

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE  
ÁCIDOS GORDOS VOLÁTEIS EM ÁGUAS INTERSTICIAIS DE SEDIMENTOS  
MARINHOS POR SPME-GC-MS**

**Sofia Isabel Cotovia Alves**

Dissertação

MESTRADO EM QUÍMICA

Química

**2014**



UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE CIÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**VALIDAÇÃO DE UM MÉTODO ANALÍTICO PARA A IDENTIFICAÇÃO DE  
ÁCIDOS GORDOS VOLÁTEIS EM ÁGUAS INTERSTICIAIS DE SEDIMENTOS  
MARINHOS POR SPME-GC-MS**

**Sofia Isabel Cotovia Alves**

MESTRADO EM QUÍMICA

Química

Dissertação orientada pelo:

Prof. Doutor Carlos Manuel Ferreira de Sousa Borges

**2014**



O trabalho apresentado nesta dissertação foi realizado no âmbito do 2º Ciclo em Química, no grupo de Espectrometria de Massa Ambiental e Biológica do Departamento de Química e Bioquímica da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, sob orientação do Professor Doutor Carlos Borges.



## Agradecimentos

Quero agradecer ao meu orientador, Prof. Carlos Borges pela oportunidade em integrar o seu grupo de trabalho, pela orientação e conhecimentos transmitidos, mas sobretudo pela amizade demonstrada.

À Doutora Marianne Nuzzo pela confiança e motivação assim como pelos conhecimentos partilhados no início deste trabalho. Ao projeto FCT-FluHyd (PTDC/MAR/11844312010) pelo financiamento do material.

Ao Engenheiro Rui Costa, técnico da Thermo Unicam, pelo esclarecimento e disponibilidade prestada sempre que necessário.

Ao Rodrigo Bernarda e à Isabela Silva, obrigada por me terem recebido na FCUL e por me terem acompanhado ao longo do mestrado.

Ao grupo de Cromatografia e Eletroforese Capilar pelos bons momentos partilhados.

Ao meu grupo, GEMAB. A todos os professores, em especial á Professora Helena Florêncio pela confiança que sempre me transmitiu, ao Paulo Madeira que será sempre “o cabeça de cartaz” deste grupo, obrigada pelas dicas e conselhos tão importantes, à Ana Marques pela paciência em esclarecer as minhas dúvidas. Aos restantes membros do grupo, Pedro Alves, Emma Gomes, Samuel Barata, Daniela Guerreiro e Joana Henriques. Um obrigada especial ao Tiago Jorge por ter sido um amigo e um companheiro que me acompanhou desde o início deste trabalho.

Ao Tiago, à Ana, à Emma, e à Tania Morais, pelo bom ambiente que me proporcionaram todos os dias, pelas brincadeiras, mas sobretudo pela vossa presença ao meu lado na concretização deste trabalho.

***“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós”***

(Saint- Exupéry)

Aos meus grandes amigos e companheiros de sempre, Cláudia, Mário, João, Diogo, Rita e Filipa, obrigada por serem parte de mim.

Ao Luís por me fazer sentir especial, por colorir os meus dias... A toda a minha família, especialmente, à minha afilhada Rita, ao Fernando e à Vera, obrigada pelas pessoas maravilhosas que são e por fazerem parte da minha vida. À minha mãe, por ser a melhor mãe e amiga do mundo, obrigada por tudo!

Às minhas estrelinhas do céu...

A todos muito Obrigada!

Sofia

## Resumo

O presente trabalho propõe a automatização e otimização da microextração em fase sólida (SPME), seguida de dessorção térmica e análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS). Com o objetivo da identificação de ácidos voláteis foram selecionados para o estudo o ácido acético, propanóico e butanóico no sentido de avaliar o desempenho desta metodologia em matrizes aquosas.

Numa primeira fase estudou-se o comportamento dos ácidos em fase gasosa através da análise por GC-MS, onde se procedeu à sua identificação através do tempo de retenção e dos espectros de massa.

Posteriormente foi realizada a otimização dos parâmetros que influenciam a extração, nomeadamente, o tipo de revestimento de fibra, condições de dessorção, tempo, temperatura de extração e o volume de *headspace*. Sob condições experimentais otimizadas, os ensaios de extração foram realizados no modo *headspace*, as soluções de trabalho foram saturadas com NaCl e o pH ajustado a 1,5. O revestimento de fibra utilizado foi CAR-PDMS, a extração decorreu durante 20 min, a uma velocidade de agitação de 600 rpm e a uma temperatura de 60°C. A dessorção foi realizada a 250°C durante 5 min. Os ensaios foram realizados em frascos de amostragem de 20 mL tendo as soluções de trabalho um volume total de 2,5 mL.

Nos estudos de validação foi obtida boa linearidade ( $r^2 \geq 0,9914$ ) numa gama compreendida entre 1 e 9  $\mu\text{g/mL}$  e limites de deteção inferiores a 1  $\mu\text{g/mL}$ . Os valores de RSD encontravam-se entre 4,8 % e 7,7 %.

Na aplicação da metodologia a amostras reais, nomeadamente a amostras de águas intersticiais extraídas de sedimentos marinhos provenientes de vulcões de lama existentes na margem Sul-Oeste Portuguesa e na margem Pacífica da Costa Rica, não foi detetada a presença de nenhum dos ácidos em estudo.

## **Palavras-chave**

- ♦ Ácidos voláteis;
- ♦ Águas intersticiais de sedimentos marinhos;
- ♦ Microextração em fase sólida;
- ♦ Cromatografia gasosa;
- ♦ Espectrometria de massa;
- ♦ Validação.

## Abstract

This paper proposes the automation and optimization of solid-phase microextraction (SPME) followed by thermal desorption and analysis by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). With the goal of identifying volatile fatty acids, for the study were selected acetic, propanoic and butanoic acids, to assess the performance of this methodology in aqueous matrices.

In the first phase it was studied the behavior of acids in the gas phase by GC-MS, which was carried through to the identification through retention time and mass spectra.

Later it was performed the optimization of parameters influencing the extraction, namely, the type of fiber coating, desorption conditions, time and extraction temperature and the volume of headspace. Under optimized experimental conditions, extraction tests were carried in headspace mode, working solutions were saturated with NaCl and the pH adjusted to 1.5. The used coated fiber was CAR-PDMS, the extraction took place for 20 min at a stirring rate of 600 rpm and a temperature of 60°C. Desorption was performed at 250°C for 5 min. Tests were performed in vials of 20 ml of sample solutions, having a total volume of 2.5 mL.

In validation studies, good linearity ( $r^2 \geq 0.9914$ ) was obtained in the range between 1 and 9  $\mu\text{g/mL}$  and the lower limits of 1  $\mu\text{g/mL}$  detection. RSD values were between 4.8% and 7.7%.

When applying the method to real samples, namely samples taken from interstitial waters of marine sediments from mud volcanoes existing in Southwest Portuguese coast and the Pacific Coast of Costa Rica, was not detected the presence of any of the acids under study.

## Keywords

- ◆ Volatile acids;
- ◆ Marine sediments pore waters;
- ◆ Solid phase microextraction;
- ◆ Gas chromatography;
- ◆ Mass spectrometry;
- ◆ Validation.

## Lista de abreviaturas e símbolos

<b>CAR-PDMS</b>	Carboxeno-Polidimetilsiloxano
<b>CI</b>	Ionização química (Chemical Ionization)
<b>DESI</b>	(Ionização de dessorção por electrospray (Desorptio Electrospray Ionization))
<b>DI</b>	Imersão direta (Direct Immersion)
<b>ECD</b>	Detetor de captura eletrónica (Electron Capture Detector)
<b>EI</b>	Impacto eletrónico (Electron Ionization)
<b>ESI</b>	Ionização por electrospray (Electrospray Ionization)
<b>FID</b>	Detetor de ionização de chama (Flame Ionization detector)
<b>FTICR</b>	Ressonância ciclotrónica de iões com transformada de Fourier (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance)
<b>GC</b>	Cromatografia gasosa (Gas Chromatography)
<b>GC-MS</b>	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (Gas Chromatography-Mass Spectrometry)
<b>HCl</b>	Ácido Clorídrico
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography)
<b>HS</b>	Espaço de cabeça ( <i>headspace</i> )
<b>IUPAC</b>	International Union of Pure and Applied Chemistry
<b>LD</b>	Limite de deteção
<b>LQ</b>	Limite de quantificação

<b>MALDI</b>	Ionização e desadsorção laser assistida por matriz (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)
<b>MS</b>	Espectrometria de massa (Mass spectrometry)
<b>NaCl</b>	Cloreto de sódio
<b>n-C6</b>	n-Hexano
<b>PA</b>	Poliacrilato
<b>PDMS</b>	Polidimetilsiloxano
<b>PDMS-DVB</b>	Polidimetilsiloxano-divinilbenzeno
<b>PTV</b>	Injetor de vaporização com temperatura programada (Programmed Temperature Vaporising)
<b>RSD</b>	Desvio padrão relativo (Relative Standard Deviation)
<b>SBSE</b>	Extração sortiva em barra de agitação (Stir Bar Sorptive Extraction)
<b>SIM</b>	Monitorização de iões selecionados (Selective Ion Monitoring)
<b>SPME</b>	Microextração em fase sólida (Solid Phase Microextraction)
<b>TCD</b>	Detetor de condutividade térmica (Thermal Conductivity Detector)
<b>TOF</b>	Analisador de tempo de voo (Time Of Flight analyzer)
<b><math>\alpha</math></b>	Seletividade
<b><math>b</math></b>	Declive
<b><math>C_0</math></b>	Concentração inicial
<b><math>c_s</math></b>	Concentração relativa de um componente na fase estacionária
<b><math>c_M</math></b>	Concentração relativa de um componente na fase móvel
<b><math>K</math></b>	Coefficiente de distribuição
<b><math>k'</math></b>	Fator de capacidade

<b><math>K_{fs}</math></b>	Coeficiente de partição do analito entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra
<b><math>m/z</math></b>	Razão massa/carga
<b><math>n</math></b>	massa de analito extraído
<b><math>N</math></b>	Eficiência
<b><math>r^2</math></b>	Coeficiente de determinação
<b><math>R_s</math></b>	Resolução
<b><math>s</math></b>	Desvio padrão da resposta instrumental
<b><math>S/N</math></b>	Razão sinal/ruído
<b><math>t_M</math></b>	Tempo morto
<b><math>t_R</math></b>	Tempo de retenção
<b><math>t'_R</math></b>	Tempo de retenção ajustado
<b><math>V_f</math></b>	Volume do revestimento
<b><math>V_s</math></b>	Volume da amostra
<b><math>W</math></b>	Largura do pico



## Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Palavras-chave	IV
Abstract	V
Keywords	VI
Lista de abreviaturas e símbolos	VII
Índice	XI
Índice de figuras	XV
Índice de tabelas	XIX

## Capítulo 1 - Introdução

1.1 Procedimento analítico	3
1.2 Técnicas de preparação de amostras	3
1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)	4
1.3 Técnicas cromatográficas	8
1.3.1 Breve história	8
1.3.2 Noções teóricas	8
1.3.3 Cromatografia Gasosa (GC)	11
1.4 Espectrometria de massa (MS)	13
1.4.1 Breve história	13
1.4.2 Princípios básicos	14
1.4.3.1 Ionização por impacto eletrónico (EI)	16
1.4.3.2 Analisador de massa de armadilha de iões ( <i>Ion trap</i> )	17
1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)	18
1.6 Validação do procedimento analítico	19
1.6.1 Parâmetros de desempenho do método	19
1.6.1.1 Seletividade	19
1.6.1.2 Gama de trabalho/linearidade	20

1.6.1.3 Limite de detecção e limite de quantificação	20
1.6.1.4 Precisão	21
1.7 Enquadramento e objetivos do trabalho	21
1.8 Referências	23

## **Capítulo 2 - Parte Experimental**

2.1 Reagentes e Padrões	29
2.2 Amostras Reais	29
2.3 Materiais	29
2.4 Equipamentos	30
2.5 Procedimento experimental	31
2.5.1 Soluções para estudo do comportamento dos ácidos	31
2.5.2 Microextração em fase sólida	31
2.5.2.1 Preparação de soluções de trabalho	31
2.5.2.2 Ensaios de otimização	31
2.5.2.3 Ensaios de validação	32
2.5.2.4 Aplicação a amostras reais	33
2.5.3 Condições de análise GC-MS	33
2.6 Referências	34

## **Capítulo 3 - Apresentação e discussão dos resultados**

3.1 - Estudo do comportamento dos ácidos	37
3.2 - Otimização da SPME	40
3.2.1 - Modo de operação	41
3.2.2 - Efeito da força iónica	41
3.2.3 - Efeito do pH	42
3.2.4 - Velocidade de agitação	42
3.2.5 - Seleção do revestimento da fibra	42
3.2.6 - Condições de dessorção	44
3.2.7 - Tempo de extração	44

---

3.2.8 - Temperatura de extração	46
3.2.9 - Volume de <i>headspace</i>	47
3.3 - Validação do método SPME-GC-MS	49
3.4 - Aplicação do método a matrizes reais	51
3.5 - Referências	53
<b>Capítulo 4 - Conclusão</b>	<b>  57</b>
<b>Anexos</b>	
Anexo A - Fórmulas	C
Anexo B - Curvas de calibração	C



## Índice de figuras

### Capítulo 1

Figura 1.1 - Representação esquemática de um frasco de amostragem com uma barra de agitação de PDMS usada na SBSE.	4
Figura 1.2 - Representação esquemática de um dispositivo de SPME durante a extração e dessorção dos analitos num sistema cromatográfico.	5
Figura 1.3 - Representação esquemática dos modos de operação na SPME.	6
Figura 1.4 - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respetivos parâmetros de retenção.	9
Figura 1.5 - Representação da definição de $\alpha$ em cromatografia.	10
Figura 1.6 - Representação esquemática de um sistema de GC.	12
Figura 1.7 - Princípio básico da análise por MS.	14
Figura 1.8 - Esquema dos componentes de um espectrómetro de massa.	15
Figura 1.9 - Esquematização do processo de EI.	16
Figura 1.10 - Constituição de um analisador de armadilha de iões.	17
Figura 1.11 - Diagrama esquemático de um analisador de armadilha de iões.	18

### Capítulo 2

Figura 2.1 - Dispositivo de SPME para injetor automático (a) e fibras de SPME (b): PA (branco), PDMS (vermelho), CAR-PDMS (preto) e PDMS-DVB (azul).	30
Figura 2.2 - Representação esquemática do procedimento de otimização da SPME.	32
Figura 2.3 - Programa de temperatura do forno usada na análise por GC-MS.	33

### Capítulo 3

Figura 3.1 - Estrutura química dos três ácidos em estudo.	37
Figura 3.2 - Cromatograma gasoso relativo aos ácidos em estudo: 1 - acético, 2 - propanóico, 3 - butanóico.	38

- Figura 3.3 - Espectro de massa do ácido acético. | 39
- Figura 3.4 - Espectro de massa do ácido propanóico. | 39
- Figura 3.5 - Espectro de massa do ácido butanóico. | 40
- Figura 3.6 - Comparação do desempenho dos diferentes revestimentos de fibra: PA, PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna. | 43
- Figura 3.7 - Área obtida usando diferentes condições de dessorção (250°C, 275°C e 300°C durante 2 e 5 min) com o revestimento de fibra CAR-PDMS. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna. | 44
- Figura 3.8 - Efeito da temperatura de extração (5, 10, 20, 30, 45, 55 min) usando o revestimento de fibra CAR-PDMS. O tempo de dessorção foi 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna. | 45
- Figura 3.9 - Efeito da temperatura de extração (40°C, 50°C e 60°C) usando como revestimento de fibra CAR-PDMS durante 20 min. O tempo de dessorção foi de 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna. | 46
- Figura 3.10 - Efeito das diferentes proporções entre o *headspace* e a fase aquosa (2,5 mL num frasco de amostragem de 10 mL e de 20 mL), usando como revestimento de fibra CAR-PDMS durante 20 min a uma temperatura de 60°C. O tempo de dessorção foi de 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna. | 47
- Figura 3.11 - Cromatograma obtido da última extração com as condições experimentais otimizadas. | 49
- Figura 3.12 - Curva de calibração obtida para ácido acético, propanóico e butanóico pelo método dos mínimos quadrados. | 50
- Figura 3.13 - Cromatograma relativo à amostra *M86-5\_GC06\_110-114cm*, fortificada com 25 µg/mL obtido por SPME-GC-MS. | 52

## Anexos

Figura B.1 - Curva de calibração do ácido acético.	C
Figura B.2 - Curva de calibração do ácido propanóico.	D
Figura B.3 - Curva de calibração do ácido butanóico.	D



## Índice de tabelas

### Capítulo 1

Tabela 1.1 - Tipos de revestimentos de fibras, principais características e aplicações. | 7

### Capítulo 3

Tabela 3.1 - Tempos de retenção ( $t_R$ ) e iões selecionados para identificação dos ácidos em estudo. | 38

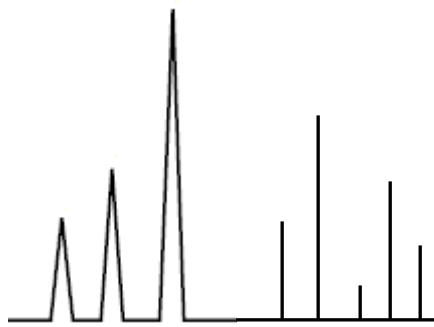
Tabela 3.2 - Condições experimentais otimizadas no procedimento de SPME-GC-MS. | 48

Tabela 3.3 - LD e LQ para os analitos estudados, obtidos na validação do método SPME-GC-MS. | 49

Tabela 3.4 - Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia. | 50

Tabela 3.5 - Ensaio de precisão obtidos por SPME-GC-MS fortificadas com 5  $\mu\text{g/mL}$  em condições otimizadas. | 51





# Capítulo 1

---

Introdução



## 1.1 Procedimento analítico

A qualidade de qualquer procedimento analítico é determinada pela qualidade das suas etapas. De um modo geral, o processo analítico envolve amostragem, armazenamento, preparação da amostra, separação, identificação, quantificação e tratamento estatístico dos resultados. Se qualquer uma das etapas não for realizada corretamente, o desempenho global do método será comprometido, serão introduzidos erros e, conseqüentemente, a variabilidade dos resultados será esperada [1].

