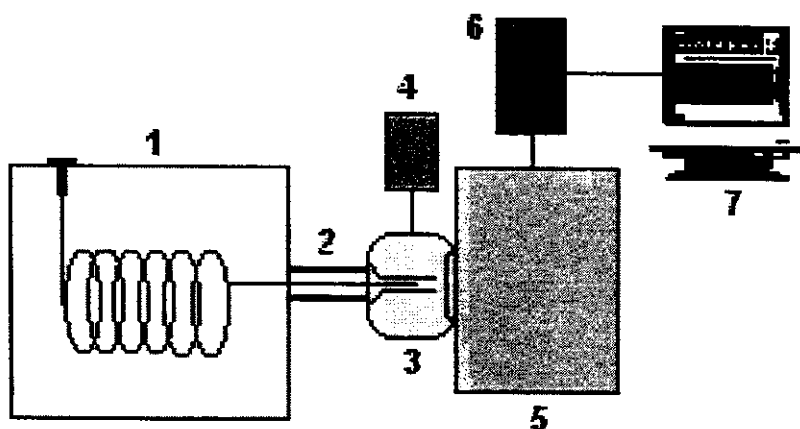


Figura 1: Diagrama de blocos do sistema GC-AED. Onde. 1: Cromatógrafo a gás, 2: linha de transferência, 3: cavidade ressonante, 4: fonte de microondas, 5: monocromador, 6: arranjo de diodos e 7: registro do sinal.

Nos sistemas GC-AED usando plasma induzido por microondas (MIP – *Microwave Induced Plasma*), o plasma é gerado em um tubo de descarga de quartzo pelo qual passa um fluxo de hélio (a cela de detecção). Esta cela de detecção é montada no interior de uma cavidade ressonante conectada a uma fonte de microondas. A cavidade ressonante focaliza a energia gerada pela fonte formando e confinando o plasma de hélio no interior da cela de detecção. O material proveniente da coluna cromatográfica é introduzido na cela de detecção e misturado ao hélio de alimentação do plasma. Estes compostos são fragmentados em seus átomos constituintes, íons derivados e radicais. Devido às colisões com espécies energéticas (He^* , espécies de He metaestáveis) os fragmentos são excitados eletronicamente e ao retornarem aos seus estados fundamentais, emitem radiação em comprimentos

de onda característicos dos elementos constituintes. No sistema GC-AED comercial [16], a radiação emitida é registrada em função do tempo por um espectrômetro ótico com um arranjo de diodos. O monitoramento de diferentes comprimentos de onda é realizado pela medida da emissão atômica dos elementos escolhidos e os dados são registrados como cromatogramas elemento-seletivos [11, 16-19]. Neste sistema, ocorre a detecção multielementar e o tratamento automático do ruído com correção em tempo real, que são essenciais para uma boa seletividade e detectabilidade. Com o arranjo de diodos, purgado com nitrogênio, medidas simultâneas de quatro ou mais elementos em uma faixa de 20 nm na região do visível e 40 nm na região do ultravioleta podem ser realizadas de 160 nm a 800 nm, permitindo a detecção de uma ampla variedade de elementos (em teoria todos os elementos, exceto hélio) [12, 20-24]. O agrupamento de elementos que podem ser medidos simultaneamente se dá pela proximidade de comprimento de onda em janelas do arranjo de diodos e também devido à compatibilidade de gases reagentes e vazões do *make-up* hélio (gás de complemento) [9, 12, 13, 21, 25]. A habilidade de operar em comprimentos de onda tão baixos quanto 160 nm permite o uso de linhas no ultravioleta a vácuo, como por exemplo as linhas de emissão do S (181 nm) e do N (174 nm) [12].

A cavidade ressonante mais usada para focalização da energia de microondas é a cavidade tipo Beenakker TM_{010} , introduzida em 1976. Nesta, uma onda eletromagnética é criada no interior da cavidade, com maximização do campo elétrico no seu centro, onde está a cela de detecção. É importante que o volume da cavidade seja tão pequeno quanto possível para garantir uma alta densidade de energia e a sintonização das microondas. O *design* da cavidade reentrante usada no detector por emissão atômica reduz muito a intensidade de ruído, que é corrigido por linhas negras e contribuições de bandas moleculares, para vários elementos [12]. No GC-AED comercial [15], uma cavidade modificada é usada em combinação com um espectrômetro com arranjo de diodos computadorizado. As principais modificações estão relacionadas à cela de detecção. Um sistema de resfriamento de água é colocado em volta da cela de detecção recoberta com poliimida para reduzir a erosão das paredes do tubo, o que pode gerar cauda no pico cromatográfico em elementos como S e P. Isto também reduz o nível de ruído durante a detecção de Si e O. Com o

resfriamento da cela de detecção é observada menor corrosão do tubo, permitindo até 30 dias de operação do sistema sem troca da cela [12]. O sistema de purga de solvente é outro dispositivo integrado ao sistema. A colocação de uma janela na saída do tubo de descarga previne a difusão de ar para dentro do mesmo, fornecendo menores níveis de ruído e interferências nas linhas do N e O. Este arranjo também permite um fluxo reverso de gás através do plasma, o qual é a base para o baixo volume morto do sistema [12, 21]. A interface cromatógrafo-detector é obtida com uma linha de transferência aquecida, que também possui um baixo volume morto [11]. Uma foto do detector por emissão atômica comercial é mostrada na Figura 2.

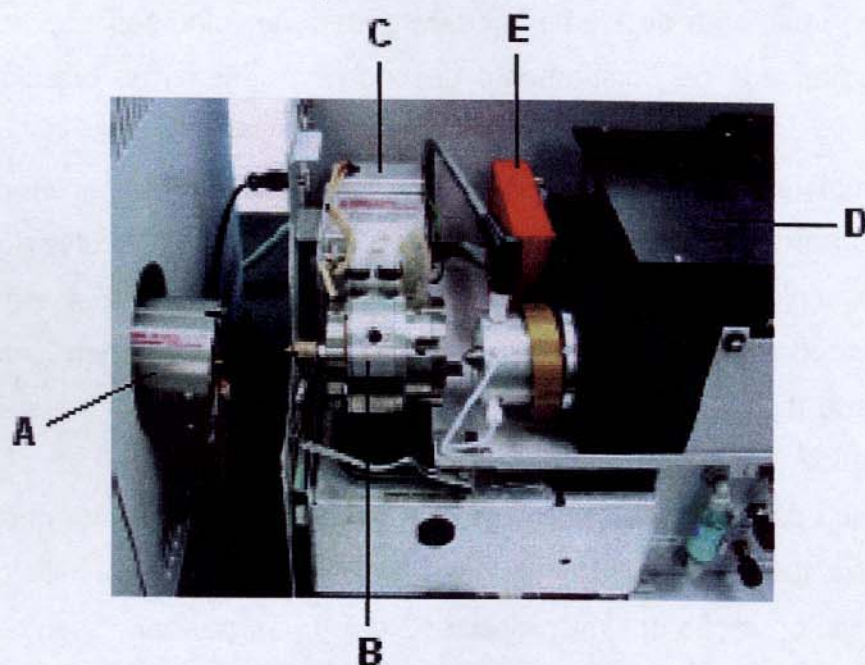


Figura 2: Detector por emissão atômica disponível comercialmente. Onde A: linha de transferência, B: cavidade ressonante, C: fonte de microondas, D: espectrômetro ótico e E: arranjo de diodos [26].

A atomização e excitação dos solutos no plasma requerem que espécies de hélio metaestáveis transfiram energia para as espécies formadas. Este mecanismo é

viável para a excitação de analitos somente se, a diferença entre a energia das espécies He^* e dos estados excitados dos íons for pequena. Para não-metais como Cl, Br, I, S e P, esta energia é menor que 1 eV [11]. Se a taxa de formação dessas espécies de hélio não é suficientemente alta devido à adição de H_2 ou fragmentos moleculares, uma proporção dos átomos não é excitada e o fator de resposta observado é menor que o esperado [23, 27, 28]. Uma vez atomizado o analito, a ionização e excitação das espécies no plasma podem ocorrer por vários processos e um grande número de parâmetros pode influenciar o desempenho analítico do sistema. Dentre os processos de ionização podem ocorrer a ionização térmica que é induzida por colisões entre íons, átomos e elétrons livres no plasma e a ionização de Penning (causada pela transferência de carga entre as espécies metaestáveis de hélio e átomos do analito, resultado da transferência de energia entre as espécies) [14].

A alta energia de ionização do hélio é a principal vantagem do MIP em relação ao plasma indutivamente acoplado (ICP – *Inductively Coupled Plasma*) [11]. Outras vantagens do plasma induzido por microondas são o pequeno volume morto do tubo de descarga, a compatibilidade do plasma com as baixas vazões provenientes de colunas capilares, o menor custo, o menor consumo de gases e a facilidade de uso comparado ao ICP. A detecção por emissão atômica de elementos excitados por MIP é muito sensível e elementos com massas atômicas menores que 40 estão menos sujeitos a interferências do que no sistema de plasma indutivamente acoplado com espectrometria de massas (ICP-MS) [12, 13]. O MIP é usado para fragmentar, atomizar e ionizar eluentes da coluna cromatográfica e exibem alta seletividade (relativa ao carbono) para metais e não-metais [14]. Plasmas de argônio são menos energéticos do que os de hélio, produzindo condições onde os compostos eluídos não são completamente atomizados. Neste caso, elementos como nitrogênio, flúor e cloro não são eficientemente excitados [15].

A alta temperatura do plasma é responsável pelos baixos limites de detecção do sistema. Valores típicos de temperatura em plasmas de hélio induzidos por microondas estão entre 4000 K e 8500 K em potências de microondas de 60 W a

200 W dependendo da posição de observação, diâmetro do tubo de descarga e vazão de gás [15].

Fontes de plasma não exibem equilíbrio térmico completo e medidas relacionadas à densidade de íons, espécies neutras e elétrons, como a temperatura cinética do gás, temperatura de ionização, temperatura de excitação e temperatura do elétron, são freqüentemente necessárias para caracterizar o plasma totalmente. Medidas da energia cinética dos íons são importantes para a caracterização das fontes de plasma usadas em espectrometria ótica, porque esta energia afetará a sensibilidade e resolução das linhas de emissão correspondentes [11].

Um requisito essencial para a precisão dos resultados obtidos por GC-AED é que a amostra não perturbe a estabilidade e habilidade de excitação do plasma. O plasma de hélio induzido por microondas pode tolerar grandes quantidades de compostos contendo carbono, se a potência do microondas é aumentada, mas isto degrada significativamente a relação sinal/ruído do detector [29].

O sistema GC-AED é caracterizado pela excelente detectabilidade, ampla faixa linear, precisão e seletividade [17, 20, 30], permitindo em virtude de sua composição elementar análises quantitativas e qualitativas [31] na presença de interferentes da matriz. Os baixos limites de detecção observados no sistema GC-AED estão relacionados às temperaturas altas do plasma [15].

1.1.1.2 Potencialidades do sistema GC-AED

Após introdução do GC-AED comercial em 1989, o número de aplicações desta técnica tem aumentado [11, 23]. O AED detecta seletivamente 25 elementos e alguns isótopos em compostos orgânicos usando uma ou mais de suas linhas de emissão [16, 31]. Encontram-se na literatura trabalhos bastante diversificados baseados na utilização desses sistemas, como por exemplo: análises de isótopos de N em fumaça de cigarro [4], organoestânicos em amostras ambientais [9], identificação de microorganismos por seus produtos de pirólise [16], caracterização

de sulfonamidas [19], organosulfurados aromáticos policíclicos [28], produtos de reação de bromação de alcenos [30], bifenilas policloradas [32], haloalcanos voláteis [11, 20, 33], halogenados em água de chuva e neve [18, 34], dimetilsulfeto em vinho tinto [35], impurezas em produtos farmacêuticos [36], pesticidas em geral [5-7, 14, 22, 37, 38], 2-fenilbenzotiazol, trimetilolpropano e 2,6-di-t-butil-4-metilfenol em adesivos [39], compostos sulfurados em gasolina [40], análises de bioequivalência [41], organometálicos [25, 42], gás mostarda [43], dentre outras.

Comparado aos métodos de detecção clássicos como a detecção por captura de elétrons, a detectabilidade do AED é consideravelmente pior, mas ele é muito mais seletivo. Isto porque o sistema GC-AED usa um conjunto de diodos para cada faixa espectral analisada e não simplesmente um único comprimento de onda nas linhas de emissão monitoradas simultaneamente [23, 38].

Como mencionado previamente, além dos elementos mais abundantes da natureza, o GC-AED pode ser usado também para detectar compostos marcados isotopicamente, devido às diferenças entre os espectros de emissão de cada isótopo. Além dos isótopos de hidrogênio, ^1H e ^2D , para os quais o espectro atômico pode ser resolvido, ^{12}C , ^{13}C , ^{14}C e ^{14}N , ^{15}N podem ser distinguidos por seus espectros de emissão molecular por reações no plasma que produzem CO e CN, respectivamente [4, 23, 31]. No uso de GC-AED para detecção de isótopos na determinação da relação precursor - composto formado, várias considerações devem ser feitas. Primeiro, o instrumento deve ser capaz de detectar seletivamente os isótopos de interesse quando este está presente em níveis maiores que a abundância natural (por exemplo, 0,37 % para ^{15}N). Segundo, ele deve ser sensível o suficiente para detectar componentes menos abundantes em matrizes complexas [4].

O detector seletivo ideal para cromatografia gasosa responderia ao elemento em qualquer composto injetado e sua resposta seria independente da estrutura molecular do analito. O detector por emissão atômica é um detector que mede a quantidade absoluta do analito em relação ao volume de gás de arraste, e a intensidade de uma banda de emissão para um dado elemento é proporcional à quantidade deste elemento no plasma. Teoricamente, a resposta independe da estrutura química do composto analisado [28, 44]. Então, a calibração de uma

mistura multicomponente pode ser reduzida a uma única substância que contém os elementos de interesse. Este tipo de calibração, chamada calibração independente de composto (CIC – *Compound Independent Calibration*), usa um único padrão para quantificar uma série de compostos tendo distribuição elementar similar mas estruturas moleculares diferentes, cuja resposta é dependente somente do teor de elemento no composto. Esta facilidade tem vantagens importantes como redução no custo de análise, uma vez que muitos dos padrões necessários são extremamente difíceis de obter [10, 14, 18, 23, 28, 30]. A resposta elementar só será independente do composto, se os processos de fragmentação molecular e subsequente excitação elementar forem quantitativos e reprodutíveis. Se há uma diferenciação no grau de fragmentação e/ou de excitação elementar, devido às diferenças estruturais entre compostos de origem ou reações químicas no plasma, a resposta elementar não será independente do composto. As áreas dos picos obtidas para os elementos representam somente o fenômeno de excitação e o comportamento dos elementos presentes no plasma após fragmentação molecular. A obtenção de uma relação linear entre a resposta e quantidade de elemento injetada, indica que o processo de excitação para os elementos sob consideração é livre de interferências químicas e espectrais [11]. Alguns elementos como hidrogênio, flúor, fósforo e nitrogênio mostram grandes discrepâncias na resposta elementar. Os últimos três podem interagir com as paredes do tubo de descarga, fornecendo relações não lineares de fatores de resposta em função da quantidade injetada de elemento [11]. Devido a estes fatores, relatos de quantificação por CIC no sistema GC-AED são discordantes quanto às características necessárias para os padrões. Seria necessário um padrão com uma mesma distribuição de elementos para análises de uma determinada família de compostos ou que o composto escolhido tivesse em sua estrutura o elemento de interesse e apresente tempo de retenção próximo ao analito a ser quantificado [14]?

A resposta independente de composto permite também a determinação das razões estequiométricas dos eluatos, e, por consequência suas fórmulas mínimas. Informações sobre fórmulas mínimas podem ser conseguidas cromatografando padrões de composição conhecida e comparando as respostas obtidas com as do

composto de interesse. Determinação de fórmulas mínimas e CIC usando GC-AED têm mostrado resultados conflitantes, provavelmente devido à dependência da resposta elementar residual com a estrutura molecular [10, 27, 36].

1.1.1.3 Fatores que afetam a detecção por emissão atômica

Há numerosos fatores que podem influenciar a resposta do AED. Entre estes fatores estão a natureza e concentração de gases reagentes no plasma, a vazão de complemento (*make-up*) no detector e a presença de altas concentrações de espécies contendo carbono (causada pela eluição de grandes quantidades de solvente, o qual pode resfriar o plasma e/ou cobrir o tubo de descarga com carbono elementar, reduzindo a resposta de alguns compostos que eluem próximos a este composto) [14].

A vazão de hélio usado como gás de arraste na coluna cromatográfica não é suficiente para sustentar o plasma, e uma quantidade adicional deste deve ser adicionada antes da entrada do tubo de descarga (gás de complemento ou *make-up*). Este tem um efeito marcante na resposta, no formato do pico cromatográfico e na detectabilidade do sistema [6, 9, 20]. Porém, vazões de *make-up* excessivas diminuem o tempo de residência dos eluatos na cela de detecção, diminuindo também a intensidade da resposta. Estas altas vazões de hélio podem danificar a janela do espectrômetro situada após o tubo de descarga [9]. Assim, este parâmetro deve ser otimizado para obtenção das melhores condições de detecção [17].

Com a cavidade ressonante e a estreita cela de detecção usada no sistema GC-AED, a adição de gases reagentes é essencial. A escolha do gás reagente é determinada pelo grupo de elementos a serem analisados. Muitos elementos requerem a adição de oxigênio, hidrogênio, metano ou uma mistura destes gases reagentes. Oxigênio é usado quando carbono, hidrogênio, cloro e bromo são medidos simultaneamente. Elementos que formam óxidos refratários, como fósforo e

boro, requerem hidrogênio como gás reagente [12]. Oxigênio também é necessário para prevenir a formação de depósito de carbono, causados pela atomização incompleta dos analitos nas paredes da cela de detecção. Em algumas linhas de emissão a adição de oxigênio não tem nenhum efeito na detectabilidade. Por outro lado, a presença de oxigênio na detecção de alguns elementos, como estanho, leva à formação de óxidos refratários, que tendem a se acumular nas paredes da cela de detecção. Isto resulta em um decréscimo na detectabilidade, na presença de cauda no pico cromatográfico e em efeito de memória. A adição de hidrogênio ao plasma elimina este efeito negativo. Além disto, o hidrogênio parece facilitar a excitação, provavelmente pela formação de hidretos voláteis que seriam mais facilmente fragmentados e excitados [9, 16, 20]. Seletividade, detectabilidade e linearidade podem também ser afetadas pelo tipo de gás reagente adicionado ao plasma [13, 18].

1.2 Materiais e métodos

Instrumental: Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent) com injetor automático 7683 (Agilent) acoplado ao detector por emissão atômica G2350A (Agilent). Colunas HP-1 (polidimetilsiloxano - 25 m x $d_i = 320\text{ }\mu\text{m}$ x $d_f = 0,17\text{ }\mu\text{m}$) e Carbowax 20M (polietilenoglicol - 25 m x $d_i = 320\text{ }\mu\text{m}$ x $d_f = 0,3\text{ }\mu\text{m}$).

Reagentes: Gases para operação do GC-AED: He, O₂, H₂ e CH₄ com pureza de 99,999 % (White Martins, Rio de Janeiro – Brasil). Metanol (Tedia, Rio de Janeiro – Brasil). Benzeno e o-xileno (Reagen, Rio de Janeiro – Brasil), tolueno e nitrobenzeno (Vetec, Rio de Janeiro – Brasil), clorobenzeno (Nuclear, Rio de Janeiro – Brasil), etilbenzeno (Fluka, Buchs - Suíça). Acetonitrila, piridina e N,N-dimetilanilina (Merck, Darmstadt – Alemanha), p-cloronitrobenzeno (Carlo Erba, Milão – Itália), pirazina e 2,3,5-trimetilpirazina (Aldrich, Milwaukee – EUA). Todos os reagentes utilizados apresentaram pureza superior a 98 %.

1.2.1 Modificações realizadas no detector por emissão atômica

As principais modificações realizadas no sistema comercial foram, a substituição da anilha de vespel usada para vedação da cela de detecção por uma anilha de teflon e a retirada da camada de poliimida da cela de detecção por imersão em ácido sulfúrico concentrado durante aproximadamente 4 h. Ajustes nas conexões de água e gases também foram necessários.

1.2.2 Operacionalização do sistema com testes em algumas linhas de emissão

Como amostra teste foi utilizada uma mistura contendo benzeno, tolueno, clorobenzeno, etilbenzeno e o-xileno a uma concentração de $2,5 \text{ g L}^{-1}$. As condições cromatográficas foram: Coluna HP-1, temperatura do forno: $60 \text{ }^{\circ}\text{C}$ (12 min), razão de divisão: 100:1, vazão na coluna: $2,0 \text{ mL min}^{-1}$, temperatura da cavidade e da linha de transferência: $180 \text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura do injetor: $250 \text{ }^{\circ}\text{C}$, volume injetado: $1 \text{ }\mu\text{L}$.

1.2.2.1 Otimização da pressão do hélio de sustentação do plasma

Para o hélio de sustentação do plasma foram testadas pressões de 69 kPa a 207 kPa. As medidas foram realizadas com monitoramento das linhas de emissão do C (193 nm), H (486 nm) e Cl (479 nm) com injeções em triplicata da solução teste. As pressões dos gases reagentes, oxigênio e hidrogênio, foram mantidas em 69 kPa durante as análises.

1.2.2.2 Otimização da pressão da cavidade do plasma

Pressões na cavidade variando entre 6 kPa e 10 kPa foram testadas. Assim como nos experimentos para verificação da melhor pressão do hélio de sustentação do plasma, foram monitoradas as linhas de emissão do C (193 nm), H (486 nm) e Cl (479 nm). As pressões dos gases reagentes e do hélio de sustentação do plasma foram mantidas em 69 kPa cada.

1.2.2.3 Determinação da pressão de gases reagentes

As seguintes combinações foram usadas para as pressões de oxigênio e hidrogênio, em kPa: 69 e 69; 69 e 34,5; 34,5 e 69; 69 e zero e 34,5 e zero para a banda de emissão do C (193 nm). Para as linhas de emissão do H (486 nm) e do Cl (479 nm) foram usadas as pressões de 34,5 kPa e 69 kPa de oxigênio.

1.2.3 *Potencialidade da calibração independente de composto*

Para testar a possibilidade de uso da calibração independente de composto foram construídas curvas analíticas para os compostos acetonitrila, piridina, pirazina, trimetilpirazina, N,N-dimetilanilina, nitrobenzeno e cloronitrobenzeno em concentrações variando entre 60 e 270 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As injeções foram feitas em triplicata monitorando as linhas de emissão do C (193 nm) e N (174 nm e 388 nm). As condições cromatográficas usadas foram: Coluna Carbowax 20M, temperatura do forno: 50 °C (4 min) $\rightarrow$ 30 °C min^{-1} $\rightarrow$ 150 °C $\rightarrow$ 20 °C min^{-1} $\rightarrow$ 220 °C (4 min), razão de divisão: 20:1, vazão na coluna: 1,8 mL min^{-1} , temperatura da cavidade e da linha de transferência: 230 °C, temperatura do injetor: 230 °C, volume injetado: 1 μL , pressão na cavidade: 10 kPa (N 174 nm e C 193 nm) e 20 kPa (N 388 nm), pressão de hélio de sustentação: 69 kPa (N 174 nm e C 193 nm) e 207 kPa (N 388 nm), pressão de O_2 : 138 kPa (N 174 nm e C 193 nm) e 483 kPa (N 388 nm), pressão de H_2 : 34,5 kPa (N 174 nm e C 193 nm) e 207 kPa (N 388 nm) e pressão de CH_4 : 345 kPa (N 388 nm). Os valores de pressão de gases reagentes, pressão da cavidade e pressão do hélio de sustentação do plasma usados nas linhas de emissão do N foram otimizados em estudos anteriores.

1.3 Resultados e Discussão

1.3.1 *Modificações realizadas no detector por emissão atômica*

O sistema comercial adquirido apresentou problemas detectados logo após a sua instalação. Os principais foram o vazamento de água para o interior da cavidade, cela de detecção e linhas de gases e a quebra constante da cela de detecção. Algumas modificações se fizeram necessárias para o seu funcionamento adequado. A primeira delas foi a retirada da camada de poliimida que originalmente envolvia parte da cela de detecção. Essa camada torna a cela de detecção mais frágil porque durante o uso, a poliimida se queima (por causa do calor gerado pela pluma de plasma) tornando este local susceptível a quebras. Como há um fluxo constante de água sob pressão moderada em torno da cela de detecção para resfriamento do sistema, com o rompimento da cela ocorre vazamento de água para dentro da mesma, extinguindo o plasma. A remoção da camada de poliimida resolveu este problema.

Outra modificação realizada foi a substituição da anilha de vespel que originalmente fazia a vedação entre a cela de detecção e a entrada de gases, por uma anilha de Teflon. Pela rigidez do vespel, a anilha original não se moldava e não promovia uma vedação efetiva na cela de detecção, fazendo com que ocorresse vazamento de água no sistema e extinção do plasma de hélio. O Teflon, por ser um material mais maleável promove uma boa vedação do sistema com o ajuste da entrada de gases. A anilha proposta no projeto original do detector por emissão atômica, bem como a entrada de gases podem ser vistas na Figura 3.

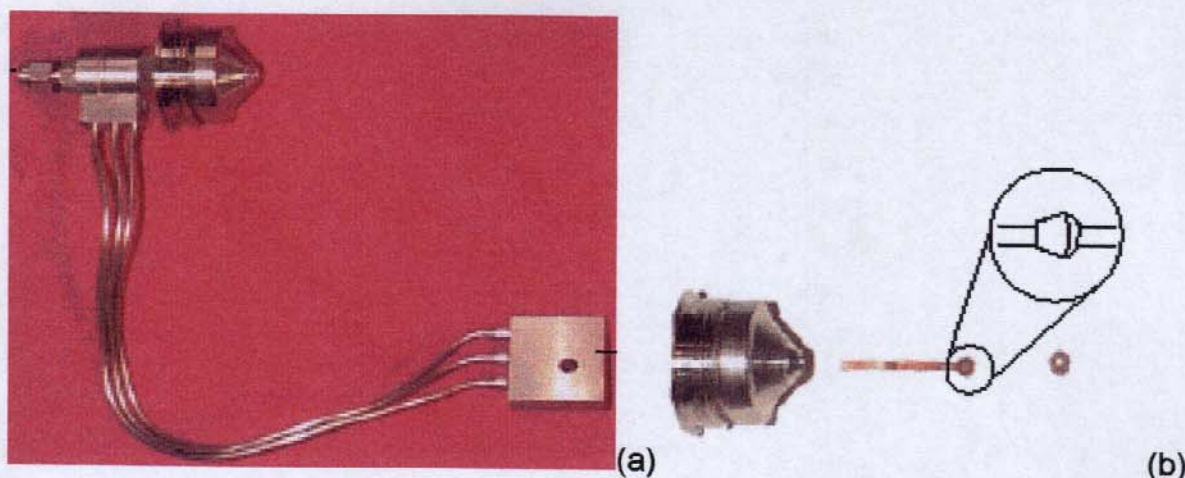


Figura 3: Detalhes do detector por emissão atômica. (a) entrada de gases e (b) cela de detecção com anilha de vespel [26].

Além das mudanças aqui citadas foram necessários ajustes em todas as conexões de água e gases. Devido ao uso de diferentes gases no sistema de detecção, a possibilidade de vazamento nestas conexões e a falta de pressão na cavidade é constante.

1.3.2 Operacionalização do sistema com testes em algumas linhas de emissão

1.3.2.1 Otimização da pressão do hélio de sustentação do plasma

Os resultados obtidos nos ensaios nas linhas de emissão do C, H e Cl para a otimização da pressão do hélio de sustentação do plasma podem ser vistos na Figura 4.

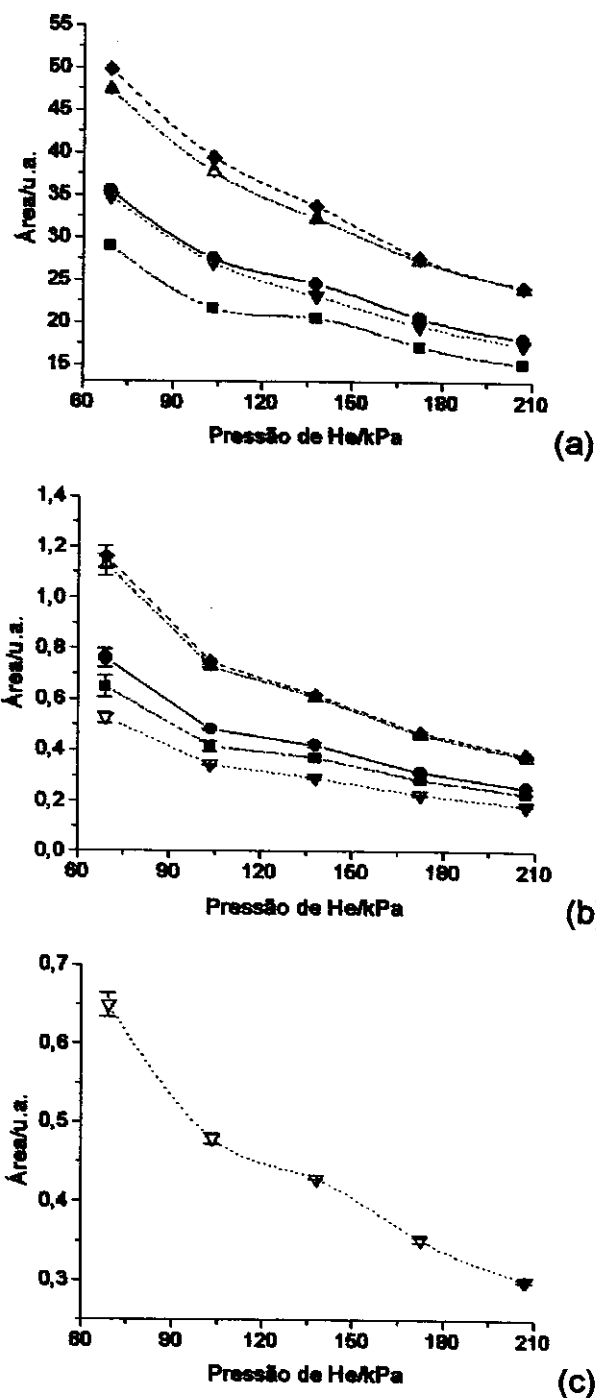


Figura 4: Variação da resposta do detector por emissão atômica com a mudança da pressão do hélio de sustentação do plasma. (a) banda de emissão do C (193 nm), (b) banda de emissão do H (486 nm) e (c) banda de emissão do Cl (479 nm). Onde: ■: benzeno, ●: tolueno, ▽: clorobenzeno, △: etilbenzeno e ◆: o-xileno.

Apesar do manual do aparelho recomendar uma pressão operacional de 207 kPa, independentemente do elemento a ser monitorado, verificou-se aqui a conveniência de otimização caso a caso. Na análise dos elementos C, H e Cl observa-se uma diminuição do sinal com o aumento da pressão de hélio de sustentação do plasma. O aumento na pressão do hélio leva a um menor tempo de residência das espécies no plasma prejudicando os processos de atomização e excitação. Em todas as linhas de emissão estudadas (C, H e Cl) as melhores respostas foram obtidas utilizando 69 kPa como pressão de hélio de sustentação do plasma.

