CENTRO FEDERAL DE EDUCAÇÃO TECNOLÓGICA DE MINAS GERIAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM QUÍMICA DE MINAS GERAIS

GABRIEL SILVEIRA DE NOVAES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE EXTRAÇÃO SORTIVA AUTOMÁTICO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA MULTIDIMENSIONAL

BELO HORIZONTE
2023

GABRIEL SILVEIRA DE NOVAES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE EXTRAÇÃO SORTIVA AUTOMÁTICO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA MULTIDIMENSIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Orientador: Prof. Patterson Patrício de Souza

BELO HORIZONTE

2023

Novaes, Gabriel Silveira de.
N935d Desenvolvimento e validação de método analítico de extração sortiva automático para análise em cromatografia gasosa multidimensional / Gabriel Silveira de Novaes. – 2023.
70 f. : il.
Orientador: Patterson Patricio de Souza.

Dissertação (mestrado) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2023.
Bibliografia.

1. Preparo de amostra - Química. 2. Cromatografia gasosa. 3. Extração (Química). 4. Automação. 5. Alcanos. 6. Validação. I. Souza, Patterson Patricio de. II. Título.

CDD: 660.284248

Ficha elaborada pela Biblioteca - *campus* Nova Suíça - CEFET-MGBibliotecária: Rosiane Maria Oliveira Gonçalves - CRB6-2660

GABRIEL SILVEIRA DE NOVAES

DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE EXTRAÇÃO SORTIVA AUTOMÁTICO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA MULTIDEMNSIONAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Química.

Belo Horizonte, 02 de maio de 2023.

Aprovado pela Banca Examinadora:

_____

Prof. Dr. Patterson Patrício de Souza (Orientador)

_____

Prof. Dr. Emerson Fernandes Pedroso

_____

Profa. Dra. Leiliane

“Educação não transforma o mundo. Educação muda as pessoas. Pessoas mudam o mundo.”

Paulo Freire

RESUMO
DESENVOLVIMENTO E VALIDAÇÃO DE MÉTODO ANALÍTICO DE EXTRAÇÃO SORTIVA AUTOMÁTICO PARA ANÁLISE EM CROMATOGRAFIA GASOSA MULTIDIMENSIONAL

Com os grandes avanços tecnológicos referentes aos métodos de análise e detectores utilizados para determinação dos analitos de uma amostra complexa, fez-se cada vez mais necessário a utilização de novos métodos de preparo de amostra para auxiliar o processo analítico. Dentro do processo de preparo de amostras, é possível destacar o desempenho dos métodos automatizados, que apresentam menor erro estatístico comparado aos tradicionais, além de poupar o analista, evitando o seu contato direto com reagentes e a longos períodos de trabalho. Para avaliar a credibilidade destes novos métodos, garantindo que eles servirão a função proposta, é realizada uma validação analítica, determinando as características de performance deles. Esse trabalho traz a proposta de automatizar, otimizar e validar um método recente de extração e pré-concentração, a extração sortiva em parede de vial (VWSE), sendo um método eficiente, miniaturizado e limpo. Para as análises escolheu-se trabalhar com um cromatógrafo gasoso multidimensional, pois, a sua utilização traz como vantagens a sensibilidade em baixas concentrações, resolução e nível de informações obtidas. O presente trabalho teve como objetivo secundário desenvolver o melhor procedimento de confecção dos dispositivos de VWSE e avaliar a equivalência estatística dos dispositivos preparados, além de avaliar a possibilidade do seu uso em uma metodologia automatizada utilizando um protótipo de amostrador automático disponibilizado no laboratório do Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais. No estudo foi utilizado um padrão de alcanos de concentração conhecida em soluções de tetraidrofurano puro e em mistura com água Mili-Q®. Os dispositivos de VWSE foram preparados em cinco diferentes condições utilizando um torno mecânico e um protótipo desenvolvido para rotacionar os vials e revesti-los por *spin coating*. A metodologia se mostrou eficiente e a sua automatização viável, com os dispositivos VWSE confeccionados em torno mecânico a 250 rpm, horizontalmente com secagem forçada por soprador de calor, apresentando os melhores resultados dentre todos os dispositivos confeccionados. Diferentes vials preparados nessas mesmas condições apresentaram ótimos resultados, tendo equivalência estatística atestada pelos testes T e F realizados para cada alcano. A partir da avaliação da viabilidade do método VWSE automático, foi realizado a otimização dos parâmetros envolvidos no processo, adotando então as condições ótimas de 50 °C durante o todo o preparo da amostra, 10 minutos de tempo de contato entre amostra e fase extratora, 5 minutos de tempo de dessorção líquida e 100 µL de solvente extrator utilizado. Com o método então definido, foi realizada a validação parcial do método de VWSE automático para avaliar a sua eficiência, determinando a sua linearidade, precisão (repetibilidade e reprodutibilidade), recuperação (exatidão) e limites de detecção e quantificação. O método se mostrou com resposta linear, preciso e exato para a série de alcanos de decano a octadecano, atigindo valores baixos de limite de detecção e quantificação na faixa de µg L^{-1}.