## 1.2 Técnicas de preparação de amostra

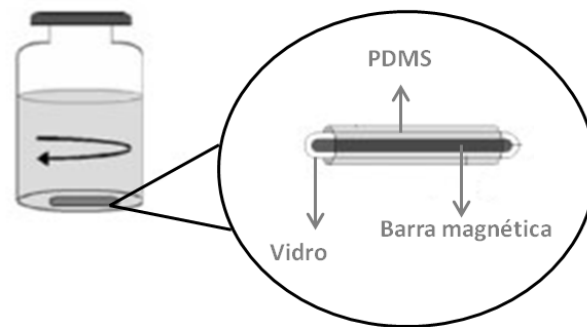
A etapa de preparação de amostra contempla essencialmente a extração ou enriquecimento dos analitos da matriz, limpeza, concentração e, em certos casos, derivatização, podendo estes procedimentos envolver cerca de 80% do tempo analítico despendido.

O principal objetivo dos métodos de preparação de amostras é transferir os analitos com interesse da matriz original, para uma forma mais adequada à sua introdução na instrumentação cromatográfica, podendo a análise ser direta, no caso de estarmos em presença de teores significativos, ou com recurso a estratégias para o enriquecimento de traços vestigiais, no sentido de ganho de sensibilidade.

As técnicas de preparação de amostras baseadas na extração sortiva têm despertado grande interesse, uma vez que se têm revelado muito promissoras, “amigas do ambiente” e integradas na designada “química verde”.

A extração sortiva é por natureza um fenómeno de equilíbrio, no qual o processo de enriquecimento é controlado pelo coeficiente de partição dos analitos entre a fase polimérica e a matriz da amostra. São exemplos deste tipo de técnicas a extração sortiva em barra de agitação (SBSE) e a microextração em fase sólida (SPME) [2].

A SBSE é uma técnica de extração proposta em 1999 por P. Sandra e seus colaboradores. Consiste numa barra de agitação, constituída por um ímã envolto numa fina película de vidro revestido por um filme em polidimetilsiloxano (PDMS). Quando colocada na amostra sob agitação, promove o movimento de rotação da matriz líquida e simultaneamente a extração dos analitos para a camada polimérica (figura 1.1) [3].



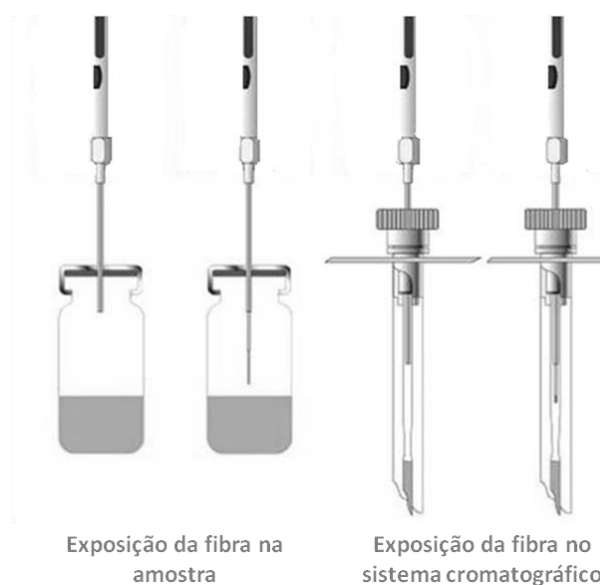
**Figura 1.1** - Representação esquemática de um frasco de amostragem com uma barra de agitação de PDMS usada na SBSE. [Adaptado de [4]].

### 1.2.1 Microextração em fase sólida (SPME)

A SPME foi introduzida no início da década de 90 por J. Pawliszyn e seus colaboradores e baseia-se na sorção dos analitos presentes numa matriz aquosa, para uma fina fibra de sílica fundida revestida por uma camada polimérica. Esta fibra encontra-se colocada num dispositivo com a forma de uma seringa [2].

As etapas operacionais da SPME são muito simples. Com a fibra retraída a agulha perfura o septo do frasco de amostragem, de seguida o êmbolo do dispositivo é pressionado e a fibra é exposta diretamente na matriz da amostra (DI-SPME) ou no espaço cabeça (*headspace*, HS-SPME) acima da mesma. Aí os analitos da amostra através de um processo de sorção aderem à fibra, dando-se a extração. A fibra é retraída para o inferior da seringa e a agulha é removida do frasco de amostragem. Posteriormente a agulha entra no injetor do sistema cromatográfico onde a fibra é

exposta e, por ação da temperatura, ocorre a dessorção dos analitos [5, 6]. As etapas descritas podem ser observadas na figura 1.2.



**Figura 1.2** - Representação esquemática de um dispositivo de SPME durante a extração e dessorção dos analitos num sistema cromatográfico [Adaptado de [7]].

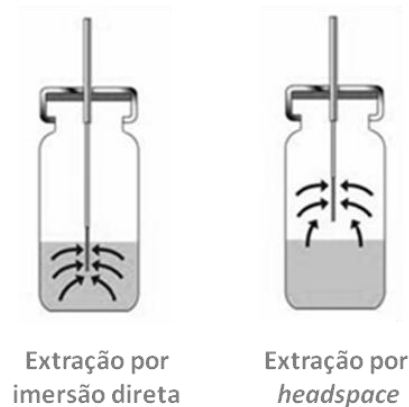
Sendo a SPME uma técnica de equilíbrio, no qual o princípio é a partição dos analitos com interesse entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra em estudo, a massa de um composto extraído pode ser calculada através da seguinte expressão [8]:

$$n = \frac{K_{fs} \times V_f \times C_0 \times V_s}{K_{fs} \times V_f + V_s} \quad (1.1)$$

onde (n) é a massa de analito extraído, ( $K_{fs}$ ) o coeficiente de partição do analito entre o revestimento da fibra e a matriz da amostra, ( $V_f$ ) o volume do revestimento, ( $V_s$ ) o volume da amostra e ( $C_0$ ) a concentração inicial do analito na amostra. Como o volume de amostra é regra geral significativamente superior ao volume do revestimento da fibra, a expressão pode ser simplificada para [8, 9]:

$$n = K_{fs} \times V_f \times C_0 \quad (1.2)$$

Existem diversos parâmetros que podem ser otimizados com o objetivo de melhorar a eficiência da extração. Um deles é o modo de operação. Pode operar-se por DI-SPME ou por HS-SPME (figura 1.3). No primeiro modo os analitos semi-voláteis ou involáteis difundem-se diretamente da matriz da amostra para o revestimento da fibra no qual são concentrados. No modo HS-SPME, ocorre partição dos analitos voláteis entre a fase vapor e a matriz da amostra, o que permite diminuir significativamente o tempo de extração, uma vez que a velocidade de difusão em fase gasosa é maior do que em fase líquida [2].



**Figura 1.3** - Representação esquemática dos modos de operação na SPME [Adaptado de [7]].

Outro parâmetro importante na otimização da SPME é o tipo de fibra. Estão disponíveis no mercado diversas fibras, com diferentes revestimentos, espessuras e polaridades, específicas para a extração de determinadas classes de compostos. De entre os revestimentos mais comumente utilizados distinguem-se o poliacrilato (PA), polidimetilsiloxano (PDMS), PDMS-divinilbenzeno (PDMS-DVB) e o Carboxeno-PDMS (CAR-PDMS). Na tabela 1.1 podem observar-se os principais revestimentos de fibra utilizados assim como as suas principais características e aplicações. É ainda de referir que as fibras de SPME apresentam como vantagem o facto de serem reutilizáveis, dependendo no entanto, do tipo de aplicação a que estão sujeitas, da complexidade da matriz da amostra e das condições experimentais, podendo o seu rendimento ser melhorado através do condicionamento [10].

**Tabela 1.1** -Tipos de revestimentos de fibras, principais características e aplicações [Adaptado de [10]].

Revestimento	Espessura (µm)	Polaridade	Temperatura máxima (°C)	Técnica de aplicação	Compostos de análise
Polidimetilsiloxano (PDMS)	100	Apolar	280	GC/HPLC	Voláteis
	30	Apolar	280	GC/HPLC	Semi-voláteis apolares
	7	Apolar	340	GC/HPLC	Semi-voláteis moderadamente polares a apolares
Poliacrilato (PA)	85	Polar	320	GC/HPLC	Semi-voláteis polares
Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno (PDMS-DVB)	65	Bipolar	270	GC	Voláteis polares
	60	Bipolar	270	HPLC	Uso geral
Carboxeno-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS)	75	Bipolar	320	GC	Gases e Voláteis
Carbonax-divinilbenzeno (CW-DVB)	65	Polar	265	GC	Polares

Para além do modo de operação e do tipo de revestimento da fibra existem outros parâmetros de otimização que devem ser considerados, tais como, as condições de dessorção (tempo e temperatura), tempo de extração, temperatura de extração, velocidade de agitação, efeito da força iónica, efeito do pH e o volume de amostra ou volume de *headspace* [11].

No que se refere a aplicações esta técnica de preparação de amostra é usada em análise ambiental de amostras de água, análise de produtos alimentares, amostras forenses provenientes de incêndios e explosivos, análise toxicológica como álcool no sangue e substâncias de abuso em urina, podendo também ter aplicações industriais.

As principais vantagens são a fácil e rápida utilização, reduzindo o tempo de preparação de amostra para 70%, redução de solventes minimizando o seu uso ou mesmo a sua eliminação. É um método económico e reutilizável (por média cada fibra tem a durabilidade de 50 extrações), sendo também um dispositivo bastante versátil que permite a automatização a qualquer sistema cromatográfico [5].

## **1.3 Técnicas Cromatográficas**

### **1.3.1 Breve história**

A palavra cromatografia tem origem no grego “*chroma* + *graphein*” que significa escrita a cor. É um método contemporâneo que alcançou relevo em 1903, com o botânico M.S. Tswett. Considerado o pai da cromatografia, este desenvolveu vários trabalhos experimentais, relacionados com a separação de extratos de plantas por absorção diferencial em colunas, tendo verificado a separação nítida de diversos pigmentos corados [12].

Anos mais tarde, em 1952, A. Martin e R. Synge desenvolveram a cromatografia gasosa de partição, sendo laureados com o Prémio Nobel da Química. Em 1957, M. Golay foi pioneiro das colunas capilares. O primeiro aparelho de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foi desenvolvido e construído por C. Horváth em 1966. Entre 1937 e 1972 foram atribuídos doze Prémios Nobel, onde a cromatografia teve um papel crucial no desenvolvimento científico.

Dada à grande necessidade dos cientistas disporem de métodos capazes de caracterizar uma grande diversidade de misturas complexas, as técnicas cromatográficas têm surgido como uma das principais técnicas de separação [13].

### **1.3.2 Noções teóricas**

Cromatografia é definida pela IUPAC como um método físico de separação no qual os componentes a serem separados são distribuídos em duas fases em que uma é estacionária enquanto a outra se movimenta numa direção definida [14].

A separação dos analitos na coluna cromatográfica resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, causadas pelas diferentes interações com a fase estacionária. As concentrações relativas de um componente na

fase estacionária ( $c_s$ ) e na fase móvel ( $c_m$ ) relacionam-se através do coeficiente de distribuição ( $K$ ), dado pela equação (1.3):

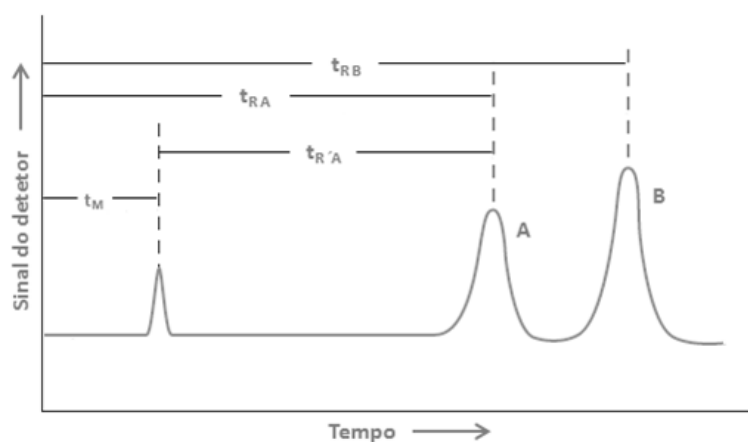
$$K = \frac{c_s}{c_m} \quad (1.3)$$

Quanto maior for o valor de  $c_s$ , maior será o valor de ( $K$ ), o que significa que maior será a interação com a fase estacionária. Os componentes com um valor de ( $K$ ) elevado mover-se-ão mais lentamente ao longo da coluna, sendo deste modo separados dos componentes com um valor de ( $K$ ) mais baixo.

Considerando uma mistura de dois analitos, a separação numa coluna só se efetuará se forem diferencialmente retidos pela fase estacionária, o que faz com que tenham tempos de retenção diferentes. O tempo de retenção ( $t_R$ ) é o tempo decorrido entre a injeção da amostra e o aparecimento do pico do soluto no detetor podendo ser calculado através da equação (1.4):

$$t_R = t_R' + t_M \quad (1.4)$$

Onde ( $t_R'$ ) é o tempo de retenção ajustado, isto é, o tempo que o composto depende na fase estacionária, e ( $t_M$ ) é o tempo morto que se define pelo tempo em que um composto não retido será eluído. A figura 1.4 exemplifica um cromatograma retratando as definições descritas.



**Figura 1.4** - Representação da eluição de dois componentes (A e B) e respetivos parâmetros de retenção [Adaptado de[15]].