1.3.2.2 Otimização da pressão da cavidade do plasma

Os resultados obtidos na otimização da pressão na cavidade do plasma nas linhas de emissão do C, H e Cl podem ser vistos na Figura 5.

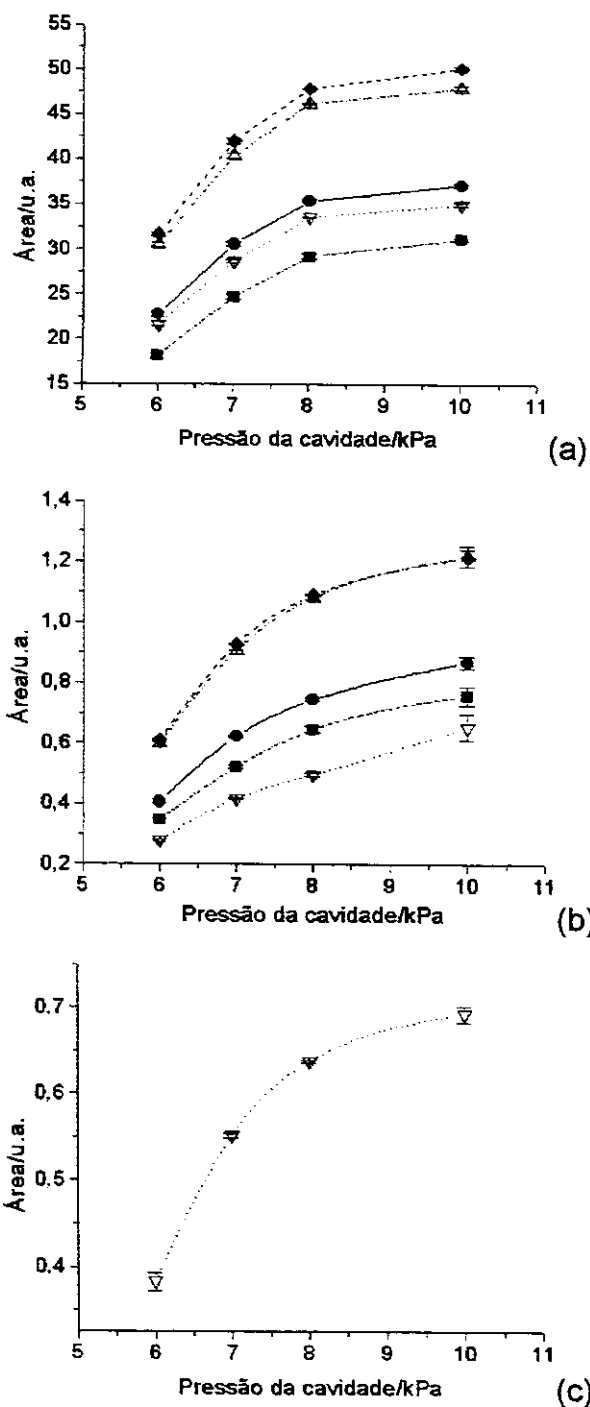


Figura 5: Variação da resposta do detector por emissão atômica em função da pressão da cavidade do plasma. (a) banda de emissão do C (193 nm), (b) banda de emissão do H (486 nm) e (c) banda de emissão do Cl (479 nm). Onde: ■: benzeno, ●: tolueno, ▽: clorobenzeno, △: etilbenzeno e ◆: o-xileno.

Em todas as linhas estudadas as melhores respostas foram obtidas com a utilização de 10 kPa de pressão na cavidade do plasma. Observa-se que ocorre um aumento na resposta dos analitos com o aumento gradativo da pressão na cavidade do plasma, provavelmente devido ao aumento da densidade dos gases no plasma e conseqüentemente menor frequência de colisões entre analitos e espécies energeticamente ativas.

1.3.2.3 Determinação da pressão dos gases reagentes

Os resultados obtidos com diferentes combinações de pressão de gases reagentes nas linhas de emissão do C, H e Cl são mostrados nas Figura 6 e 7.

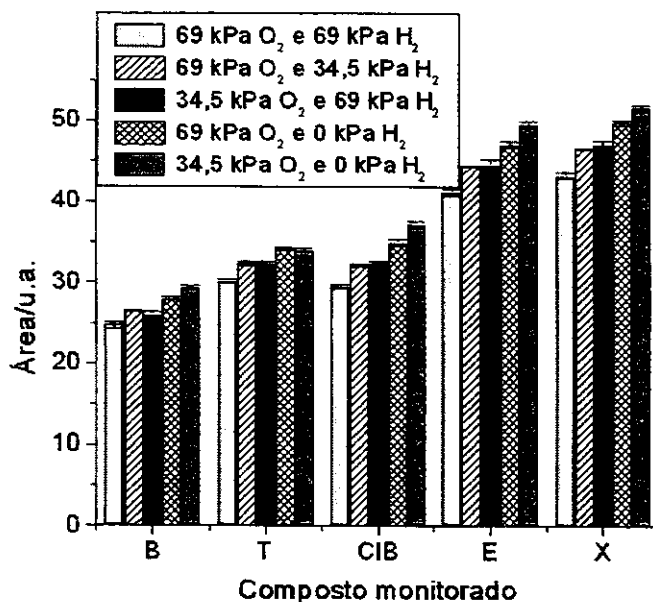


Figura 6: Variação da resposta do detector por emissão atômica dos compostos na banda de emissão do carbono com a alteração da pressão dos gases reagentes, oxigênio e hidrogênio. Onde: B: Benzeno, T: tolueno, ClB: clorobenzeno, E: etilbenzeno e X: o-xileno.

Para os analitos benzeno, tolueno e clorobenzeno a alteração na proporção de gases reagentes não acarretou grandes mudanças nas respostas dos analitos, apesar das respostas terem sido melhores na ausência de hidrogênio. Já para os compostos com maior teor de carbono, etilbenzeno e o-xileno, os melhores resultados foram obtidos utilizando 34,5 kPa de oxigênio, sem a adição de hidrogênio. Isto indica que a presença de oxigênio é necessária para aumentar a detectabilidade do sistema.

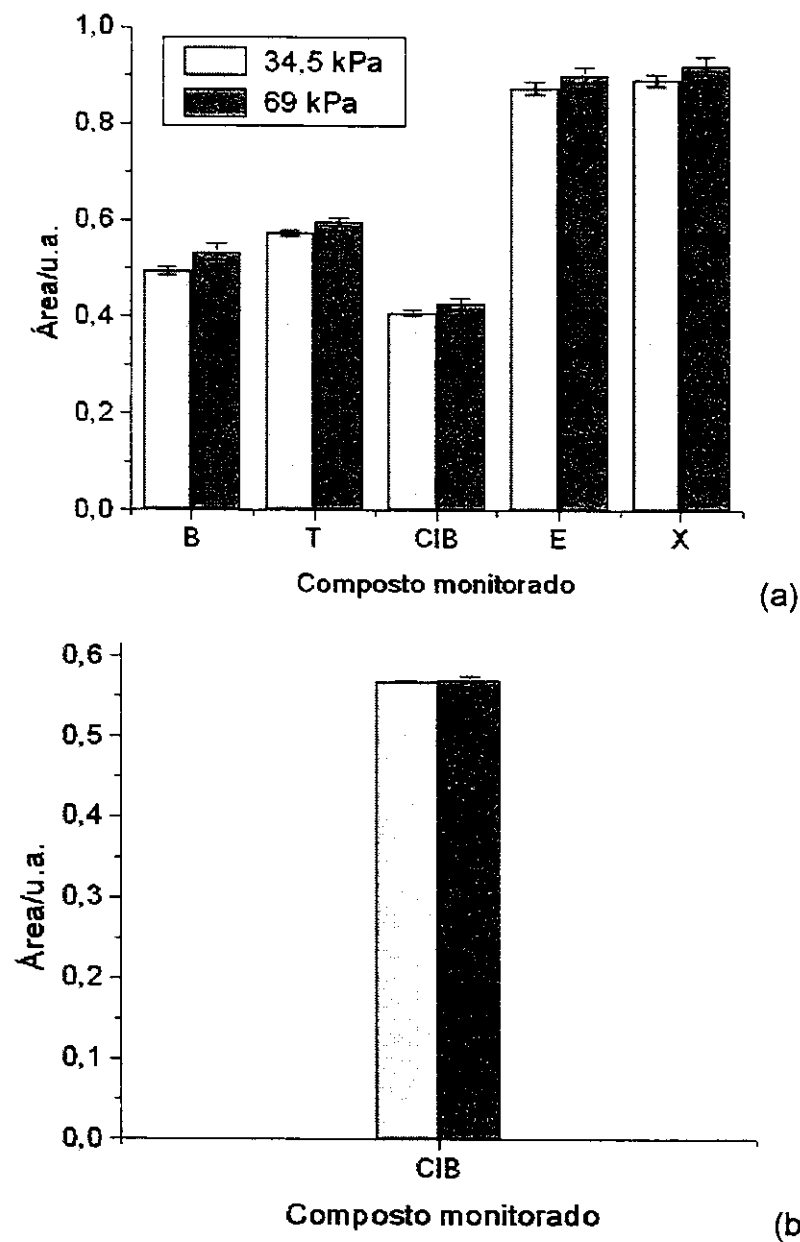


Figura 7: Variação da resposta com a alteração da pressão do gás reagente oxigênio. (a) banda de emissão do H (486 nm) e (b) banda de emissão do Cl (479 nm).

Tanto na banda de emissão do hidrogênio como na banda de emissão do cloro a alteração na pressão do gás reagente oxigênio não ocasionou mudanças significativas nas respostas dos analitos, independentemente da estrutura dos

compostos. Mas para evitar a formação de depósitos carbonáceos na cela de detecção, a pressão de oxigênio foi mantida em 69 kPa.

1.3.3 Potencialidade da calibração independente de composto

A calibração independente de composto (CIC) é um dos grandes atrativos da detecção por emissão atômica, pois permite a utilização de um único padrão para a quantificação de uma série de compostos. Como pode ocorrer diferenciação dos elementos durante o processo de injeção e atomização dos compostos, a CIC deve ser investigada para cada grupo de compostos/elementos de interesse. Com o objetivo de verificar a aplicação da CIC na análise de compostos nitrogenados foram construídas curvas analíticas nas linhas de emissão do C (193 nm) e N (174 nm e 388 nm). Os valores correspondentes a inclinações, interceptos, bem como correlações observadas nas curvas analíticas de compostos nitrogenados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1: Valores de inclinação, intercepto e correlações observadas nas curvas analíticas de compostos nitrogenados

Composto	MM (g mol ⁻¹)	C 193 nm			N 174 nm			N 388 nm		
		a	b	r	a	b	r	a	b	r
ACN	41,0	835	2725	0,991	65,3	47,9	0,995	147,3	16,7	0,994
PRD	79,1	1095	3181	0,993	81,3	4,5	0,995	160,3	43,8	0,995
PIR	80,1	1073	2383	0,993	84,7	13,6	0,996	172,1	11,7	0,997
TMP	122,2	1279	3193	0,992	91,2	88,2	0,997	212,9	70,8	0,992
NNDMA	121,2	752	20360	0,994	73,0	114,4	0,994	200,4	131,5	0,996
NB	123,1	1055	13215	0,994	82,5	190,7	0,994	225,2	75,4	0,994
Cl NB	157,5	1177	14545	0,995	87,2	175,2	0,993	238,4	65,9	0,997

Onde: a: inclinação, b: intercepto, r: coeficiente de correlação, ACN: acetonitrila, PRD: piridina, PIR: pirazina, NNDMA: N,N-dimetilanilina, NB: nitrobenzeno e Cl NB: nitrobenzeno.

Os valores de inclinação para a piridina, pirazina e nitrobenzeno nas linhas de emissão do carbono (193 nm) e do nitrogênio (174 nm) sugerem que pode ser utilizada a calibração independente de composto na quantificação destas espécies. O mesmo não pode ser observado na banda de emissão do N 388 nm. Nesta linha a sensibilidade aumenta com o aumento da massa molecular do composto. A única discrepância ocorre entre a trimetilpirazina e a N,N-dimetilanilina. Além disto, como a linha de N em 388 nm monitora emissões da espécie molecular CN, a relação C : N presente no analito também influencia o processo de detecção. Assim, como mostrado na Tabela 1, melhores sensibilidades são observadas em analitos com relação C : N maiores, como o nitrobenzeno e o p-cloro-nitrobenzeno.

Segundo Stevens e Borgerding [10] e Anderson [23] observa-se uma discriminação baseada na volatilidade dos analitos, quando é considerada a ordem de eluição dos compostos. Os compostos mais retidos na coluna, os quais são menos voláteis, mostram um decréscimo pronunciado no fator de resposta. Portanto, de acordo com Stevens e Borgerding [10], a volatilidade e a estrutura do padrão de calibração devem ser similares aos compostos de interesse. Estas observações

ênfatizam a necessidade de consideração dos parâmetros cromatográficos para a utilização da CIC no sistema GC-AED.

Com base nos resultados mostrados neste capítulo, verificou-se a necessidade de otimização de parâmetros como a pressão de hélio na cavidade do plasma, a pressão de hélio de sustentação do plasma e a pressão de gases reagentes para cada conjunto de linhas monitoradas. Isto, porque cada faixa de comprimento de onda monitorado requer condições diferentes de detecção e de adição de gases ao plasma. Além disto, estudos nas bandas de emissão do N mostraram que é possível a utilização da calibração independente de composto, mas que os analitos envolvidos devem apresentar estruturas similares e perfis cromatográficos semelhantes, para que não ocorra discriminação dos mesmos durante o processo de injeção das amostras.

CAPÍTULO 2 - Determinação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED e HS-SPME-GC-ITMS

2.1 Introdução

2.1.1 A química dos aromas

Os aromas característicos de alimentos são freqüentemente gerados durante o processamento por uma sequência de reações químicas de precursores sem odor [45]. O processamento dos alimentos leva a mudanças nos carboidratos, proteínas, gorduras ou substâncias fisiologicamente ativas, como aminoácidos ou vitaminas, de acordo com a temperatura-tempo de tratamento do produto. Proteínas e aminoácidos podem se ligar ou decompor, substâncias nutricionais como vitaminas podem ser destruídas ou podem reagir com outros ingredientes durante a torração. Compostos provenientes da reação entre carboidratos e aminoácidos, são formados como precursores da reação de Maillard. Gorduras podem estar envolvidas quimicamente

na formação de aminas heterocíclicas, por geração de radicais livres via oxidação de lipídios ou por participação na reação de Maillard. Estas reações podem resultar num aumento dos produtos da reação de Maillard, como as alquilpirazinas e as piridinas. Oligossacarídeos podem se decompor hidroliticamente ou caramelizar. Todas as reações contribuem para a mudança nas propriedades originais do produto como cor, textura, aroma e valor nutricional [46, 47].

As características do aroma são fortemente dependentes da constituição da amostra. As proteínas podem afetar a volatilidade por adsorção física reversível dos compostos voláteis, via interações de van der Waals e/ou ligações químicas covalentes e eletrostáticas. Carboidratos como os mono e dissacarídeos podem causar um aumento na volatilidade dos compostos, enquanto polissacarídeos podem suprimir a volatilidade de compostos como resultado de interações moleculares não-específicas. Lipídios têm efeito na partição de compostos voláteis entre as fases aquosa e gasosa. Em geral, um aumento no teor de lipídios resulta em um decréscimo no número de constituintes do aroma. A influência de lipídios na volatilidade específica de compostos depende principalmente de suas propriedades lipofílicas e hidrofílicas [48].

No aroma de líquido de cacau foram identificados 3-metilbutanal, ácido acético e alquilpirazinas. Dentre os voláteis de manteiga de cacau foram identificadas 62 alquilpirazinas, sendo 57 presentes na manteiga do cacau torrado e 27 na manteiga do cacau não torrado [49]. Outros estudos têm demonstrado a presença de mais de 600 compostos voláteis em cacau e derivados, principalmente alquilpirazinas, ésteres, aminas, amidas, ácidos e hidrocarbonetos, além de 3-metilbutanal, β -linalol e dimetildissulfeto que também contribuem para o aroma destes produtos [50-53]. Os compostos heterocíclicos de nitrogênio são os principais constituintes do aroma destes produtos [49, 50].

Em amostras de chocolate foram observados, antes e após o processamento da amostra, compostos como 3-metilbutanal, dimetildissulfeto, 2,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, benzaldeído, 2,3,5-trimetilpirazina, benzenoacetaldeído, tetrametilpirazina, β -linalol e ácido acético. A presença de grupos etila em algumas alquilpirazinas sugere a

rota de síntese de compostos responsáveis pelo aroma do chocolate a partir da alanina e/ou acetaldeído [50]. Aldeídos e cetonas são grandes constituintes do aroma de chocolate sendo produtos típicos da oxidação de lipídios. Ácidos graxos insaturados sofrem reações de oxidação não-enzimáticas resultando na formação de hidroperóxidos. Estes hidroperóxidos são então oxidados a aldeídos e cetonas [54]. A reação entre lisina e treonina com hidroperóxidos provenientes do ácido linoléico prejudica o aroma e/ou diminui o valor nutritivo do produto além de causar envelhecimento e endurecimento do mesmo [47]. Já compostos sulfurados, como dimetildissulfeto, podem ser formados pelo aquecimento de β -lactoglobulina [54].

Em carnes bovina e de carneiro, o aroma tem sido atribuído à presença de alquilpirazinas, alquilpiridinas, alquiltióis e compostos carbonílicos [55]. Em amostras de carne de carneiro cozida foram observados compostos voláteis formados via reação de Maillard incluindo compostos nitrogenados e sulfurados, como as alquilpirazinas, tiofenos e tiazóis, bem como furanonas e furfurais. Compostos não heterocíclicos como os aldeídos 2- e 3-metilbutanal e benzenacetaldéido, alcanodionas e hidroxicetonas são também produtos da reação de Maillard, bem como dissulfetos alifáticos e furanos. Dentre os compostos identificados em carne de carneiro cozida pode-se citar o 3-metilbutanal, benzaldeído, benzenoacetaldéido, etilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina, dimetildissulfeto [56].

Estudos têm demonstrado a presença de furanos, pirróis, tiofenos, piridinas e alquilpirazinas no aroma do café. Foram identificadas 81 alquilpirazinas no aroma do café, cuja concentração é dependente das condições de tempo e temperatura do tratamento térmico [57]. Ryan *et al.* [58] observaram a presença de 2-metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, etilpirazina, 2,3-dimetilpirazina e trimetilpirazina em amostras de *headspace* (espaço confinante) de café torrado, sendo estes compostos os maiores responsáveis pelo perfil aromático do café. No malte algumas alquilpirazinas encontradas foram 2-metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina e trimetilpirazina [59].

Benzenacetaldéido foi observado em amostras de soja, sendo sua presença atribuída à oxidação de lipídios. Outros compostos observados foram o 3-metilbutanal (proveniente da degradação da leucina), dimetildissulfeto (proveniente

da degradação térmica da cisteína ou metionina), limoneno, além das alquilpirazinas, metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina e 2,6-dimetilpirazina [51, 60, 61]. As alquilpirazinas, 2-metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina e tetrametilpirazina foram identificadas em amostras de óleo de soja após torração da soja a 130 °C, 150 °C ou 170 °C durante 15 min, sendo a 2,5-dimetilpirazina o constituinte responsável pelo odor agradável do óleo [61]. Já em amostras de óleo de oliva foi observado somente a presença de aldeídos como o 3-metilbutanal, cetonas, ésteres e álcoois, além do ácido acético [62].

As alquilpirazinas 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina e trimetilpirazina foram caracterizadas em amostras de trigo, com concentrações dependentes do pH durante o processamento do produto [63]. Em leite em pó os compostos ácido acético, dimetildissulfeto e as alquilpirazinas, 2,6-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, etilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, e trimetilpirazina também foram observados [64].

Compostos como hexanal, metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina e trimetilpirazina foram identificados no aroma de amendoim torrado [65]. Compostos como linalol, ácido acético e benzenacetaldéido foram observados no aroma de suco de fruta (pêra e pêssego) [66].

2.1.2 Alquilpirazinas

Alquilpirazinas são compostos heterocíclicos de nitrogênio como mostrado na Figura 8. Elas são constituintes-chave do aroma de alimentos torrados, cozidos e fritos como café [22, 56], carnes [6, 56], malte de sorgo [59], soja [50, 57], trigo [63], amendoim [65], óleo de soja [67], mosto de vinho [68], cacau e derivados [14, 49, 50, 69], dentre outros.

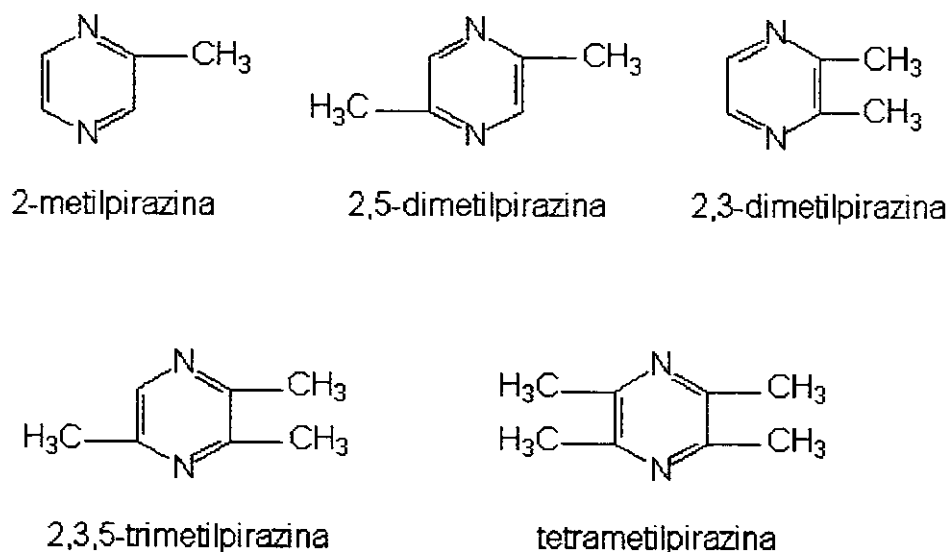


Figura 8: Estruturas de algumas alquilpirazinas.

As reações de formação de alquilpirazinas nos alimentos, conhecidas coletivamente como reações de Maillard [70], têm sido extensamente estudadas e verificou-se que elas ocorrem através de reações não-enzimáticas, onde açúcares reagem com aminas dando origem a intermediários α -aminocarbonílicos. A autocondensação dos compostos α -aminocarbonílicos, com desidratação (perda de duas moléculas de água) e oxidação (perda formal de H₂) produz as alquilpirazinas [57, 68]. Alguns dos compostos carbonílicos intermediários da reação entre a glicose e os aminoácidos são a 4-hidroxi-3(2H) furanona, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3(2H)-furanona e 4-hidroxi-2(ou 5)-etil-5(ou 2)-metil-3(2H)-furanona, que geram o cátion radical pirazina por interação com a glicina [71]. Compostos α -aminocarbonílicos podem produzir alquilpirazinas mono-substituídas através da dimerização com α -aminoacetaldeído seguida por oxidação, podendo gerar também pirróis através da condensação aldólica com acetaldeído [72]. Um exemplo de rota de formação de alquilpirazinas é mostrada na Figura 9.

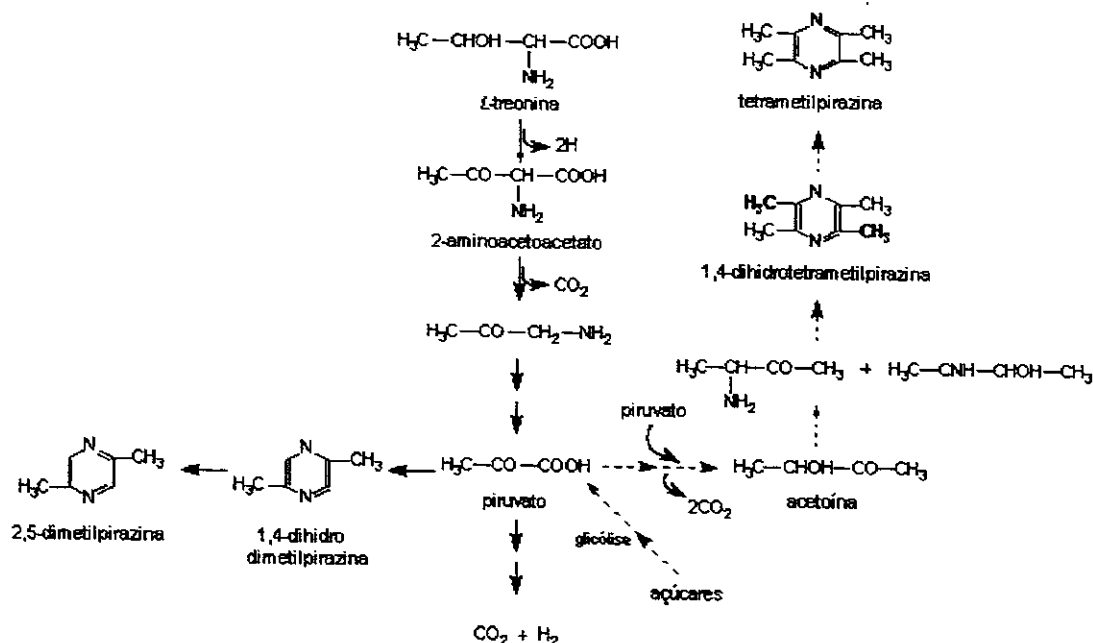


Figura 9: Rota de formação da 2,5-dimetilpirazina e da tetrametilpirazina [67].

Em temperaturas baixas a reação entre açúcares e aminoácidos forma lentamente o intermediário ditetrahidroxibutylpirazina, o qual sofre condensação, fragmentação e clivagem até a formação das alquilpirazinas. Em altas temperaturas, o rearranjo e a clivagem de açúcares resulta na formação de fragmentos hidroxicarbonila e dicarbonila, os quais podem condensar com aminoácidos para formar as alquilpirazinas [69]. Os aminoácidos agem como precursores de compostos quinolínicos servindo como fonte de nitrogênio na formação de alquilpirazinas, sendo o rendimento da reação dependente do tipo de aminoácido [46]. No caso da soja, o nitrogênio usado na formação de alquilpirazinas vem da degradação térmica de proteínas que ocorre em temperaturas acima de 190°C . Em produtos processados de soja a formação de alquilpirazinas pode ocorrer em temperaturas abaixo de 190°C . Além dos açúcares, outros compostos como glicerol, acetaldeído, glioxal, 2,3-butanodiona, hidroxiacetona e glicosamina também podem ser precursores de alquilpirazinas [69].

Alguns estudos têm mostrado que produtos de degradação da L-serina dão origem a açúcares, que por sua vez geram metilpirazinas. Além das alquilpirazinas, a

degradação térmica de L-serina (em temperaturas de 180 °C a 360 °C) produz uma variedade de compostos heterocíclicos como metilpirróis e etilpirróis, pirrolilalcanóis e alguns compostos heterocíclicos condensados [72].

Reações de Maillard entre pentoses e cisteína ou sulfeto de hidrogênio são muito importantes para o aroma de carnes. A enolização de produtos da reação entre carboidratos e aminoácidos na reação de Maillard é dependente do pH e a formação de compostos dicarbonílicos é mais pronunciada em condições alcalinas. Em geral, compostos dicarbonílicos como a 2,3-pentanodiona e a 2,3-butanodiona são intermediários importantes na formação de compostos voláteis de carnes. Em pH baixos estes compostos dicarbonílicos podem reagir com a cisteína ou com o sulfeto de hidrogênio levando à formação de tiocetonas. A mudança de pH também induz a formação de alquilpirazinas. Em condições ácidas, foi verificado uma inibição na formação destes compostos. A formação de outras classes de compostos como dissulfetos, tiofenos, tiazóis, furanos, compostos sulfurados cíclicos também são dependentes do pH da amostra [51, 69].

Além de serem constituintes do aroma de uma grande variedade de alimentos, as alquilpirazinas estão envolvidas também nas reações de formação de quinolinas, através da condensação da creatinina e do aldeído. A formação destes compostos é dependente da cinética da reação de Maillard [46].

Alquilpirazinas são responsáveis por diferentes características de aromas, de acordo com a natureza do substituinte alquila. São responsáveis também pelo sabor característico de nozes, pela aparência de torrado e das tonalidades tostadas. O aroma e desenvolvimento de cor durante a reação de Maillard estão relacionados à temperatura, tempo, tipo de alimento e presença de água (umidade) durante o processamento [54]. A formação da pirazina e 2-metilpirazina na reação de Maillard alcança um máximo com altas condições de umidade. Entretanto, este máximo é altamente dependente da temperatura [46]. A temperatura parece ser mais importante do que o tempo, na formação de aminas heterocíclicas. Muitos estudos usando sistemas modelos têm sido realizados em temperaturas variando entre 125 °C e 300 °C [46].

A 2,5-dimetilpirazina e a tetrametilpirazina são as principais alquilpirazinas detectadas em cacau e alimentos fermentados à base de soja contribuindo significativamente para o seu aroma [67]. Além de presentes em muitos alimentos, alguns estudos têm mostrado a formação de alquilpirazinas a partir de soja submetida à fermentação com *Bacillus subtilis*. Neste caso, foi verificado que a treonina é precursora da 2,5-dimetilpirazina e a acetoína e a amônia precursoras da tetrametilpirazina [67].

A fermentação do cacau é fundamental não somente para a formação da fração volátil (álcoois, ésteres e ácidos graxos) mas também para o desenvolvimento de precursores do aroma do chocolate (aminoácidos e açúcares). O cacau é seco para minimizar a formação de mofo e reduzir o nível ácido e adstringente das amêndoas por decréscimo da quantidade total de polifenóis. Através das reações de Maillard que ocorrem nas amêndoas de cacau torradas, precursores do aroma formados durante a fermentação de compostos são convertidos em duas classes principais, as alquilpirazinas e os aldeídos [50]. Alguns autores têm identificado 95 alquilpirazinas no aroma de cacau, com concentrações dependendo do tempo e da temperatura do tratamento térmico. Genótipo, origem do cacau, bem como os processos de estocagem, fermentação e secagem também influenciam nos teores de alquilpirazinas [54, 73]. Além disto, a presença de umidade e de polifenóis no líquido de cacau diminui a disponibilidade de alquilpirazinas devido à ligação destes compostos. Esta diminuição é dependente do tipo de pirazina [73, 74]

Alquilpirazinas são responsáveis também pelo aroma do café e do amendoim torrado, mas não de batatas *chips* devido à pequena quantidade encontrada nestas amostras [60].

Os teores de alquilpirazinas encontrados em óleo de soja variaram de 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ a 63 $\mu\text{g g}^{-1}$ conforme a temperatura de torração da soja e o tipo de alquilpirazina. Maiores teores de alquilpirazinas foram encontrados em amostras de soja submetidas a torração a 170 °C, sendo que a 2,5-dimetilpirazina apresentou o maior teor, 63 $\mu\text{g g}^{-1}$. Os menores teores observados na temperatura de 170 °C foram da pirazina e tetrametilpirazina, 0,6 $\mu\text{g g}^{-1}$ e 1,6 $\mu\text{g g}^{-1}$, respectivamente [61]. Segundo

Jung *et al.* [61], a ocorrência de alquilpirazinas no óleo de soja está diretamente relacionado ao aquecimento envolvido no tratamento e as alquilpirazinas são responsáveis pelo aroma associado ao óleo de soja muito utilizado.