Palavras-chave: preparo de amostra, cromatografia, VWSE, automatização, alcanos, validação.

ABSTRACT

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF AN AUTOMATIC ANALYTICAL METHOD FOR SORPTIVE EXTRACTION ANALYSIS IN COMPREHENSIVE MULTIDIMENSIONAL GAS CHROMATOGRAPHY

With the great technological advances related to the analysis methods and detectors used to determine the analytes of a complex sample, the use of new sample preparation methods has become increasingly necessary to aid the analytical process. Within the sample preparation process, it is possible to highlight the performance of automated methods, which present lower statistical error compared to traditional ones, in addition to sparing the analyst, avoiding his direct contact with reagents and long periods of work. To assess the credibility of these new methods, ensuring that they will serve the proposed function, an analytical validation is carried out, determining their performance characteristics. This work brings the proposal to automate, optimize and validate a recent method of extraction and pre-concentration, the vial wall sorptive extraction (VWSE), being an efficient, miniaturized, and clean method. For the analyzes, it was chosen to work with a multidimensional gas chromatograph, since its use brings the advantages of sensitivity at low concentrations, resolution and level of information obtained. The present work also aimed to develop the best procedure for making VWSE devices and to evaluate the statistical equivalence of the prepared devices, in addition to evaluating the possibility of their use in an automated methodology using a prototype of an automatic sampler available in the laboratory of the Centro Federal de Educação Tecnológica Minas Gerais. In the study, a standard of alkanes of known concentration was used in pure tetrahydrofuran solutions and in a mixture with Mili-Q® water. The VWSE devices were prepared in five different conditions using a lathe and a prototype developed to rotate the vials and spin coat them. The methodology proved to be efficient and its automation viable, with the VWSE devices made on a lathe at 250 rpm, horizontally with forced drying by a heat blower, presenting the best results among all the devices made. Different vials prepared under the same conditions showed excellent results, with statistical equivalence attested by the T and F tests performed for each alkane. From the evaluation of the viability of the automatic VWSE method, the optimization of the parameters involved in the process was carried out, adopting the optimal conditions of 50 °C during the process, 10 minutes of contact time between sample and extractor phase, 5 minutes of of liquid desorption and 100 µL of extracting solvent used. With the method then defined, a partial validation of the automatic VWSE method was carried out to assess its efficiency, determining its linearity, precision (repeatability and reproducibility), recovery (accuracy) and limits of detection and quantification. The method showed a linear, precise and exact response for the series of alkanes from decane to octadecane, reaching low detection and quantification limit values in the range of µg L^{-1}.

Keywords: sample preparation, cromatography, VWSE, automation, alkanes, validation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Ilustração de uma separação cromatográfica. 16
Figura 2 - Desenho da montagem de um FID. 18
Figura 3 - Desenho esquemático de um cromatógrafo multidimensional. 19
Figura 4 - Processo de modulação de um pico cromatográfico com três componentes.....20
Figura 5 - Desenho esquemático de um modulador térmico em dois estágios. 21
Figura 6 - Funcionamento de um modulador de fluxo diferencial. 22
Figura 7 - Desenho esquemático do funcionamento do CFT em (a) modo de coleta e (b) modo de injeção. 23
Figura 8 - Desenho esquemático de um dispositivo de SPME. 27
Figura 9 - Desenho esquemático do dispositivo de DVE. 30
Figura 10 - Desenho esquemático do dispositivo de VWSE. 31
Figura 11 - Fotografia do protótipo de *spin coating*, adaptado para vials em posição a) vertical e b) horizontal. 36
Figura 12 - Desenho do protótipo do preparador amostral automático. 38
Figuras 13 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de PDMS. 43
Figura 14 – Análise termogravimétrica da amostra de PDMS. 44
Figura 15 – Cromatograma obtido para o experimento A (a) e o branco do ciclohexano (b).....45
Figura 16 – Cromatograma obtido para o experimento B (a) e o branco do metanol (b). 46
Figura 17 – Cromatograma obtido para o experimento C (a) e o branco da acetonitrila(b). 47
Figura 18 – Cromatograma obtido para o experimento D. 48
Figura 19 – Histograma obtido para avaliação do melhor método de confecção dos vials. 51
Figura 20 – Histograma obtido para avaliação da equivalência dos vials. 53
Figura 21 – Curva de cinética de extração para alcanos leves (C9 a C12) 54
Figura 22 – Curva de cinética de extração para alcanos pesados (C14 a C18) 55
Figura 23 – Curva de otimização de volume de solvente extrator utilizado na dessorção. 56