Os componentes que apresentam elevada interação com a fase estacionária, isto é, ( $t_R$ ) elevado, deslocam-se mais lentamente com a fase móvel, enquanto os componentes com baixa interação com a fase estacionária, ou seja, ( $t_R$ ) baixo, deslocam-se rapidamente na coluna. O tempo que o analito permanece na fase estacionária em relação à fase móvel é relacionado pelo fator de capacidade, ( $k'$ ), sendo este expresso por:

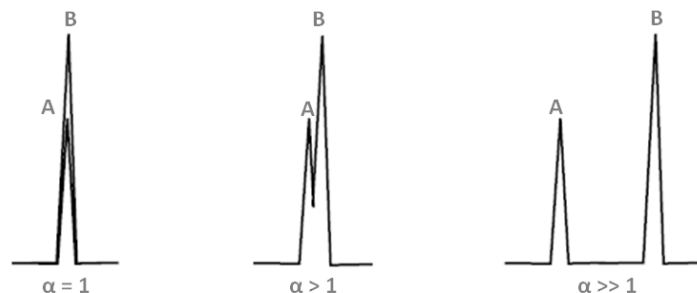
$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1.5)$$

Para valores de ( $k'$ ) baixos os componentes são pouco retidos pela fase estacionária, assim como para valores de ( $k'$ ) elevados os componentes são fortemente retidos.

Outro parâmetro a ter em conta em cromatografia é a seletividade ( $\alpha$ ), que se traduz pela razão entre os fatores de capacidade de dois compostos adjacentes:

$$\alpha = \frac{k_B'}{k_A'} \quad (1.6)$$

Onde ( $k_A'$ ) é o fator de capacidade do componente que elui primeiro e ( $k_B'$ ) é o fator de capacidade do segundo composto a eluir. Quanto maior for o afastamento entre picos adjacentes maior é o valor de  $\alpha$  e conseqüentemente maior é a seletividade. Se ( $\alpha$ ) igual a 1 não há seletividade, ou seja os dois compostos não se separam (figura 1.5).



**Figura 1.5** - Representação da definição de  $\alpha$  em cromatografia.

A eficiência de uma coluna define-se pela capacidade de eluição com o mínimo de dispersão do analito, podendo também ser expressa pelo número de pratos teóricos ( $N$ ), grandeza que exprime o número de equilíbrios que ocorrem durante a separação. A eficiência pode ser calculada através da equação (1.7), em que ( $W$ ) é a largura da base de um pico simétrico:

$$N = 16 \times \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (1.7)$$

Se o valor de ( $N$ ) for elevado, significa que os picos obtidos são mais finos, logo há maior eficiência.

O objetivo das separações cromatográficas consiste em separar todos os componentes de uma dada mistura, sendo a medida de separação entre dois compostos designada por resolução ( $R_s$ ). Desta forma, pode-se recorrer a uma expressão que exprime a ( $R_s$ ) em termos de três fatores fundamentais, ou seja, a seletividade, fator de capacidade e eficiência, como é ilustrado na equação 1.8:

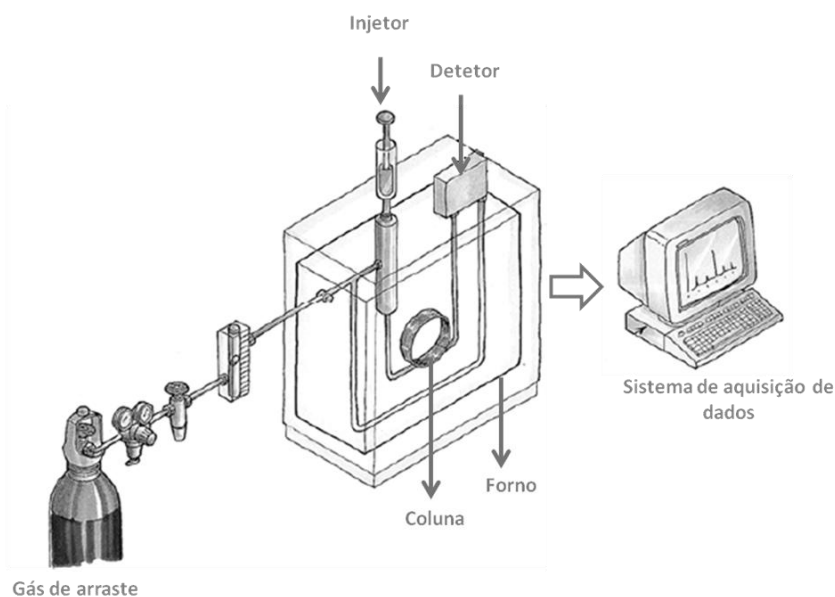
$$R_s = \frac{1}{4} \times \sqrt{N} \times \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k_B'}{k_B' + 1} \right) \quad (1.8)$$

Para que haja resolução entre dois picos o valor de ( $R_s$ ) tem de ser igual ou superior a 1,5 [15-17].

### 1.3.3 Cromatografia gasosa (GC)

A cromatografia gasosa (GC) é uma das técnicas mais utilizadas em análises qualitativas e quantitativas. Permite o estudo de compostos orgânicos voláteis, semi-voláteis, e simultaneamente não termolábeis.

Os principais componentes de um cromatógrafo gasoso são o sistema de injeção, a coluna cromatográfica inserida num forno, o detetor e o sistema de aquisição de dados (figura 1.6).



**Figura 1.6** - Representação esquemática de um sistema de GC [Adaptado de [18]].

O gás de arraste refere-se à fase móvel e tem a função de transportar os analitos através da coluna sem interagir com a mesma. Este gás deve ser puro e quimicamente inerte sendo o hélio a fase móvel gasosa normalmente usada, embora gases como o hidrogénio ou o azoto também possam ser utilizados. O fluxo do gás de arraste varia consoante o tipo de coluna. Para colunas empacotadas utiliza-se um fluxo compreendido entre 25 e 150 mL/min, enquanto em colunas capilares se utiliza um fluxo de 1 a 25 mL/min.

No que se refere ao sistema de injeção da amostra existem diversos tipos, sendo que os mais utilizados operam por vaporização com temperatura programada (PTV) ou por vaporização isotérmica com ou sem repartição de fluxo (*split/splitless*). No modo de injeção PTV é possível a introdução de grandes volumes de amostra oferecendo grande sensibilidade e tornando este modo de injeção decisivo em análise vestigial. Na vaporização isotérmica com injeção no modo *split* a amostra após ser vaporizada é dividida em duas frações, sendo que a mais pequena entra na coluna e a maior é eliminada. No modo *splitless* toda a amostra injetada é introduzida na coluna.

São utilizadas para a injeção de amostras líquidas micro seringas calibradas, com capacidades típicas de 5 e 10  $\mu\text{L}$ .

A coluna representa a fase estacionária do processo cromatográfico. Existem dois tipos de colunas, as de empacotamento e as capilares, sendo as últimas as mais utilizadas na atualidade. As colunas capilares são constituídas por um tubo de sílica fundida, sendo a parede interna revestida pela fase estacionária. O comprimento das colunas pode variar entre os 2 e os 100 m, e podem apresentar um diâmetro interno de 0,10 a 0,75 mm. Por forma a serem inseridas no forno do GC encontram-se geralmente enroladas em bobines com diâmetros de 10 a 30 cm. É a temperatura do forno que vai permitir a separação dos compostos, podendo esta separação ocorrer a uma temperatura isotérmica (temperatura constante) ou por gradiente de temperatura (rampa de temperatura).

No que diz respeito a detetores, existe atualmente uma grande variedade, conforme as necessidades de aplicação. As principais características que um detetor deve possuir são sensibilidade adequada, boa estabilidade e reprodutibilidade, tempo de resposta curto, e facilidade de utilização. Destacam-se para cromatografia gasosa o detetor de ionização de chama (FID), de condutividade térmica (TCD), e de captura eletrónica (ECD). A cromatografia gasosa pode ainda ser hifenada com outras técnicas analíticas como a Espectrometria de massa (MS) como será abordado mais à frente neste capítulo [15].

## **1.4 Espectrometria de massa (MS)**

### **1.4.1 Breve história**

A história da espectrometria de massa começou em 1897 quando Sir J.J. Thomson desenvolveu estudos que levaram à construção do primeiro espectrómetro de massa (espectrógrafo de parábola). Descobriu o eletrão e determinou a sua razão massa/carga ( $m/z$ ) levando-o a ser galardoado com o Prémio Nobel da Física em 1906. F.W. Aston deu continuidade as investigações realizadas por Thomson e em 1919

desenvolveu o primeiro espectrómetro de massa com velocidade de focagem. Os seus estudos com isótopos valeram-lhe em 1922 o Prémio Nobel da Química.

Nas décadas seguintes a espectrometria de massa continuou a prosperar com o físico, A.J. Dempster que introduziu o primeiro espectrómetro de massa com ionização por impacto eletrónico, sendo esta técnica desenvolvida em 1940 por A.O. Nier. Em 1956 F.W. McLafferty e R.S. Gohlke fizeram o primeiro acoplamento entre um espectrómetro de massa e um cromatógrafo gasoso (tendo este sido comercializado em 1975). Em 1988 J. Fenn desenvolveu a ionização por *electrospray* (ESI), onde obteve o primeiro espectro de proteínas com 20000 Da [19-21].

Atualmente existe uma extensa gama de técnicas de ionização, assim como analisadores de massa, tendo os últimos desenvolvimentos surgido em 2000 por A. Makarov com a introdução da orbitrap e em 2002 por J.W. Hager com a *trap* linear. Em 2004 R.G. Cooks e seus colaboradores descreveram a ionização de desorção por *electrospray* (DESI) [22].

### 1.4.2 Princípios básicos

A espectrometria de massa é provavelmente a técnica analítica mais versátil disponível atualmente. Mede com precisão as massas moleculares dos compostos através da ionização dos átomos ou moléculas de uma amostra separando-os de acordo com a sua razão massa carga ( $m/z$ ) (figura 1.7) [21].

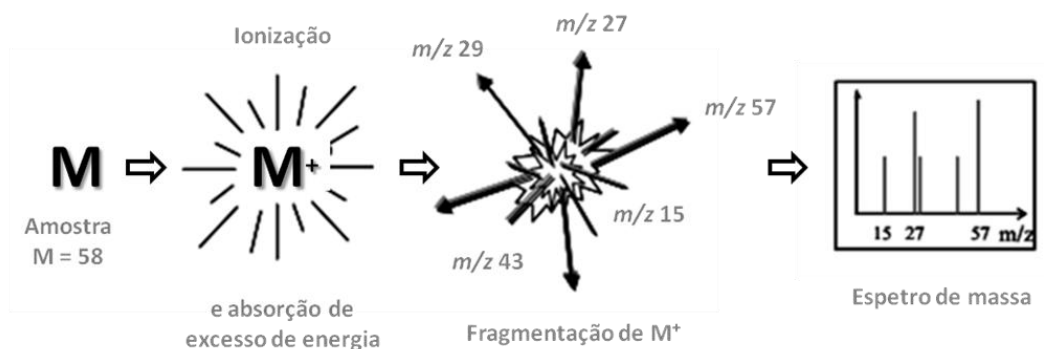


Figura 1.7 - Princípio básico da análise por MS [Adaptado de [23]].

Um espectrómetro de massa é composto por cinco componentes: o sistema de introdução da amostra, a fonte de ionização, o analisador de massa, o detetor e o sistema de aquisição de dados [24].



**Figura 1.8** - Esquema dos componentes de um espectrómetro de massa [Adaptado de [24]].

De um modo geral, a amostra é introduzida na fonte de ionização onde os analitos são transferidos para a fase gasosa e ionizados. De seguida, os íons são direcionados para o analisador onde são separados de acordo com a razão  $m/z$ . No detetor, habitualmente um multiplicador de íons, a corrente iónica é amplificada (da colisão de íons na superfície de um eléctrodo, resulta a emissão de electrões secundários, transformando a corrente iónica numa corrente electrónica suscetível de ser medida). Por fim, é transmitido um sinal eléctrico que chega ao sistema de aquisição de dados, onde é exibido na forma de um espectro de massa.

Todo o processo desde a fonte de ionização até ao detetor, é realizado sob condições de alto vácuo. Deste modo é possível minimizar a possibilidade de colisão entre os íons e as moléculas em estudo com outras espécies, originando fragmentações reprodutíveis. Possibilita também condições de isolamento eléctrico, o que permite trabalhar com elevadas voltagens; aumenta o tempo de vida dos dispositivos, como é o exemplo do filamento, e a sensibilidade reduzindo o ruído de fundo. Os valores do vácuo estão compreendidos entre os  $10^{-4}$  e os  $10^{-6}$  Torr, sendo que este é produzido combinando um sistema de duas bombas, uma rotatória e uma turbomolecular.

Em espectrometria de massa existe uma vasta gama de técnicas de ionização e de analisadores de massa, sendo a escolha da técnica feita de acordo com as propriedades físico químicas do analito, isto é, de acordo com a sua volatilidade e estabilidade térmica. De entre as técnicas de ionização, as mais utilizadas são a ionização por impacto eletrónico (EI), a ionização química (CI), a ionização e desadsorção laser assistida por matriz (MALDI), e a ionização por *electrospray* (ESI). Relativamente aos analisadores de massa os mais vulgares são o de sector, o quadrupolo, a armadilha de iões (*ion trap*), o tempo de voo (TOF), e o de ressonância iónica ciclométrica de iões com transformada de Fourier (FTICR). Neste trabalho utilizou-se um espectrómetro de massa equipado com uma fonte de ionização por impacto eletrónico e um analisador de armadilha de iões [22, 24].

#### 1.4.2.1 Ionização por impacto eletrónico (EI)

As substâncias voláteis podem ser ionizadas por impacto eletrónico num processo que envolve a interação da amostra gasosa com um feixe de eletrões de 70 eV gerado por um filamento aquecido. Os eletrões são acelerados e ao colidirem com moléculas da amostra provocam a sua ionização. É utilizada a energia de 70 eV porque a probabilidade de ionização para a maior parte dos compostos orgânicos é maximizada próximo deste valor.

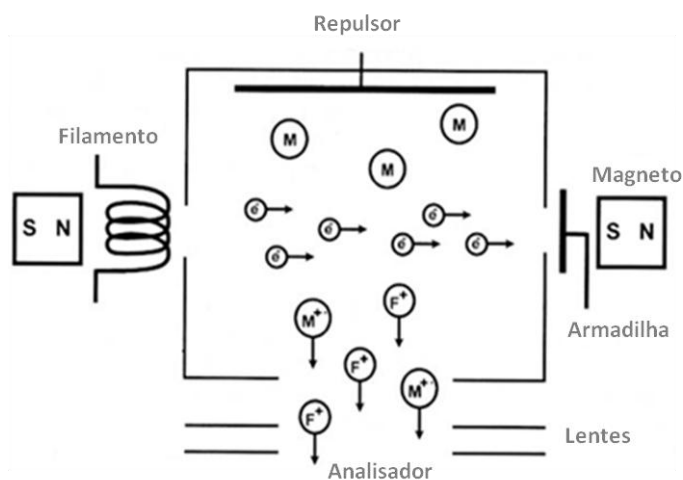
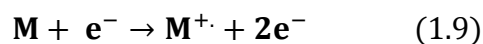


Figura 1.9 - Esquemática do processo de EI.

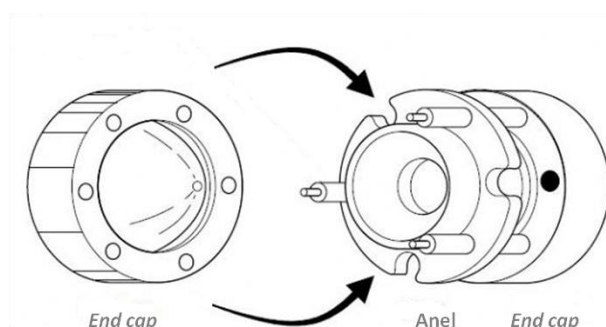
Da colisão dos elétrons energéticos (70 eV) a molécula gasosa pode perder um elétron, resultando na formação de um íon radical com carga positiva ( $M^+$ ), denominado íon molecular, como é expresso na equação 1.9 [21, 25].