Em amostras de café torrado verificou-se que a formação de metilpirazinas aumenta linearmente em relação à temperatura de torração alcançando um máximo de concentração em 185 °C ou 205 °C, dependendo da variedade agronômica, robusta ou arábica, respectivamente [57]. Na variedade arábica as alquilpirazinas mais abundantes são 2-metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina e 2,6-dimetilpirazina [57].

Abegaz *et al.* [65] mostraram que o tempo de estocagem do produto tem um efeito significativo no teor de alquilpirazinas em amostras de amendoim torrado. Em muitos casos a concentração de alquilpirazinas diminui com o tempo de estocagem, como observado para a metilpirazina, cuja concentração variou de 101 ng g⁻¹ para 42 ng g⁻¹ de 0 a 52 semanas de estocagem e para a 2,5-dimetilpirazina que diminuiu de 124 ng g⁻¹ para 80 ng g⁻¹ [65].

2.1.3 Cupuaçu

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, Spreng) é uma árvore nativa da Amazônia, sendo uma cultura comercial de grande importância local. As frutas têm uma polpa amarela clara com sabor ácido e aroma forte, que é consumida como suco, sorvete e geléia [75]. Suas sementes são processadas de maneira similar ao cacau para produzir o chocolate de cupuaçu ou cupulate. Após colheita da fruta, as sementes são separadas da polpa, secas e passam por um processo de fermentação. A semente seca fermentada é então torrada e após retirada da casca e desgerminação da amêndoa, o cotilédone obtido é finamente moído. O produto obtido é chamado líquido de cupuaçu e é a base do chocolate de cupuaçu [76]. Pelo fato do cupuaçu ser da mesma família que o cacau é esperado que, a semelhança deste, ocorra a formação de alquilpirazinas durante o processo de torração das amêndoas.

2.1.4 Técnicas para extração e pré-concentração de compostos orgânicos voláteis associados a aromas

Muitas técnicas foram desenvolvidas para tornar o *screening* de aroma fidedigno, como por exemplo as baseadas na destilação a vácuo, métodos de extração (extração e destilação simultâneas – SDE – *Simultaneous Distillation Extraction*) ou técnicas de *headspace* estático (SHS – *Static Headspace*) e dinâmico (DHS – *Dinamic Headspace*) seguida de dessorção térmica [48].

A destilação a vácuo é uma das ferramentas de isolamento de voláteis em alimentos mais usadas, sendo descrita por vários autores em uma ampla variedade de amostras. Esta técnica possibilita o isolamento de compostos com volatilidade intermediária, minimizando a geração de artefatos, mas com a desvantagem de possíveis perdas de compostos voláteis durante o processo. Isto faz com que os resultados obtidos necessitem ser comprovados por outros métodos, como a extração e destilação simultâneas (Métodos de Likens-Nickerson) ou a extração por *headspace* estático. A extração e destilação simultâneas possibilita a liberação de voláteis, mas compostos instáveis podem se degradar e artefatos podem ser gerados. Usando o sistema Likens-Nickerson foi observada a formação de alquilpirazinas durante o processo de extração de amostras de cereais [48, 63, 67, 69]. Um esquema deste dispositivo é mostrado na Figura 10.

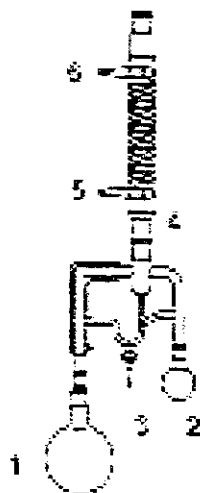


Figura 10: Dispositivo Likens-Nickerson usado para extração e destilação simultâneas [77]. Onde: 1: frasco de amostra, 2: frasco com solvente, 3: coleta do extrato, 4: corpo do destilador, 5: entrada de água e 6: saída de água.

Apesar de muito utilizados, métodos de destilação para extração de voláteis consomem tempo, requerem uma considerável quantidade de solvente orgânico, espaço no laboratório e segurança. Como as caracterizações de compostos constituintes do aroma não preconizam a repetibilidade e exatidão dos métodos de extração, muitas distorções podem ser observadas entre análises podem ser observadas [50].

A técnica de *headspace* dinâmico também é muito popular na análise de compostos voláteis em alimentos. Quando um gás de *stripping* inerte é borbulhado em amostras líquidas, a técnica é conhecida como *purge-and-trap*. A amostra deve ser aquecida por um aquecedor elétrico ou em microondas para facilitar a liberação dos compostos voláteis. Os voláteis desprendidos são então coletados em sorventes sólidos ou em solventes à temperatura ambiente ou a baixas temperaturas. Algumas vantagens da utilização de sorventes sólidos são a análise de todo material retido no *trap*, a não utilização de solvente e baixa geração de resíduos [78]. Dentre os compostos usados como sorventes no *trap* os mais comuns são: Tenax TA (polímero do óxido 2,6-difenil-p-fenileno), Chromosorb 106, carbonos grafitizados (Carbotrap B,

C) e peneiras moleculares de carbono (Carbosieve S-III, Carboxen 1000, Carboxen 1003, Spheroorb, Anasorb). Dentre todos os sorventes citados acima, o mais popular é o Tenax TA, devido a sua alta estabilidade térmica (até 450 °C), sua baixa retenção de água e baixa sangria [48, 57, 63, 79].

2.1.5 Microextração em Fase Sólida (SPME)

A microextração em fase sólida (SPME - *Solid Phase Microextraction*) foi introduzida em 1990 por Pawliszyn *et al.* e combina a extração, pré-concentração e introdução da amostra em uma única etapa. Ela oferece várias vantagens para o preparo de amostras incluindo a redução do tempo total de análise por amostra, menor manipulação/tratamento, eliminação de solventes orgânicos, perda reduzida de analito, simplicidade, baixo custo por amostra, possibilidade de implementação de procedimento analítico *on-line*, reuso da fibra, além de permitir a manipulação de pequenos volumes de amostra [79-89]. Como a fibra por SPME por si só age como um amostrador passivo, equipamentos como bombas e controladores de fluxo são desnecessários para amostragem em campo. Adicionalmente, a secagem da amostra não é necessária devido a natureza hidrofóbica e a pequena capacidade de extração do recobrimento [83].

As fibras de SPME consistem de um pedaço de sílica fundida de cerca de 1 cm de comprimento recoberta com uma fase extratora. Esta fibra é colocada em contato com a amostra. O polímero é capaz de extrair alguns dos compostos presentes na amostra de acordo com a afinidade do composto pela fibra, separando-os da matriz e concentrando-os. Então, os compostos extraídos são diretamente transferidos para o injetor do cromatógrafo, onde eles são termicamente desorvidos [68, 80, 82, 83, 85, 88, 90-95]. O procedimento é rápido, simples e bastante sensível, caracterizado por perdas reduzidas na transferência da solução para o injetor do cromatógrafo a gás [93]. Para a proteção da fibra, ela é montada em um dispositivo

semelhante a uma seringa, conhecido como aplicador ou *holder*. A fibra e o dispositivo usados para a extração por SPME são ilustrados na Figura 11.

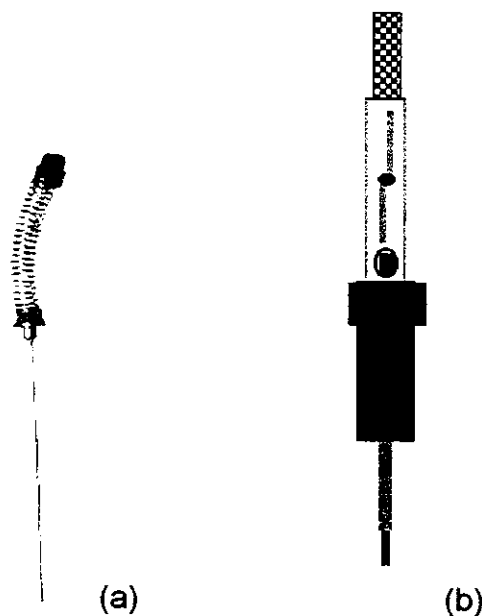


Figura 11: Fibra (a) e aplicador (*holder*) (b) utilizados para a extração por SPME.

Em termos do mecanismo e princípios de extração a principal diferença entre a SPME e as técnicas de extração convencionais é o fato da extração dos analitos não ser exaustiva [83, 94]. Ela é baseada na distribuição dos diferentes analitos sobre a matriz, o seu *headspace* e o recobrimento da fibra. A cinética do processo de extração é governada pela difusão no meio e/ou recobrimento polimérico da fibra [83, 96, 97]. Através do conhecimento da relação de equilíbrio entre o polímero e a matriz, a concentração do analito na amostra pode ser determinada [90, 98]. Fora da condição de equilíbrio, as variações nas condições de agitação, tempo de amostragem e posição da fibra no frasco de amostragem têm uma influência significativa na precisão dos métodos de SPME, como observado por Bao *et al.* [87].

A teoria da SPME tem sido largamente discutida na literatura e tem sido observado que a análise quantitativa por SPME é possível fora das condições de equilíbrio, desde que as condições de tempo de sorção e agitação se mantenham constantes [84]. Para realizar a análise quantitativa, a quantidade de amostra e o

volume do *headspace* devem ser escolhidos para a obtenção de uma relação linear entre a quantidade de analito sorvido na fibra e a concentração inicial do analito na amostra e também para prevenir o efeito de competição entre os vários compostos voláteis [84]. Fibras de SPME compostas por polímeros líquidos, como polidimetilsiloxano, exibem uma faixa linear ampla. Sólidos adsorventes, como Carbowax/divinilbenzeno ou polidimetilsiloxano/divinilbenzeno apresentam uma faixa linear mais estreita, devido ao número limitado de sítios ativos na superfície. Entretanto, esta faixa pode ser expandida se as fibras são usadas em matrizes limpas ou com tempos de extração curtos. Em alguns casos, quando o analito tem uma afinidade extremamente alta pelo recobrimento, a saturação pode ocorrer mesmo em baixas concentrações de analito [95].

Dentre as muitas aplicações descritas de SPME podem-se destacar: voláteis em óleo de oliva [62], voláteis em suco de fruta [66], compostos medicinais [79], sulfetos e tióis [83], ácidos graxos em queijo [84], isoborneol, 2-alkil-3-metoxialquilpirazinas e 2,4,6-tricloroanisol em águas [88], pesticidas organofosforados [82, 85, 91], álcoois e ésteres em cerveja [99], tricloroetileno, tetracloroetileno, tolueno e benzeno [100], organoestânicos [93, 94, 101], sulfurados em cerveja [80, 102], pesticidas organoclorados [81, 103, 104], organoarsênicos [105], compostos orgânicos de chumbo [93, 94, 98, 106], aldeídos em águas [87] e sangue [107], quinonas [108], voláteis em arroz [109], voláteis em carne bovina [110], óleos essenciais [111], particulados em fumaça de cigarro [112], metilxantinas em fluidos biológicos [113], anfetaminas e fenciclidinas em urina [114], tetramina em sangue [115], dentre outras.

Há dois tipos básicos de extração em SPME, extração direta e extração através do *headspace*. Na extração direta a fibra é imersa diretamente na amostra onde os analitos são extraídos. Uma agitação eficiente propicia atingimento rápido do equilíbrio. Para amostras gasosas, a convecção natural do ar é suficiente para facilitar um equilíbrio rápido. No modo de *headspace*, os analitos primeiro difundem da matriz para a fase gasosa e então da fase gasosa para o recobrimento da fibra. Esta técnica é especialmente indicada para análises de matrizes altamente complexas, que podem danificar a fibra. A velocidade da extração pode ser

aumentada não só pelo uso de uma agitação eficiente, como também pelo aumento da temperatura de extração ou por ambos. Para a determinação de analitos com alta volatilidade em matrizes sujas, é indicada a proteção da fibra de SPME por membranas permeáveis é indicada [78, 95, 116, 117].

Desde a introdução da SPME, diferentes tipos de recobrimentos de fibras têm sido desenvolvidos. Os recobrimentos das fibras podem ser classificados em dois grupos: polímeros líquidos puros como polidimetilsiloxano (PDMS) ou poliacrilato (PACR), e filmes mistos contendo polímeros líquidos e partículas sólidas adsorventes dispersas como Carboxen-PDMS (CAR), divinilbenzeno-PDMS (DVB), Carbowax-DVB e divinilbenzeno-Carboxen-PDMS. Os processos de extração envolvidos na SPME são a partição e a adsorção e dependem da natureza do recobrimento [90]. Filmes mistos recobrindo matrizes poliméricas extraem os analitos por adsorção. Recobrimentos líquidos extraem os compostos pelo processo de partição e são geralmente utilizados para a extração no equilíbrio de compostos orgânicos voláteis [78, 86, 117, 118]. A Tabela 2 apresenta as fibras de SPME disponíveis comercialmente. O máximo de espessura de filme observado é de 100 μm para a fibra de PDMS.

Tabela 2: Algumas fibras para SPME disponíveis comercialmente [78]

Recobrimento (espessura do filme)	Aplicação indicada
PDMS (7 μm)	Compostos voláteis
PDMS (30 μm)	Compostos apolares semivoláteis
PDMS (100 μm)	Compostos apolares com alta massa molecular
Poliacrilato (85 μm)	Compostos polares semivoláteis
PDMS/DVB (65 μm)	Compostos polares voláteis
Carbowax/DVB (65 μm)	Compostos polares
Carboxen/PDMS (75 μm)	Gases e compostos de baixa massa molecular
DVB/Carboxen/PDMS (50/30 μm)	Compostos voláteis e semivoláteis de aroma

PDMS puro é fortemente hidrofóbico e foi originalmente proposto para a extração de poluentes em matrizes aquosas. Poliacrilato (PACR) é o mais polar dos recobrimentos poliméricos disponíveis comercialmente. Carboxen é uma peneira molecular de carbono contendo macro-, meso- e microporos e é usada em combinação com PDMS. O tamanho dos poros não permite que moléculas grandes entrem nos microporos (onde as interações são mais fortes), aumentando a eficiência de extração de moléculas pequenas. Na fibra PDMS/DVB, o polímero sólido divinilbenzeno apresenta poros maiores que Carboxen, adaptando-se melhor à extração de moléculas maiores. Na combinação DVB/Carboxen/PDMS, uma primeira camada de PDMS/Carboxen é coberta com uma segunda camada de PDMS/DVB. Moléculas pequenas, que apresentam um coeficiente de difusão maior, alcançam a camada interna mais rapidamente, onde são adsorvidos pelo Carboxen. As moléculas mais pesadas são retidas na camada externa contendo DVB. A etapa de dessorção é facilitada com esta configuração. Porém, estas fibras são difíceis de serem produzidas e rachaduras visíveis no recobrimento são observadas após sua

utilização. A última fibra disponível, Carbowax/DVB é a mais polar dentre as fibras de sólidos adsorventes dispersos em matrizes poliméricas [78, 116].

A capacidade de extração das fibras é dependente da espessura do filme e do tamanho e características do analito [117]. A produção de fibras com alta capacidade extratora é restrita devido a problemas mecânicos e à estabilidade térmica dos filmes. Para aumentar a quantidade extraída do analito de interesse, a extração pode ser realizada com o uso de filmes com polaridade similar ao analito ou pela adição de eletrólitos à amostra aquosa, sendo o sucesso desta última dependente do analito [103].

Nas fibras que extraem pelo processo de adsorção ocorre competição entre os analitos quando estes estão em altas concentrações, impedindo em muitos casos a quantificação. Em amostras contendo uma mistura complexa de compostos, a competição molecular pelos sítios ativos da fibra durante a extração é inevitável. Esta competição é regida por energias de ligação diferentes associadas a interações fibra-composto específicas, as quais podem excluir os compostos de interesse [62]. Uma alternativa é o uso de tempos de extração pequenos, antes do equilíbrio, onde a massa extraída depende do processo de difusão dos analitos pelas fases [118].

Como os coeficientes de partição fase extratora/ar para muitos compostos orgânicos voláteis são relativamente pequenos para os materiais de recobrimento de fibra disponíveis comercialmente, os limites de detecção muitas vezes não são satisfatórios. Isto tem incentivado o desenvolvimento de fibras com novos recobrimentos [83].

A natureza química dos analitos determina o tipo de polímero usado na extração. A seleção da fibra é baseada primeiramente na polaridade e volatilidade dos compostos alvo, podendo fornecer seletividade e eficiência à extração [95, 99, 117].

A eficiência de extração em SPME é maximizada quando é atingido o equilíbrio entre a matriz da amostra e o recobrimento da fibra. O tempo de equilíbrio é dependente do tipo de analito, amostra, modo de extração e recobrimento da fibra [62, 95, 99]. A quantidade de analitos extraídos aumenta com o aumento da razão volume da fibra/volume de amostra. A extração completa pode ser alcançada para

volumes pequenos de amostras quando as constantes de distribuição dos compostos de interesse são grandes [95].

A necessidade de *screening* rápido, de monitoramento de amostras ambientais e humanas, investigações clínicas e amostragem *in vivo* tem feito com que a SPME também seja aplicada a análises de campo. Acoplada à cromatografia gasosa ela tem a vantagem de eliminar a necessidade de estocagem e transporte da amostra ou do amostrador [118]. A proteção da fibra é necessária em todo o processo de preparação da amostra/amostragem, estocagem e período de transporte, devido ao risco de dano [79, 119]. Como analitos orgânicos podem dissolver em material polimérico, vedar a agulha com um septo destes materiais só é eficiente para isolamento por períodos de tempo curtos [78]. Na amostragem em campo a estocagem da fibra a baixas temperaturas tem se mostrado eficiente na preservação da integridade dos compostos extraídos. Processos de absorção/partição são exotérmicos e o decréscimo na temperatura favorece a absorção/partição dos analitos na fibra, caracterizada por uma constante de distribuição maior [118].

A repetibilidade dos resultados é um fato crucial nas análises por SPME devido ao seu caráter de equilíbrio. Tem sido estabelecido que a agitação pode ser o fator que mais influencia na repetibilidade das extrações [98]. Para análises através do *headspace*, a agitação deve ser vigorosa e sua taxa deve ser mantida ao longo do experimento. Precisão de até 15% tem sido aceitas para as análises por SPME [98, 120]. Como o volume da fase extratora é extremamente pequeno, da ordem de 0,5 μL para a fibra PDMS 100 μm , irregularidades e falta de homogeneidade do recobrimento podem causar efeito significativo na precisão. Além disto, o uso repetido da fibra de SPME leva à degradação da mesma. A falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos com fibras de lotes diferentes é freqüentemente observada [76, 78, 95, 119].

2.2 Materiais e métodos

Instrumental: Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent) com detector por emissão atômica G2350A (Agilent). Colunas: Carbowax 20M (polietilenoglicol - 25 m x d_i = 320 μ m x d_f = 0,3 μ m); HP-5 (5% polidifenil, 95 % d polidimetilsiloxano - 30 m x d_i = 250 μ m x d_f = 0,25 μ m), HP-1 (polidimetilsiloxano - 25 m x d_i = 320 μ m x d_f = 0,17 μ m). Cromatógrafo a gás com detector de massas com trapeamento de íons (GC-ITMS) Saturn 2100D (Varian) e coluna CP-Sil 8 CB (5% difenil, 95 % polidimetilsiloxano - 30 m x d_i = 250 μ m x d_f = 0,25 μ m). Agitadores magnéticos digitais (Termolyne, Dubuque - USA). Banho termostatzado Polystat. *Holder* para SPME (Supelco).

Materiais: Fibras de SPME recobertas com: CAR (Carboxen – polidimetilsiloxano (PDMS) 75 μ m), DVB (PDMS – divinilbenzeno 65 μ m), P100 (PDMS 100 μ m) e PACR (poliacrilato 85 μ m) (Supelco, Bellefonte - USA). Frascos de vidro de 4 e 16 mL com tampa de plástico e septo de silicone/teflon (Wheaton, Milville – USA).

Reagentes: 2-metilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,6-dimetilpirazina, etilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina e tetrametilpirazina (Aldrich, Milwaukee – USA). Cloreto de sódio e acetona (Synth, Rio de Janeiro - Brasil). Metanol (Tedia, Rio de Janeiro – Brasil). Metanol (Tedia, Rio de Janeiro – Brasil). Todos os reagentes apresentaram pureza superior a 98 %. Gases para operação do GC-AED: CH₄, He, O₂ e H₂ com grau de pureza 99,999% (White Martins, Rio de Janeiro – Brasil).

2.2.1 Ensaios preliminares de screening

Amostras: Amêndoas de cupuaçu fermentadas e secas passaram por condições diversas de torração como mostrado na Tabela 3. Após torração, foi feita a quebra da amêndoa para retirada da casca e desgerminação da mesma. O cotilédono obtido (resultado da peneiração em peneira de 2 mm) foi passado por um moinho estriado de cobre e depois por 2 vezes em um moinho cilíndrico resfriado com solução 2:1 de água e álcool (8-10 °C). Após moagem, as amostras foram acondicionadas em sacos de polietileno e guardadas em freezer para posterior análise. O tratamento da amostra foi realizado na Faculdade de Engenharia de Alimentos da UNICAMP.

Tabela 3: Condições de torração das amêndoas de cupuaçu

Amostra	Tipo de forno usado na torração	Tempo de torração (min)	Temperatura de torração (°C)
M1	Microondas	12	105
M2	Microondas	16	105
M3	Microondas	12	115
M4	Microondas	16	115
M5	Microondas	11,18	110
M6	Microondas	16,82	110
M7	Microondas	14	103
M8	Microondas	14	117
M9	Microondas	14	110
M10	Microondas	14	110
M11	Microondas	14	110
CO1	Convencional	53	150
CO2	Convencional	55	150
CO3	Convencional	57	150

Procedimento: A $(1,000 \pm 0,005)$ g de líquido de cupuaçu finamente moído foram adicionados 5 mL de solução saturada de NaCl, em frasco de vidro de 16 mL com

tampa de plástico e septo de silicone/teflon. A suspensão, sob agitação a 1200 rpm, foi termostatizada a 45 °C e o seu *headspace* extraído por 45 min com as fibras CAR, DVB ou P100. O material extraído foi imediatamente dessorvido, separado e detectado por GC-AED e GC-ITMS. As condições cromatográficas para ambos os sistemas foram: colunas HP-5 ou CP-Sil 8; temperatura do injetor: 250 °C; programação do forno: 40 °C → 10 °C min⁻¹ → 250 °C (1 min); injeção sem divisão; vazão nas colunas: 1,8 mL min⁻¹; faixa de massas monitorada: m/z= 40 a 500 (GC-ITMS); temperatura das linhas de transferência: 250 °C (GC-ITMS) e 270 °C (GC-AED); temperatura do “trap”: 150 °C (GC-ITMS). Nas análises por GC-AED foram monitoradas as linhas de emissão do N (174 nm e 388 nm), C (193 nm) e S (181 nm). As pressões dos gases de dopagem e de alimentação do plasma usados no sistema GC-AED são mostrados na Tabela 4 e foram determinados em estudos iniciais nas linhas de emissão do N usando a sistemática descrita no Capítulo 1.

Tabela 4: Pressões dos gases utilizados nas análises das alquilpirazinas em líquido de cupuaçu no sistema GC-AED

Variáveis	Pressão (kPa)	
	Banda de emissão N (388 nm)	Linhas de emissão N (174 nm), C (193 nm) e S (181 nm)
Cavidade do plasma	20	10
He de sustentação do plasma	207	69
O ₂	483	138
H ₂	207	34,5
CH ₄	345	-----

2.2.2 Otimização da metodologia para isolamento de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED

Após a identificação inicial dos principais constituintes voláteis das amostras, utilizando análises por GC-MS e extrações de uma série homóloga de alcanos (C₈-C₁₈) para determinação dos índices de Kovats, foi feita a otimização dos parâmetros fundamentais para a extração das alquilpirazinas nas amostras por SPME. Os ensaios foram realizados com extrações no *headspace* da amostra e análises com monitoramento das linhas de emissão N (174 e 388 nm) e C (193 nm). As análises foram realizadas com uma coluna HP-1; temperatura do injetor: 270 °C (fibra CAR) e 210 °C (fibra DVB); programação do forno: 50 °C (2 min) → 40 °C min⁻¹ → 150 °C → 25 °C min⁻¹ → 250 °C; vazão na coluna: 1,8 mL min⁻¹; injeção sem divisão; temperatura da linha de transferência e cavidade: 270 °C; temperatura da cavidade: 270 °C e pressões dos gases conforme mostrados na Tabela 4.

Foram adotados procedimentos de extração similares ao descrito no item 2.2.1. Amostras de líquido de cupuaçu dopadas com 400 ng das alquilpirazinas metilpirazina, 2,5-dimetilpirazina, 2,3-dimetilpirazina, 2,3,5-trimetilpirazina e tetrametilpirazina, foram usadas em todos os experimentos. Foram escolhidas estas alquilpirazinas pelo fato delas serem mais frequentemente observadas em amostras de cacau, amendoim e soja. Os processos de extração foram realizados em triplicata.

2.2.2.1 Seleção de fibra

Nesta otimização foram comparadas as fibras CAR e DVB (P100 foi eliminada após estudos preliminares). Para tal, $(0,700 \pm 0,005)$ g de amostra de líquido de cupuaçu dopadas com alquilpirazinas foi submetida à extração através do *headspace* durante 15 min sob agitação a 1200 rpm.

2.2.2.2 Efeito da massa de amostra processada

A 0,700 g; 1,000 g e 1,200 g de líquido de cupuaçu dopadas com alquilpirazinas foram adicionados 5,0 mL de solução saturada de cloreto de sódio. As extrações foram realizadas no *headspace* da amostra durante 15 min, sob agitação, com a fibra CAR.

2.2.2.3 Avaliação da força iônica do meio

Extrações de amostras com e sem adição de 5,0 mL de solução saturada de NaCl foram feitas com a fibra CAR. As extrações foram realizadas com $(1,000 \pm 0,005)$ g durante 15 min, sob agitação.

2.2.2.4 Influência da temperatura de extração

As temperaturas de extração testadas foram: $(25 \pm 3) ^\circ\text{C}$ (ambiente), $35 ^\circ\text{C}$ e $45 ^\circ\text{C}$. Todas as extrações foram realizadas sob agitação, com a fibra CAR durante 15 min, após adição de 5 mL de solução saturada de NaCl a $(1,000 \pm 0,005)$ g de amostra.

2.2.2.5 Perfil de extração

Utilizando a fibra CAR, $(1,000 \pm 0,005)$ g de amostra de líquido de cupuaçu foi extraída a $45 ^\circ\text{C}$, sob agitação, com tempos de extração variando entre 10 e 60 min.

2.2.3 Quantificação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu

As condições de extração das amostras de líquido de cupuaçu com a fibra CAR são descritas no item 2.2.1. As análises cromatográficas usaram uma coluna Carbowax 20M; temperatura do injetor: $230 ^\circ\text{C}$; vazão na coluna: $1,8 \text{ mL min}^{-1}$; injeção sem divisão; programação do forno: $50 ^\circ\text{C} \rightarrow 3 ^\circ\text{C min}^{-1} \rightarrow 90 ^\circ\text{C} \rightarrow 15 ^\circ\text{C min}^{-1} \rightarrow 200 ^\circ\text{C}$ (2 min); injeção sem divisão; temperatura da cavidade e da linha de transferência: $230 ^\circ\text{C}$; pressão do He de sustentação do plasma: 207 kPa; pressão da cavidade do plasma: 21 kPa; pressão H_2 : 207 kPa; pressão O_2 : 483 kPa e pressão CH_4 : 345 kPa.

Para verificar a linearidade de resposta das alquilpirazinas no detector por emissão atômica primeiramente foram testadas as duas linhas de emissão do N (174 e 388 nm) tendo sido selecionada a última. A quantificação das alquilpirazinas nas amostras de líquido de cupuaçu foi realizada por adição padrão em concentrações

variando entre $120 \mu\text{g g}^{-1}$ e $1700 \mu\text{g g}^{-1}$ de acordo com o teor de alquilpirazinas presentes nas amostras de líquido de cupuaçu.

2.3 Resultados e Discussão

2.3.1 Ensaios preliminares de screening

Exemplos de cromatogramas obtidos por extrações no *headspace* de amostras de líquido de cupuaçu nos sistemas GC-ITMS e GC-AED são mostrados na Figura 12. A identificação dos picos foi baseada na comparação dos espectros de massa obtidos com os existentes na biblioteca do aparelho e complementada com os índices de Kovats calculados a partir de análises de amostras dopadas com uma série homóloga de alcanos ($\text{C}_8\text{-C}_{18}$).

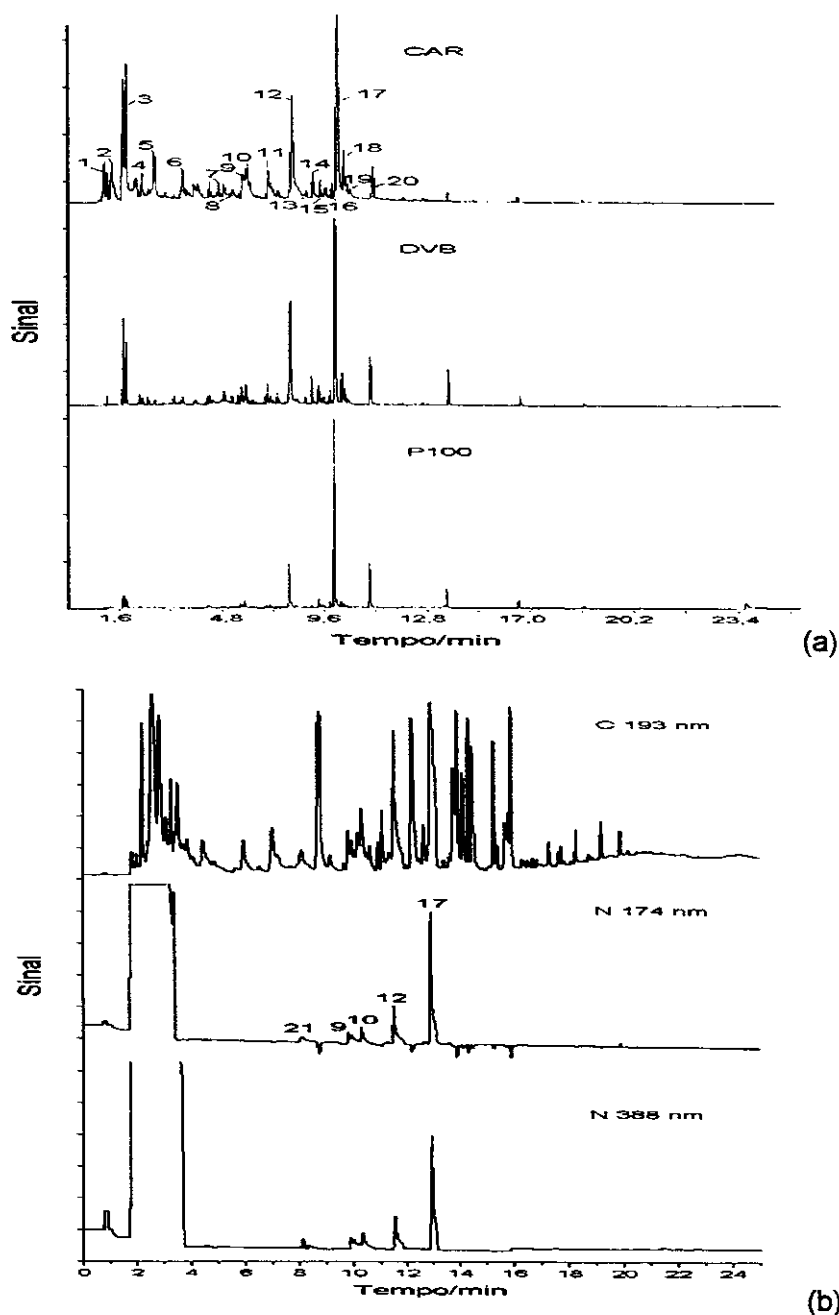


Figura 12: Cromatogramas obtidos após extração de líquido de cupuaçu por (a) HS-SPME-GC-ITMS e (b) GC-AED com fibra CAR. Identificação dos picos: (1) dimetilsulfeto, (2) ácido acético, (3) 3-metilbutanal, (4) 2,4,5-trimetil-1,3-dioxolano, (5) dimetildissulfeto, (6) butirato de etila, (7) 3,5-dimetil-3-hexanol, (8) 3-metil-2-butanona, (9) 2,5-dimetilpirazina, (10) 2,3-dimetilpirazina, (11) benzaldeído, (12) 2,3,5-trimetilpirazina, (13) limoneno, (14) 3-metilbutirato de butila, (15) benzenoacetaldéido, (16) 3-etil-2,5-dimetilpirazina, (17) tetrametilpirazina, (18) β -linalol, (19) 3-metilbutirato de 3-metilbutila, (20) 2,3,5-trimetil-6-etilpirazina e (21) 2-metilpirazina.