Figura 24 – Curva de otimização de tempo de dessorção líquida 57
Figura 25 – Curva de otimização da temperatura do método. 58

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Diferentes condições de experimento de revestimento. 36
Quadro 2 – Diferentes condições de experimento com VWSE automático. 39
Tabela 1 – Volumes obtidos para os picos de C12 nos experimentos. 48
Tabela 2 – Massas obtidas para os vials durante o processo de revestimento. 49
Tabela 3 – Resultados obtidos para avaliação do melhor método de confecção dos vials. 50
Tabela 4 – Resultados obtidos para teste de equivalência dos vials 1. 52
Tabela 5 – Resultados dos testes T e F pareados realizados para avaliação da equivalência dos vials. 53
Tabela 6 – Níveis de concentração utilizados na validação. 59
Tabela 7 – Especificações utilizadas para linearidade. 59
Tabela 8 – Resultados obtidos para linearidade. 60
Tabela 9 – Resultados obtidos para precisão (repetibilidade). 61
Tabela 10 – Resultados obtidos para precisão intermediária (reprodutibilidade). 62
Tabela 11 – Resultados obtidos para recuperação (exatidão). 63
Tabela 12 – Resultados obtidos para limite de detecção e quantificação 64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

GCxGC	Cromatografia Gasosa Multidimensional Abrangente
SPME	*Solid Phase Micro Extraction* (Micro Extração em Fase Sólida)
VWSE	*Vial Wall Sorptive Extraction* (Extração Sortiva em Parede de Vial)
GC	*Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa)
FID	*Flame Ionization Detector* (Detector de Ionização em Chama)
1D-GC	*One Dimensional Gas Chromatography* (Cromatografia Gasosa em Uma Dimensão)
CFT	*Capillary Flow Technology* (Tecnologia de fluxo capilar)
FAME	*Fatty Acid Methyl Esters* (Ésteres metílicos de ácidos graxos)
VOCs	*Volatile organic compounds* (Compostos orgânicos voláteis)
TF-SPME	*Thin Film Solid Phase Microextraction* (Microextração em fase sólida com filme fino)
SBSE	*Stir Bar Sorptive Extraction* (Extração Sortiva em Barra Magnética)
PDMS	Polidimetilsiloxano
DVE	*Direct Vial Extraction* (Extração Direta por Vial)
C5	Pentano
C6	Hexano
C7	Heptano
C8	Octano
C9	Nonano
C10	Decano
C11	Undecano
C12	Dodecano
C14	Tetradecano
C15	Pentadecano
C16	Hexadecano

C17	Heptadecano
C18	Octadecano
THF	Tetrahidrofurano
ppm	Partes por milhão
DPR	Desvio Padrão Relativo
µSPE	*Micro-Solid Phase Extraction* (Extração em micro-fase sólida)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 13
2 OBJETIVO 15
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 16
3.1 Análises cromatográficas 16
3.2 Cromatografia multidimensional 18
3.3 Preparo de amostras 24
3.3.1 Micro extração em fase sólida (SPME) 26
3.3.2 Extração sortiva em parede de vial 28
3.4 Automação em química 31
3.5 Validação analítica 32
4 METODOLOGIA 34
4.1 Preparo do dispositivo de VWSE 34
4.1.1 Extração do PDMS 34
4.1.2 Caracterização por análise termogravimétrica 35
4.1.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho 35
4.1.4 Revestimento do vial 35
4.2 Preparo de solução estoque de alcanos 37
4.3 Análise cromatográfica GCxGC-FID 37
4.3.1 Desenvolvimento de metodologia de preparo de amostra automático utilizando o VWSE 38
4.4 Avaliação do melhor método de confecção dos vials 38
4.5 Avaliação da equivalência dos vials produzidos 38
4.6 Otimização de parâmetros do método de extração e pré-concentração VWSE 40
4.7 Parâmetros de validação analítica do VWSE 40
4.7.1 Linearidade 40
4.7.2 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária 41
4.7.3 Tendência de recuperação 41
4.7.4 Limites de detecção e quantificação 41
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES 42
5.1 Caracterização do PDMS utilizado no revestimento 42