#### 1.4.2.2 Analisador de massa de armadilha de íons (*Ion trap*)

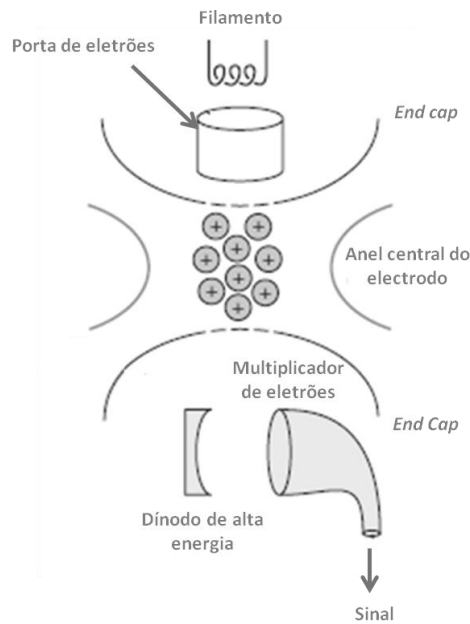
O princípio de funcionamento da armadilha de íons consiste na existência de um campo elétrico de radiofrequências que permite separar os íons de acordo com a sua razão  $m/z$ .

Como é possível observar na figura 1.10, este analisador de massa é constituído por dois eléctrodos com superfícies hiperbólicas, eléctrodos *end cap*, e por um eléctrodo central em forma de anel central.



**Figura 1.10** - Constituição de um analisador de armadilha de íons [Adaptado de [26]].

A aplicação do campo em três coordenadas, confina os íons ao centro do analisador. O campo de radiofrequências tridimensional cria trajetórias estáveis para os íons de um determinado intervalo  $m/z$ , que vão sendo sequencialmente gerados, por aplicação de voltagens nos eléctrodos *end cap*, em direcção ao detetor. Por sua vez remove os electrões indesejáveis fazendo-os colidir com as paredes do analisador [22, 26].



**Figura 1.11** - Diagrama esquemático de um analisador de armadilha de íons [Adaptado de [16]].

## 1.5 Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

Um dos detetores mais poderosos para a cromatografia gasosa é o espectrómetro de massa. Esta hifenação é conhecida como GC-MS e combina o poder de separação da cromatografia com a capacidade de identificação da espectrometria de massa.

A GC constitui uma forma ideal de introduzir misturas no espectrómetro de massa, pois os componentes de uma mistura são separados na coluna cromatográfica antes da sua introdução no espectrómetro de massa através da linha de transferência. Esta transferência deve ser interfaceada entre a pressão atmosférica do sistema de GC e a baixa pressão ( $10^{-4}$  a  $10^{-6}$ ) do espectrómetro de massa.

No que diz respeito a técnicas de ionização apenas o impacto eletrónico e a ionização química são utilizadas na GC-MS. Relativamente aos analisadores de massa os mais comuns são o quadrupólo e a armadilha de íons.

A grande vantagem da utilização do acoplamento da MS a um sistema cromatográfico reside na sua capacidade em responder a todos os compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis. Quando opera no modo de varrimento contínuo (*full-scan*) permite a identificação de compostos em amostras desconhecidas com recurso a bibliotecas espectrais de referência (por exemplo NIST e Wiley Mass Spectral Library). Quando o objetivo reside na quantificação vestigial de compostos alvo, o modo monitorização selecionada de iões (SIM), permite elevada sensibilidade e seletividade, tornando-se numa ferramenta analítica muito poderosa [15, 16].

## **1.6 Validação do procedimento analítico**

Segundo a Eurachem, validação é o processo que define uma exigência analítica e confirma que o método tem capacidade de desempenho consistente com o que a aplicação requer [27].

Para avaliar a adequação do método à análise existem diversos parâmetros de desempenho analítico que devem ser estudados, entre os quais a seletividade, gama de trabalho/linearidade, limite de deteção e quantificação, precisão, exatidão e a incerteza da medição. No presente trabalho foram estudados alguns destes parâmetros.

### **1.6.1 Parâmetros de desempenho do método experimental**

#### **1.6.1.1 Seletividade**

A seletividade de um método experimental é a sua capacidade de identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa, sem interferência de outras espécies [28].

### 1.6.1.2 Gama de trabalho/linearidade

A gama de trabalho indica o intervalo de concentrações de analito, em que é possível aplicar o método com precisão e exatidão. Se na gama de trabalho utilizada, o método gerar uma resposta diretamente proporcional à concentração de analito, então há linearidade na gama de trabalho [28].

### 1.6.1.3 Limite de deteção e limite de quantificação

Limite de deteção (*LD*) corresponde ao teor mínimo, a partir do qual é possível detetar a presença do analito com um certo nível de confiança (normalmente 95%), utilizando um determinado procedimento experimental. Pode ser calculado através da seguinte equação:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (1.10)$$

onde (*s*) é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão linear, e (*b*) o declive ou coeficiente angular da curva analítica. O fator 3,3 é baseado em observações estatísticas com, relativamente, poucos graus de liberdade (<6), para um nível de confiança de 99,7%.

O limite de quantificação (*LQ*) é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um certo nível de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental. O seu valor pode ser calculado através da equação:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (1.11)$$

Neste caso, assume-se um fator de 10, para assegurar um coeficiente de variação nas determinações de 10% [29].

#### **1.6.1.4 Precisão**

A precisão é definida como “aproximação entre indicações ou valores medidos obtidos por medições repetidas no mesmo objeto ou objetos semelhantes em condições especificadas”, e é geralmente expressa na forma numérica por desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação. A precisão da medição é usada para medir: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade da medição

A repetibilidade representa “a fidelidade da medição para um conjunto de condições de repetibilidade”, que inclui, “mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições operativas, a mesma localização, e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, num curto intervalo de tempo”.

A precisão intermédia representa “a fidelidade da medição para um conjunto de condições de precisão intermédia”. Estas condições incluem “o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares, durante um intervalo de tempo alargado, mas que pode incluir outras condições que se fazem variar, como novas calibrações, padrões, operadores, sistemas de medição”.

As condições de reprodutibilidade incluem “diferentes locais, operadores e sistemas de medição incluindo procedimentos de medição, e medições repetidas no mesmo objeto ou objetos similares” [30].

### **1.7 Enquadramento e objetivos do trabalho**

Os vulcões de lama são estruturas que canalizam o transporte de fluídos, sedimentos e gases (por exemplo, o gás metano) desde fontes profundas até à superfície dos fundos marinhos. O fluxo de metano (gás com potente efeito de estufa) das zonas de escape marinhas para a atmosfera ainda não foi bem avaliado, uma vez que depende de interações complexas entre fatores geológicos, químicos e biológicos ainda por elucidar. Também, a origem do metano está em larga medida por esclarecer,

especialmente em vulcões de lama. Este pode ter origem na degradação térmica da matéria orgânica e do petróleo ou pode ser produzido por micróbios extremófilos (*Archaea* metanogénicas) que podem viver nos sedimentos superficiais ou em profundidade, incluindo em reservatórios de petróleo e gás natural.

Os fluídos provenientes dos reservatórios de petróleo são notavelmente enriquecidos em ácidos gordos voláteis que constituem nos meios anaeróbicos e oligotróficos um substrato muito apetecível para as comunidades microbianas que lá vivem, essencialmente *Archaea* metanogénicas. Suspeita-se, portanto, que o fluxo de fluídos profundos enriquecidos em ácidos gordos voláteis sustente a produção superficial de metano por micróbios nas zonas de escape como os vulcões de lama [31].

A presente dissertação de mestrado propõe a identificação de ácidos voláteis (ácido acético, propanóico e butanóico) em amostras de água intersticial, extraída de sedimentos marinhos provenientes de vulcões de lama. Como tal consideram-se os seguintes objetivos:

- ♦ Monitorização e otimização da técnica de microextração em fase sólida seguida de análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa;
- ♦ Validação da metodologia desenvolvida;
- ♦ Aplicação do método a amostras reais.

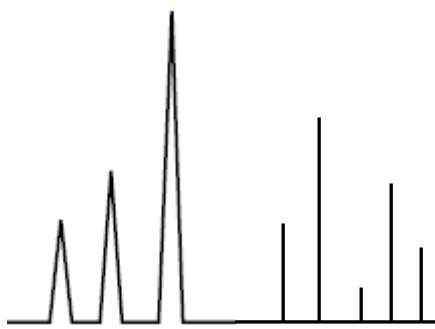
## 1.8 Referências

1. Alpendurada, M.F., *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**: p. 3-14.
2. Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., Nogueira, J.M.F., *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2004. **95**: p. 69-77.
3. David, F., Sandra, P., *Stir bar sorptive extraction for trace analysis*. Journal of Chromatography A, 2007. **1152**: p. 54-69.
4. Caldas, S.S., Gonçalves, F.F., Primel, E.G., Prestes, O.D., Martins, M.L., Zanella, R., *Principais técnicas de preparo de amostra para a determinação de resíduos de agrotóxicos em água por cromatografia líquida com detecção por arranjo de diodos e por espectrometria de massas*. Química Nova, 2011. **34**: p. 1604-1617.
5. Supelco-Sigma Aldrich: *Solid phase microextraction* [Acesso em Janeiro de 2014] <http://www.sigmaaldrich.com/ifb/supelco/7-spme/files/assets/basic-html/page2.html>
6. Valente, L.P.V., Augusto, F., *MICROEXTRAÇÃO POR FASE SÓLIDA*. Química Nova, 2000. **23**: p. 523-530
7. *LabSphere*. [Acesso em Abril de 2014]. [http://www.labsphere.biz/Images/pictures%20CTC/PAL\\_Accessories/SPME-principle.PNG](http://www.labsphere.biz/Images/pictures%20CTC/PAL_Accessories/SPME-principle.PNG)
8. Pawliszyn, J., *Solid Phase Microextraction: Theory and Practice*, ed. Wiley-VCH. 1997.
9. Lord, H., Pawliszyn, J., *Evolution of solid-phase microextraction technology*. Journal of Chromatography A, 2000. **885**: p. 153-193.
10. Vas, G., Vékey, K., *Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis*. Journal of Mass Spectrometry, 2004. **39**: p. 233-54.
11. Supelco-Sigma Aldrich, *Solid Phase Microextraction: Theory and optimization of Conditions*. 1988. **Bulletin 923**.

12. Nogueira, J.M.F., *Mikhail S. Tswett: Um legado para a cromatografia moderna*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2006. **100**: p. 51.
13. *Nobelprize.org - The Official Web Site of the Nobel prize: All Nobel Prizes in Chemistry*. [Acesso em Agosto de 2014].  
[http://www.nobelprize.org/nobel\\_prizes/chemistry/laureates/](http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/)
14. IUPAC.org - International Union of Pure and Applied Chemistry [Acesso em Agosto de 2014].  
[http://iupac.org/publications/analytical\\_compendium/Cha09sec211.pdf](http://iupac.org/publications/analytical_compendium/Cha09sec211.pdf)
15. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., *Fundamentos de Química Analítica*, ed. Thomson. 2007.
16. Harris, D.C., *Quantitative Chemical Analysis*. W.H. Freeman and Company. 2003.
17. Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., *Principios de Análisis Instrumental*, ed. McGrawHill. 2007.
18. *Linde - Cromatografia Gasosa*. [Acesso em Abril de 2014].  
[http://hiq.lindegas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/anal\\_gaschrom](http://hiq.lindegas.com.br/international/web/lg/br/like35lgspgbr.nsf/docbyalias/anal_gaschrom)
19. Griffiths, J., *A Brief History of Mass Spectrometry*. Analytical Chemistry, 2008. **80**: p. 5678-5683.
20. Borman, S., *A Brief History of Mass Spectrometry Instrumentation*. [Acesso em Setembro de 2014].  
<http://masspec.scripps.edu/mshistory/perspectives/sborman.php>
21. Hoffmann, E., Stroobant, V., *Mass Spectrometry: Principles and Applications*. ed. Wiley. 2001.
22. Madeira, P.J.A., *A MASS SPECTROMETRY STUDY OF COMPOUNDS WITH ENVIRONMENTAL AND BIOLOGICAL INTEREST*, in *Faculdade de Ciências 2010*, Universidade de Lisboa.

23. Rodriguez, R.M., *Estudo da Emissão de Íons Estáveis e Metaestáveis (LiF)<sub>n</sub>Li<sup>+</sup> induzida por Fragmentos de Fissão do <sup>252</sup>Cf*, in Pontifícia Universidade Católica de Rio de Janeiro 2003.
24. Gross, J.H., *Mass Spectrometry - A textbook*, ed. Springer. 2004.
25. Ekman, R., Silberring, J., Westman-Brinkmalm, A., Kraj, A., *Mass spectrometry: Instrumentation, Interpretation, and Applications*, ed. Wiley. 2009.
26. Wong, P.S.H., Cooks, R.G., *Ion Trap Mass Spectrometry*. Current Separations, 1997. **16**.
27. *EURACHEM/CITAC Guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. 2000.
28. Ribani, M., Bottoli, C.B.G., Collins, C.H., Jardim, I.C.S.F., Melo, L.F.C., *VALIDAÇÃO EM MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS E ELETROFORÉTICOS*. Química Nova, 2004. **27**: p. 771-780.
29. *Guia Relacre 13: Validação de Métodos internos de ensaio em Análise Química*. Relacre - Associação de Laboratórios Acreditados de Portugal, 2000.
30. *Vocabulário Internacional de Metrologia: Guia ISO/IEC 99*. Instituto Português de Qualidade, 2008.
31. Hensen, C., and cruise participants GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel, *Tracing for active dewatering sites along deep-reaching transform faults in the western Gulf of Cadiz*, 2013.





# Capítulo 2

---

Parte Experimental



## 2.1 Reagentes e Padrões

Os reagentes e os solventes utilizados eram analiticamente certificados. O n-hexano (*n*-C6) e o ácido clorídrico (HCl, 37%) foram adquiridos da Fluka analytical, Sigma-Aldrich (Alemanha e França, respetivamente). O cloreto de sódio (NaCl, 99,5%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Suíça). A água Millipore (resistividade 18,2 MΩcm a 25°C) foi retirada de um sistema de purificação de água Milli-Q Academic da Merck Millipore (EUA). O padrão de ácido acético (99,9%) foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA), o ácido propanóico (99%) e o ácido butanóico (99%) foram obtidos da Acros Organics (Bélgica e Alemanha, respetivamente).

## 2.2 Amostras reais

As amostras de água intersticial foram extraídas de sedimentos marinhos provenientes de vulcões de lama existentes na margem Sul-Oeste Portuguesa e na margem Pacífica da Costa Rica de acordo com o método Mc Aullife (1971). Alíquotas de 2 a 4 mL de água intersticial foram filtradas com filtros de celulose (0,2 μm, Wheaton®). As amostras filtradas foram colocadas em frascos de vidro e congeladas a -20°C [1]. Os sedimentos marinhos foram recolhidos e as amostras de água intersticial foram extraídas e pré-preparadas no cruzeiro M86/5. As amostras foram analisadas por SPME-GC-MS.

## 2.3 Materiais

Na preparação das soluções, além do material de uso corrente de laboratório, foram utilizadas micropipetas de 10 μL da VWR, micropipetas de 200 e 1000 μL da Gilson, frascos de amostragem de vidro de 10 e 20 mL (Chromacol, EUA) com as respetivas tampas (d = 18 mm *magnetic screw cap*) e septos de teflon e silicone. Foram também usados vials de vidro transparente (VWR Internacional, Portugal) de 1,5 mL com as respetivas tampas (d = 11 mm) e septos de teflon.

## 2.4 Equipamento

As análises de SPME-GC-MS foram realizadas num equipamento da Thermo Scientific, constituído por um cromatógrafo gasoso Trace GC Ultra equipado com injetor automático TriPlus RSH Autosampler, acoplado a um espectrómetro de massa ITQ 900 equipado com uma fonte de ionização por impacto eletrónico e um analisador de massa do tipo *ion trap*. O *software* utilizado para controlo instrumental, aquisição e processamento dos dados foi o Xcalibur versão 1.2 da Thermo Scientific.

A coluna cromatográfica usada foi a Nukol™ fused silica capillary 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm da Supelco (EUA). As fibras de SPME testadas foram de Poliacrilato (PA) 85 µm, Polidimetilxiloxano (PDMS) 100 µm, Carboxeno-Polidimetilsiloxano (CAR-PDMS) 75 µm, Polidimetilsiloxano-Divinilbenzeno (PDMS-DVB) 65 µm. Estas fibras foram adquiridas à Supelco (Espanha) (figura 2.1).

As pesagens foram efetuadas numa balança analítica Sartorius CP225D. Foi também utilizada uma placa de agitação múltipla com 25 posições da Velp Scientifica. O pH das amostras foi controlado com recurso a um medidor de pH SympHony SP70P da VWR.