Um grande número de compostos voláteis de potencial impacto no aroma foram identificados no *headspace* do líquido de cupuaçu. Observou-se a presença de picos intensos nas linhas de emissão do nitrogênio correspondentes a tetrametilpirazina e 2,3,5-trimetilpirazina, além de outros congêneres.

Alguns compostos encontrados como butirato de etila, ácido acético, benzenoacetaldeído, limoneno e β -linalol já tinham sido identificados em polpa de cupuaçu [53, 121]. Alquilpirazinas como 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina e tetrametilpirazina, além do ácido acético, foram identificadas anteriormente em amostras de cacau submetidas a diferentes tempos de estocagem [69]. A estocagem do cacau reduz o teor de água da polpa diminuindo a fermentação alcoólica e a formação de ácido acético [69].

Além da caracterização dos compostos constituintes do aroma do líquido de cupuaçu possibilitada pela extração com diferentes recobrimentos de fibras de SPME pode ser visto que a quantidade de analitos extraídos com a fibra CAR é consideravelmente maior do que a quantidade extraída pelas demais fibras (Figura 12). A fibra CAR tem uma eficiência de extração maior, especialmente para compostos mais leves. A fibra DVB apresentou uma eficiência intermediária na extração de voláteis de líquido de cupuaçu e a fibra apolar P100 apresentou o pior desempenho.

No que se refere aos cromatogramas obtidos pelo sistema GC-AED verifica-se a maior detectabilidade deste quando comparado ao GC-ITMS, tendo sido possível a separação/detecção de um maior número de compostos na banda de emissão do carbono. Altas concentrações de carbono no plasma causam uma saturação no mesmo que se reflete no aparecimento de picos negativos na banda de emissão do N (174 nm), devido à supressão do sinal. Isto é observado porque as análises nas linhas de emissão do C (193 nm) e do N (174 nm) são realizadas simultaneamente. Outras interferências que podem ocorrer com a banda de emissão do N 174 nm são atribuídas à presença de constituintes do ar no sistema, que absorvem em comprimentos de onda abaixo de 200 nm. Estes fatos colaboram para a indicação de uso da banda de emissão do N 388 nm.

2.3.2 Otimização da metodologia para isolamento de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu por HS-SPME-GC-AED

A amostragem através do *headspace* foi escolhida para evitar que compostos pesados, não-voláteis sejam sorvidos na fibra. Além da formação de artefatos com o aquecimento no injetor do cromatógrafo, a sorção de compostos não voláteis no recobrimento da fibra levam à sua rápida degradação, sobretudo em amostras complexas como o líquido de cupuaçu, que possuem um alto teor de gordura [102].

2.3.2.1 Seleção de fibra

Na Figura 13, comparam-se as áreas obtidas na banda de emissão do N (388 nm) para os analitos de teste com as diferentes fibras testadas na extração de alquilpirazinas.

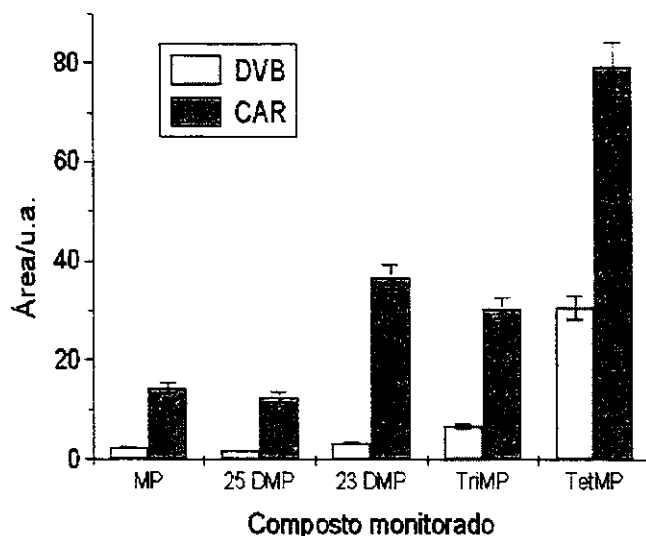


Figura 13: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) em função da fibra utilizada na extração. Onde: MP: metilpirazina, 25 DMP: 2,5-dimetilpirazina, 23 DMP: 2,3-dimetilpirazina, TriMP: trimetilpirazina e TetMP: tetrametilpirazina.

Como pode ser verificado, a fibra CAR é muito mais eficiente na extração das alquilpirazinas (Figura 12 e Figura 13). Valores de área chegam a ser até nove vezes maiores (para 2,3-dimetilpirazina) do que os obtidos com a extração com a fibra DVB. A estrutura porosa da fibra CAR favorece a extração de analitos mais leves. Todos os ensaios seguintes foram realizados com esta fibra.

Trabalhos na literatura têm demonstrado a aplicabilidade das fibras P100 e DVB na extração de alquilpirazinas. Níveis satisfatórios de alquilpirazinas extraídas com a fibra P100 foram reportados [68]. Entretanto, entre as fibras utilizadas no presente trabalho, a fibra DVB mostrou melhores resultados para a extração das alquilpirazinas que a P100, já descartada em ensaios preliminares.

2.3.2.2 Efeito da massa de amostra processada

A quantidade de amostra utilizada na análise por SPME é fundamental, devido à possibilidade de competição dos analitos pelos sítios ativos da fibra CAR e também

à possibilidade de saturação da fibra. Para prevenir estes efeitos são recomendadas massas pequenas de amostra. Os resultados obtidos com a utilização de diferentes massas de amostras estão na Figura 14.

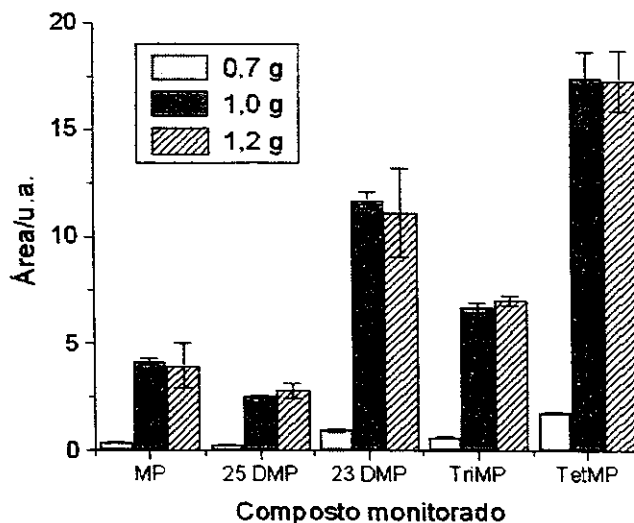


Figura 14: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) de acordo com a massa de amostra usada na análise.

Não há diferença significativa entre as eficiências de extração das alquilpirazinas com o uso de 1,000 g de amostra. Além disso, a dificuldade da homogeneização do meio com 1,200 g de amostra se refletiu na pior precisão das medidas nessas extrações. Assim nas análises subsequentes a massa de amostra foi fixada em 1,000 g.

2.3.2.3 Avaliação da força iônica do meio

Os resultados obtidos com a alteração da força iônica do meio para a extração de alquilpirazinas estão mostrados na Figura 15.

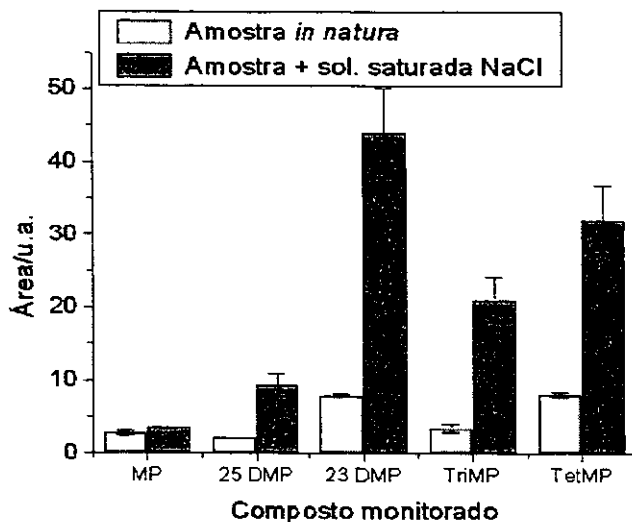


Figura 15: Resposta das alquilpirazinas na linhas de emissão do N (388 nm) de acordo com a adição ou não de NaCl à amostra.

Os sais mais usados para alteração da força iônica são o cloreto de sódio e o sulfato de sódio. A adição de NaCl à amostra aumenta muito a eficiência de extração de alquilpirazinas, sobretudo para 2,3-dimetilpirazina, trimetilpirazina e tetrametilpirazina (Figura 15). Segundo Sala *et al.* [68] e Sung *et al.* [88] na extração de 3-alkil-2-metoxipirazinas foi observado um aumento do sinal cromatográfico com o aumento da quantidade de NaCl adicionada, até a adição de 30 % de NaCl. A partir deste valor a resposta tornou-se constante.

A presença de NaCl ao meio de extração geralmente aumenta a eficiência de extração devido a um aumento do coeficiente de atividade dos analitos e conseqüente diminuição da solubilidade dos mesmos no meio extrator. Isto faz com que ocorra um deslocamento do equilíbrio de extração para o *headspace* da amostra gerando um aumento na eficiência de extração. Este efeito não é geral e depende das características do analito, amostra e fibra [86]. Para compostos hidrofóbicos, que apresentam baixa solubilidade na fase aquosa, a adição de NaCl aumenta a eficiência de extração [88, 99]. A força iônica do meio afeta tanto as extrações diretas como no *headspace*. Quatro tipos de comportamento podem ser diferenciados com a adição de sal à amostra: (a) aumento da eficiência de extração com o aumento da concentração de sal, (b) aumento inicial da quantidade extraída seguida de pequena

diminuição em altas concentrações de sal, (c) aumento da eficiência de extração e decréscimo acentuado na resposta com o aumento da concentração de sal e (d) decréscimo na eficiência de extração com o aumento da concentração de sal [78, 99]. Devido a todas as possibilidades é necessário investigar a influência da presença de sal na amostra durante o procedimento de extração.

2.3.2.4 Influência da temperatura de extração

A temperatura influencia a sensibilidade e repetibilidade do método de extração por SPME. O aquecimento da amostra favorece a volatilização dos analitos, em extrações através do *headspace*. Entretanto, altas temperaturas podem afetar a sorção dos analitos na fibra resultando em um decréscimo no coeficiente de partição [84, 88]. No caso de amostras contendo alta concentração de lipídios, como é o caso do líquido de cupuaçu, uma seleção cuidadosa da temperatura é necessária para minimizar a oxidação e evitar a degradação de precursores do aroma, com a formação de *off flavors* (compostos voláteis que conferem aromas e sabores desagradáveis aos alimentos) [62]. Em geral a extração, limitada basicamente por transferência de massa, é mais eficiente em temperaturas altas [82]. A influência da temperatura na extração de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu com a fibra CAR é mostrada na Figura 16.

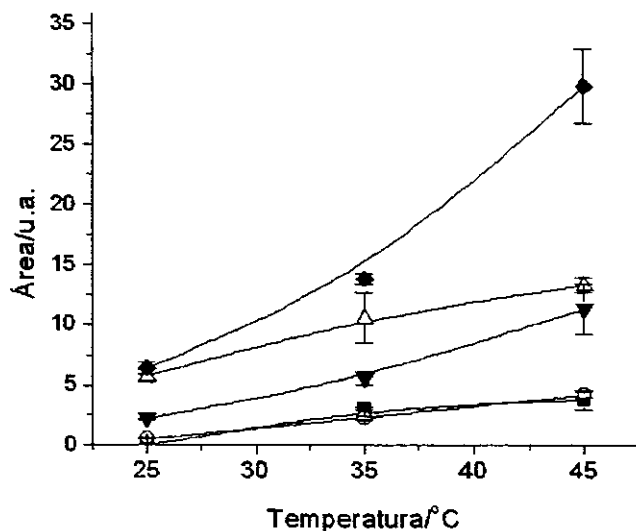


Figura 16: Influência da temperatura na extração de alquilpirazinas em amostras de líquido de cupuaçu. Onde: ■: MP, ○: 25 DMP, △: 23 DMP, ▼: TriMP e ◆: TetMP.

A extração de alquilpirazinas em amostras de líquido de cupuaçu é mais eficiente a 45 °C (Figura 16). O aumento da temperatura proporciona o aumento da concentração de espécies voláteis no *headspace* da amostra, apesar de em muitos casos diminuir a constante de distribuição fibra/*headspace* levando a dessorção dos analitos na fibra. Entretanto, temperaturas muito altas favorecem a condensação de água na fibra e a formação de bolhas prejudicando a precisão dos resultados [92]. Este fato é ainda mais acentuado com a fibra CAR. Segundo Sala *et al.* [68], na extração de 3-alkil-2-metoxipirazinas com a fibra DVB os melhores resultados foram observados com a temperatura de 30 °C.

Temperaturas maiores não foram testadas neste experimento devido a grande possibilidade de formação de artefatos provenientes da reação de Maillard, em temperaturas superiores a 45 °C. A formação adicional de alquilpirazinas em temperaturas superiores a 60 °C já foi documentada para amostras de líquido de cacau e o uso destas temperaturas causa uma superestimação dos resultados [102, 122].

2.3.2.5 Perfil de extração

A determinação do tempo de equilíbrio é uma importante etapa no desenvolvimento do método por SPME. Ele é definido como o tempo no qual a quantidade extraída de analito permanece constante e corresponde à quantidade extraída após um tempo infinito [95]. Geralmente, em amostragens através do *headspace* o equilíbrio é atingido mais rapidamente do que na extração direta [102]. Os resultados obtidos na otimização do tempo de equilíbrio de alquilpirazinas com a fibra CAR são mostrados na Figura 17.

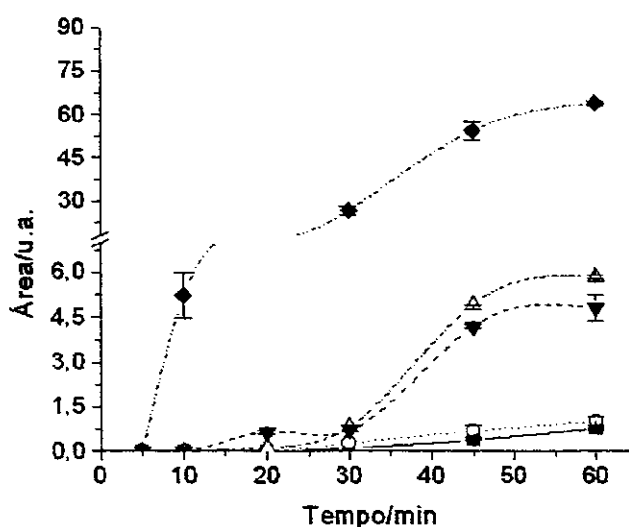


Figura 17: Resposta das alquilpirazinas na banda de emissão do N (388 nm) de acordo com o tempo de extração da amostra. Onde: ■: MP, ○: 25 DMP, △: 23 DMP, ▼: TriMP e ◆: TetMP.

A Figura 17 mostra que mesmo após 60 min de extração o equilíbrio não é atingido, sendo este fato característico das fibras compostas por sólidos adsorventes dispersos sobre matrizes poliméricas, como é o caso da fibra CAR. Tempos de equilíbrio longos são característicos das fibras CAR devido à necessidade de difusão dos analitos nos poros do sorvente. Por razões práticas, estabeleceu-se 45 min como o tempo de extração para o procedimento final.

Segundo Sala *et al.* [68], na extração de 3-alkil-2-metoxipirazinas, que não são muito voláteis, o tempo para que o equilíbrio entre o recobrimento da fibra, o *headspace* e a solução da amostra seja atingido também é longo. Como a difusão dos analitos através das três fases é essencial na técnica de *headspace*, foi necessário um mínimo de 4 h de extração com a fibra DVB, para que o equilíbrio fosse atingido.

2.3.3 Quantificação de alquilpirazinas em líquido de cupuaçu

O método de quantificação mais usado para SPME é a adição padrão, onde as quantidades extraídas dos analitos irão depender do valor das constantes de equilíbrio partição/adsorção, que por sua vez dependem da composição da matriz [84]. As curvas analíticas obtidas por adição padrão das alquilpirazinas nas duas linhas de emissão do N podem ser vistas na Figura 18.

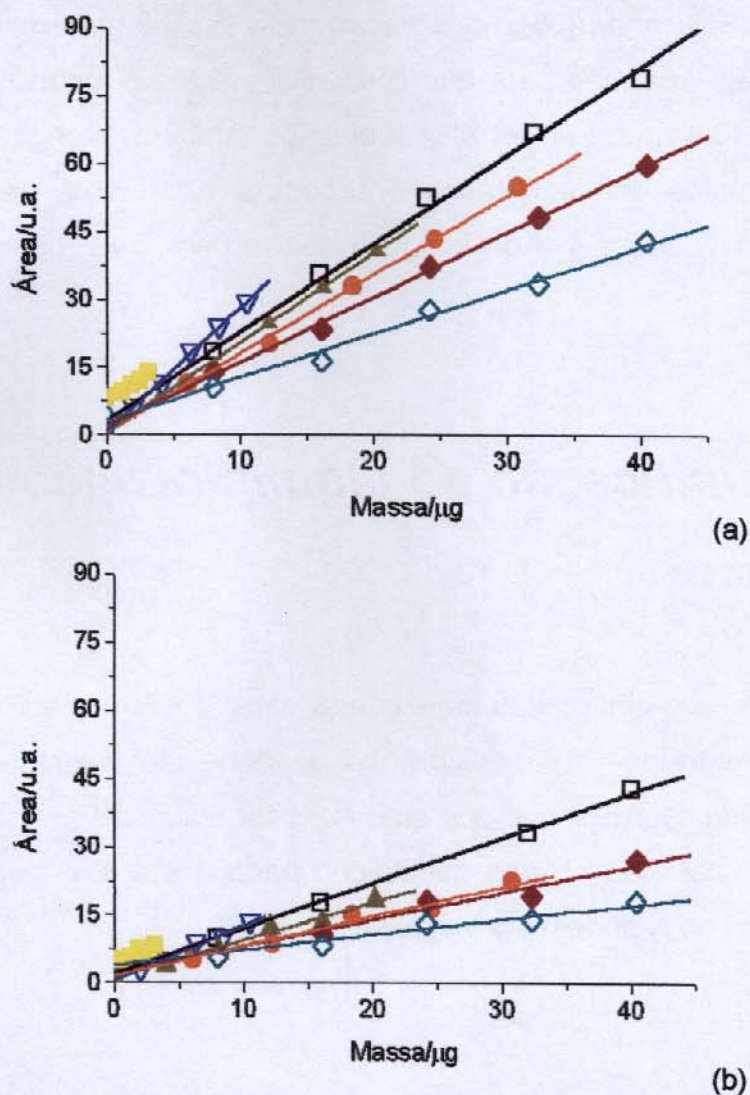


Figura 18: Curvas analíticas obtidas por adição padrão de alquilpirazinas para as amostras de líquido de cupuaçu nas linhas de emissão do N. (a) 388 nm e (b) 174 nm. Onde: □= MP, ●= 25 DMP, ▲= 26 DMP, ▽= EtP, ◆= 23 DMP, ◇= TriMP e ■= TetMP.

Os coeficientes de correlação, as inclinações, interceptos e os limites de detecção (LD) obtidos a partir das curvas analíticas são mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros obtidos a partir das curvas analíticas por adição padrão das alquilpirazinas

Composto	Banda de emissão (N 174 nm)				Banda de emissão N (388 nm)			
	a ^a	b ^b	r	LQ ^c /μg g ⁻¹	a ^a	b ^b	r	LQ ^c /μg g ⁻¹
MP	993,2	2064	0,9991	1,8	1960	2928	0,9979	2,3
25 DMP	649,0	1528	0,9894	4,1	1742	321,4	0,9990	1,3
26 DMP	827,1	977,9	0,9916	2,4	1977	463,1	0,9992	0,73
23 DMP	591,8	2007	0,9886	5,6	1434	1601	0,9993	1,3
EtP	1221	334,1	0,9936	1,1	2750	374,0	0,9995	0,31
TriMP	336,9	3736	0,9802	7,4	964,7	2922	0,9958	3,4
TetMP	671,0	5448	0,6744	3,2	1661	7753	0,9807	0,73

Notas: a: inclinação, b: intercepto, r: fator de correlação, c: calculado a partir da referência [123], MP: metilpirazina, 25 DMP: 2,5-dimetilpirazina, 23 DMP: 2,3-dimetilpirazina, TriMP: trimetilpirazina, TetMP: tetrametilpirazina, EtP: etilpirazina e 26 DMP: 2,6-dimetilpirazina.

Os resultados visualizados na Figura 18 e Tabela 5 mostram que o uso da banda de emissão 388 nm possibilita limites de detecção mais baixos e maior sensibilidade quando comparada à linha de N em 174 nm. O limite de detecção não foi menor somente para a metilpirazina, provavelmente devido à sua menor relação C : N. Como a banda de emissão do N (388 nm) monitora a emissão do fragmento CN, a menor relação C : N desfavorece a detecção do composto.

A baixa detectabilidade, altos níveis de ruído e seletividade da banda de emissão do N 174 nm tem sido atribuída a vazamento de ar no sistema, interferência da banda de emissão em 193 nm do C e ineficiência no processo de excitação. O nitrogênio necessita de temperaturas altas para alcançar seu estado excitado, então é esperado uma resposta menor em sua linha atômica (174 nm), enquanto a formação de moléculas, como CN, N₂ e N₂⁺ é favorecida quando carbono está disponível [27]. Tendo em vista estes fatores, a banda de emissão do N 388 nm foi escolhida para as análises das amostras (Tabela 6).

Tabela 6: Concentração das alquilpirazinas nas amostras de líquido de cupuaçu submetidos à diferentes tratamentos térmicos

Amostra	T _{torração} (°C)	t _{torração} (min)	Concentração / µg g ⁻¹						
			MP	25 DMP	26 DMP	EtP	23 DMP	TriMP	TetMP
M1 ^b	105	12	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	1,9 ±0,2	7,4 ±0,5	14,1 ±1,0
M2 ^b	105	16	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	2,0 ±0,1	7,12 ±0,01	16,3 ±1,7
M3 ^b	115	12	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a
M4 ^b	115	16	3,4 ±0,3	3,7 ±0,1	2,8 ±0,2	nq ^a	5,7 ±0,3	20,0 ±1,0	11,9 ±1,0
M5 ^b	110	11,18	nq ^a	2,3 ±0,1	1,2 ±0,1	nq ^a	3,4 ±0,1	11,1 ±0,5	8,1 ±0,8
M6 ^b	110	16,82	nq ^a	2,3 ±0,1	1,21 ±0,01	nq ^a	2,90 ±0,01	11,6 ±0,2	33,3 ±2,3
M7 ^b	103	14	nq ^a	1,8 ±0,2	1,0 ±0,1	nq ^a	2,4 ±0,1	8,5 ±0,8	14,7 ±1,3
M8 ^b	117	14	3,0 ±0,1	3,5 ±0,1	2,0 ±0,1	0,59 ±0,03	5,3 ±0,2	15,2 ±1,0	14,3 ±0,6
M9 ^b	110	14	nq ^a	2,5 ±0,1	1,3 ±0,1	0,32 ±0,02	3,9 ±0,2	11,6 ±0,6	13,0 ±0,6
M10 ^b	110	14	3,0 ±0,1	nq ^a	nq ^a	nq ^a	2,2 ±0,1	6,1 ±0,3	9,3 ±0,9
M11 ^b	110	14	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a
CO1 ^c	150	53	2,1 ±0,1	2,5 ±0,1	1,2 ±0,1	0,47 ±0,04	5,3 ±0,4	15,6 ±1,4	10,5 ±1,0
CO2 ^c	150	55	2,3 ±0,1	2,7 ±0,1	1,3 ±0,1	0,5 ±0,1	5,9 ±0,2	17,8 ±0,5	6,9 ±0,1
CO3 ^c	150	57	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a	nq ^a

Notas: a: < limite de quantificação, b: torrada em forno microondas; c: torrada em forno convencional.

Desvios-padrão da ordem de 0,2 a 10% foram observados nas análises de líquido de cupuaçu, o que é aceitável para análises quantitativas utilizando SPME. Estes resultados mostraram teores maiores de alquilpirazinas que os observados na literatura para chocolate de cacau (não existiam dados preliminares para chocolate de cupuaçu). No chocolate de cacau foram observados teores de tetrametilpirazina (o composto mais abundante no chocolate preto) variando entre $6 \mu\text{g g}^{-1}$ e $12,82 \mu\text{g g}^{-1}$, de trimetilpirazina entre $2,36 \mu\text{g g}^{-1}$ e $3,69 \mu\text{g g}^{-1}$, de metilpirazina de $2,54 \mu\text{g g}^{-1}$, de 2,5-dimetilpirazina entre $1,43 \mu\text{g g}^{-1}$ e $2,25 \mu\text{g g}^{-1}$ e de 2,3-dimetilpirazina entre $2,02 \mu\text{g g}^{-1}$ e $4,43 \mu\text{g g}^{-1}$ [50, 70, 73, 89, 124].

No nosso estudo, foi observado que nas amostras submetidas à torração em forno convencional há um decréscimo do teor das alquilpirazinas, principalmente tetrametilpirazina com o aumento do tempo de torração. Este fato pode ser atribuído à perda destes analitos durante o processo de torração. Segundo Maga *et al.* [69], a variação na temperatura de torração das amostras de cacau de 80°C a 150°C mostrou que pouca ou nenhuma alquilpirazina é formada em temperaturas inferiores a 100°C . Acima de 150°C o teor de alquilpirazinas formadas durante a torração diminui provavelmente, devido à decomposição destes compostos. Usando a temperatura de 120°C e variando o tempo de reação, a formação de alquilpirazinas aumenta rapidamente nas primeiras 24 h de tratamento. Após este período ocorre uma pequena diminuição na formação destes compostos seguida de um aumento gradual ao final de 72 h. No caso do cacau a formação de alquilpirazinas é dependente da relação tempo-temperatura podendo ocorrer após 30 min de aquecimento a 70°C [69].

CAPÍTULO 3 - Determinação de compostos organomercúricos por GC-AED

3.1 Introdução

3.1.1 Mercúrio: ocorrência e ciclo biológico

Mercúrio é um dos contaminantes mais tóxicos e persistentes, apresentando-se tanto como formas orgânicas como inorgânicas que diferem grandemente em suas propriedades físico-químicas, como a solubilidade, taxa de bioacumulação nos organismos, etc. Dentre as espécies de mercúrio no ambiente destacam-se o Hg^0 , forma comum no ar, Hg^{2+} e metilmercúrio [97, 120, 125-130].

A diferença na toxicidade das várias espécies de mercúrio faz com que seja importante determinar todas as formas deste elemento, após exposição aguda e crônica. Como compostos organomercúricos podem ser transformados em Hg^{2+} nos tecidos é de grande interesse estudar os aspectos temporais de transporte e transformação das várias espécies de mercúrio [117, 131-133].

O mercúrio é um elemento que ocorre naturalmente no ambiente em baixas concentrações devido ao desgaste natural da crosta terrestre, à atividade vulcânica e à evaporação dos oceanos [133]. Além disto, a atividade antropogênica contribui muito para a concentração global de mercúrio, sendo responsável por emissões da ordem de 6000 t por ano [134, 135]. A presença de mercúrio no ambiente se deve também à emissão, transporte atmosférico e deposição [136] provenientes de baterias, termômetros, fungicidas, herbicidas, desinfetantes [133], produtos da indústria petrolífera [29, 137, 138], preservativos de madeira, tintas e pesticidas [139], incineração de lixo, mineração, fábricas de papel [140], peixes e frutos do mar e amálgama dentário [141], queimadas, carvão, antibactericidas [142], dentre outras.

Compostos organomercúricos, principalmente metilmercúrio (CH_3Hg^+) e etilmercúrio ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg}^+$), foram introduzidos como fungicidas no começo do século XX, mas após uma série de acidentes e evidência de contaminação ambiental seu uso na agricultura foi descontinuado. No entanto, até recentemente um composto orgânico de mercúrio (etilmercuriotiosalicilato de sódio), princípio ativo do medicamento timerosal, era usado em vacinas infantis com propósito antimicrobiano [131].

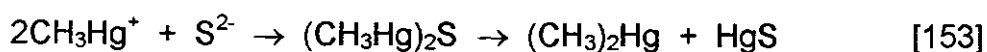
O uso de mercúrio inorgânico e metilmercúrio em aplicações industriais, agrícolas, junto com a metilação natural do Hg^{2+} que ocorre no ambiente tem levado a vários episódios de poluição em diferentes países [134, 143]. Devido a estes episódios e aos problemas associados à exposição e acúmulo de mercúrio no ambiente, seu uso em uma variedade de produtos e processos industriais tem diminuído [144].

Várias transformações químicas ocorrem no ciclo do mercúrio. Estes podem ser sumarizados como: oxidação de mercúrio metálico a mercúrio divalente, redução de mercúrio divalente a mercúrio metálico, metilação de mercúrio inorgânico e conversão de metilmercúrio a mercúrio inorgânico divalente [141]. Mercúrio inorgânico é transformado por processos bióticos e abióticos em ambientes aquáticos a formas alquiladas lipofílicas neurotóxicas, as quais podem acumular nos organismos aquáticos. Estas espécies orgânicas podem acumular na cadeia

alimentar mais facilmente que as formas inorgânicas, resultando em uma exposição humana crônica [128, 133, 139, 145-149].

Zonas de encontro de água de mar e rio são locais de geração de mercúrio elementar por ambos os mecanismos, biótico e abiótico. Estas condições também favorecem a metilação abiótica. A metilação abiótica contribui para uma quantidade significativa de dimetilmercúrio e metilmercúrio observados em águas com baixo teor de oxigênio [150, 151]. Metilmercúrio pode ser originário de fontes antropogênicas, mas também espécies de mercúrio inorgânico podem ser biologicamente convertidos em formas metiladas em algas, substâncias húmicas e bactérias. A taxa e extensão da metilação de mercúrio inorgânico em águas e sedimentos é afetada por fatores como o tipo de composto de mercúrio inorgânico, o agente de metilação, a composição química da água e do sedimento, concentração de oxigênio e o pH [133].