**Figura 2.1** - Dispositivo de SPME para injetor automático (a) e fibras de SPME (b): PA (branco), PDMS (vermelho), CAR-PDMS (preto) e PDMS-DVB (azul).

## 2.5 Procedimento Experimental

### 2.5.1 Soluções para estudo do comportamento dos ácidos

Uma solução com uma mistura de 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético, 50  $\mu\text{L}$  de ácido propanóico e 50  $\mu\text{L}$  de ácido butanóico foi preparada em 850  $\mu\text{L}$  de n-hexano. A solução foi injetada e analisada por GC-MS. Para efeitos de identificação foi utilizado o tempo de retenção e o espectro de massa dos ácidos em estudo.

### 2.5.2 Microextração em fase sólida

#### 2.5.2.1 Preparação de soluções de trabalho

As soluções *stock* individuais de ácido acético, ácido propanóico e ácido butanóico foram preparadas em água Milli-Q com uma concentração de 10000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  e armazenadas a 4°C [2]. A solução mistura foi preparada diariamente a partir das soluções *stock* de cada um dos ácidos.

#### 2.5.2.2 Ensaios de otimização

Os ensaios de otimização foram efetuados medindo 2 mL de água Milli-Q saturada com NaCl num frasco de amostragem de 10 mL selado com um septo de teflon. A solução aquosa foi fortificada com 500  $\mu\text{L}$  da solução mistura de modo a obter uma concentração final de 2000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . De seguida o pH foi ajustado para 1,5 através da injeção de HCl (37%). Os frascos foram colocados no injetor automático para extração no modo *headspace* e posterior análise por GC-MS. Todos os ensaios foram realizados em triplicado, tendo sido também realizados ensaios em branco.

Por forma, a otimizar a eficiência da extração, foram estudados diversos parâmetros: revestimento de fibra (PA, PDMS, CAR-PDMS e PDMS-DVB), condições de dessorção (250°C, 275°C e 300°C durante 2 e 5 min), tempo de extração (5, 10, 20, 30,

45 e 55 min), temperatura de extração (40°C, 50°C e 60°C), e volume de *headspace* (2,5 mL num frasco de 10 mL e 2,5 mL num frasco de 20 mL) (figura 2.2).

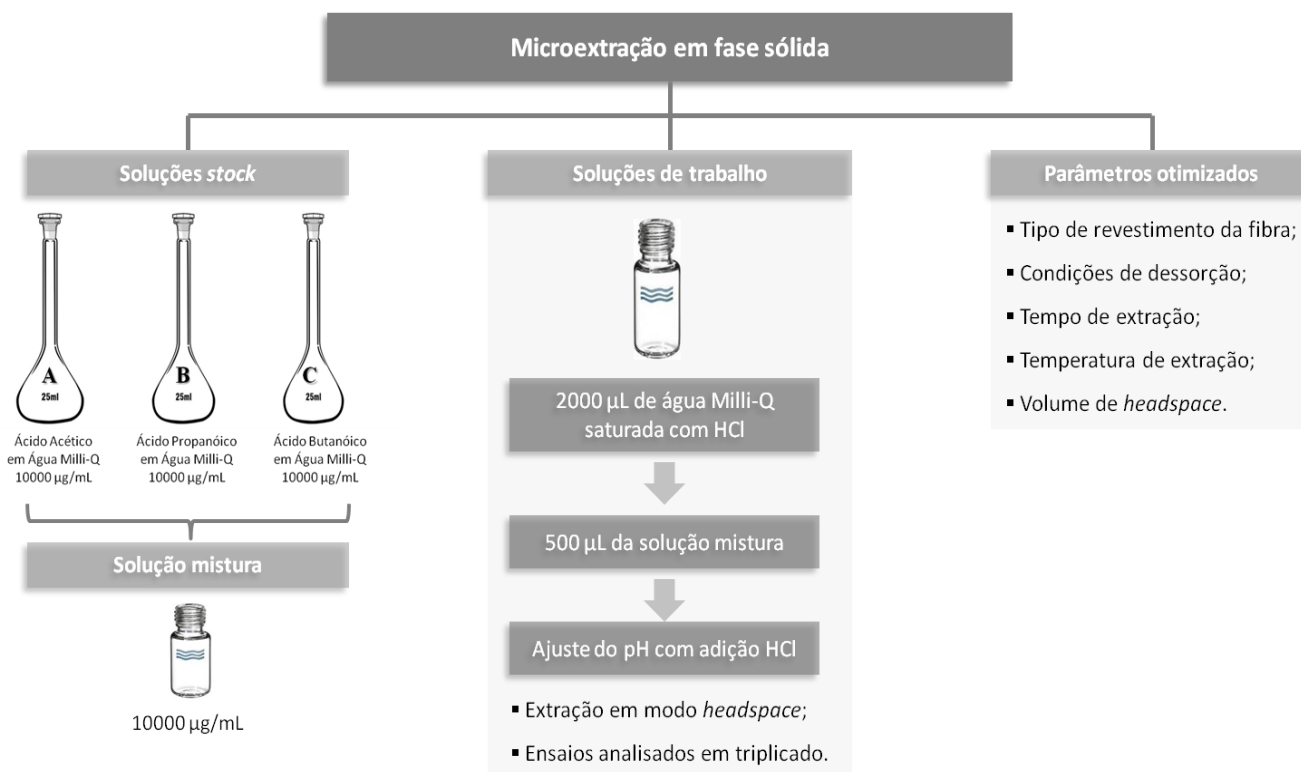


Figura 2.2 - Representação esquemática do procedimento de otimização da SPME.

### 2.5.2.3 Ensaios de validação

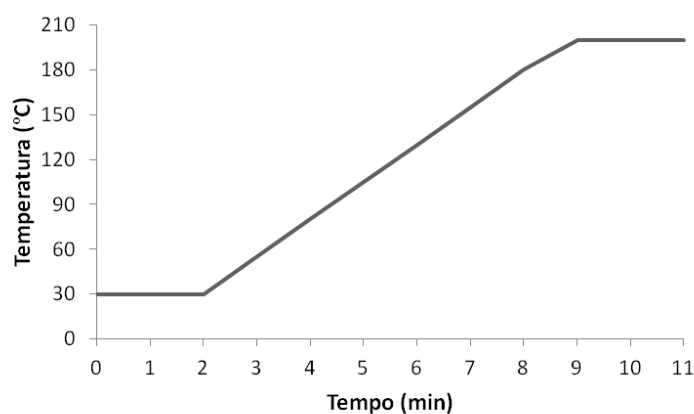
Nos estudos de validação foram efetuados ensaios com diferentes níveis de fortificação, de acordo com o procedimento descrito anteriormente para as condições otimizadas. Para a obtenção das curvas de calibração e respetivo estudo da linearidade foram preparados padrões com 4 níveis de concentração (1, 3, 6 e 9 µg/mL) a partir da solução mistura. Os ensaios foram sempre realizados em triplicado. A precisão do método foi avaliada em termos de repetibilidade através de ensaios fortificados com a concentração de 5 µg/mL. Foram realizados 6 consecutivos.

### 2.5.2.4 Aplicação a amostras reais

Nos estudos de aplicação do método a amostras reais foram realizados ensaios fortificados com a mistura dos três ácidos a uma concentração de 25 µg/mL. Foram também realizados ensaios em branco, ou seja, sem fortificação.

### 2.5.3 Condições de análise GC-MS

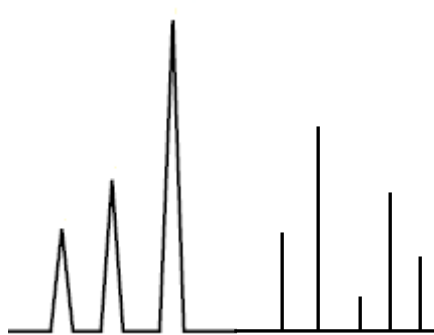
As análises foram realizadas por GC-MS. O gás de arraste utilizado foi o hélio a um fluxo constante de 1,2 mL/min. A temperatura inicial do forno foi 30°C durante 2 min, aumentando 25°C/min até atingir 200°C onde permaneceu durante 2 min (figura 2.3). O tempo total de corrida foi aproximadamente 11 min. A temperatura da linha de transferência foi 280°C. Foi utilizada ionização eletrônica (70 eV) numa gama de massas compreendida entre os 10-100 Da, no modo de varrimento contínuo. Para comparação com os espectros de massa obtidos foi utilizado a base de dados da biblioteca espectral Wiley6, Mainlib, e Replib.



**Figura 2.3** - Programa de temperatura do forno usada na análise por GC-MS.

## 2.6 Referências

1. Hensen, C., and cruise participants GEOMAR Helmholtz-Zentrum für Ozeanforschung Kiel, *Tracing for active dewatering sites along deep-reaching transform faults in the western Gulf of Cadiz*, 2013.
2. Ábalos, M., Bayona, J.M, Pawliszyn, J., *Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters*. Journal of Chromatography A, 2000. **873**(1): p. 107-115.



# Capítulo 3

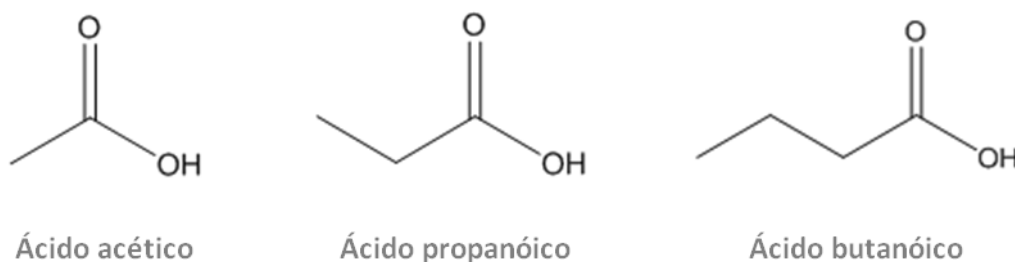
---

Apresentação e tratamento de  
resultados



### 3.1 Estudo do comportamento dos ácidos

O presente trabalho consistiu primeiramente em estabelecer condições instrumentais adequadas, que permitissem a separação dos três ácidos em estudo (figura 3.1). Para tal, recorreu-se a soluções com a mistura dos ácidos preparadas em n-hexano que foram injetadas e analisadas por GC-MS.



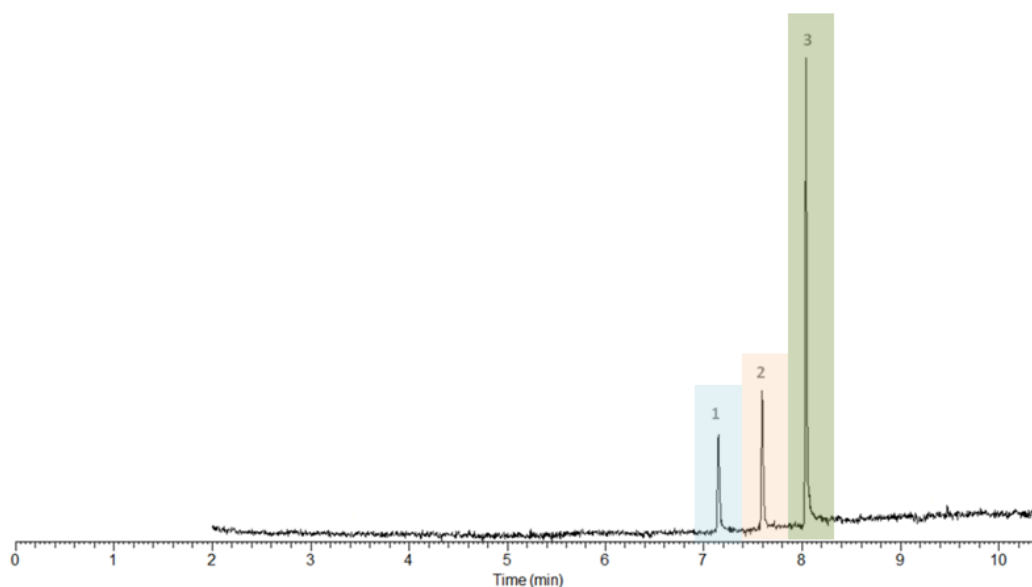
**Figura 3.1** - Estrutura química dos três ácidos em estudo.

De modo a proceder-se à identificação dos ácidos recorreu-se ao seu tempo de retenção e respetivos espectros de massa. Para o estudo do tempo de retenção dos compostos foi necessário determinar diversos parâmetros experimentais, nomeadamente os que se referem à injeção da amostra e à temperatura do forno.

No que diz respeito à temperatura de injeção foi utilizada uma temperatura de 250°C, temperatura superior à temperatura de ebulição dos compostos, de modo a que a amostra vaporize imediatamente. Devido ao facto da análise se efetuar numa coluna capilar e de se tratar de amostras líquidas foi usado como volume de injeção 1 µL no modo *split*, com uma razão de *split* de 10, prevenindo assim a sobrecarga da coluna para amostras com concentrações mais elevadas. O cromatograma foi adquirido a partir dos 2 min de modo a não obter do pico do solvente.

Relativamente à temperatura do forno, esta é crucial para uma boa separação. Uma vez que em misturas complexas os analitos com volatilidades diferentes são separados isotermicamente, durante a implementação do trabalho foram testadas diferentes rampas de temperatura. Foi então definida uma rampa de 25°C/min até atingir a temperatura de 200°C, temperatura máxima de operação da coluna usada.

Após estabelecidas as condições experimentais, foi possível obter a separação dos três ácidos, num tempo de corrida de aproximadamente 11 minutos (figura3.2).



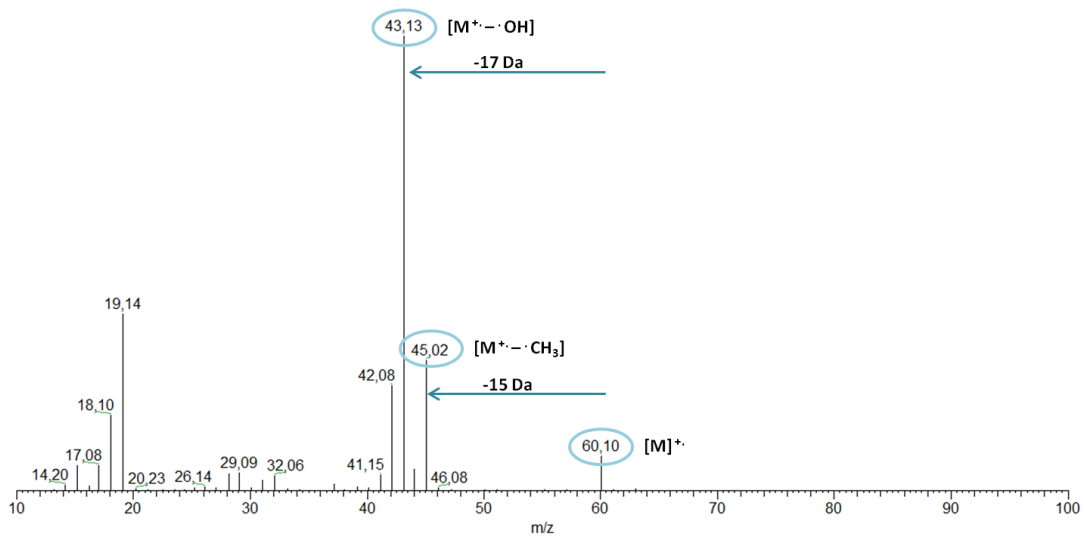
**Figura 3.2** - Cromatograma gasoso relativo aos ácidos em estudo: 1-acético, 2-propanóico, 3-butanóico.

Na tabela 3.1 é possível observar os tempos de retenção e os iões usados para identificação dos ácidos em estudo.

**Tabela 3.1** - Tempos de retenção ( $t_R$ ) e iões selecionados para identificação dos ácidos em estudo.

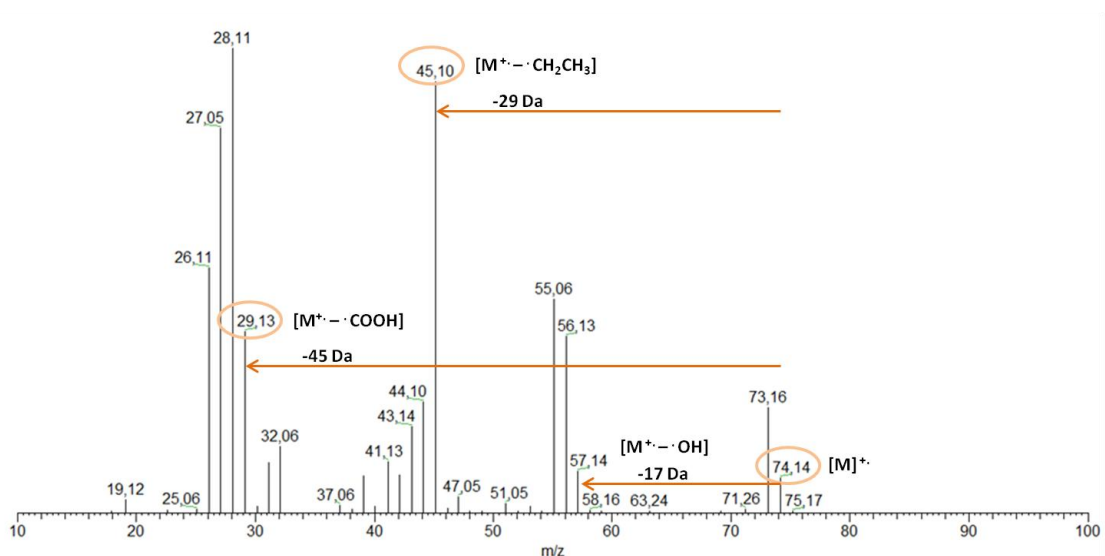
Ácido Volátil	$t_R$ (min)	Iões ( $m/z$ )
Acético	7,15	43/45/60
Propanóico	7,59	29/45/74
Butanóico	8,04	43/45/60/73

O ácido acético tem uma massa molecular de 60 g/mol. No seu espectro de massa é possível identificar o aparecimento de um pico correspondente ao ião molecular  $m/z = 60$  e perdas de 15 Da e 17 Da correspondentes a  $\cdot\text{CH}_3$  e  $\cdot\text{OH}$  respetivamente (figura 3.3).



**Figura 3.3** - Espectro de massa do ácido acético.

Relativamente ao ácido propanóico no espectro de massa é possível observar o aparecimento de um pico correspondente ao ião molecular  $m/z = 74$  assim como aos fragmentos resultantes de perdas de 17 Da, 29 Da e 45 Da, que correspondem a perdas de  $\cdot OH$ ,  $\cdot CH_2CH_3$  e  $\cdot COOH$  respetivamente (figura3.3).



**Figura 3.4** - Espectro de massa do ácido propanóico.

No que diz respeito ao ácido butanóico a sua massa molecular é de 88 g/mol. O espectro de massa deste composto não apresenta pico correspondente ao ião molecular, ou seja, no caso deste composto, a fragmentação é o processo preferencial. Para efeitos de identificação foram observadas a perda de 15 Da correspondentes a  $\cdot\text{CH}_3$ , e perdas de 43 Da e 45 Da correspondentes a  $\cdot\text{COOH}$  e  $\cdot\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_3$ , respetivamente. A partir do espectro de massa do ácido butanóico é ainda possível observar o aparecimento de um ião fragmento a  $m/z = 60$ , cujo aparecimento é explicado através de um rearranjo de McLafferty de que resulta a perda de 28 Da, ou seja  $\text{C}_2\text{H}_4$ .

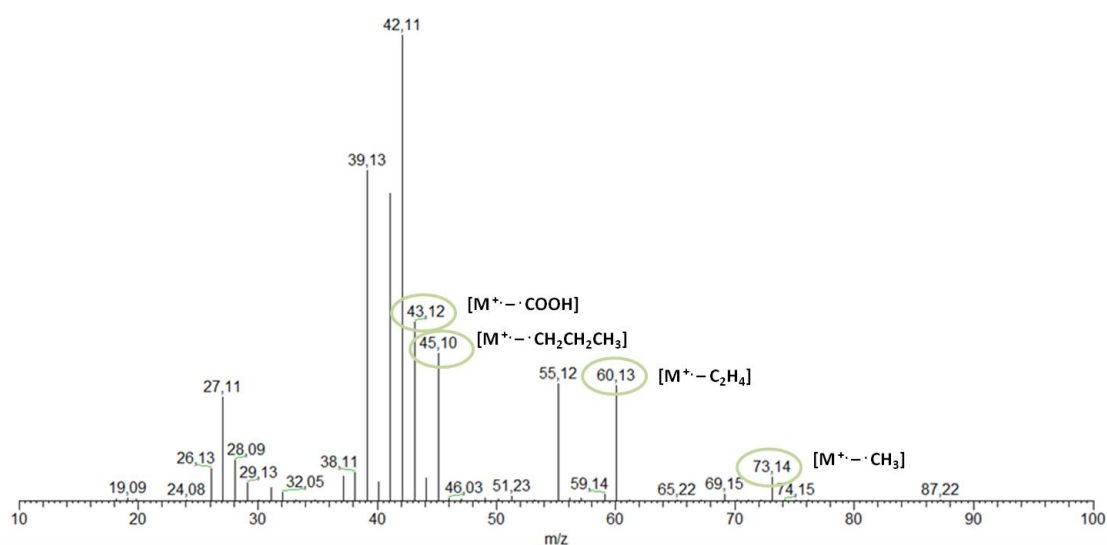


Figura 3.5 - Espectro de massa do ácido butanóico.

A identificação dos compostos, após a análise dos espectros de massa, foi ainda confirmada através das bibliotecas de espectros.

### 3.2 Otimização da SPME

Após encontradas as condições instrumentais adequadas, procedeu-se ao principal objetivo do presente trabalho que foi alcançar as melhores condições experimentais com base na SPME. Deste modo foram estudados os parâmetros que podem influenciar o processo de extração. Uma vez que este método foi automatizado

pela primeira vez no GC-MS do laboratório, foi necessário perceber o funcionamento e as limitações do equipamento.

Os parâmetros estudados foram o revestimento da fibra, condições de dessorção, tempo e temperatura de extração e o volume de *headspace*. [1-7]

### **3.2.1 Modo de operação**

Uma vez que na análise de compostos orgânicos voláteis se tem utilizado maioritariamente a amostragem por *headspace*, a fim de evitar a contaminação da fibra, neste trabalho todas as extrações foram realizadas neste modo. Ao operar por HS-SPME é possível obter tempos de equilíbrio mais rápidos para compostos orgânicos voláteis, o que permite diminuir significativamente o tempo de extração, uma vez a velocidade de difusão em fase gasosa ser maior do que em fase líquida. A HS-SPME permite maior seletividade quando são analisadas amostras complexas, e protege as colunas de GC dos compostos não voláteis de alta massa molecular.

### **3.2.2 Efeito da força iónica**

Outro fator que tem grande influência na eficácia da extração é o efeito da força iónica. Este parâmetro pode ser controlado com a adição de um sal, por exemplo o NaCl, fazendo assim aumentar a força iónica da solução. Nestas condições, a eficiência da extração de muitos analitos é aumentada, em particular de compostos polares e voláteis. O aumento da força iónica faz diminuir a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na matriz resultando no aumento dos coeficientes de distribuição, aumentando a transferência em fase gasosa e conseqüentemente a apetência para o revestimento da fibra.

Como a matriz real a que se pretende implementar a metodologia desenvolvida são amostras de água intersticial de sedimentos marinhos, e uma vez que a água do mar é caracterizada por um valor de salinidade de cerca de 35% (g de sais/Kg de água

do mar), sendo que a maior parte desses sais é cloreto de sódio, nos ensaios de otimização, de modo a aproximar as soluções de trabalho com a matriz foi utilizada água Milli-Q saturada com NaCl.

### **3.2.3 Efeito do pH**

Durante o processo extrativo, também o valor de pH pode ter influência nas características químicas dos analitos alvo e conseqüentemente, ser decisivo na apetência para o material de revestimento da fibra. Através da redução do pH da amostra, os ácidos permanecem nas suas formas neutras e conseqüentemente, têm maior afinidade para a fibra. No presente trabalho, o pH da solução foi ajustado a 1,5 sendo este o valor utilizado durante os ensaios de otimização.

### **3.2.4 Velocidade de agitação**

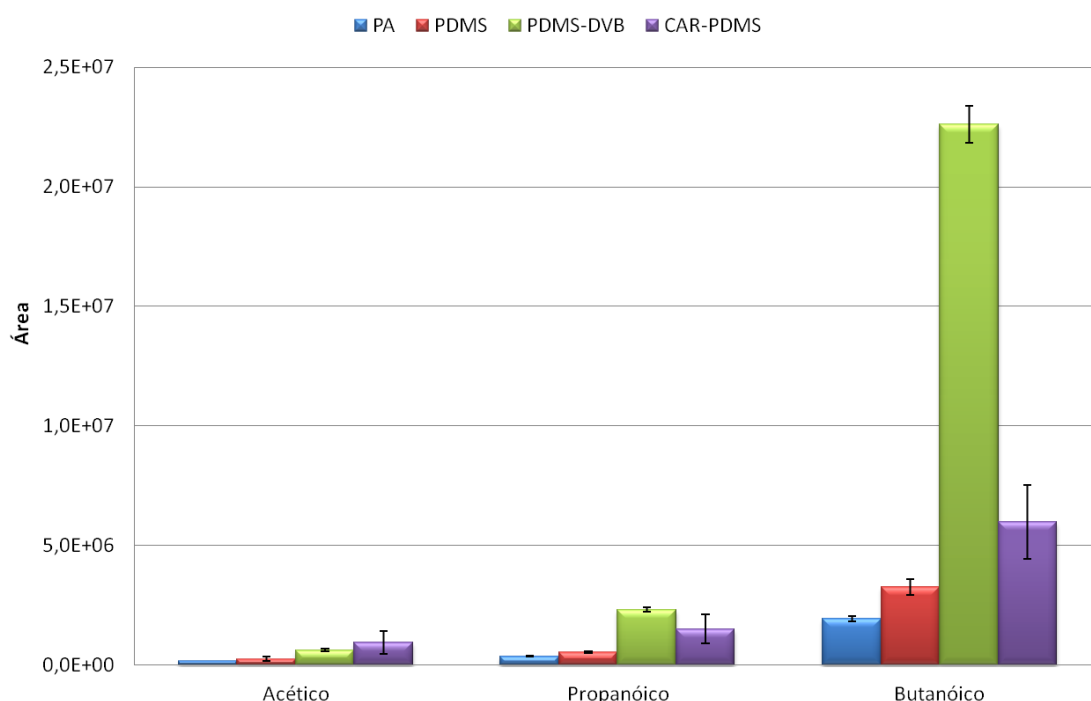
No que se refere à velocidade de agitação, teoricamente a extração é favorecida se a amostra for perfeitamente agitada. Nos casos em que o tempo necessário para atingir o equilíbrio é relativamente longo, este pode ser reduzido com recurso à agitação, uma vez que acelera o processo de difusão dos componentes orgânicos na matriz. A velocidade de agitação foi uma das limitações do *software* encontradas durante a realização deste trabalho, pois não foi possível alterar este parâmetro, tendo todo o trabalho sido realizado a uma velocidade de 600 rpm.

### **3.2.5 Seleção do revestimento da fibra**

A seleção do revestimento da fibra é um dos aspetos críticos na otimização da SPME. No presente estudo foram testadas 4 fibras diferentes: PA, PDMS, PDMS-DVB e CAR-PDMS. Nesta fase do estudo, as extrações foram realizadas no modo *headspace*, durante 55 min (de modo a assegurar que o equilíbrio fosse atingido e que fosse possível a extração de todos os ácidos), a uma velocidade de agitação de 600 rpm, e a

uma temperatura de 40°C. A dessorção foi realizada a 250°C durante 5 min, sendo o volume total da solução de trabalho 2,5 mL num frasco de amostragem de 10 mL. A solução foi saturada com NaCl e o pH ajustado a 1,5. Os resultados obtidos podem ser observados na figura 3.6.

No geral foram obtidas extrações bastante satisfatórias para o ácido butanóico, ácido de maior peso molecular, embora o revestimento da fibra PDMS-DVB apresente destaque. O ácido acético por sua vez pode ser extraído com uma área de pico aceitável usando CAR-PDMS.



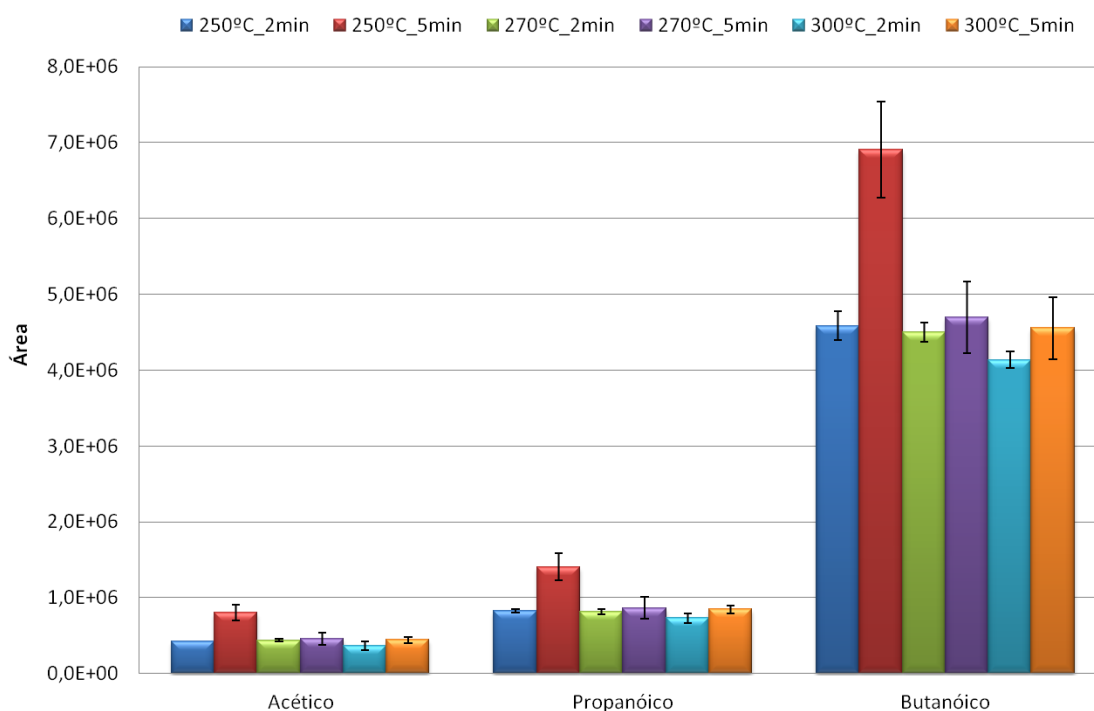
**Figura 3.6** - Comparação do desempenho dos diferentes revestimentos de fibra: PA, PDMS, PDMS-DVB, CAR-PDMS. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna.

Deste modo, e uma vez que de acordo com a literatura o revestimento de CAR-PDMS se adequa à extração de voláteis, e como também apresenta resultados satisfatórios para os restantes ácidos este foi o revestimento de fibra escolhido para ser utilizado durante o estudo.

### 3.2.6 Condições de dessorção

A fim de evitar o efeito de arrastamento dos picos, a temperatura do injetor e o tempo de dessorção são parâmetros importantes a otimizar na análise por SPME. Foram testados neste trabalho seis condições de dessorção: 250°C, 275°C e 300°C (temperatura máxima de operação da fibra de CAR-PDMS), durante 2 e 5 min.

Através da análise da figura 3.7 é possível observar que a área dos picos obtida foi muito similar, havendo no entanto destaque para a análise realizada a uma temperatura de 250°C durante 5 min.