O acúmulo de metilmercúrio no ambiente (bioacumulação e sorção em solos e sedimentos) depende do teor de matéria orgânica dissolvida e da presença de ligantes como o sulfeto [148, 152]. Se o sedimento contendo metilmercúrio é exposto a sulfeto, o nível de metilmercúrio diminui devido à conversão de metilmercúrio a dimetilmercúrio, que é perdido para a atmosfera e transportado através de longas distâncias. A reação envolvida é:



Assumindo que a maior fração de mercúrio está ligada a componentes orgânicos, observou-se um aumento do teor de mercúrio com o aumento da quantidade de húmus na camada superficial em solos [154]. Alguns estudos sugerem que a interação entre mercúrio inorgânico e ácidos húmicos do solo envolve os grupos funcionais tiol e dissulfeto. Compostos que contêm grupos tiois como a glutatona e a cisteína forma fortes complexos com o metilmercúrio. As concentrações relativas de ligantes como cloreto e sulfeto em sistemas naturais também podem ter importante implicação na biodisponibilidade e toxicidade do metilmercúrio [148].

No organismo humano, em geral etilmercúrio é mais rapidamente convertido a Hg^{2+} do que metilmercúrio. O fato da ligação carbono-mercúrio no etilmercúrio ser menos estável do que no metilmercúrio favorece a degradação mais rápida deste composto. Sistemas que produzem espécies de oxigênio reativas, bem como vários sistemas microbianos são capazes de dealquilar etilmercúrio. Entretanto, os mecanismos responsáveis pela dealquilação de metilmercúrio e etilmercúrio são ainda desconhecidos [131].

Metilmercúrio, dimetilmercúrio e Hg^{2+} são as espécies que mais aparecem em amostras sólidas e líquidas em ambientes aquáticos. Metilmercúrio representa menos de 10% do mercúrio total em amostras de água, mas tende a se acumular na cadeia trópica. Já se sabe que metilmercúrio é capaz de atravessar a parede celular e acumular no sistema nervoso de mamíferos e pássaros [143].

Em programas de monitoramento de poluição marinha, mexilhões e ostras têm sido freqüentemente usados como organismos sentinelas, nos quais os níveis de contaminantes orgânicos e inorgânicos são medidos [149].

3.1.2 Métodos para análise de organomercúricos

Nos últimos anos vários estudos têm reconhecido que o teor de mercúrio total fornece uma informação insuficiente para avaliar a toxicidade potencial do Hg, isto porque a toxicidade deste elemento, não somente depende de sua concentração, mas também da sua forma química. Muitas tentativas têm no entanto, sido feitas para analisar as formas de mercúrio presentes em diferentes tipos de amostras [115, 144]. O conhecimento da concentração, transporte e dinâmica do mercúrio inorgânico, metilmercúrio, etilmercúrio e outros compostos derivados do mercúrio em ecossistemas aquáticos e terrestres é necessário para prever o ciclo biológico destes contaminantes e o potencial impacto no homem e no ambiente [144, 154-157].

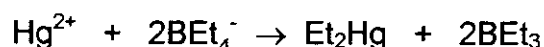
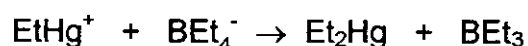
Devido ao fato de vários países limitarem o uso do mercúrio são necessárias informações analíticas rápidas, com alta qualidade e confiança para estabelecer as análises destas espécies em amostras ambientais e mais precisamente os seus níveis de poluição [143]. No solo, por exemplo, a forma química do mercúrio pode dar uma indicação, pelo menos a curto prazo, do acúmulo de mercúrio no ambiente [154]. Tendo em vista estes desafios, a especiação é um caminho a ser seguido. Ela é definida como a ocorrência de um elemento em formas identificáveis separadas (química e física). Análises químicas de especiação incluem o estudo de elementos em diferentes estados de oxidação ou espécies organometálicas individuais [117, 155].

A estratégia analítica ideal para a especiação de elementos tóxicos no ambiente deve ser sua determinação direta *in situ* na amostra desejada, com um mínimo de manipulação e tempo e em muitos casos o uso de um detector seletivo e sensível. Neste sentido, um dos mais difíceis desafios da especiação, que é a preservação da natureza original de cada uma das espécies de interesse, deve ser garantida [130, 155, 157]. Devido à sua pressão de vapor significativa à temperatura ambiente, o mercúrio é muito difícil de ser mantido em solução e pode ser facilmente perdido durante a estocagem ou tratamento da amostra [142]. Outro problema observado é o fato de que muitos dos compostos organometálicos presentes no ambiente são polares e iônicos. Sua determinação em amostras sólidas e líquidas geralmente envolve várias etapas analíticas incluindo extração, derivatização, separação e detecção, cada qual podendo contribuir para a dificuldade da análise, custo, diminuição da exatidão e precisão dos resultados [24, 114, 129, 133].

Se a cromatografia gasosa é selecionada como uma técnica de análise de organometálicos, muitas espécies de interesse necessitam ser derivatizadas para obtenção de compostos voláteis, termicamente estáveis e não polares. Dentre as técnicas utilizadas na derivatização de espécies de mercúrio destacam-se a geração de hidretos [141, 157, 158], o uso de reagentes de Grignard, como o brometo de pentilmagnésio [24] e o cloreto de butilmagnésio [29, 137, 153, 159, 160], a complexação com tropoleno [136], 2-mercaptobenzimidazol [144], dietilditiocarbamato de sódio [24, 130, 160] e ditizona e tiouréia [161] e a alquilação

com tetraalquilboratos como o tetrapropilborato de sódio [127, 129, 136, 150, 162], o tetraetilborato de sódio [24, 147, 153, 159, 163, 164] e o tetrafenilborato de sódio [24, 131, 133].

Quando se usa a SPME para o isolamento das espécies iônicas do mercúrio, elas primeiramente devem ser convertidas em compostos neutros. Uma vez que a SPME não é compatível com altas concentrações de solvente, a etapa de derivatização deve ser realizada diretamente na fase aquosa, o que restringe a escolha de reagentes derivatizantes a alquilboratos [94]. Com o uso de condições apropriadas na derivatização com tetraalquilboratos de sódio a transferência dos analitos é quantitativa e o procedimento é limpo e confortável, o tempo de análise e consumo de solventes orgânicos são menores, além de propiciar a alquilação e a extração em fase aquosa, simultaneamente [87, 94, 132, 134, 143, 155]. A etilação com tetraetilborato de sódio produz poucos problemas, sendo possível a análise de metilmercúrio em concentrações muito baixas. Além disto, o método é capaz de detectar metilmercúrio e mercúrio inorgânico e não foi observada a formação de dimetilmercúrio durante a manipulação das amostras [153]. As reações que ocorrem entre o tetraetilborato de sódio e espécies iônicas de Hg são as seguintes:



De forma similar, o tetrafenilborato de sódio, outro possível derivatizante, converte esses analitos em fenilmetilmercúrio, etilfenilmercúrio e difenilmercúrio, respectivamente. Verifica-se através das equações acima que o etilmercúrio e o Hg^{2+} não podem ser distinguidos quando o tetraetilborato de sódio é usado na derivatização. Já usando o derivatizante tetrafenilborato de sódio, é possível diferenciar essas espécies.

Em matrizes complexas o uso de tetraetilborato de sódio provoca algumas interferências, razão pela qual ele é usado na derivatização de amostras mais

simples como água. A derivatização com tetrafenilborato de sódio é menos sensível a interferências [24]. Além disso, este derivatizante apresenta maior estabilidade e menor custo [126].

Quando os reagentes de Grignard são usados na derivatização, apesar da sua versatilidade, há formação de um grande número de compostos que podem interferir na análise. Além disto, a reação deve se processar em meio orgânico e inerte, devido à incompatibilidade do reagente com a água e a sua extrema sensibilidade ao ar. Isto aumenta a manipulação da amostra e ocasiona perdas ou transformações dos analitos de interesse [149, 160, 165].

Se a geração de hidretos é escolhida para a etapa de derivatização faz-se necessário o uso de um excesso de boridreto de sódio, o que leva a problemas devido à formação de H_2 . Além disto observa-se interferências da matriz e problemas com a baixa estabilidade dos derivados. A possível formação de HgH_2 proveniente do Hg^0 é outro problema do método, levando à observação desta espécie durante a análise cromatográfica [149, 153, 166, 167].

Os problemas associados à determinação de mercúrio são relacionados à sua natureza volátil, à necessidade de baixos limites de detecção e à necessidade de etapas de pré-concentração [161]. Devido ao fato do teor de mercúrio em matrizes ambientais ser baixo e de suas propriedades tóxicas serem dependentes da espécie, métodos sensíveis e específicos são sempre imperativos [24, 158]. Estas técnicas envolvem várias etapas analíticas: extração dos analitos da matriz, pré-concentração para aumentar a detectabilidade, modificação dos analitos por derivatização e eventual detecção específica visando a transferência quantitativa das espécies presentes na amostra para o sistema analítico. O acoplamento *on-line* das técnicas de separação com detectores sensíveis e elemento seletivos tem levado a vários métodos de análise hifenados. Entretanto o acoplamento entre vários instrumentos se reflete na duração da análise e no custo da instrumentação [87, 117, 155].

Tradicionalmente a cromatografia gasosa com detecção por captura de elétrons (GC-ECD) foi amplamente usada para a determinação e especiação de organomercúricos em muitas amostras ambientais e biológicas [126, 132, 134, 153, 159, 163]. No entanto, a GC-ECD sofre a desvantagem de ser não específica, de

necessitar de uma etapa de separação do mercúrio inorgânico e poder ocorrer a formação de dimetilmercúrio a partir do metilmercúrio durante o processamento da amostra [153]. As técnicas hífenadas mais comumente utilizadas na determinação de organomercúricos são a combinação da cromatografia gasosa com métodos de detecção como a espectrometria de absorção atômica (AAS – *Atomic Absorption Spectrometry*) [153, 160, 164, 165, 168], espectrometria de fluorescência atômica (AFS – *Atomic Fluorescence Spectrometry*) [126, 147, 163, 169], espectrometria de fluorescência atômica com atomização por vapor frio (CVAFS – *Cold Vapour Atomic Fluorescence Spectrometry*) [148, 157], a espectrometria de emissão atômica com plasma indutivamente acoplado e detecção por massas (ICP-MS) [94, 95, 127, 131, 136, 137, 169], espectrometria de massas (MS) [126, 129, 133, 134], espectrometria de emissão em plasma com atomização eletrotérmica (FAPES – *Furnace Atomization Plasma Emission Spectrometry*) [89], espectrometria de emissão atômica com plasma induzido por microondas (MIP-AES ou AED) [24, 126, 132, 134, 139, 143, 156, 170]. Dentre estas, GC-AED tem se mostrado bastante eficiente na separação e detecção de analitos e tem sido uma boa alternativa à técnica GC-ICP-MS [143]. Os benefícios do sistema de detecção AED são o alto poder de detecção de mercúrio, a capacidade de detecção multielementar, a faixa dinâmica de aproximadamente cinco ordens de magnitude e a alta seletividade por elemento [160].

A cromatografia líquida é outra técnica eventualmente utilizada na análise de compostos organomercúricos tanto com detecção por UV-VIS usando como agente colorimétrico e complexante o sulfonato de ditizona [145] como ICP-MS [130, 146], espectrometria de fluorescência atômica com atomização por vapor frio (CVAFS) [127, 140, 150] e fluorescência de raios-X com reflectância total (TXRF) [161]. A cromatografia líquida permite um tratamento mais fácil da amostra, eliminação da etapa de derivatização, separação de organomercúricos a temperatura ambiente, injeção de grandes volumes de amostra e automação [167]. No entanto, estes métodos de cromatografia líquida são significativamente menos sensíveis do que os procedimentos de cromatografia gasosa e isto limita sua aplicação às amostras reais [130]. Além das técnicas cromatográficas são usadas também a espectrometria de

absorção atômica com forno de quartzo (AAS) [153], a espectrometria de absorção atômica com atomização por vapor frio (CVAAS) [24, 130, 153, 154], espectrometria de absorção atômica com vaporização eletrotérmica (ETVAAS – *Electrothermal Vaporization Absorption Atomic Spectrometry*) [142, 144], ICP-MS [150] ICP-MS com atomização por vapor frio (CVICP-MS) [140], ICP-MS com vaporização eletrotérmica [128] e CVAFS [135, 141].

A validação de métodos para a análise de organomercúricos requer o uso de materiais de composição conhecida (materiais certificados), nem sempre disponíveis. Experimentos com dopagem das amostras têm sido realizados para controle de qualidade do método. Neste caso ênfase deve ser dada aos procedimentos de dopagem das amostras, que exercem influência no valor recuperado. Mesmo se a recuperação de compostos dopados em uma certa matriz é total, não há evidência que os compostos presentes na amostra sejam extraídos com a mesma eficiência. Apesar disto, o uso de experimentos de dopagem ajudam a minimizar erros [119].

3.2 Materiais e métodos

Instrumental: Cromatógrafo a gás HP 6890 (Agilent) com detector por emissão atômica G2350A (Agilent). Coluna HP-1 (polidimetilsiloxano - 25 m x d_i = 320 μ m x d_f = 0,17 μ m). Agitador magnético digital Termolyne (MIRAK). Banho termostatzado Polystat. pHmetro Micronal B474. Holder para SPME (Supelco). Banho de ultrasom (UNIQUE).

Materiais: Fibras de SPME recobertas com: CAR, DVB, P100 e PACR (Supelco, Bellefonte - USA). Frascos de vidro de 4 e 16 mL com tampa de plástico e septo de silicone/teflon (Wheaton, Milville – USA).

Reagentes: Cloreto de sódio e acetona (Synth, Rio de Janeiro - Brasil). Gases para operação do GC-AED CH_4 , He, O_2 e H_2 com pureza de 99,999% (White Martins, Rio de Janeiro – Brasil). Me_2Hg , Et_2Hg , Ph_2Hg , $(\text{EtHg})\text{Cl}$ e $(\text{MeHg})\text{Cl}$ (Alfa Products, Houston - USA). Cloreto de mercúrio (II), hidróxido de potássio, hidróxido de sódio e ácido clorídrico (Merck, Rio de Janeiro – Brasil). Metanol (Tedia, Rio de Janeiro – Brasil), tetraetilborato de sódio e tetrafenilborato de sódio (Acros, New Jersey – USA). Todos os reagentes com pureza superior a 98 %. Material certificado tecido de molusco (*Mussel Tissue*) 2976 (NIST, Gaithersburg - USA).

3.2.1 Otimização multivariada das variáveis de detecção de Hg por GC-AED

Através de um planejamento fatorial 2^5 foram otimizadas as pressões de gases reagentes do plasma O_2 e H_2 (P_{O_2} e P_{H_2}), temperaturas da linha transferência (T_{LT}) e cavidade (T_{cav}) e vazão de gás *make-up* (F_{He}). Os níveis adotados no estudo foram:

207 e 345 kPa para P_{O_2} , 69 e 138 kPa para P_{H_2} , 130 e 190 mL min⁻¹ para F_{He} e 230 e 280 °C para T_{cav} e T_{LT} . Todas as medidas foram feitas em triplicata com injeção de soluções contendo 6 µg mL⁻¹ de dimetilmercúrio e dietilmercúrio. As demais condições foram: Coluna HP-1, temperatura do injetor: 260 °C; vazão na coluna: 1,8 mL min⁻¹; razão de divisão: 20:1; programação do forno: 45 °C (2 min) → 20 °C min⁻¹ → 105 °C ; pressão do hélio de sustentação do plasma: 103 kPa; pressão na cavidade do plasma: 7 kPa; volume injetado: 0,2 µL. Monitoramento das bandas de emissão do Hg em 254 nm e C em 248 nm.

As razões sinal/ruído obtidas nas determinações de dimetilmercúrio e dietilmercúrio foram definidas como resposta e os efeitos das variáveis foram calculados usando o programa Matlab versão 6.0. Para refinamento dos valores ótimos de pressão de O_2 e vazão de gás *make-up* foi construída uma superfície de resposta, através de ensaios usando os valores combinados de P_{O_2} e F_{He} mostrados na Tabela 7.

Tabela 7: Valores de pressão de oxigênio e vazão de *make-up* hélio utilizados nos experimentos para a construção de uma superfície de resposta

Nº experimento	Pressão O_2 (kPa)	Vazão de <i>make-up</i> hélio (mL min ⁻¹)
1	97	82
2	234	82
3	97	142
4	234	142
5	165	112
6	165	154
7	262	112
8	165	70

3.2.2 Derivatização de compostos mercúricos com tetraalquilboratos de sódio seguida de extração por SPME

Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira etapa foi otimizada a extração de alquilmercúricos neutros (dimetilmercúrio, dietilmercúrio e difenilmercúrio) por SPME. Na segunda etapa, conhecidas as condições para extração dos dialquilmercúricos que poderão ser formados na derivatização, os parâmetros deste último processo foram estudados. Nesta etapa foram usados como compostos teste o MeHg^+ , o EtHg^+ e o Hg^{2+} , espécies iônicas de mercúrio encontradas no ambiente e os reagentes derivatizantes tetraetilborato de sódio e tetrafenilborato de sódio. Nas duas etapas foram usadas as seguintes condições cromatográficas: Coluna HP-1, temperatura do injetor: 200 °C; vazão na coluna: 1,8 mL min⁻¹; injeção sem divisão; programação do forno: 45 °C (2 min) → 20 °C min⁻¹ → 180 °C ; temperatura da cavidade e da linha de transferência: 280 °C; pressão do He de sustentação do plasma: 103 kPa; pressão na cavidade do plasma: 7 kPa; pressão H₂: 69 kPa, pressão O₂: 165 kPa e vazão de *make-up*: 154 mL min⁻¹.

3.2.2.1 Otimização da extração de dialquilmercúricos

Em todos os ensaios desta etapa foram usados 5,0 mL de solução aquosa dopada com 6 ng mL⁻¹ de dimetilmercúrio, dietilmercúrio e difenilmercúrio e acondicionada em frascos de 16 mL. As extrações foram realizadas sob agitação magnética (1200 rpm) com tempo de equilíbrio amostra/headspace de 5 min.

3.2.2.1.1 Escolha do recobrimento da fibra de SPME

Fibras de PACR, P100, CAR e DVB foram testadas em extrações dos analitos teste através do *headspace* durante 10 min. Também foram testadas extrações diretas com as fibras P100 e DVB por 10 min.

3.2.2.1.2 Influência da temperatura de dessorção

Temperaturas de dessorção de 150 °C a 260 °C foram testadas após extração no *headspace* da amostra com a fibra DVB por 10 min e de 190 °C a 270 °C para as extrações diretas com a fibra P100 por 10 min.

3.2.2.1.3 Efeito da força iônica do meio

Para testar a influência da força iônica do meio, amostras aquosas contendo até 36 % m/v NaCl (solução saturada) foram extraídas durante 10 min usando as fibras DVB no *headspace* e P100 com extração direta.

3.2.2.1.4 Influência da temperatura de extração

Temperaturas de extração de 25 °C a 60 °C foram estudadas para ambas as fibras, DVB e P100, em ambos os modos de extração, *headspace* e direta. Foram utilizadas 5 mL de soluções 9 % m/v e 18 % m/v de NaCl para as extrações com as fibras DVB e P100 por 10 min, respectivamente.

3.2.2.1.5 Tempo de extração

Ensaio à temperatura ambiente (25 ± 3) °C foram realizados com tempos de extração variando entre 3 min e 60 min. As extrações foram realizadas com 5 mL de soluções 9 % m/v e 18 % m/v de NaCl para as fibras DVB no *headspace* da amostra e P100 no modo direto, respectivamente.

3.2.2.2 Otimização da etapa de derivatização de compostos organomercúricos

A extração/derivatização *in situ* de compostos organomercúricos compreende a etapa de derivatização da amostra com tetraalquilboratos de sódio em pH controlado (tampão acetato de sódio : ácido acético a pH = 4,75 com soluções 0,2 mol L⁻¹), adição de 9 % m/v de NaCl à amostra, seguida de extração através do *headspace* da amostra a (25 ± 3) °C com a fibra DVB por 15 min e dessorção a 200 °C. Pode-se usar também a extração direta a (25 ± 3) °C com a fibra P100 por 30 min, após adição de 18 % m/v NaCl, e dessorção a 230 °C.

Em todas as etapas da otimização foram utilizados 1 mL de tampão de acetato de sódio : ácido acético, 0,5 mL de derivatizante (tetraetilborato de sódio ou tetrafenilborato de sódio) e dopagem com os cloretos de etilmercúrio, metilmercúrio e de mercúrio (II) na concentração de 6 ng mL⁻¹ do. As derivatizações/extrações foram realizadas sob agitação a 1200 rpm.

3.2.2.2.1 Otimização da concentração do derivatizante

Soluções de tetraetilborato de sódio com concentrações variando entre 0,25 % e 1,00 % m/v e de tetrafenilborato de sódio entre 0,25 % e 1,50 % m/v foram usadas nas reações de derivatização das espécies iônicas de mercúrio por 15 min. As

extrações dos derivados etílicos foram realizadas com a fibra DVB no *headspace* da amostra por 15 min e dos derivados fenílicos com a fibra P100 no modo direto por 30 min.

3.2.2.2.2 Influência da acidez do meio

Para determinar a melhor acidez do meio para a derivatização das espécies de mercúrio foram realizados ensaios usando amostras tamponadas (acetato de sódio : ácido acético) em pH de 3,0 a 8,0. A acidez das soluções foi ajustada com soluções diluídas de HCl ou NaOH. As reações de derivatização ocorreram durante 15 min com concentrações dos derivatizantes tetraetilborato de sódio e tetrafenilborato de sódio mantidos em 0,25 % e 0,50 %, respectivamente. Para extrações no *headspace* dos derivados etílicos foi utilizada a fibra DVB durante 15 min, à temperatura ambiente. Já os derivados fenílicos foram extraídos com a fibra P100 por 30 min.

3.2.2.2.3 Influência da temperatura de derivatização

Temperaturas de derivatização entre 25 °C e 60 °C foram testadas tanto para a derivatização com solução 0,25 % de tetraetilborato de sódio (NaBEt_4) e extração através do *headspace* com a fibra DVB por 15 min, como para a derivatização com solução 0,50 % de tetrafenilborato de sódio (NaBPh_4) e extração direta com a fibra P100 por 30 min. As reações de derivatização ocorreram durante 15 min. A acidez do meio foi ajustada em pH 5,0 nas derivatizações com NaBEt_4 e em pH 4,5 nas derivatizações com NaBPh_4 .

3.2.2.2.4 Otimização do tempo de derivatização

Tempos de derivatização entre 3 a 30 min em pH 5,0 foram testados para reação com NaBEt_4 e extrações no *headspace* com a fibra DVB e em pH 4,5 para a

derivatização com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. As derivatizações/extrações foram realizadas à temperatura ambiente (25 ± 3) °C.

3.2.3 Verificação da exatidão do método utilizando material certificado

A 250 mg de tecido de molusco certificado para metilmercúrio (SRM 2976) foram adicionados 25 mL de solução metanólica de KOH 35 %. A amostra foi agitada em banho de ultrassom durante 3:30 h. Após agitação o extrato foi neutralizado com ácido acético e uma alíquota de 600 μL foi usada para a análise do teor de metilmercúrio utilizando os métodos otimizados.

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Otimização multivariada das variáveis de detecção de Hg por GC-AED

Vários autores têm demonstrado influências diferentes das vazões de *make-up*, pressão de oxigênio e pressão de hidrogênio na resposta de organomercúricos. Segundo Botana *et al.* [171] e Minganti *et al.* [24], as influências da pressão de hidrogênio e de hélio no plasma foram negativas na resposta de metilmercúrio e mercúrio inorgânico. Cai *et al.* [126] verificaram que um aumento na pressão de hidrogênio resulta em um aumento da sensibilidade de detecção de espécies feniladas de mercúrio até um máximo de 138 kPa, após o qual a sensibilidade decresce rapidamente. Donais *et al.* [139] observaram um máximo de resposta com o uso de 276 kPa de hidrogênio. Já Pereiro *et al.* [156] e Rodil *et al.* [170] observaram uma maior estabilidade da linha de base com a pressão de hidrogênio igual a 350 kPa. A introdução de grandes quantidades de hidrogênio pode levar a um aumento na diluição dos analitos no plasma, o que ocasionaria uma diminuição no sinal do detector.

Neste trabalho as razões sinal/ruído obtidas nas determinações de dimetilmercúrio e dietilmercúrio foram definidas como resposta e os efeitos das variáveis (pressão de oxigênio, pressão de hidrogênio, vazão de *make-up*, temperatura da cavidade e da linha de transferência) foram calculados usando o programa Matlab 6.0 (Tabela 8). Os efeitos da vazão de gás *make-up* (F_{He}) e da pressão de O_2 (P_{O_2}) foram mais significativos, considerando a aplicação do teste *t* com 95 % de confiança. O decréscimo do sinal em vazões superiores a 250 mL min^{-1} pode ser atribuído aos efeitos de diluição e resfriamento do plasma [25]. Os efeitos das demais variáveis não foram representativos. A interação entre as variáveis, T_{cav} e T_{LT} foi positiva e significativa sendo fixadas em 280°C . Temperaturas maiores da

linha de transferência são necessárias para prevenir a condensação dos constituintes da amostra na coluna capilar quando são analisados espécies fenílicas derivadas do mercúrio, uma vez que estas possuem pontos de ebulição maiores que os derivados etílicos [89, 170]. A pressão de H_2 foi fixada em 69 kPa.

Tabela 8: Efeitos obtidos para o dietilmercúrio utilizando um planejamento fatorial completo 2^5 para otimização das variáveis de detecção por emissão atômica na banda de emissão do Hg (254 nm).

Fatores e interações	Estimativa dos efeitos $\pm$ erro padrão	Relação $t_{\text{calculado}}$
P_{O_2}	$-26,59 \pm 2,2$	-12,09
P_{H_2}	$5,65 \pm 2,2$	2,57
F_{He}	$-24,08 \pm 2,2$	-10,95
T_{CP}	$-1,82 \pm 2,2$	-0,83
T_{LT}	$-0,63 \pm 2,2$	-0,29
$P_{O_2} \times P_{H_2}$	$-5,94 \pm 2,2$	-2,70
$P_{O_2} \times F_{He}$	$0,98 \pm 2,2$	0,44
$P_{O_2} \times T_{CP}$	$4,78 \pm 2,2$	2,17
$P_{O_2} \times T_{LT}$	$5,69 \pm 2,2$	2,59
$P_{H_2} \times F_{He}$	$-8,63 \pm 2,2$	-3,92
$P_{H_2} \times T_{CP}$	$1,51 \pm 2,2$	0,69
$P_{H_2} \times T_{LT}$	$3,90 \pm 2,2$	1,77
$F_{He} \times T_{CP}$	$-0,46 \pm 2,2$	-0,21
$F_{He} \times T_{LT}$	$-0,69 \pm 2,2$	-0,31
$T_{CP} \times T_{LT}$	$14,38 \pm 2,2$	6,54

$t^{\text{tab}} = t_{v,\alpha} = 2,024$ (com $v = 38$ e $\alpha = 0,05$) Onde: F_{He} : vazão de gás *make-up*, P_{O_2} : pressão de O_2 , P_{H_2} : pressão de H_2 , T_{CP} : temperatura da cavidade e T_{LT} : temperatura de linha de transferência.

O refinamento dos valores de pressão de O_2 e vazão de *make-up* hélio foi realizado através da construção de uma superfície de resposta mostrada na Figura 19.

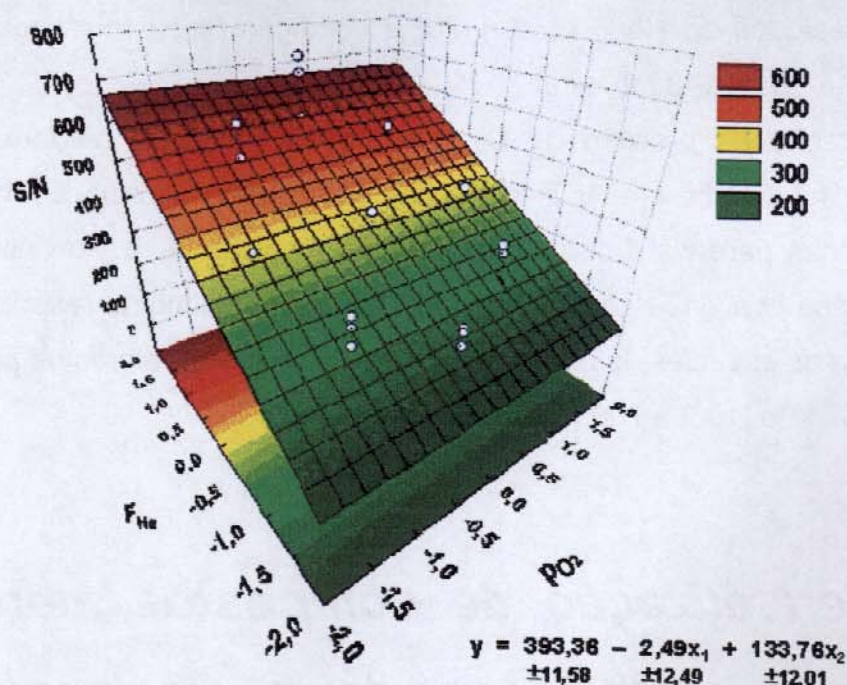


Figura 19: Superfície de resposta para o dietilmercúrio obtida através do planejamento estrela usando a relação altura/ruído.

A estabilidade do plasma induzido por microondas é altamente dependente das vazões de gases usados: hélio para criar e manter o plasma, oxigênio para oxidar compostos orgânicos e hidrogênio para aumentar a estabilidade da linha de base [143]. A adição de traços da mistura oxigênio e hidrogênio no plasma de hélio melhora o formato dos picos cromatográficos, removendo depósitos de carbono e prevenindo a formação de óxidos refratários [126].

O parâmetro mais crítico em termos de condições de detecção é a vazão de hélio no plasma. Uma suplementação de hélio adicionada ao hélio proveniente da coluna cromatográfica antes do sistema de detecção, referido como gás *make-up*, pode afetar a detectabilidade e o formato dos picos dos compostos de interesse [139]. Geralmente a detectabilidade do sistema decresce rapidamente com o aumento de F_{He} , devido à redução do tempo de residência das espécies no plasma [126]. Entretanto, neste trabalho observou-se o contrário, a resposta aumenta com F_{He} , tendo sido o valor ótimo dentro da faixa de vazões estudada estabelecido em 154 mL min^{-1} (Figura 19). Fato também observado por Sanz *et al.* [143] e Minganti *et*

al [24]. Nos estudos de Rodil *et al.* [170] a condição ótima foi atingida com uma vazão de *make-up* de 140 mL min⁻¹.

A alteração da pressão de O₂ não afeta a resposta na faixa de valores estudados e foi fixada em 165 kPa para minimizar a formação de depósitos carbonáceos nas paredes da cela de detecção e aumentar a vida útil da mesma. Segundo Botana *et al.* [171], o oxigênio tem um efeito mínimo na resposta obtida por MIP-AED para as espécies de mercúrio. A literatura reporta valores de pressão de O₂ variando de 69 kPa [156] a 200 kPa [170].

3.3.2 Derivatização de compostos mercúricos com tetraalquilboratos de sódio seguida de extração por SPME

Este estudo foi dividido em duas partes. Na primeira etapa foi otimizada a extração de alquilmercúricos (dimetilmercúrio, dietilmercúrio e difenilmercúrio) por SPME. Na segunda etapa, conhecidas as condições para extração dos dialquilmercúricos foram otimizados os parâmetros de derivatização. Nesta etapa foram usados como compostos teste o MeHg⁺, o EtHg⁺ e o Hg²⁺, espécies iônicas de mercúrio encontradas no ambiente.