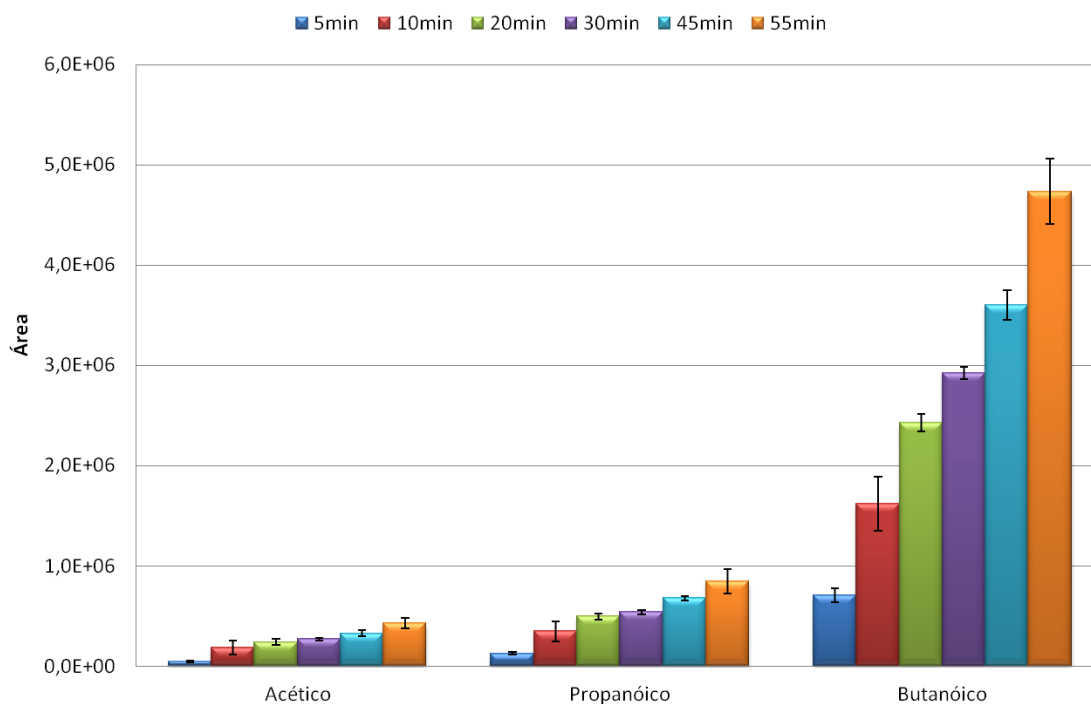
**Figura 3.7** - Área obtida usando diferentes condições de dessorção (250°C, 275°C e 300°C durante 2 e 5 min) com o revestimento de fibra CAR-PDMS. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna.

### 3.2.7 Tempo de extração

O tempo de extração deve ser, regra geral, suficiente para que uma quantidade significativa dos analitos alvo sejam extraídos durante esse período de tempo, e seja

atingido o equilíbrio de distribuição dos mesmos entre a matriz da amostra e o revestimento da fibra. Geralmente o tempo de extração é mais curto quando se opera no modo *headspace*.

Relativamente ao tempo de extração foi detetada outra limitação do equipamento, sendo que não foi possível realizar extrações superiores a 55 minutos. A extração foi realizada a 5, 10, 20, 30, 45 e 55 minutos. Observando a figura 3.8, é possível verificar que o aumento do tempo de extração faz aumentar a área dos picos. Contudo, observando o aumento da área dos picos para o ácido acético verifica-se que não houve um aumento significativo. Com base nesta análise, e de modo a adequar o método a análises de rotina, foi escolhido como tempo de extração 20 min.

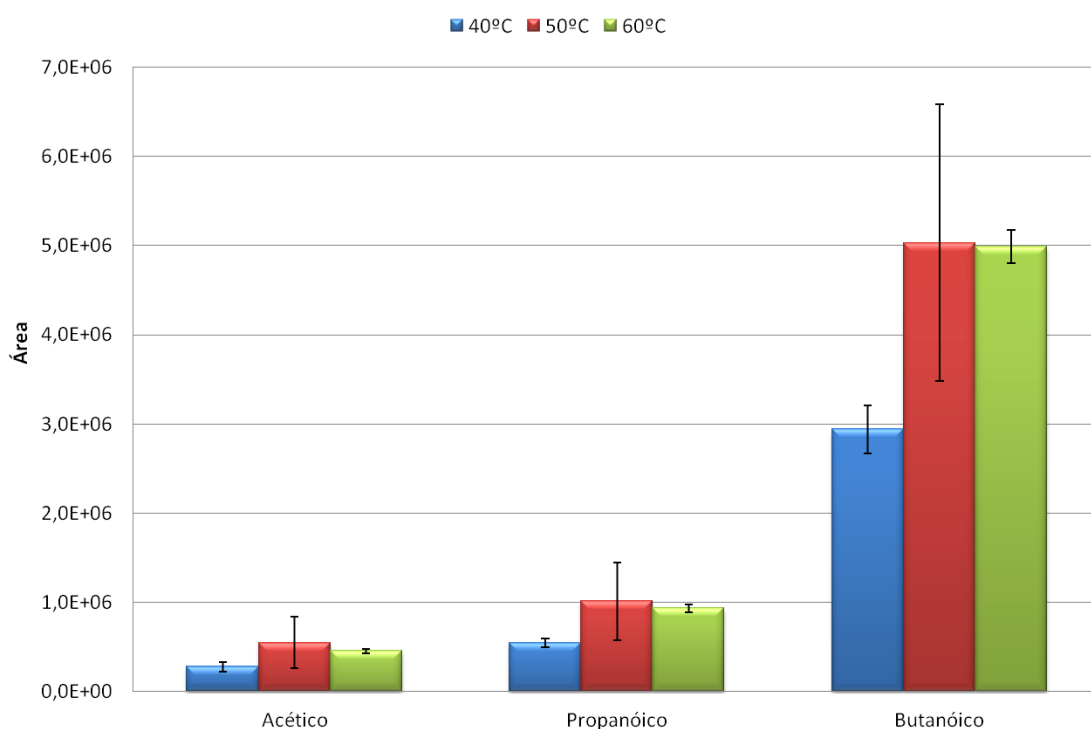


**Figura 3.8** - Efeito da temperatura de extração (5, 10, 20, 30, 45, 55 min) usando o revestimento de fibra CAR-PDMS. O tempo de dessorção foi 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna.

### 3.2.8 Temperatura de extração

A regulação da temperatura de extração do agitador automático consistiu noutra limitação encontrada durante a implementação desta metodologia, sendo que a temperatura mínima de extração permitida pelo *software* foi 40°C. De acordo com a literatura, o aumento da temperatura não favorece em geral o processo de sorção pela fibra. Este faz aumentar a solubilidade dos compostos hidrofóbicos na matriz da amostra, ocorrendo este fenómeno para valores superiores à temperatura ambiente.

De modo a avaliar o efeito da temperatura nesta classe de compostos, foram testadas três temperaturas: 40°C, 50°C e 60°C.



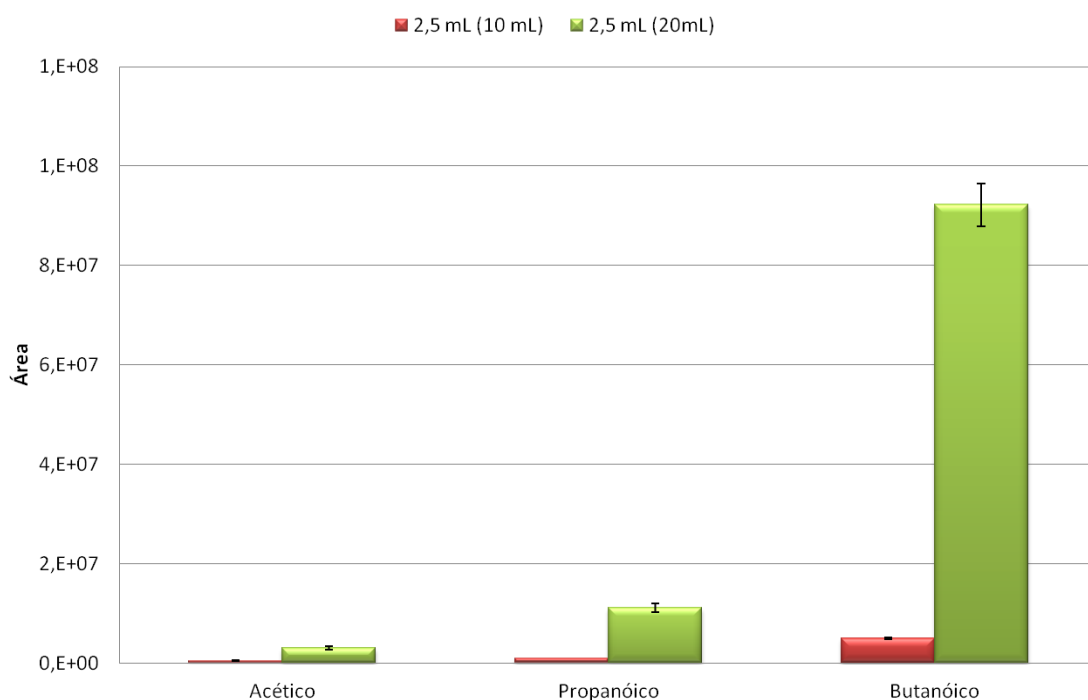
**Figura 3.9** - Efeito da temperatura de extração (40°C, 50°C e 60°C) usando como revestimento de fibra CAR-PDMS durante 20 min. O tempo de dessorção foi de 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna.

Através da figura 3.9 é possível observar que os melhores resultados foram obtidos para temperaturas superiores, ao contrário do que seria de esperar. Uma vez

que se observaram desvios padrão superiores na temperatura de 50°C foi escolhida como temperatura de extração 60°C.

### 3.2.9 Volume de *headspace*

A proporção entre o *headspace* e a fase aquosa da amostra foi avaliada na fase final da otimização da SPME. Devido ao facto do método ser desenvolvido para aplicação em amostras reais e de essas amostras terem um volume limitado (2-5 mL), o volume das soluções de trabalho utilizado na otimização foi de 2,5 mL. Deste modo o que se fez variar foi o volume dos frascos de amostragem, sendo utilizados frascos com volumes de 10 e 20 mL.



**Figura 3.10** - Efeito das diferentes proporções entre o *headspace* e a fase aquosa (2,5 mL num frasco de amostragem de 10 mL e de 20 mL), usando como revestimento de fibra CAR-PDMS durante 20 min a uma temperatura de 60°C. O tempo de dessorção foi de 5 min a uma temperatura de 250°C. O valor médio e o desvio padrão dos replicados são representados pelas barras verticais no topo de cada coluna.

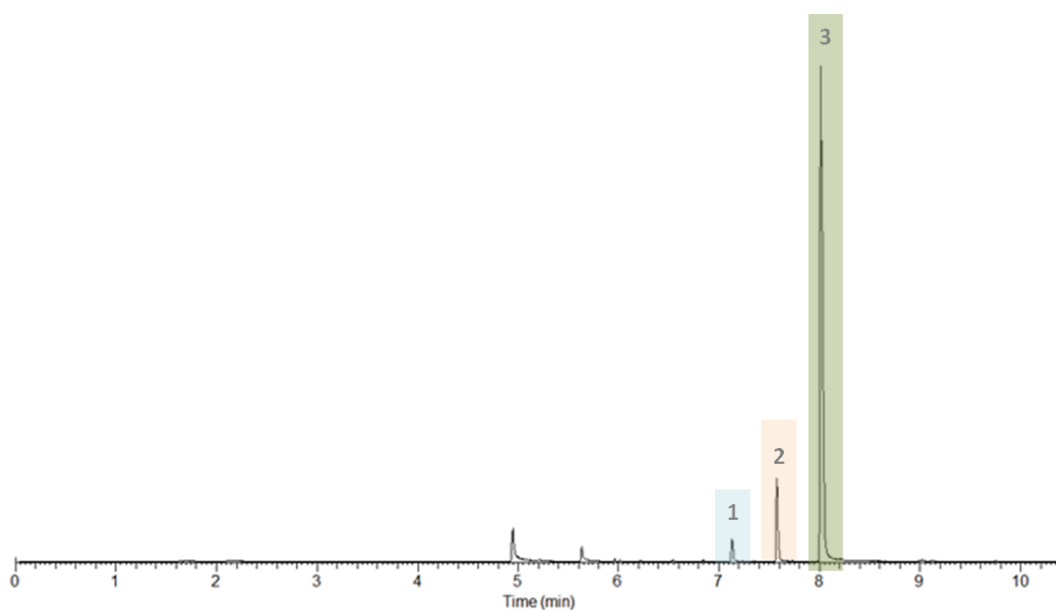
Através da análise da figura 3.10 é de notar que se obteve um aumento bastante significativo da área dos picos quando se utilizou frascos de amostragem de 20 mL, isto é, a transferência de analito para a fase gasosa pode ser favorecida quando se aumenta a proporção entre o *headspace* e a fase aquosa da amostra.

A conclusão da otimização dos parâmetros permitiu obter as melhores condições de análise para a SPME dos analitos em estudo. Estas podem ser observadas na tabela 3.2.

**Tabela 3.2** - Condições experimentais otimizadas no procedimento de SPME-GC-MS.

Condições experimentais	
Modo de operação	<i>headspace</i>
pH da matriz (HCl)	1,5
Saturação da matriz (NaCl)	Sim
Velocidade de agitação (rpm)	600
Tipo de Revestimento de fibra	CAR-PDMS
Tempo de dessorção (min)	5
Temperatura de dessorção (°C)	250
Tempo de extração (min)	20
Temperatura de extração (°C)	60
Volume de <i>headspace</i>	2,5 mL num frasco de amostragem de 20 mL

A figura 3.11 representa o cromatograma obtido na última extração com as condições experimentais otimizadas.



**Figura 3.11** - Cromatograma obtido da última extração com as condições experimentais otimizadas.

### 3.3 Validação do método SPME-GC-MS

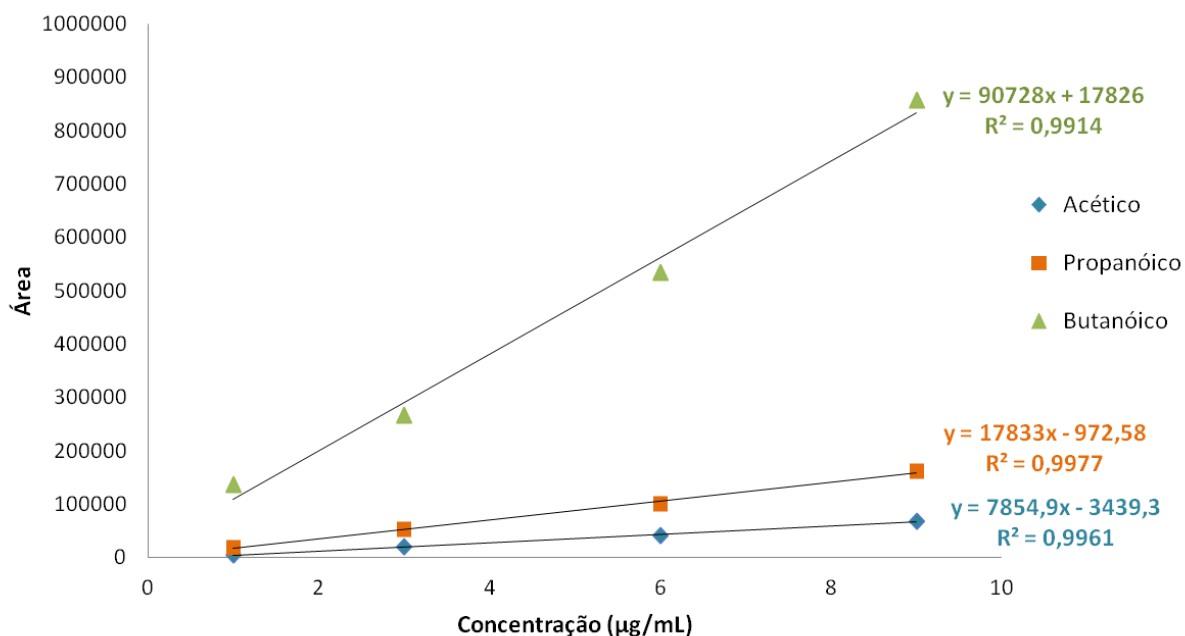
Depois de realizada a otimização experimental, procedeu-se à validação da metodologia, nomeadamente, linearidade da gama dinâmica, limiares analíticos e precisão associada.

Os limiares analíticos foram verificados com recurso ao LD e LQ, para uma razão sinal/ruído (S/N) de 3:1 e 10:1 respetivamente (tabela 3.3).

**Tabela 3.3** - LD e LQ para os analitos estudados, obtidos na validação do método SPME-GC-MS.

Ácido Gordo Volátil	LD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Acético	0,884	2,677
Propanóico	0,683	2,070
Butanóico	0,387	1,168

A linearidade da gama dinâmica foi avaliada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo as regressões lineares sido aplicadas no intervalo de concentrações compreendido entre 1 e 9 µg/mL (envolvendo quatro níveis de concentração, analisados em triplicado) (figura 3.12).



**Figura 3.12** - Curva de calibração obtida para ácido acético, propanóico e butanóico pelo método dos mínimos quadrados.

As curvas de regressão linear no intervalo de concentração estudado, bem como os respetivos coeficientes de determinação ( $r^2$ ), são apresentados na tabela 3.4, verificando-se boa linearidade ( $r^2 \geq 0,9914$ ).

**Tabela 3.4** - Parâmetros relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.

Ácido Gordo Volátil	Gama linear (µg/mL)	a	b	$r^2$
Acético	1 - 9	-3439	7855	0,9961
Propanóico	1 - 9	-973	17833	0,9977
Butanóico	1 - 9	17826	90728	0,9914

A precisão foi avaliada em termos de repetibilidade, com recurso a amostras fortificadas com 5 µg/mL. Foram realizados 6 ensaios consecutivos. Os resultados dos RSD são apresentados na tabela 3.5 e indicam valores inferiores a 8 %.

**Tabela 3.5** - Ensaio de precisão obtidos por SPME-GC-MS fortificadas com 5 µg/mL em condições otimizadas.

Ácido Gordo Volátil	Repetibilidade (n=6)
	RSD (%)
Acético	4,8
Propanóico	6,8
Butanóico	7,7

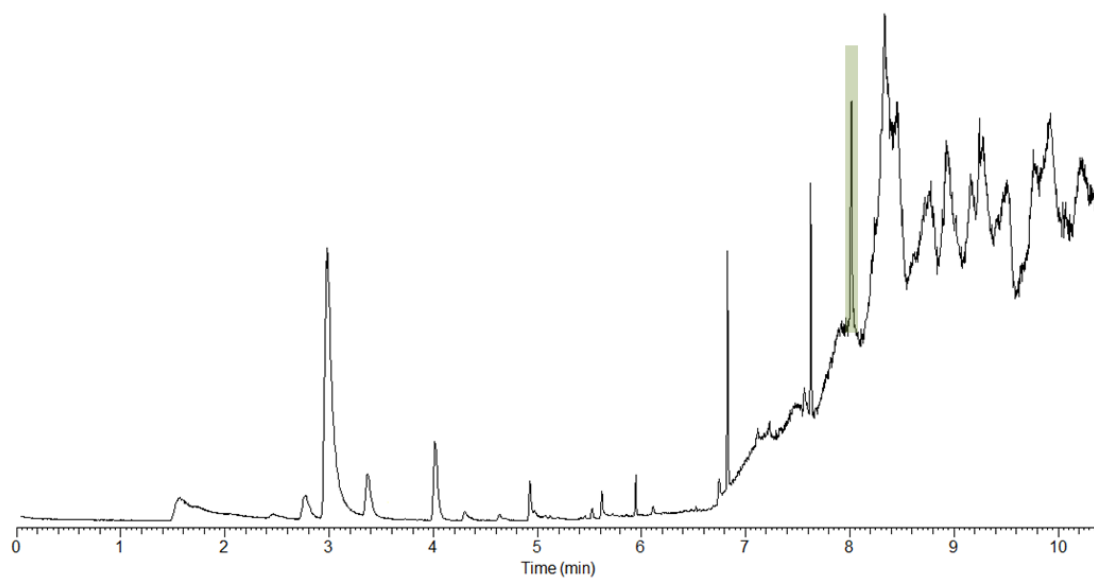
### 3.4 Aplicação do método a matrizes reais

Por forma a demonstrar a capacidade analítica da metodologia desenvolvida avaliou-se a sua aplicabilidade a amostras reais, em condições otimizadas, descritas anteriormente.

Na análise das amostras de água intersticial de sedimentos marinhos não foi detetada a presença de nenhum dos compostos em estudo nem de outros ácidos voláteis. Estes compostos embora possam estar presentes nas amostras encontram-se abaixo do limite de deteção do método analítico.

Devido ao reduzido volume de cada amostra apenas foi possível fortificar com um nível de fortificação a uma concentração de 25 µg/mL.

Na análise da amostra, *M86-5\_GC06\_110-114cm* fortificada, foi possível detetar o ácido butanóico. Contudo verificou-se uma subida acentuada da linha de base no cromatograma a partir dos 6 minutos. Este facto pode estar relacionado com uma degradação da coluna, o que não permitiu a identificação do ácido acético e do ácido propanóico (figura 3.13).

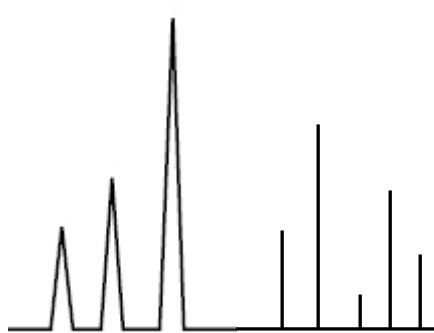


**Figura 3.13** - Cromatograma relativo à amostra *M86-5\_GC06\_110-114cm*, fortificada com 25 µg/mL obtido por SPME-GC-MS.

### 3.5 Referências

1. Matisova, E., Medved'ová, M., Vraniaková, J., Simon, P., *Optimisation of solid-phase microextraction of volatiles*. Journal of Chromatography A, 2002. **960** (1-2): p. 159-164.
2. Alpendurada, M.F., *Solid-phase microextraction: a promising technique for sample preparation in environmental analysis*. Journal of Chromatography A, 2000. **889**(1-2): p. 3-14.
3. Almeida, C., Rosário, P., Serôdio, P., Nogueira, J.M.F, *Novas perspectivas na preparação de amostras para análise cromatográfica*. Boletim da Sociedade Portuguesa de Química, 2004. **95**: p. 69-77.
4. Ábalos, M., Bayona J.M., Pawliszyn J., *Development of a headspace solid-phase microextraction procedure for the determination of free volatile fatty acids in waste waters*. Journal of Chromatography A, 2000. **873**(1): p. 107-115.
5. Gros, N., Camões, M.F., Oliveira, C., Silva, M.C.R., *Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other water quality parameters*. Journal of Chromatography A, 2008. **1210**: p. 92–98.
6. Supelco - Sigma-Aldrich, *Solid Phase Microextraction: Theory and optimization of Conditions*. 1988. **Bulletin 923**.
7. Prosen, H., Zupancic-Kralj, L., *Solid-phase microextraction*. trends in analytical chemistry 1999. **18**: p. 272-282.





# Capítulo 4

---

Conclusão



O presente trabalho propõe a identificação de ácidos gordos voláteis, nomeadamente ácido acético, propanóico e butanóico em amostras de água intersticial de sedimentos marinhos utilizando como técnica de extração a SPME com posterior análise por GC-MS.

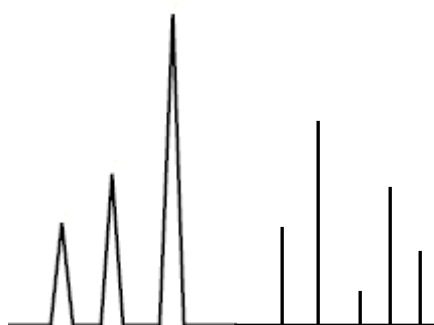
Verificou-se que o sistema analítico usado, GC-MS, era apropriado para a análise dos ácidos voláteis. A otimização dos parâmetros instrumentais permitiu a separação dos três compostos, com ótima resolução, num tempo de análise de 11 min. Também os espectros de massa apresentaram as fragmentações características dos compostos permitindo assim a sua identificação inequívoca.

No que diz respeito à otimização da SPME dos quatro revestimentos de fibra testados, o CAR-PDMS foi o que apresentou melhores resultados de extração para o ácido acético, ácido de baixo peso molecular, apresentando extrações satisfatórias para os restantes ácidos em estudo. Relativamente aos restantes parâmetros testados as melhores condições foram obtidas realizando extrações de 20 min a uma temperatura de 60°C com agitação vigorosa da amostra (600 rpm). A dessorção no injetor do GC foi mantida durante 5 minutos a uma temperatura de 250°C.

Quanto à validação analítica, obtiveram-se LD inferiores a 1 µg/mL. A gama de trabalho estudada, 1 a 9 µg/mL demonstrou boa linearidade ( $r^2 \geq 0,9916$ ), assim como valores de repetibilidade adequados (RSD < 8).

O método desenvolvido SPME-GC-MS foi testado em amostras de águas intersticiais de sedimentos marinhos, não sendo detetada a presença de ácidos voláteis. Devido ao limitado volume de amostra disponível, apenas se realizou um ensaio fortificado com uma concentração de 25 µg/mL de modo a demonstrar que o método era adequado. Nesta etapa do estudo ocorreu um problema com a coluna cromatográfica, verificando-se uma inclinação acentuada da linha de base a partir dos 6 minutos de tempo de corrida, ou seja, quando se atingiam temperaturas mais elevadas no forno. Deste modo nas amostras fortificadas apenas foi possível a identificação do ácido butanóico.

A SPME demonstrou ser um método de preparação de amostra simples, rápido, isento de solventes e adequado para a monitorização em GC-MS.



**Anexos**



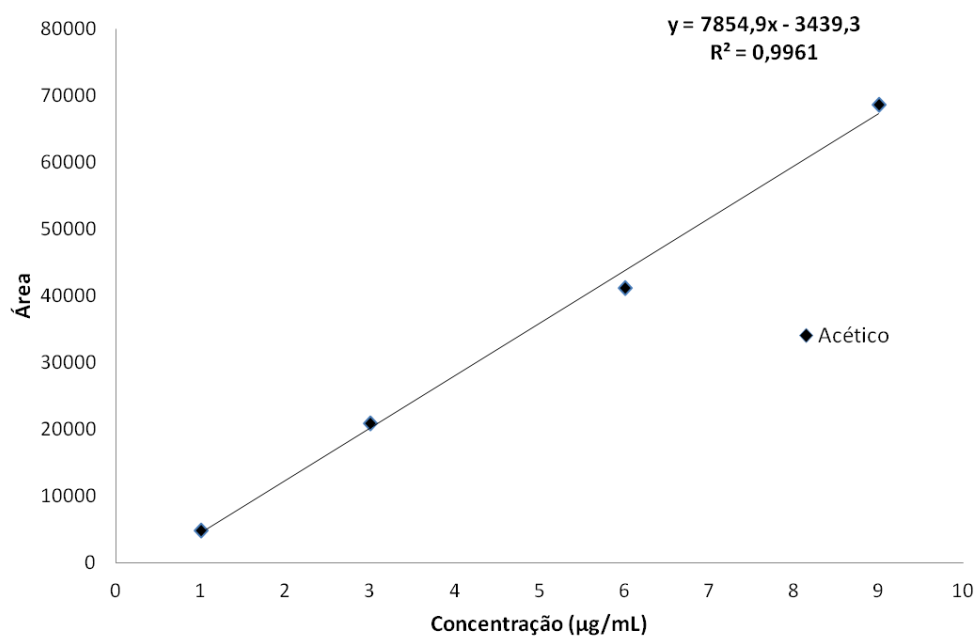
## Anexo A - Fórmulas

O cálculo da média ( $\bar{x}$ ), desvio padrão ( $\sigma$ ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização), foram efectuados com recurso as funções pré-definidas do *software* Microsoft Excel.

O desvio padrão relativo (RSD) foi calculado com recurso à seguinte equação:

$$RSD = \left( \frac{\sigma}{\bar{x}} \right) \times 100\%$$

## Anexo B - Curvas de calibração



**Figura B.1** - Curva de calibração do ácido acético.

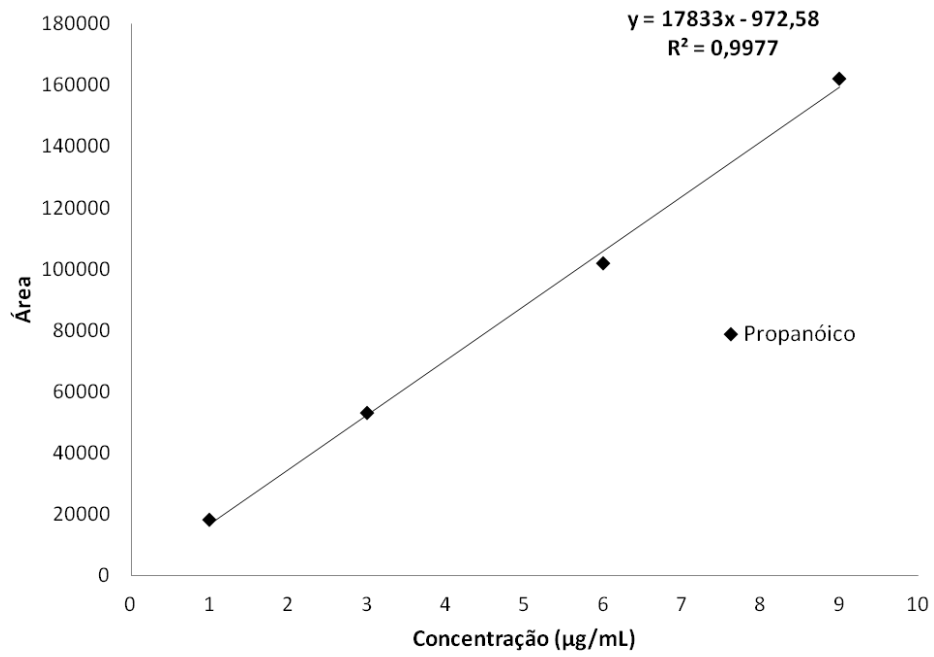


Figura B.2 - Curva de calibração do ácido propanóico.

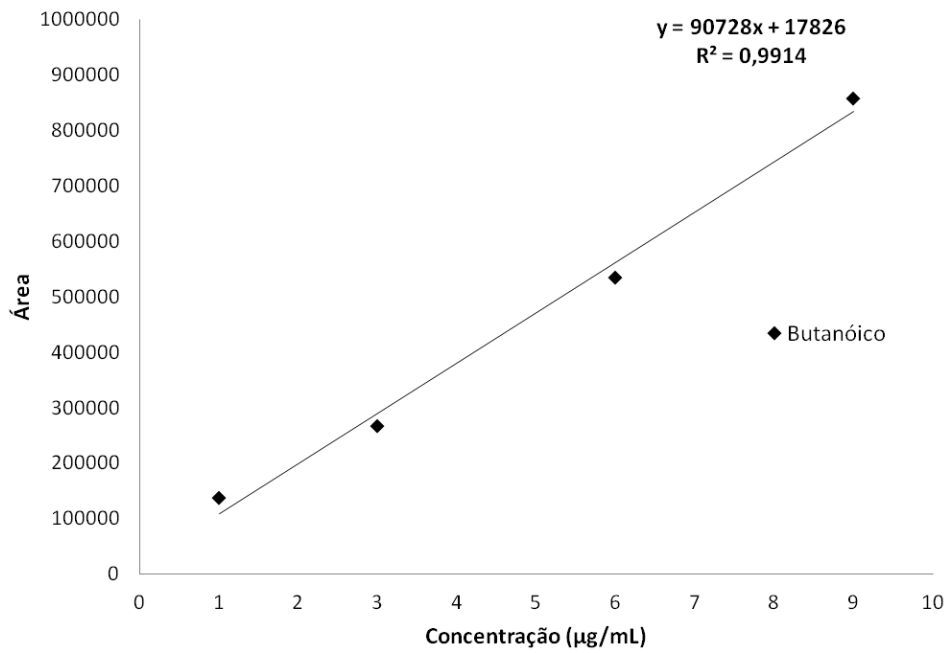


Figura B.3 - Curva de calibração do ácido butanóico.