3.3.2.1 Otimização da extração de dialquilmercúricos

Altas quantidades de solventes no plasma causam um distúrbio no sistema pelo resfriamento do mesmo e formação de depósitos carbonáceos nas paredes da cela de detecção. Segundo Pereiro *et al.* [156], a possível solução para o problema é eliminar o solvente orgânico na etapa de preparo de amostra pela extração na fase

gasosa ou aquosa, seguida de pré concentração em “trap” criogênico ou pelo uso da SPME.

3.3.2.1.1 Escolha do recobrimento da fibra de SPME

Considerando a volatilidade e a polaridade dos derivados de mercúrio e dos recobrimentos de fibra disponíveis comercialmente foram avaliadas as fibras CAR, PACR, P100 e DVB. Os resultados podem ser visualizados na Figura 20.

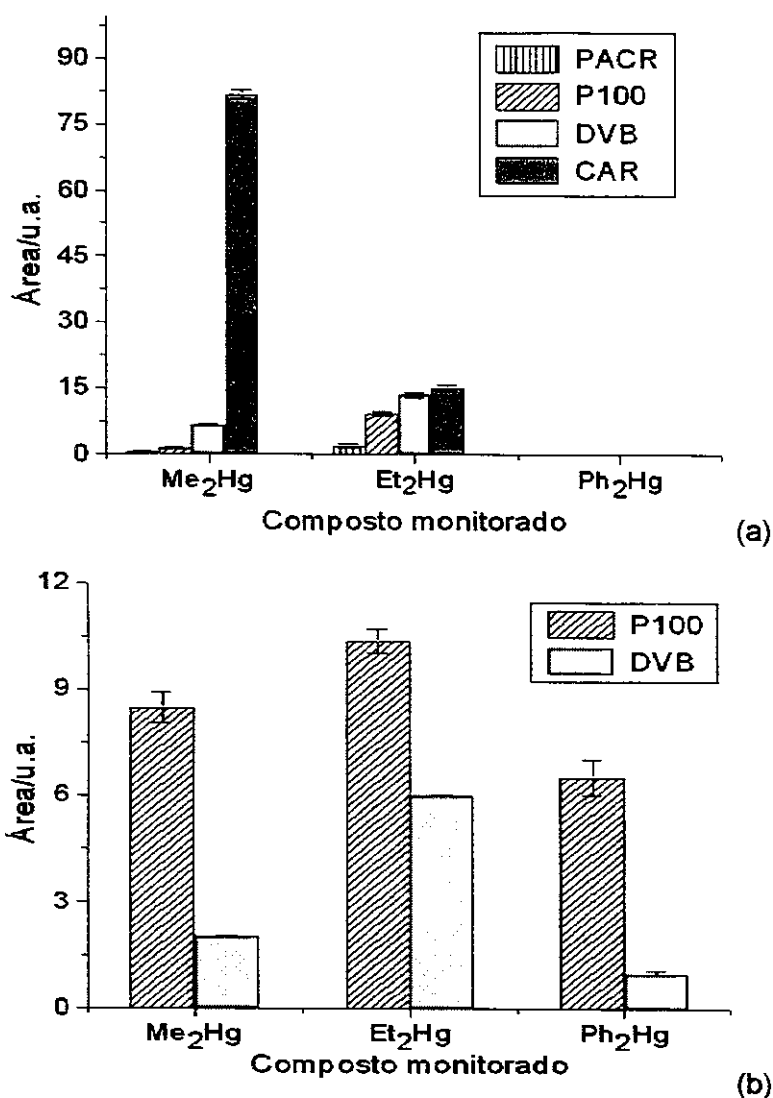


Figura 20: Resposta de compostos organomercúricos após extração por SPME com diferentes fibras. (a) extração de *headspace* (b) extração direta.

Os dialquilmercúricos são melhor extraídos no *headspace* da amostra pelas fibras CAR e DVB. A fibra CAR extrai cerca de dez vezes mais dimetilmercúrio que a fibra DVB. No entanto, o pico cromatográfico obtido com a extração usando esta fibra é assimétrico, o que dificulta sua integração (Figura 21). Além disto, a degradação dos compostos organomercúricos durante a etapa de dessorção é muito mais acentuada com o uso da fibra de CAR, mas pode ser observada também com a fibra DVB [117]. A utilização de SPME para extração no *headspace* não possibilita a extração de difenilmercúrio devido à baixa volatilidade deste composto [89]. Assim a

fibra DVB foi escolhida para o restante dos trabalhos em *headspace* devido a maior eficiência de extração dos dialquilmercúricos em relação às demais fibras testadas.

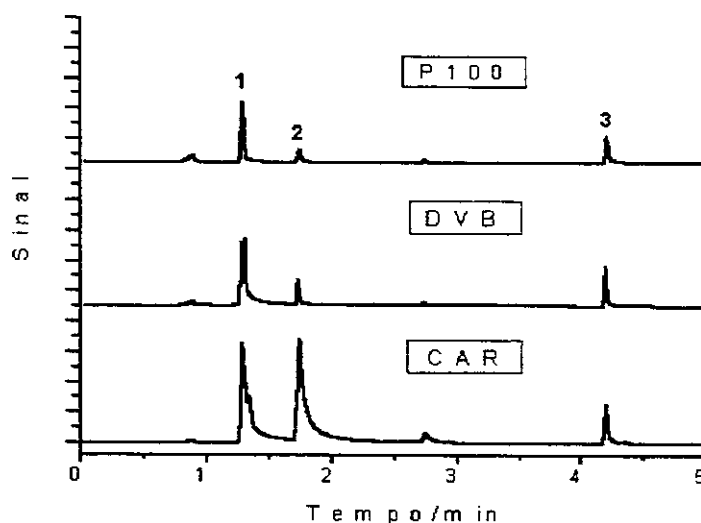


Figura 21: Cromatogramas de alquilmercúricos submetidos à extrações no *headspace* da amostra com diferentes fibras. Picos: 1: Hg^0 , 2: Me_2Hg e 3: Et_2Hg .

Na extração direta, a fibra P100 foi de duas a seis vezes mais eficiente na extração de dialquilmercúricos que a fibra DVB (Figura 20b); além disto foi capaz de extrair o composto difenilmercúrio (não visível nos cromatogramas em extrações através do *headspace*). Fato semelhante foi observado por Rodil *et al.* [170] e Minganti *et al.* [24].

Sempre que possível extrações no *headspace* são preferidas pois a amostragem no *headspace* minimiza a exposição da fibra de SPME à matriz da amostra, aumentando o tempo de vida útil da mesma [129]. O processamento da amostra é mais simples e mais rápido em extrações no *headspace*, uma vez que não há necessidade de separação de fases como na extração líquido-líquido [96].

3.3.2.1.2 Influência da temperatura de dessorção

A temperatura de dessorção deve ser suficiente para dessorver completamente os analitos sorvidos, mas apresenta fatores limitantes como a estabilidade destes e a resistência da fibra a altas temperaturas. Na análise de compostos organomercúricos termolábeis há geração de Hg^0 durante o processo de dessorção. Segundo a literatura, dentre as espécies de mercúrio foi observada uma maior tendência de decomposição térmica do dietilmercúrio do que etilmetilmercúrio quando sorvido em *trap* de carbono, tornando às vezes a quantificação impossível. Este efeito é devido à combinação de impurezas coletadas no *trap*, temperatura, taxa de aquecimento e preparo do *trap* [134, 162]. Alguns estudos mostram que dimetilmercúrio decompõem em taxas mensuráveis entre 312 °C e 401 °C e em uma pressão inicial de 2 mmHg a 90,3 mmHg para fornecer predominantemente metano e etano. Os dados indicam que a decomposição térmica de dimetilmercúrio é homogênea em recipientes empacotados e não-empacotados a 401 °C [172].

Quando o tipo de extração usada é a SPME, se ocorrer decomposição térmica, a extensão desta degradação é dependente do sorvente usado na extração [43, 115, 118, 155]. Em vista disto, foram testadas várias temperaturas de dessorção para as fibras DVB e P100. Observou-se que a variação da temperatura de dessorção gera uma diferenciação na resposta dos derivados de mercúrio (Figura 22). Os resultados mostram que a resposta diminui com o aumento da temperatura de dessorção para a fibra DVB, principalmente para o dietilmercúrio, (Figura 22a) indicando degradação destes compostos no injetor do cromatógrafo. Este comportamento não foi observado com a fibra P100 (Figura 22b), especialmente na dessorção do composto dimetilmercúrio que não foi influenciada por alterações na temperatura de dessorção. Estes fatos mostram que interações entre o recobrimento da fibra e os analitos têm um papel importante na decomposição térmica de compostos organomercúricos extraídos por SPME. A diferenciação nos comportamentos observados com as fibras DVB e P100 durante o processo de dessorção pode ser atribuída às diferenças nos recobrimentos. Na fibra DVB os

analitos adsorvidos nos sítios ativos provavelmente são mais lentamente dessorvidos, favorecendo a degradação destes compostos ainda no recobrimento. Em P100, por se tratar de um polímero líquido, onde o mecanismo de sorção é partição, os compostos são mais facilmente dessorvidos. Assim, foram adotadas as temperaturas de dessorção de 200 °C para a fibra DVB e 230 °C para a fibra P100.

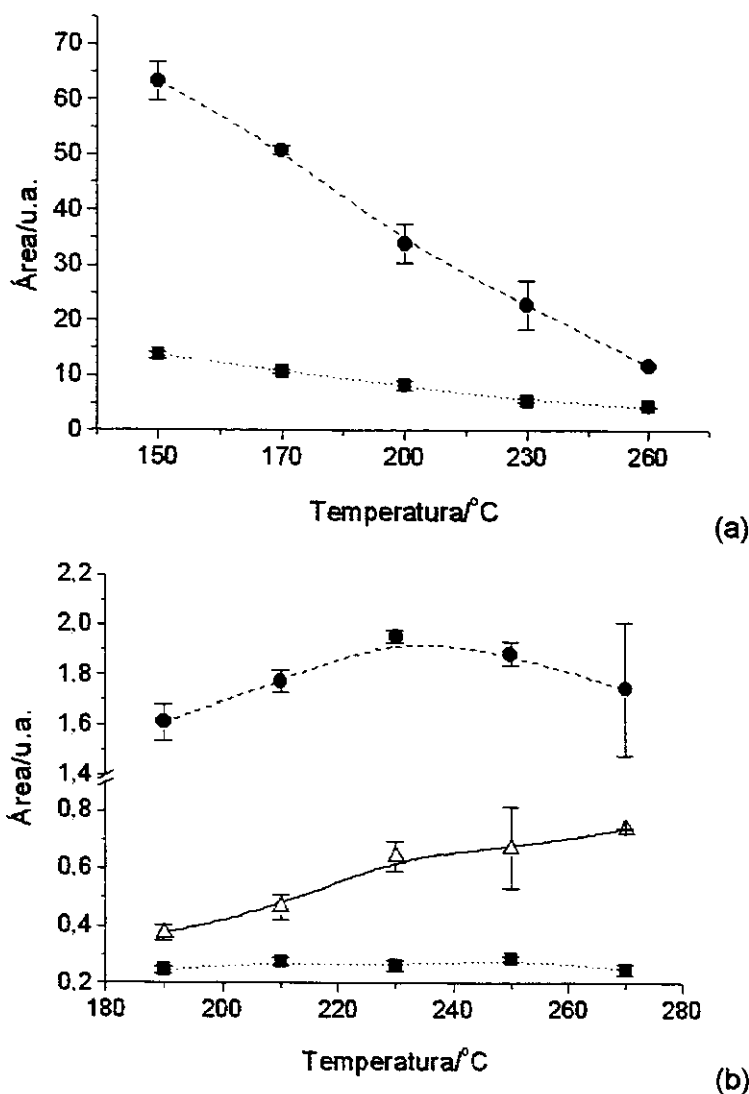
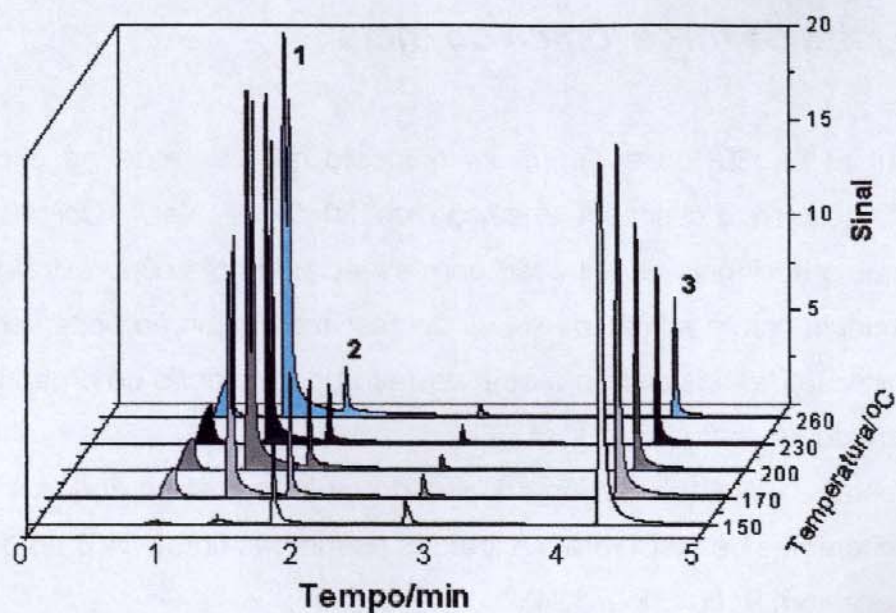


Figura 22: Variação da resposta dos compostos organomercúricos com a temperatura de dessorção. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me₂Hg, ●: Et₂Hg e △: Ph₂Hg.

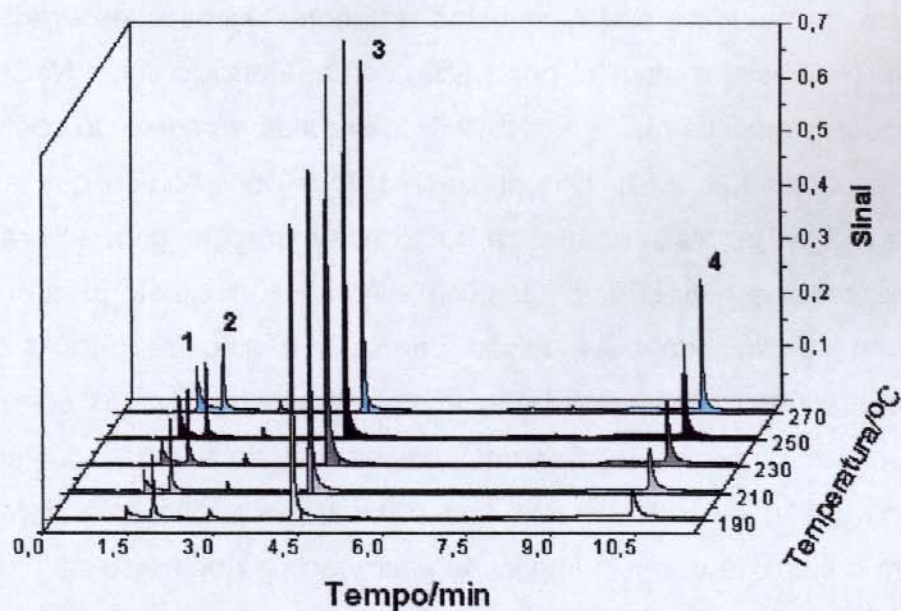
Apesar da degradação, nenhum efeito memória foi observado com o uso da temperatura de dessorção de 230 °C e extração com P100, como verificado por Bonvehí *et al.* [89]. Yang *et al.* [120] observaram uma pequena decomposição dos derivados de mercúrio quando submetidos à dessorção a 220 °C, após extração através do *headspace* com a fibra P100.

Segundo Cai *et al.* [126] respostas maiores foram obtidas para espécies etiladas com o aumento da temperatura de dessorção de 220 °C para 270 °C. Para espécies feniladas um aumento da resposta foi observado com a alteração da temperatura de dessorção de 220 °C para 300 °C.

Como citado anteriormente, além da alteração na resposta dos compostos de mercúrio estudados, a temperatura de dessorção influencia na degradação destes compostos na fibra, com o aparecimento de um pico atribuído a mercúrio metálico. Este fato foi observado em todos os cromatogramas obtidos a diferentes temperaturas de dessorção, independentemente da fibra utilizada para a extração (Figura 23). A análise dos cromatogramas mostra que um aumento na temperatura de dessorção causa uma diminuição da resposta de dialquilmercúricos extraídos com a fibra DVB, que se reflete em um aumento na área do pico relativo ao Hg^0 .



(a)



(b)

Figura 23: Cromatogramas obtidos a diferentes temperaturas de dessorção após extração de organomercúricos por SPME. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg^0 , 2: Me_2Hg , 3: Et_2Hg e 4: Ph_2Hg .

3.3.2.1.3 Efeito da força iônica do meio

Bonvehí *et al.* [89] observaram um aumento de 7,5 vezes na eficiência de extração de alquilmercúricos com a adição de 30 % de NaCl. Cai *et al.* [134], observaram que a eficiência de extração para espécies de mercúrio extraídos com a fibra P100 diminuiu com a adição de sal. O decréscimo na sorção pode ser atribuído à alta concentração de íons cloreto o qual desfavorece a reação de organometálicos com tetraetilborato de sódio [94, 134, 173].

Para testar a influência da força iônica do meio, amostras aquosas contendo quantidades diferentes de NaCl foram extraídas usando as fibras DVB no *headspace* e extração direta com P100 (Figura 24).

Em vista da natureza dos compostos organometálicos é esperado que um aumento na força iônica da amostra por adição de um eletrólito como NaCl aumente a concentração dos analitos na fibra de SPME, devido ao aumento do coeficiente de partição das espécies [94, 114]. Nos nossos estudos observou-se que a resposta diminui com a adição de NaCl à amostra, tanto nas extrações com a fibra DVB em *headspace*, quanto com extrações diretas com a fibra P100, exceto para Ph_2Hg , cuja extração não é influenciada pela adição de NaCl à amostra (Figura 24). Este resultado sugere que o íon cloreto pode formar complexos iônicos com Me_2Hg e Et_2Hg diminuindo a disponibilidade destes compostos para a extração. Para Ph_2Hg , pode-se supor que o elevado volume dos grupos fenila dificulta a formação do complexo com o cloro, já que isto implicaria alteração da geometria da molécula de linear para trigonal plana ($[\text{HgPh}_2\text{Cl}]^{-1}$) com proximidade dos grupos fenila [43, 134]. Em vista destes resultados, adotaram-se as concentrações de NaCl de 9% e 18 % nas amostras para extrações com as fibras DVB e P100, respectivamente.

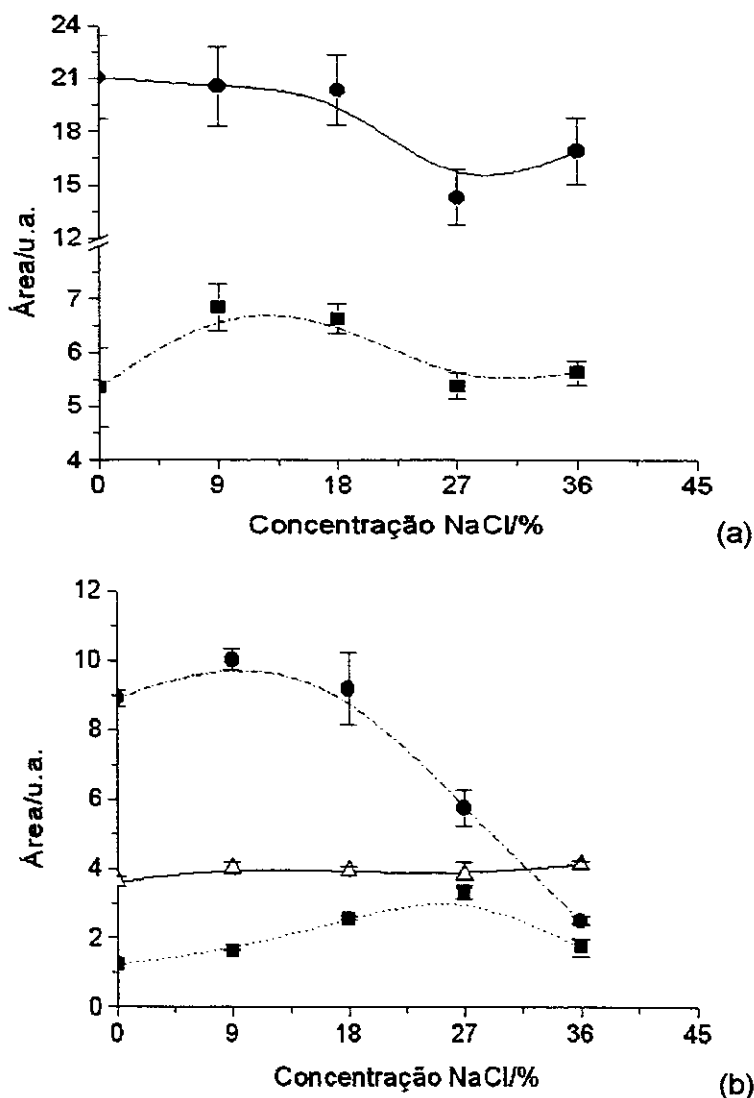


Figura 24: Variação da resposta dos organomercúricos com a percentagem de NaCl adicionado à amostra. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me₂Hg, ●: Et₂Hg e △: Ph₂Hg.

3.3.2.1.4 Influência da temperatura de extração

O equilíbrio entre a concentração do analito sorvido na fibra de SPME e a concentração do analito na solução da amostra depende da solubilidade do analito na fase aquosa (lei de Henry) e de sua afinidade pelo recobrimento da fibra de

SPME. O aumento da temperatura aumentará a constante de Henry de compostos organometálicos, resultando no aumento da pressão de vapor destes analitos. Por outro lado, a sorção diminuirá com o aumento da temperatura [87, 94]. Portanto, a temperatura da amostra tem um impacto duplo, em temperaturas maiores o coeficiente de difusão na água é maior e o tempo de extração é menor. O aquecimento da amostra é recomendado para promover a liberação dos analitos para a fase gasosa [93, 155]. A temperatura de extração tem um efeito importante no tempo de equilíbrio, principalmente na cinética e transporte de massa [155].

Neste estudo a faixa de 25 °C e 60 °C foi investigada para ambas as fibras e condições. Observou-se que a eficiência de extração é maior em temperatura ambiente (25 ± 3) °C tanto para as extrações no *headspace* como diretas (Figura 25). Esta diminuição da eficiência de extração com o aumento da temperatura é mais pronunciada para o dietilmercúrio, sobretudo para extrações através do *headspace*.

Segundo Mothes *et al.* [174], o aumento da temperatura de extração de 25 °C para 50 °C reduziu a resposta de dimetilmercúrio e dietilmercúrio extraídos com a fibra P100, em cerca de 50%. Grimberg *et al.* [117] também observaram a diminuição na eficiência de extração para derivados de mercúrio, com o aumento da temperatura até 80 °C e extração com a fibra P100. Este comportamento também foi observado nas análises de compostos organoestânicos e compostos orgânicos de chumbo, onde um aumento da temperatura de 25 °C para 75 °C ocasionou um decréscimo na eficiência de extração da fibra em torno de 48 % [93].

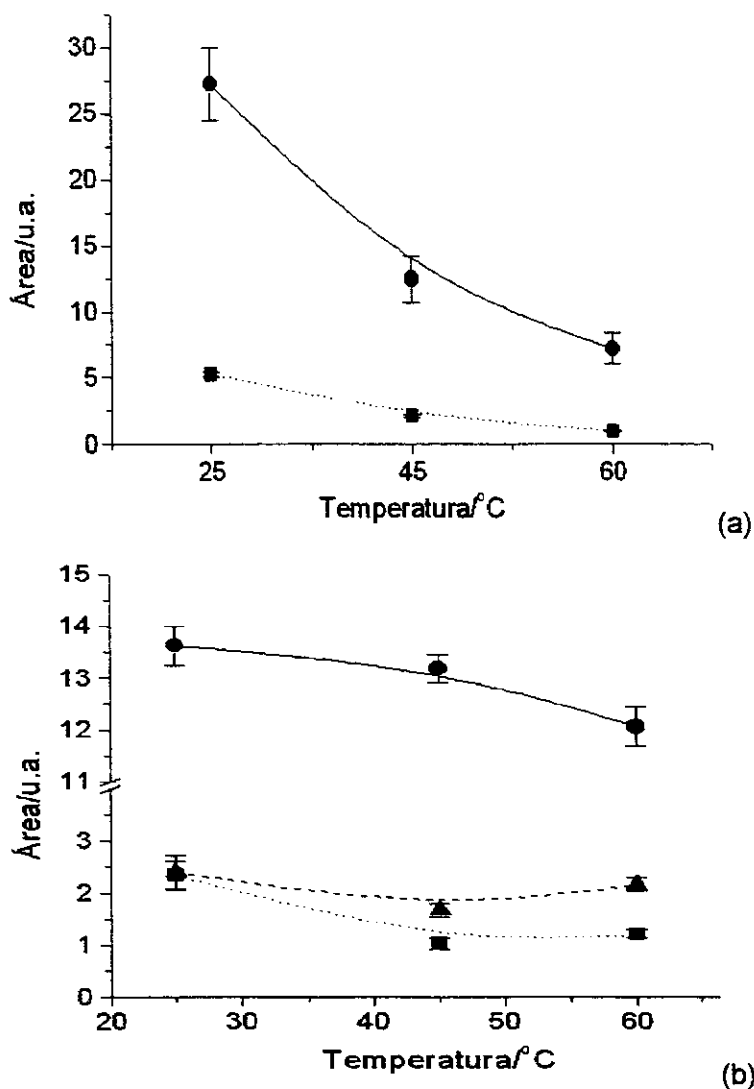


Figura 25: Variação da resposta dos organomercúricos com a temperatura de extração. (a) extração no *headspace* da amostra com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me₂Hg, ●: Et₂Hg e △: Ph₂Hg.

3.3.2.1.5 Tempo de extração

Um dos mais importantes parâmetros de caracterização na extração por SPME é o tempo de equilíbrio fibra/analito. A SPME é bastante influenciada pelo tempo de sorção dos analitos e também pela volatilidade dos mesmos. O tempo de

extração ótimo depende do coeficiente de partição do analito e da agitação da amostra e é usualmente menor para extrações no *headspace* [87, 152]. No equilíbrio, variações no tempo de extração não afetam a quantidade de analito extraído pela fibra [87, 115, 118].

Organometálicos derivatizados são voláteis e apolares e têm uma afinidade maior pelo recobrimento da fibra do que pela matriz polar. Uma vez que a difusão dos analitos através do *headspace* é mais rápida, é esperado que o equilíbrio entre a fibra, o *headspace* e a amostra seja rapidamente atingido. Quanto menos volátil é o composto, menor é sua concentração no *headspace* [94, 95, 134]. Uma vantagem da extração no *headspace* sobre a extração direta é que compostos levemente voláteis ou componentes não-voláteis da matriz não são amostrados e portanto não são inseridos na coluna capilar [95, 96].

Neste experimento a análise de compostos organomercúricos foram realizadas extrações entre tempos de 3 min e 60 min, para as fibras DVB e P100 no modo *headspace* e direto, respectivamente (Figura 26).

Neste estudo, foi observado que com o uso da fibra DVB o equilíbrio é rapidamente atingido (15 min), devido à alta volatilidade destes compostos e a sua rápida difusão na fase vapor, como observado por Smeele *et al.* na extração de metilmercúrio [97]. Já com a fibra P100 são necessários 30 min para que o equilíbrio seja atingido, como observado por Grimberg *et al.* [175] e Carro *et al.* [155]. As diferenças nas respostas obtidas nas extrações através do *headspace* e direta são explicadas pelas diferenças cinéticas dos processos de partição e absorção das fibras DVB e P100, respectivamente [94].

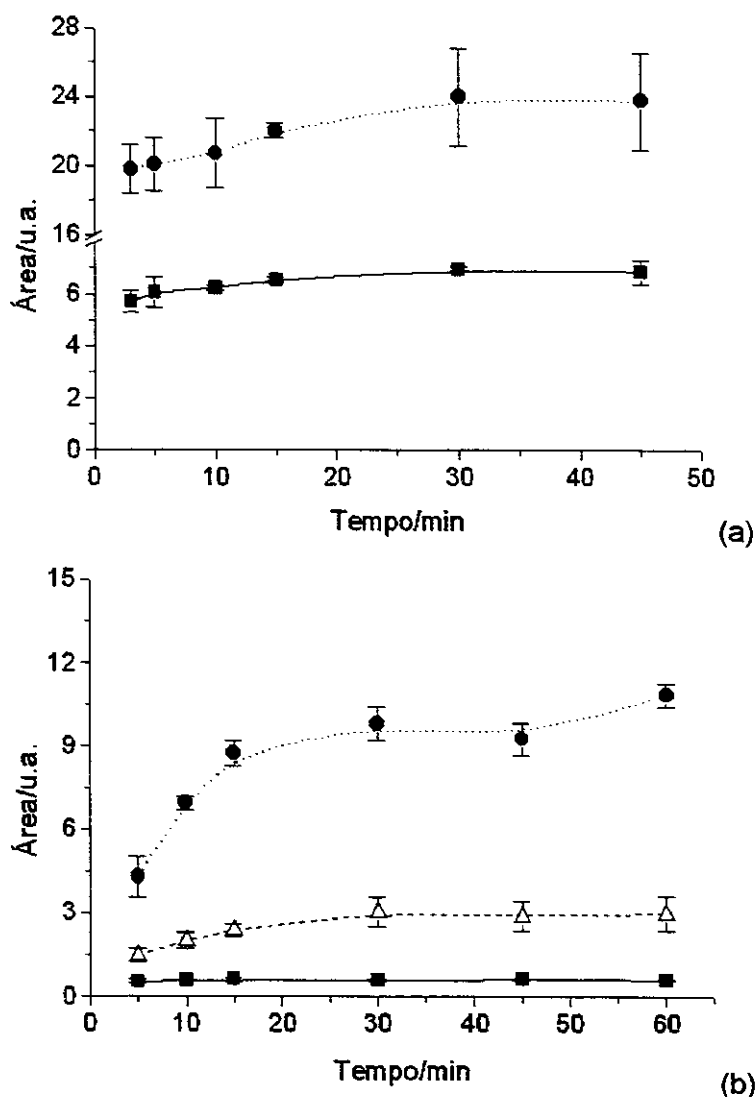


Figura 26: Perfis de extração de compostos organomercúricos. (a) extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) extração direta com a fibra P100. Onde: ■: Me_2Hg , ●: Et_2Hg e △: Ph_2Hg .

Com base nos experimentos realizados para a extração de organomercúricos tem-se que a extração através do *headspace* deve ser realizada com a fibra DVB por 15 min, a 25 °C, com a adição de 9% de NaCl e dessorção a 200 °C. Já a extração direta com a fibra P100 deve ser realizada a 25 °C durante 30 min, com adição de 18 % de NaCl e dessorção a 230 °C.

3.3.2.2 Otimização da etapa de derivatização de compostos organomercúricos

A extração/derivatização *in situ* de compostos organomercúricos compreende a etapa de derivatização da amostra com tetraalquilboratos de sódio em pH controlado (adição de tampão acetato de sódio/ácido acético), adição de 9% de NaCl à amostra, seguida de extração no *headspace* da amostra a 25 °C com a fibra DVB por 15 min e dessorção a 200 °C. Pode-se usar também a extração direta a 25 °C com a fibra P100 por 30 min, após adição de 18% NaCl, e dessorção a 230 °C. A adição de sal é feita após o processo de derivatização devido à interferência dos íons cloreto nas derivatizações de compostos de Hg e Sn com tetraetilborato de sódio [101].

Os principais parâmetros a serem otimizados na derivatização de alquilmercúricos com tetraetilborato de sódio e tetrafenilborato de sódio (pH, temperatura da reação, tempo de reação e concentração do reagente derivatizante) foram estudados.

3.3.2.2.1 Otimização da concentração do derivatizante

A eficiência de extração de organometálicos por SPME pode ser influenciada por um grande número de fatores, incluindo a temperatura de extração, o tempo de extração, o pH da solução e a concentração do reagente derivatizante [129]. Geralmente, as reações de alquilação podem ser realizadas em uma ampla faixa de concentração de derivatizante, mas o uso de concentrações maiores que 2% pode levar à degradação do recobrimento da fibra de SPME durante o processo de extração [87, 115]. Os resultados obtidos com a variação da concentração do agentes derivatizantes na derivatização/extração de alquilmercúricos são mostrados na Figura 27.

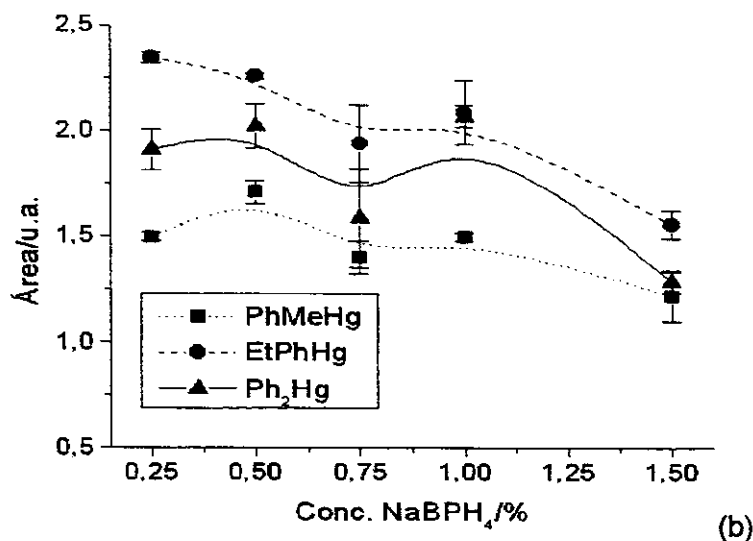
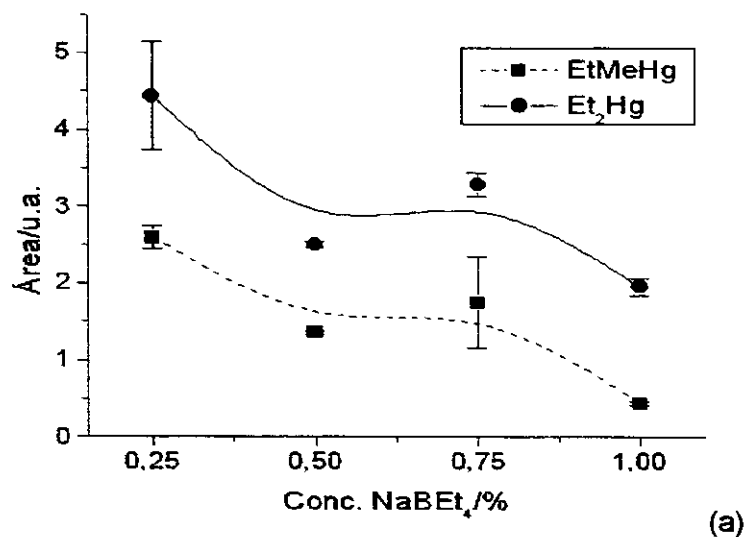
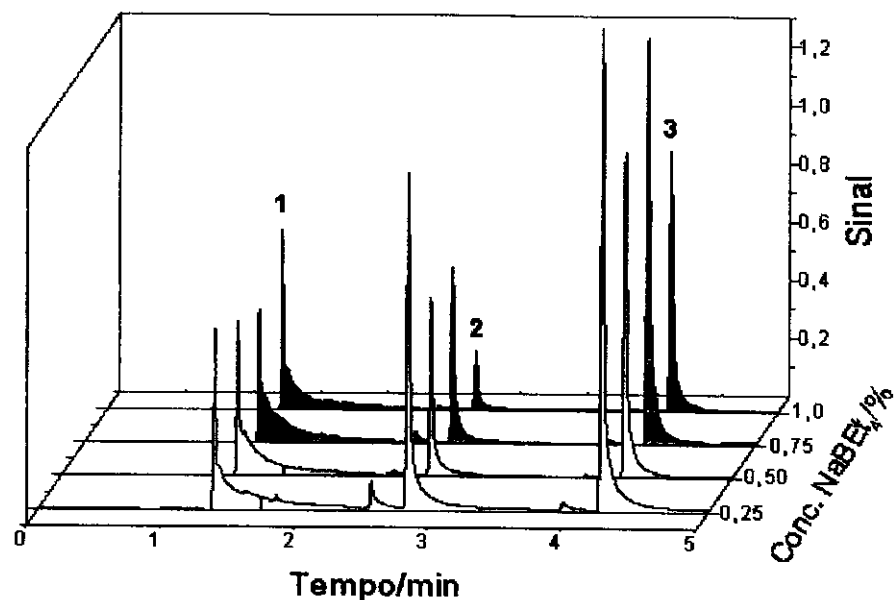


Figura 27: Efeito da concentração de derivatizante na resposta de alquilmercúricos (a) derivatização com NaBEt₄ e extração com fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração com fibra P100.

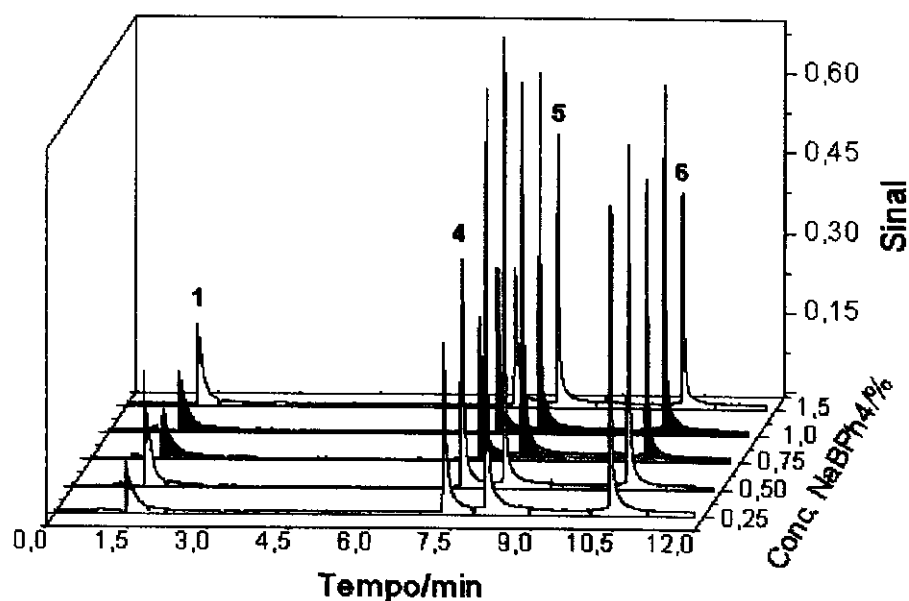
Observa-se uma tendência de queda na quantidade extraída de organomercúricos com um aumento da concentração de derivatizante, especialmente quando o NaBEt₄ é usado. Para NaBEt₄, a concentração ótima obtida foi 0,25% (Figura 27a). Já para o NaBPh₄ as melhores respostas ficaram entre 0,25 % e 0,50 %, sendo esta última adotada nas análises subsequentes. A literatura tem indicado valores de concentração de NaBEt₄ bastante baixos, chegando a soluções 0,1 % [143, 153, 171].

Botana *et al.* observaram que as áreas dos picos de compostos etilados não foram afetadas pela concentração do reagente derivatizante. Entretanto a estabilidade da linha de base cromatográfica, na linha do mercúrio, foi perturbada pelo uso de um excesso de borato. Quanto mais reagente é utilizado durante a etapa de derivatização, mais elevado é o nível de ruído [164, 171]. Segundo Tseng *et al.* [164], o nível de interferência na análise de dietilmercúrio também está relacionada à quantidade de tetraetilborato de sódio usado na reação de derivatização. Os resultados mostraram que o sinal atribuído ao mercúrio metálico é menor quanto menor for a quantidade de tetraetilborato de sódio utilizada [164].

Além da influência na estabilidade da linha de base do cromatograma, alguns trabalhos têm demonstrado a formação de metilmercúrio, devido a impurezas no reagente tetraetilborato de sódio [164] e também o aparecimento de um pico referente ao mercúrio metálico nos cromatogramas obtidos após extração por SPME, atribuído ao uso de tetraalquilboratos de sódio. Como já verificado este sinal é proveniente da decomposição térmica das espécies derivadas do mercúrio no injetor aquecido. Ela é observada independentemente do agente derivatizante utilizado e a intensidade de resposta aumenta com o aumento da temperatura do injetor. A presença deste pico não compromete a exatidão do método porque uma fração de massa constante das espécies derivatizadas é decomposta levando sempre a mesma perda de resposta [175-177]. Segundo Grimberg *et al.* [175], a intensidade do pico do mercúrio metálico é relativamente maior após a reação para fenilação das espécies de mercúrio, devido à necessidade do uso de uma maior temperatura da linha de transferência. No nosso trabalho, os cromatogramas obtidos com diferentes concentrações de derivatizante mostram que a formação de Hg^0 é dependente da concentração do derivatizante. Em geral, em concentrações menores de agente derivatizante o sinal atribuído ao Hg^0 é menor, sem prejuízo dos demais sinais analíticos (Figura 28).



(a)



(b)

Figura 28: Cromatogramas obtidos com diferentes concentrações de agente derivatizante. (a) derivatização com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg^0 , 2: EtMeHg , 3: Et_2Hg , 4: PhMeHg , 5: EtPhHg e 6: Ph_2Hg .

3.3.2.2 Influência da acidez do meio

A acidez e a salinidade do meio são importantes fatores, que influenciam não somente a derivatização, mas também as características de sorção dos analitos. O ajuste da acidez da amostra aumenta a detectabilidade do método para analitos ácidos e básicos. Pelo ajuste adequado da acidez do meio, ácidos e bases fracas podem ser convertidas a formas neutras com extração mais eficiente pela fibra de SPME. Entretanto, neste caso a acidez do meio somente influencia o procedimento de derivatização [93, 114, 115, 155].

A alquilação de compostos organometálicos com tetraalquilboratos de sódio é conhecida por ser fortemente dependente da acidez do meio. Para determinar a melhor acidez do meio para as reações de derivatização foram feitos ensaios usando amostras tamponadas (acetato de sódio : ácido acético) em pH de 3,0 a 8,0 (Figura 29).

Para NaBEt_4 , o melhor pH para derivatização é 5,0. Os resultados obtidos com a variação do pH mostraram que nenhum efeito significativo pode ser atribuído a este parâmetro durante a etapa de etilação, a partir do pH 5,0, concordando com o observado por Tseng *et al.* [164]. Na derivatização com NaBPh_4 verifica-se uma dispersão de dados maior, mas o rendimento parece ser constante a partir de pH 4,5, tendo sido este adotado nos ensaios posteriores. Na análise no *headspace* de espécies etiladas muitos trabalhos têm mostrado que uma eficiência de extração maior é alcançada com pH 5,3 [96] ou pH 5,0 com a fibra P100 [115, 156, 171]. Segundo a literatura, na derivatização com tetrafenilborato de sódio o pH pode variar na faixa de 2 a 6, sendo este reagente mais robusto que o tetraetilborato de sódio, que deve ser usado em pH por volta de 5,0 [87, 93, 156]. O pH da solução para a extração de espécies propiladas de mercúrio pode variar de 4 a 7 [129]. Quando a geração de hidretos é utilizada na análise do metilmercúrio o pH ótimo deve ser 4,0 [153].

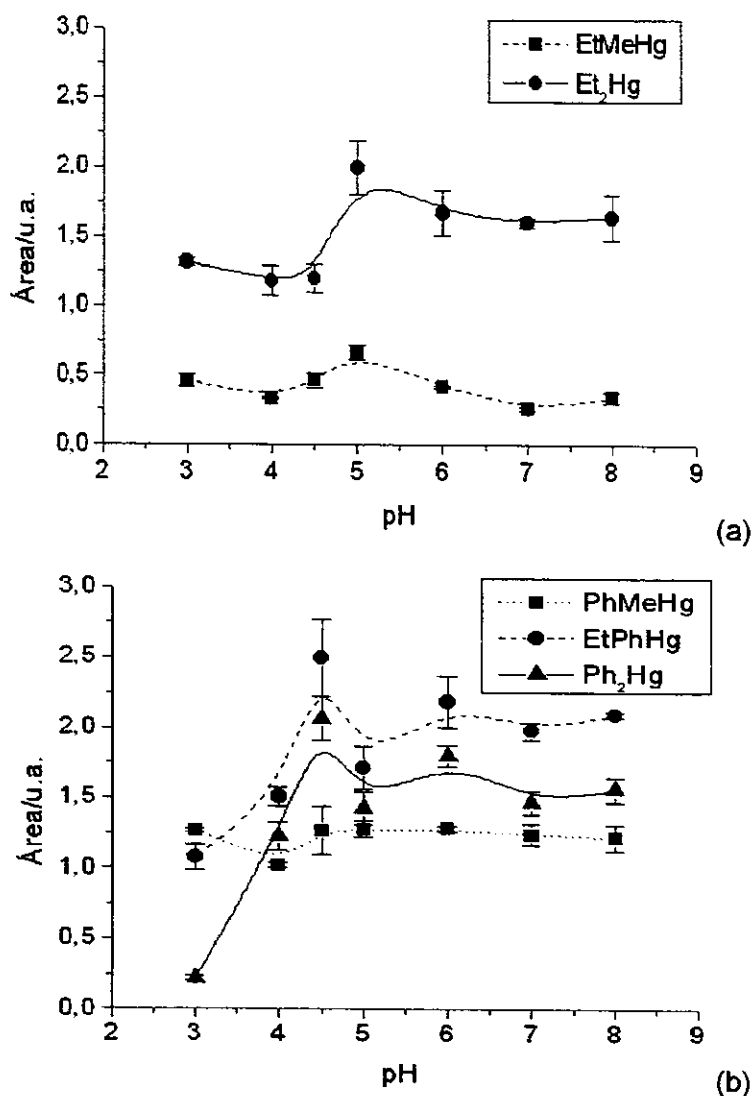


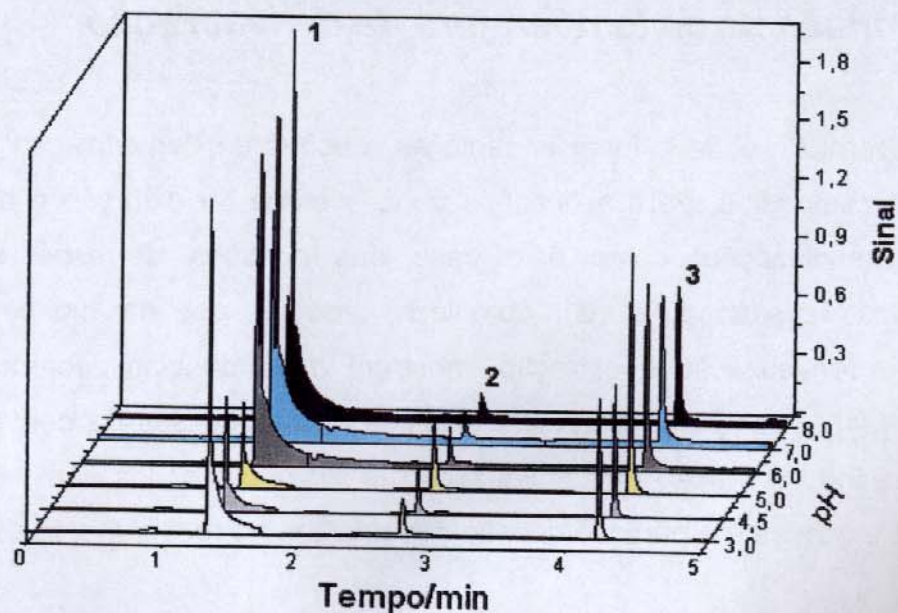
Figura 29: Variação da resposta de organomercúricos submetidos à derivatização/extração em diferentes valores de acidez do meio. (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100.

Segundo Tseng *et al.* [164], a transformação de espécies de mercúrio durante a etapa de etilação é significativamente afetada pela combinação dos efeitos de pH e quantidade de tetraetilborato de sódio. Uma transformação significativa de metilmercúrio em mercúrio metálico e inorgânico durante o processo de etilação foi reportado em soluções contendo haletos. Segundo Rodil *et al.* [170], o procedimento de derivatização de mercúrio inorgânico com tetrafenilborato de sódio requer mais

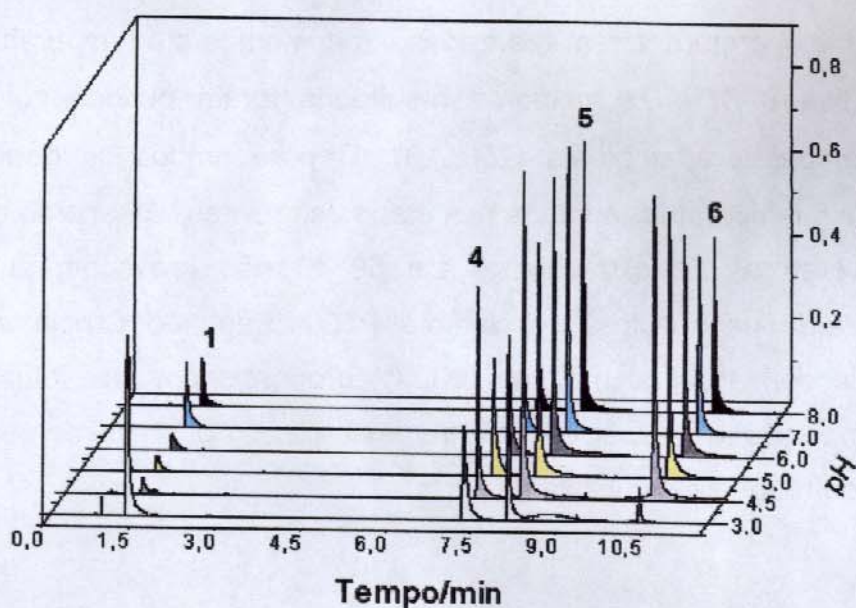
estudos a respeito de possíveis compostos formados durante o pré-tratamento químico da amostra.

Estudos têm demonstrado que o grau de transformação de Hg^{2+} a Hg^0 está relacionado à acidez da solução na etapa de etilação. Em valores mais baixos de pH ocorre formação de mercúrio metálico. Em valores de pH menores que 2,0 a derivatização das espécies de mercúrio será menor pela rápida decomposição do agente de etilação. Entretanto, para maximizar a geração de derivados de mercúrio e minimizar a formação de mercúrio metálico, o pH ótimo deve ser observado.

A acidez da amostra tem um efeito significativo na formação de Hg^0 (Figura 30). Tanto na derivatização com tetraetilborato de sódio quanto na derivatização com tetrafenilborato de sódio, observa-se uma maior intensidade do sinal atribuído ao Hg^0 em valores de pH 3,0 e acima de 6,0. Este fato indica que apesar da acidez não influenciar a resposta dos derivados fenílicos e etílicos do mercúrio a partir de pH 4,5 e 5,0, respectivamente, ele altera a formação de Hg^0 durante o processo de extração/dessorção com a fibra de SPME, independentemente do recobrimento utilizado, P100 ou DVB.



(a)



(b)

Figura 30: Cromatogramas obtidos após reação de derivatização em diferentes valores de acidez do meio. (a) derivatização com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: Hg^0 , 2: EtMeHg , 3: Et_2Hg , 4: PhMeHg , 5: EtPhHg e 6: Ph_2Hg .

3.3.2.2.3 Influência da temperatura de derivatização

A temperatura pode influenciar tanto as reações de derivatização quanto as extrações de compostos. Para aplicações onde a etapa de extração é acoplada à reação de derivatização, como é o caso das análises de espécies iônicas organometálicas, a situação é mais complexa, uma vez que em muitos casos as duas etapas, derivatização e extração, mostram dependências diferentes com a temperatura [94]. A temperatura afeta a cinética dos processos de derivatização e extração, incluindo a reação de derivatização, a distribuição dos analitos entre as fases líquida e gasosa e a partição/difusão dos analitos no recobrimento da fibra [92, 115].

Para verificar a dependência das reações de derivatização de espécies de mercúrio com a temperatura, foram realizados experimentos em temperaturas de 25 °C a 60 °C (Figura 31). Os melhores resultados foram obtidos com reações realizadas à temperatura ambiente (25 ± 3) °C para ambos os derivatizantes, portanto esta foi a temperatura adotada nas etapas seguintes. De acordo com Cai *et al.* [134], temperaturas de extração de até 50 °C não provocam aumento na quantidade extraída de analitos com a fibra P100. Segundo Crnoja *et al.* [94], temperaturas de derivatização maiores (60 °C) proporcionam uma diminuição na eficiência de extração de espécies etiladas e fenílicas, provavelmente devido à decomposição do reagente derivatizante.

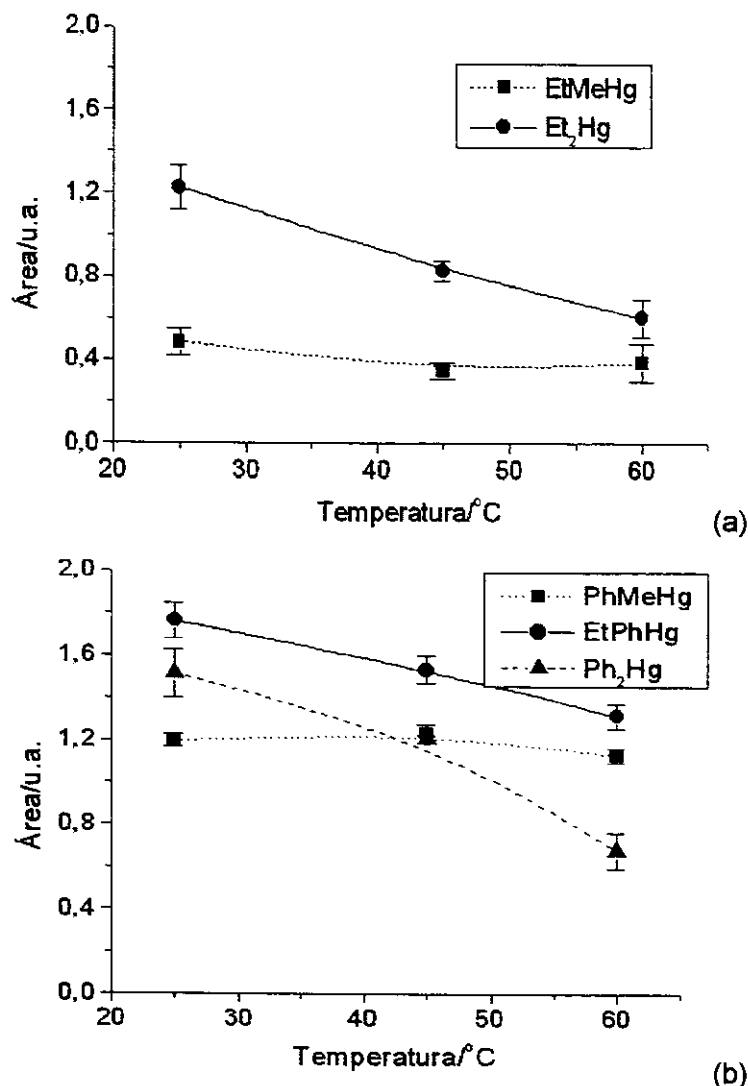


Figura 31: Efeito da temperatura de derivatização na determinação de compostos organomercúricos (a) derivatização com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100.

3.3.2.2.4 Otimização do tempo de derivatização

O processo de derivatização pode aumentar significativamente a partição dos analitos entre o recobrimento da fibra e a matriz da amostra, influenciando o tempo de formação das espécies de interesse [134]. Os resultados obtidos com diferentes

tempos de derivatização de compostos mercúricos são mostrados na Figura 32. Tanto a reação com o tetraetilborato de sódio como com o tetrafenilborato de sódio é bastante rápida, 3 min e 5 min, respectivamente. Tempos de reação maiores ocasionaram uma menor resposta dos analitos, provavelmente devido à sua perda, especialmente para derivados etilados.

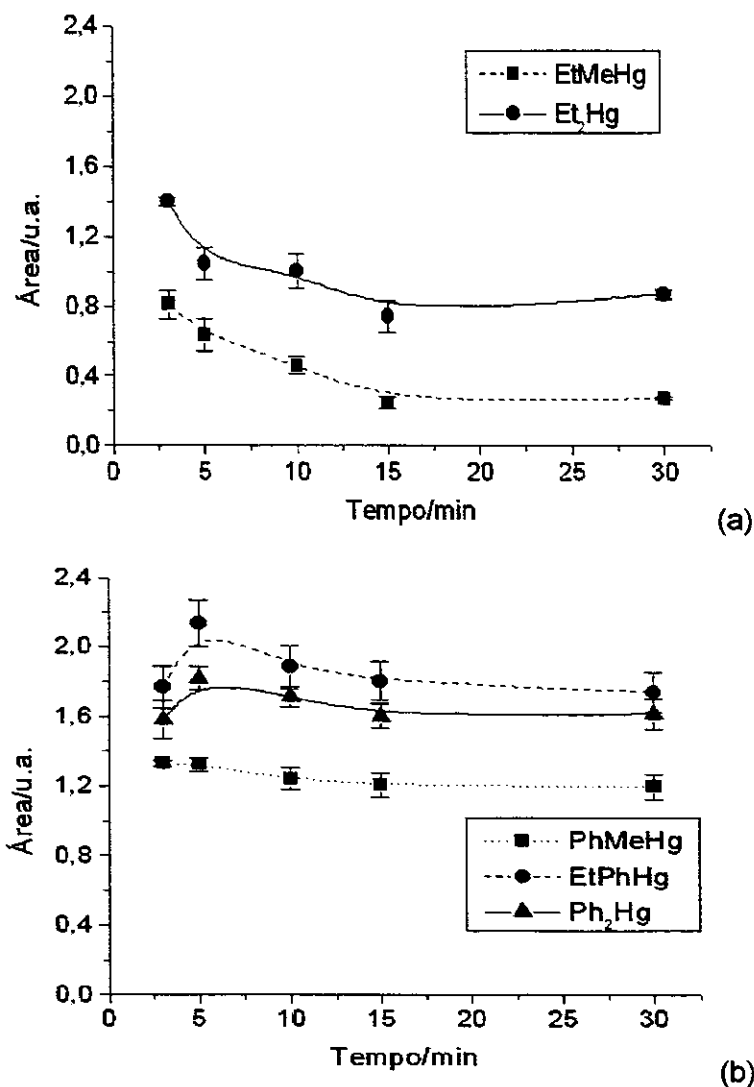


Figura 32: Estudo da influência do tempo de reação de derivatização na determinação de compostos organomercúricos. (a) derivatização com NaBEt₄ e extração no *headspace* com a fibra DVB e (b) derivatização com NaBPh₄ e extração direta com a fibra P100.

Os resultados mostraram que as melhores condições para determinação simultânea de compostos organomercúricos no *headspace* da amostra e derivatização com solução 0,25% de tetraetilborato de sódio são: pH 5,0 (tampão acetato de sódio : ácido acético) a 25 °C por 3 min, adição de 9% de NaCl seguida de extração com a fibra DVB por 15 min e dessorção a 200 °C. Já a derivatização com solução com NaBPh₄ 0,50 % deve ser realizada a pH 4,5 (tampão acetato de sódio : ácido acético) por 5 min, seguida de extração direta com a fibra P100 a 25 °C por 30 min e dessorção a 230 °C.

A literatura indica em alguns casos, uma baixa repetibilidade nas extrações diretas por SPME realizados com a adição de NaCl, devido à sorção de haletos na fibra e conseqüente dessorção no injetor [101]. Isto não foi observado neste trabalho. Os métodos otimizados apresentaram uma boa repetitividade com desvios padrão relativo entre 2 e 8 %. Além disto a presença de NaCl e tetrafenilborato de sódio nas extrações diretas não comprometeu a vida útil da fibra P100.

Exemplos de cromatogramas obtidos após derivatização/extração nas condições otimizadas são apresentados nas Figura 33 e 33. Os cromatogramas mostram a boa detectabilidade do sistema GC-AED para derivados etílicos e fenílicos, com baixo nível de ruído, apesar da baixa concentração utilizada no procedimento.

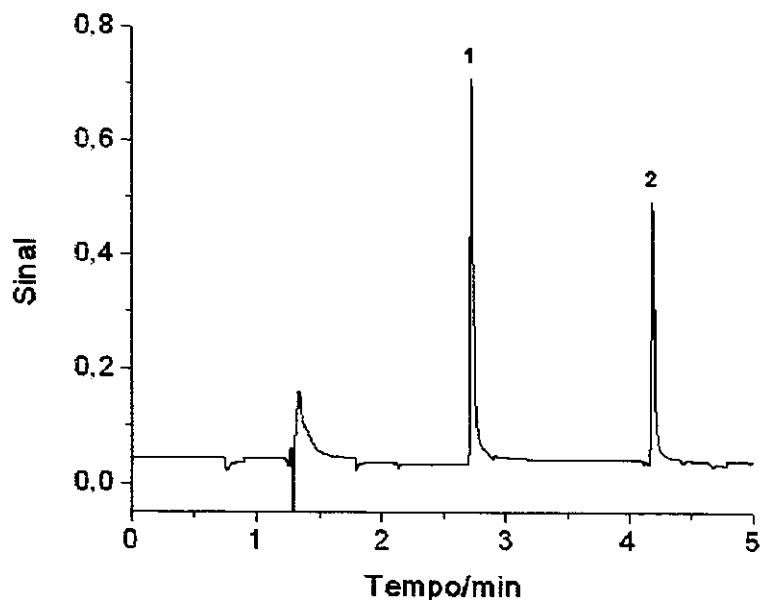


Figura 33: Cromatograma obtido na banda de emissão do Hg (254 nm) após derivatização de MeHg^+ e EtHg^+ com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB. Onde: 1: EtMeHg e 2: Et_2Hg . Dopagem com solução 6 ng mL^{-1} .

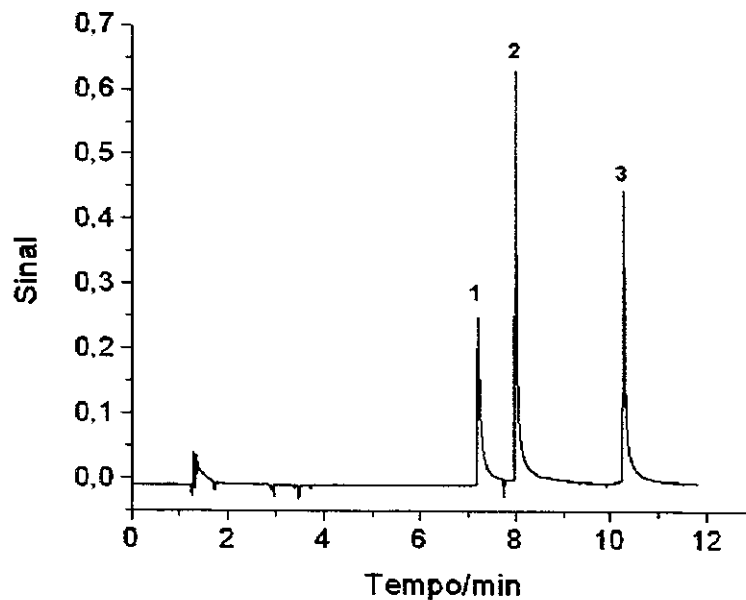


Figura 34: Cromatograma obtido na banda de emissão do Hg (254 nm) após derivatização de Hg^{2+} , MeHg^+ e EtHg^+ com NaBPh_4 e extração direta com a fibra P100. Onde: 1: PhMeHg , 2: EtPhHg e 3: Ph_2Hg . Dopagem com solução 6 ng mL^{-1} .

A análise dos resultados dos dois métodos otimizados: derivatização com NaBEt_4 e extração no *headspace* com a fibra DVB e derivatização com NaBPH_4 seguido de extração direta com a fibra P100, mostra que ambos podem ser utilizados em análises de amostras ambientais e biológicas, devido à alta detectabilidade obtida no sistema GC-AED. No entanto, eles possuem algumas particularidades. A derivatização com NaBEt_4 é prejudicada pela instabilidade do reagente, que deve ser preparado a cada dia. Além disto, o NaBEt_4 é bastante higroscópico dificultando o preparo da solução derivatizante e é cerca de 15 vezes mais caro que o NaBPH_4 . Outro fato observado é a impossibilidade de determinação conjunta de mercúrio inorgânico e etilmercúrio. Apesar destas desvantagens o NaBEt_4 permite as análises no *headspace* com alta detectabilidade das espécies etiladas, o que favorece a análise de amostras muito sujas. O uso do NaBPH_4 oferece as vantagens de análise conjunta de mercúrio inorgânico e etilmercúrio, o baixo custo do reagente e a facilidade de manipulação, menor sensibilidade à água, oxigênio e luz [87, 126, 149]. No que tange a extração por SPME, verifica-se uma maior detectabilidade para o derivado de metilmercúrio com a fibra DVB, apesar de ocorrer maior degradação dos analitos durante o processo de dessorção. A escolha de um dos métodos para a análise de organomercúricos vai depender de fatores como custo, tempo de análise e características da amostra. Se for priorizado o custo da análise, a escolha tenderá para a derivatização com NaBPH_4 e extração com a fibra P100. Se o tempo de análise for a peça chave, então a derivatização com NaBEt_4 e extração com a fibra DVB será escolhida. Se na amostra de interesse contiver as espécies mercúrio inorgânico e etilmercúrio e a especiação se fizer necessária, a derivatização com NaBPH_4 deverá ser utilizada. Se somente uma das duas espécies estiver presente na amostra, o NaBEt_4 poderá ser usado. Independentemente do método escolhido para a análise é de importância primordial o controle do pH e da concentração de derivatizante, que como mostraram os resultados obtidos neste estudo influenciam a formação de Hg^0 durante o processo de dessorção das amostras.

3.3.3 Verificação da exatidão do método com material certificado

No presente trabalho foi utilizado tecido de molusco para verificar a exatidão dos métodos aqui propostos para a determinação de organomercúricos. A utilização de materiais certificados na validação do método possibilita a determinação de parâmetros como o limite de detecção, a repetibilidade, a precisão, a exatidão, entre outros. A quantificação foi realizada através de curvas analíticas obtidas por adição padrão. Os resultados obtidos são mostrados na Tabela 9.

Tabela 9: Parâmetros de validação obtidos para o MeHg^+ utilizando a derivatização com NaBEt_4 e extração através do *headspace* com a fibra DVB

Parâmetros	Valor certificado SRM 2976	Valor encontrado
Conc. MeHg^+ (ng g^{-1})	27,8 ($\pm 1,1$)	27,0 ($\pm 1,3$)
LD (pg g^{-1})	----	2,0
r	----	0,9999
a	----	0,602
b	----	33,8

Os resultados obtidos com o uso do material certificado SRM 2976 mostram uma concordância entre os valores de concentração de metilmercúrio certificado e encontrado. Além disto, um limite de detecção baixo foi encontrado. Segundo Ipolyi *et al.* [133] a quantidade de mercúrio total máxima permitida em frutos do mar é $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$ de massa. Etilmercúrio não tem sido observado em amostras de animais marinhos e de águas frescas [89]. Alimentos de origem marinha são caracterizados

lipofílicas elas podem estar ligadas a esta fase, diminuindo assim sua concentração, especialmente no *headspace* da amostra [87, 147]. Pela concordância dos resultados obtidos com o valor certificado verifica-se que este fato não foi observado. A digestão alcalina não foi apropriada ao uso de tetrafenilborato de sódio como agente derivatizante. A adição deste derivatizante ao extrato de material certificado produziu um sólido branco, possivelmente tetrafenilborato de potássio, fazendo com que a extração direta se tornasse inviável. A utilização de outros métodos de extração como a digestão ácida, destilação ou a extração assistida por microondas eliminaria este problema. Entretanto, trabalhos na literatura têm mostrado que ocorre formação de metilmercúrio e outros artefatos durante o processo de digestão ácida e destilação, sendo esta formação de metilmercúrio menor nas técnicas de destilação. A formação de artefatos é influenciada também pelo tipo de matriz [127, 133, 135, 164]. Em amostras de tecido biológico (amostras de frutos do mar) não foi observada a formação accidental durante os procedimentos de destilação [157, 163].

CONCLUSÕES

O sistema GC-AED possui grande aplicabilidade, mas deve ser otimizado para cada conjunto de linhas de emissão, pois sofre influência da pressão de gases como hélio, metano, oxigênio e hidrogênio. Os estudos com compostos nitrogenados mostraram a aplicabilidade do sistema à calibração independente de composto para injeções líquidas de compostos, quando são monitoradas as linhas de emissão do C (193 nm) e N (174 nm). Já as respostas obtidas na banda de emissão do N (388 nm) sofrem influência da razão C : N de cada molécula.

As análises das amostras de líquido de cupuaçu mostraram que a combinação SPME-GC-AED é apropriada para a determinação de compostos nitrogenados em amostras complexas. A versatilidade da detecção por emissão atômica permite análises confiáveis, já que sua detecção elemento-seletiva facilita a identificação e quantificação de alquilpirazinas. Apesar dos problemas inerentes ao monitoramento da emissão de N (174 nm) que está sujeito à interferência do próprio ar atmosférico, ela mostrou-se eficiente em muitos casos. No entanto, a banda de emissão de N em 388 nm apresenta melhor resposta que a emissão em 174 nm, com boa precisão, linearidade e menores limites de detecção para todos os compostos nitrogenados estudados. As desvantagens desta banda de emissão são a dificuldade de estabilização da resposta e o maior consumo de gases reagentes. As análises de líquido de cupuaçu por SPME-GC-AED mostraram níveis de alquilpirazinas maiores que os já encontrados em chocolate e líquido de cacau.

A complexidade do funcionamento do sistema GC-AED demanda otimização quimiométrica de parâmetros operacionais, como as pressões de gases e as temperaturas da cavidade e da linha de transferência, como demonstrado nas análises de compostos organomercúricos. O planejamento fatorial aliado ao planejamento estrela utilizados na otimização dos parâmetros de detecção forneceu os valores ótimos para os parâmetros estudados, bem como mostrou a influência das variáveis que afetam a detecção de compostos organomercúricos. Através destes estudos verificou-se que na faixa estudada, apenas a vazão de *make-up* hélio influencia a resposta de compostos organomercúricos.

A otimização em separado das etapas de derivatização *in situ* e da extração por SPME de compostos derivados do mercúrio possibilitou o esclarecimento antes da detecção da influência de parâmetros como pH, temperaturas de derivatização e extração e recobrimento da fibra de SPME. Tanto o NaBEt₄ como o NaBPh₄ foram efetivos na derivatização de compostos iônicos de mercúrio. Entretanto, cada um possui suas particularidades e sua aplicação em separado. O uso de NaBEt₄ foi adequado para análises em modo *headspace* com a fibra DVB. Já o uso do NaBPh₄ possibilita a diferenciação entre etilmercúrio e Hg²⁺, duas espécies importantes no ciclo ambiental do mercúrio, mas deve ser realizada no modo direto. Independente do agente derivatizante utilizado, as variáveis pH e concentração do agente derivatizante devem ser ajustadas, pois elas influenciam o processo de decomposição das espécies de mercúrio no injetor do cromatógrafo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] A.J. McCormack, S.C. Tong, W.D. Cooke, Anal. Chem. 37 (1965) 1470.
- [2] C. Webster, M. Cooke, J. High Resolut. Chromatogr. 18 (1995) 319.
- [3] T. Greibrokk, C. Brede, S. Pedersen-Bjergaard, E. Lundanes, Am. Lab. 31 (1999) 24.
- [4] N.A. Stevens, M.F. Borgerding, Anal. Chem. 71 (1999) 1083.
- [5] O. Zuloaga, N. Etxebarria, L.A. Fernández, J.M. Madariaga, J. High. Resolut. Chromatogr. 23 (2000) 681.
- [6] P. Viñas, N. Campillo, I. López-García, N. Aguinaga, M. Hernández-Córdoba, J. Chromatogr. A 978 (2002) 249.
- [7] F.D. Rinkema, A.J.H. Louter, U.A.T. Brinkman, J. Chromatogr. A 678 (1994) 289.
- [8] Y. Takigawa, T. Hanai, J. Hubert, J. High Resolut. Chromatogr. 9 (1986) 698.
- [9] R. Lobinski, W.M.R. Durkx, M. Ceulemans, F.C. Adams, Anal. Chem. 64 (1992) 159.
- [10] N.A. Stevens, M.F. Borgerding, Anal. Chem. 70 (1998) 4223.
- [11] N.R. Hardas, P.C. Uden, J. Chromatogr. A 844 (1999) 271.
- [12] B.D. Quimby, J.J. Sullivan, Anal. Chem. 62 (1990) 1027.
- [13] I.R. Pereiro, A.C. Díaz, Anal. Bioanal. Chem. 372 (2002) 74.
- [14] D.F. Gurka, S. Pyle, R. Titus, Anal. Chem. 69 (1997) 2411.
- [15] B. Rosenkranz, J. Bettmer, Trends Anal. Chem. 19 (2000) 138.
- [16] S. Voisin, F.N.R. Renaud, J. Freney, M. de Montclos, R. Boulieu, D. Deruaz, J. Chromatogr. A 863 (1999) 243.
- [17] F. Bertoncini, D. Thiébaud, M. Caude, M. Gagean, B. Carrazé, P. Beurdouche, X. Duteurtre, J. Chromatogr. A 910 (2001) 127.
- [18] N. Kovacic, T.L. Ramus, J. Anal. Atomic Spectrom. 7 (1992) 999.
- [19] B. Chiavarino, M.E. Marzio, A. di Marzio, S. Fornarini, J. Chromatogr. B 706 (1998) 269.
- [20] S. Slaets, F. Laturus, F.C. Adams, Fresenius J. Anal. Chem. 364 (1999) 133.
- [21] J.J. Sullivan, B.D. Quimby, Anal. Chem. 62 (1990) 1034.
- [22] T. Hankemeier, A.J.H. Louter, F.D. Rinkema, U.A.T. Brinkman, Chromatographia 40 (1995) 119.
- [23] J.T. Anderson, Anal. Bioanal. Chem. 373 (2002) 344.

- [24] V. Minganti, R. Capelli, R. de Pellegrini, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 471.
- [25] R. Reuther, L. Jaeger, B. Allard, *Anal. Chim. Acta* 394 (1999) 259.
- [26] HP GC-AED ChemStation, Rev A. 07.01, Hewlett-Packard Company, Palo Alto, 1998.
- [27] A.M. González, P.C. Uden, *J. Chromatogr. A* 898 (2000) 201.
- [28] G. Becker, A. Colmsjö, *Anal. Chim. Acta* 376 (1998) 265.
- [29] J.P. Snell, W. Frech, Y. Thomassen, *Analyst*, 121 (1996) 1055.
- [30] N.R. Hardas, R. Adam, P.C. Uden, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 249.
- [31] W. Elbast, M.S. Caubet, D. Deruaz, J.L. Brazier, *Anal. Lett.* 32 (1999) 1627.
- [32] S. Pedersen-Bjergaard, S.I. Semb, E.M. Brevik, T. Greibrokk, *J. Chromatogr. A* 723 (1996) 337.
- [33] S.R. Sousa, S.E. Bialkowski, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 181.
- [34] K. Laniewski, H. Borén, A. Grimvall, *Chemosphere* 38 (1999) 393.
- [35] H.B. Swan, *J. Food Compos. Anal.* 13 (2000) 207.
- [36] K. Laniewski, T. Wännman, G. Hagman, *J. Chromatogr. A* 985 (2003) 275.
- [37] J.L. Bernal, M.J. del Nozal, M.T. Martín, J.J. Jiménez, *J. Chromatogr. A* 754 (1996) 245.
- [38] R. Eisert, K. Levsen, G. Wünsch, *J. Chromatogr. A* 683 (1994) 175.
- [39] S. Nakamura, M. Takino, S. Daishima, *Anal. Sci.* 16 (2000) 627.
- [40] A. Stumpf, K. Tolvaj, M. Juhász, *J. Chromatogr. A* 819 (1998) 67.
- [41] W. Elbast, F. Besacier, D. Deruaz, J.L. Brazier, *J. Chromatogr. A* 690 (1997) 115.
- [42] I.R. Pereiro, V.O. Schmitt, R. Lobinski, *Anal. Chem.* 69 (1997) 4799.
- [43] M. Mazurek, Z. Witkiewicz, S. Popiel, M. Sliwakowski, *J. Chromatogr. A* 919 (2001) 133.
- [44] W. Elbast, M.S. Caubet, D. Deruaz, J.L. Brazier, *Anal. Lett.* 32 (1999) 3111.
- [45] D. Kohl, I. Heinert, J. Bock, T. Hofmann, P. Schieberle, *Thin Solid Films* 391 (2001) 303.
- [46] K.I. Skog, M.A.E. Johansson, M.I. Jägerstad, *Food Chem. Toxicol.* 36 (1998) 879.
- [47] M. Özdemir, F. Açıktur, M. Yildiz, G. Biringen, T. Gürçan, M. Löker, *Food Chem.* 73 (2001) 185.
- [48] A. Stephan, M. Bücking, H. Steinhart, *Food Res. Int.* 33 (2000) 199.
- [49] M. Lipp, E. Anklam, *Food Chem.* 62 (1998) 99.
- [50] C. Counet, D. Callemien, C. Ouwerx, S. Collin, *J. Agric. Food Chem.* 50 (2002) 2385.
- [51] P. Schnermann, P. Schielberle, *J. Agric. Food Chem.* 45 (1997) 867.
- [52] M. van Praag, H.S. Stein, M.S. Tibetts, *J. Agric. Food Chem.* 16 (1968) 1005.
- [53] J. Pino, E. Roncal, *Nahrung* 36 (1992) 299.
- [54] S. Muresan, M.A.J.L. Eillebrecht, T.C. de Rijk, H.G. de Jonge, T. Leguijt, H.H. Nijhuis, *Food Chem.* 68 (2000) 167.
- [55] M. Wettasinghe, T. Vasanathan, F. Temelli, K. Swallow, *Food Res. Int.* 34 (2001) 149.
- [56] J.S. Elmore, D.S. Mottram, M. Enser, J.D. Wood, *Meat Sci.* 55 (2000) 149.
- [57] L. Hashim, H. Chaveron, *Food Res. Int.* 28 (1996) 619.

- [58] D. Ryan, R. Shellie, P. Tranchida, A. Casilli, L. Mondello, P. Marriott, J. Chromatogr. A 1054 (2004) 57.
- [59] O.O. Lasekan, W.O. Lasekan, M.A. Idowu, Food Chem. 58 (1997) 341.
- [60] M. Solina, P. Baumgartner, R.L. Johnson, F.B. Whitfield, Food Chem. 90 (2005) 861.
- [61] M.Y. Jung, J.Y. Bock, S.O. Back, T.K. Lee, J.H. Kim, Food Chem. 60 (1997) 95.
- [62] A. Kanavouras, A. Kiritsakis, R.J. Hernandez, Food Chem. 90 (2005) 69.
- [63] J.M. Ames, A.B. Defaye, L. Bates, Food Chem. 58 (1996) 323.
- [64] S.S. Mahajan, L. Goddik, M.C. Qian, J. Dairy Sci. 87 (2004) 4057.
- [65] E.G. Abegaz, W.L. Kerr, P.E. Koehler, Lebensm. -Wiss.u.-Technol. 37 (2004) 215.
- [66] M. Riu-Aumatell, M. Castellari, E. López-Tamames, S. Galassi, S. Buxaderas, Food Chem. 87 (2004) 627.
- [67] C. Larroche, I. Besson, J.B. Gros, Process Biochem. 34 (1999) 667.
- [68] C. Sala, M. Mestres, M.P. Martí, O. Busto, J. Ghasch, J. Chromatogr. A 880 (2000) 93.
- [69] M.M. Sanagi, W.P. Hung, S.M. Yasir, J. Chromatogr. A 785 (1997) 361.
- [70] J.A. Maga, C.E. Sizer, J. Agr. Food Chem. 21 (1973) 22.
- [71] K. Kikugawa, K. Hiramoto, T. Kato, H. Yanagawa, Mut. Res. 465 (2000) 183.
- [72] V.A. Yaylayan, A. Keyhani, Food Chem. 74 (2001) 1.
- [73] M.S. Jinap, B. Jamilah, S. Nazamid, Food Chem. 85 (2004) 73.
- [74] M.S. Madruga, D.S. Mottram, J. Bras. Chem. Soc. 9 (1998) 261.
- [75] P.B. Cavalcante, Frutas Comestíveis da Amazônia, INPA, Belém, 1976.
- [76] R.F.R. Nazaré, Cocoa and chocolate substitute production from *Theobroma grandiflorum* seeds, by fermenting, washing, roasting, shelling, milling, etc. patent BR9003739-A (to Empresa Brasileira de Agropecuária - EMBRAPA).
- [77] J.B. Harbourne, Phytochemical Methods : a Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, Chapman and Hall, London, 1984.
- [78] L. Pillonel, J.O. Bosset, R. Tabacchi, Lebensm. -Wiss.u.-Technol. 35 (2002) 1.
- [79] Y. Sha, S. Shen, G. Duan, J. Pharm. Biomed. Anal. 36 (2004) 381.
- [80] C.J. Scarlata, S.E. Ebeler, J. Agric. Food Chem. 47 (1999) 2505.
- [81] M. Natangelo, S. Tavazzi, R. Fanelli, E. Benfenati, J. Chromatogr. A 859 (1999) 193.
- [82] I. Valor, J.C. Moltó, D. Apraiz, G. Font, J. Chromatogr. A 767 (1997) 195.
- [83] C. Haberhauer-Troyer, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, J. Chromatogr. A 848 (1999) 305.
- [84] O. Pinho, I.M.P.L.V.O. Ferreira, M.A. Ferreira, Anal. Chem. 74 (2002) 5199.
- [85] J. Beltran, F.J. Lopez, O. Cepria, F. Hernandez, J. Chromatogr. A 808 (1998) 257.
- [86] A. Peñalver, E. Pocurull, F. Borrull, R.M. Marcé, Chromatographia 50 (1999) 685.
- [87] M. Bao, F. Pantini, O. Griffini, D. Burrini, D. Santianni, K. Barbieri, J. Chromatogr. A 809 (1998) 75.
- [88] Y.H. Sung, T.Y. Li, S.D. Huang, Talanta 65 (2005) 518.
- [89] J.S. Bonvehí, F.V. Coll, J. Agric. Food Chem. 50 (2002) 3743.
- [90] K. Gill, W.A. Brown, Anal. Chem. 74 (2002) 1031.

- [91] F.J. Lopes, E. Pitarch, S. Egea, J. Beltran, F. Hernández, *Anal. Chim. Acta* 433 (2001) 217.
- [92] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 105.
- [93] T. Tutschku, S. Mothes, R. Wennrich, *Fresenius J. Anal. Chem.* 354 (1996) 587.
- [94] M. Crnoja, C. Habernauer-Troyer, E. Rosenberg, M. Grasserbauer, *J. Anal. At. Spectrom.* 16 (2001) 1160.
- [95] Z. Mester, R.E. Sturgeon, J. Pawliszyn, *Spectrochim. Acta, Part B* 56 (2001) 233.
- [96] L. Moens, T. de Smaele, R. Dams, *Anal. Chem.* 69 (1997) 1604.
- [97] T. de Smaele, L. Moens, P. Sandra, R. Dams, *Mikrochim. Acta* 130 (1999) 241.
- [98] T. Górecki, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3008.
- [99] H.H. Jelén, K. Wlazly, E. Wasowicz, E. Kaminski, *J. Agric. Food Chem.* 46 (1998) 1469.
- [100] J. Peng, A. Wan, *Chemosphere* 36 (1998) 2731.
- [101] Y. Morcillo, Y. Cai, J.M. Bayona, *J. High Resolut. Chromatogr.* 18 (1995) 767.
- [102] P.G. Hill, R. M. Smith, *J. Chromatogr. A* 872 (2000) 203.
- [103] J. Lipinski, *Fresenius J. Anal. Chem.* 367 (2000) 445.
- [104] C. Aguilar, A. Peñalver, E. Pocurull, J. Ferré, F. Borrull, R.M. Marcé, *J. Chromatogr. A* 844 (1999) 425.
- [105] D.R. Killelea, J.H. Aldstadt III, *J. Chromatogr. A* 918 (2001) 169.
- [106] X. Yu, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 72 (2000) 1788.
- [107] C. Deng, N. Li, X. Zhang, *J. Chromatogr. B* 813 (2004) 47.
- [108] R.C. Sparrenberger, C.K. Cross, E.D. Conte, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6156.
- [109] S. Wongpornchai, K. Dumri, S. Jongkaewwattana, B. Siri, *Food Chem.* 87 (2004) 407.
- [110] S.Y. Moon, E.V.Y. Li-Chan, *Food Chem.* 88 (2004) 141.
- [111] C. Deng, N. Li, X. Zhang, *J. Chromatogr. A* 1059 (2004) 149.
- [112] C.H. Watson, J.S. Trommel, D.L. Ashley, *J. Agric. Food Chem.* 52 (2004) 7240.
- [113] T. Kumazawa, H. Seno, X.P. Lee, A. Ishii, K. Watanabe-Suzuki, K. Sato, O. Suzuki, *Anal. Chim. Acta* 387 (1999) 53.
- [114] C. Casari, A.R.J. Andrews, *Forensic Sci. Int.* 120 (2001) 165.
- [115] T. Luan, G. Li, M. Zhao, Z. Zhang, *Anal. Chim. Acta* 404 (2000) 329.
- [116] M.F. Alpendurada, *J. Chromatogr. A*, 889 (2000) 3.
- [117] P. Grinberg, R.C. Campos, Z. Mester, R.E. Sturgeon, *Spectrochim. Acta, Part B* 58 (2003) 427.
- [118] Y. Chen, J. Pawliszyn, *Anal. Chem.* 76 (2004) 6823.
- [119] J.L. Gómez-Ariza, E. Morales, I. Giráldez, D. Sánchez-Rodas, A. Velasco, *J. Chromatogr. A* 938 (2001) 211.
- [120] L. Yang, Z. Mester, R.E. Sturgeon, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 431.
- [121] F. Augusto, A.L.P. Valente, E.S. Tada, S.R. Rivellino, *J. Chromatogr. A* 873 (2000) 117.
- [122] G.F. Pini, E.S. Brito, N.H.P. García, A.L.P. Valente, F. Augusto, *J. Braz. Chem. Soc.* 15 (2004) 267.
- [123] M.G. Bagur, D. Gázquez, M. Sánchez-Vinãs, *Analisis* 24 (1996) 374.

- [124] C.C. Velho, D.J. Charles, J.E. Simon, *Hortscience* 26 (1991) 608.
- [125] I. Devai, R.D. Delaune, W.H. Patrick Jr., R.P. Gambrell, *Org. Geochem.* 32 (2001) 755.
- [126] Y. Cai, S. Monsalud, R. Jaffé, R.D. Jones, *J. Chromatogr. A* 876 (2000) 147.
- [127] H. Hintelmann, *Chemosphere* 39 (1999) 1093.
- [128] I. Gelaude, R. Dams, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, *Anal. Chem.* 74 (2002) 3833.
- [129] L. Yang, V. Colombini, P. Maxwell, Z. Mester, R.E. Sturgeon, *J. Chromatogr. A* 1011 (2003) 135.
- [130] R.M. Blanco, M.T. Villanueva, J.E.S. Uria, A.S. Medel, *Anal. Chim. Acta* 419 (2000) 137.
- [131] J. Qvarnström, L. Lambertsson, S. Havarinasab, P. Hultman, W. Frech, *Anal. Chem.* 75 (2003) 4120.
- [132] M.I. Mena, C.W. McLeod, P. Jones, A. Withers, V. Minganti, R. Capelli, P. Quevauviller, *Fresenius J. Anal. Chem.* 351 (1995) 456.
- [133] I. Ipolyi, P. Massanisso, S. Sposato, P. Fodor, R. Morabito, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 145.
- [134] Y. Cai, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A* 696 (1995) 113.
- [135] P.C. Montesinos, E.R. Torralba, A.M. Rubio, M.L. Cervera, M. de la Guardia, *Anal. Chim. Acta* 506 (2004) 145.
- [136] J.H. Huang, G. Ilgen, E. Matzner, *Anal. Chim. Acta* 493 (2003) 23.
- [137] B. Bouyssiere, F. Baco, L. Savary, R. Lobiński, *J. Chromatogr. A* 976 (2002) 431.
- [138] L. Liang, M. Horvat, P. Danilchik, *Sci. Total Environ.* 187 (1996) 57.
- [139] M.K. Donais, P.C. Uden, M.M. Schantz, S.A. Wise, *Anal. Chem.* 68 (1996) 3859.
- [140] S.E. Long, W.R. Kelly, *Anal. Chem.* 74 (2002) 1477.
- [141] L. Rahman, W.T. Corns, D.W. Bryce, P.B. Stockwell, *Talanta* 52 (2000) 833.
- [142] R. Richaud, H. Lachas, A.G. Collot, A.G. Mannering, A.A. Herod, D.R. Dugwell, R. Kandiyoti, *Fuel* 77 (1998) 359.
- [143] J. Sanz, A. de Diego, J.C. Raposo, J.M. Madariaga, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 255.
- [144] H. Bagheri, A. Gholami, *Talanta* 55 (2001) 1141.
- [145] M.J. Shaw, P. Jones, P.R. Haddad, *Analyst* 128 (2003) 1209.
- [146] G.M.M. Rahman, H.M.S. Kingston, *Anal. Chem.* 76 (2004) 3548.
- [147] J.L. Gómez-Ariza, F. Lorenzo, T. García-Barrera, D. Sánchez-Rodas, *Anal. Chim. Acta* 511 (2004) 165.
- [148] A. Amirbahman, A.L. Reid, T.A. Haines, J.S. Kahl, C. Arnold, *Environ. Sci. Technol.* 36 (2002) 690.
- [149] S. Tutschku, M.M. Schantz, S.A. Wise, *Anal. Chem.* 74 (2002) 4694.
- [150] C.R. Hammerschmidt, W.F. Fitzgerald, *Anal. Chem.* 73 (2001) 5930.
- [151] L. Dunemann, H. Hajimiragha, J. Begerow, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 466.
- [152] D.E. Nixon, M.F. Burrit, T.P. Moyer, *Spectrochim. Acta, Part B* 54 (1999) 1141.
- [153] P.J. Craig, R.O. Jenkins, G.H. Stojak, *Chemosphere* 39 (1999) 1181.
- [154] M.M. Inácio, V. Pereira, M.S. Pinto, *Geoderma* 85 (1998) 325.

- [155] A.M. Carro, I. Neira, R. Rodil, R.A. Lorenzo, *Chromatographia* 56 (2002) 733.
- [156] I.R. Pereiro, A. Wasik, R. Lobinski, *J. Chromatogr. A* 795 (1998) 359.
- [157] Y. Cai, *Trends Anal. Chem.* 19 (2000) 62.
- [158] L.N. Liang, G.B. Jiang, J.F. Liu, J.T. Hu, *Anal. Chim. Acta* 477 (2003) 131.
- [159] R. Falter, H. Hintelmann, P. Quevauviller, *Chemosphere* 39 (1999) 1039.
- [160] H. Emteborg, H.W. Sinmus, B. Radziuk, D.C. Baxter, W. Frech, *Spectrochim. Acta, Part B* 51 (1996) 829.
- [161] P.E. Koulouridakis, N.G. Kallithrakas-Kontos, *Anal. Chem.* 76 (2004) 4315.
- [162] L. Liang, M. Horvat, N.S. Bloom, *Talanta* 41 (1994) 371.
- [163] W. Bayens, M. Leermakers, R. Molina, L. Holsbeek, C.R. Joiris, *Chemosphere* 39 (1999) 1107.
- [164] S. Rapsomanikis, P.J. Craig, *Anal. Chim. Acta* 248 (1991) 563.
- [165] C.M. Tseng, A. de Diego, J.C. Wasserman, D. Amouroux, O.F.X. Donard, *Chemosphere* 39 (1999) 1119.
- [166] T. de Smaele, L. Moens, R. Dams, P. Sandra, J. van der Eycken, J. Vandyck, *J. Chromatogr. A* 793 (1998) 99.
- [167] R. Ramalhosa, S. R. Segade, E. Pereira, C. Vale, A. Duarte, *Anal. Chim. Acta* 448 (2001) 135.
- [168] R. Agraz, M.T. Sevilla, L. Hernadez, *J. Electroanal. Chem.* 390 (1995) 47.
- [169] C.F. Harrington, S.A. Merson, T.M.D. Silva, *Anal. Chim. Acta* 505 (2004) 247.
- [170] R. Rodil, A.M. Carro, R.A. Lorenzo, M. Abuín, R. Cela, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 313.
- [171] J.C. Botana, R.R. Rodriguez, A.M.C. Diaz, R.A.L. Ferreira, R.C. Torrijos, I.R. Pereiro, *J. Anal. At. Spectrom.* 17 (2002) 904.
- [172] C.E. Waring, R. Pellin, *J. Phys. Chem.* 71 (1967) 2044.
- [173] S. Díez, J.M. Bayona, *J. Chromatogr. A* 963 (2002) 345.
- [174] S. Mothes, R. Wenrich, *J. High Resol. Chromatogr.* 22 (1999) 181.
- [175] P. Grinberg, R.C. Campos, Z. Mester, R.E. Sturgeon, *J. Anal. At. Spectrom.* 18 (2003) 902.
- [176] G. Chiavari, D. Fabbri, S. Prati, *J. Chromatogr. A* 922 (2001) 235.
- [177] M.D. Brickhouse, W.R. Creasy, B.R. Williams, K.M. Morissey, R.J. O'Connor, H.D. Durst, *J. Chromatogr. A* 883 (2000) 185.