5.2 Desenvolvimento de metodologia de preparo de amostra automático utilizando o VWSE 44
5.3 Avaliação dos diferentes métodos de revestimento do vial 49
5.4 Otimização de parâmetros do método de extração e pré-concentração VWSE 54
5.5 Validação analítica 58
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 66
7 REFERÊNCIAS 67

1 INTRODUÇÃO

Grande parte das amostras que são analisadas em laboratórios de química atualmente, são compostas de diferentes substâncias. Essas misturas complexas demandam por métodos poderosos de preparo e análise para obtenção de um resultado confiável. Como destaque entre as técnicas de análise, há a cromatografia, a qual realiza a separação dos compostos da amostra a partir da diferença da interação destes com uma coluna de separação e então são detectados por um detector acoplado ao final da coluna cromatográfica.

Conforme os detectores utilizados foram sendo aprimorados, foi descoberto que algumas amostras apresentam uma complexidade superior à capacidade de separação da cromatografia convencional. Para aumentar a capacidade de separação foi então desenvolvida a cromatografia multidimensional, que adiciona novos critérios de separação, ou também chamados de dimensões, para obter mais informações da amostra aumentando a capacidade de resolução.

A cromatografia gasosa multidimensional abrangente (GCxGC) é composta por duas colunas cromatográficas em sequência com um modulador na interface entre elas. Este modulador é um dispositivo de extrema importância que permite a injeção do eluente de uma coluna na outra em forma de pulsos, o que evita a perda da separação que já foi obtida na primeira coluna.

Mesmo com todo o potencial obtido com a cromatografia multidimensional, ainda há a desvantagem de algumas amostras necessitarem serem tratadas antes de analisadas, pois sua injeção direta poderia apresentar muitos interferentes ou até mesmo danificar o equipamento. Portanto, em grande parte das análises, se faz necessário a adição de uma etapa analítica de extração dos analitos de suas matrizes e ainda realizar a pré-concentração. Há muitas estratégias utilizadas para o preparo de amostra, destacando-se o uso de dispositivos de extração sortiva, fundamentadas na microextração em fase sólida (SPME, do inglês solid phase micro extraction).

Apesar do preparo de amostras ser muito eficiente, aumentando a detectabilidade e minimizando os efeitos de matriz, em um processo analítico o SPME se torna um dos processos mais lentos e a adição de uma nova etapa pode tornar o processo mais suscetível a erros. Para contornar essas desvantagens, há a possibilidade de aplicação de novas tecnologias para automatização desse processo que permite a execução padronizada com mais rapidez e por longos períodos.

Com esse intuito de aumentar o número de processos automatizados na química, há um grande interesse em desenvolvimento de novos equipamentos que possam modernizar o processo analítico de métodos já consolidados e até mesmo de recém desenvolvidos, aprimorando os resultados gerados e a sua confiabilidade.

Para poder determinar o potencial dos novos métodos que surgem nesses desenvolvimentos é necessário a sua avaliação sistemática por meio de ensaios experimentais de modo a confirmar e fornecer evidências das características e do comportamento desse método, atestando seu uso para os fins supostos. A essa avaliação sistemática é dada o nome de validação analítica.

2 OBJETIVO

Esse trabalho teve como objetivo geral desenvolver, otimizar e validar uma metodologia de preparo de amostras automático utilizando um dispositivo de extração sortiva denominado extração sortiva em parede de vial (VWSE, do inglês *vial wall sorptive extraction*). Com o intuito de desenvolver futuras pesquisas no tema, o trabalho tem como objetivos específicos:

- Avaliar a melhor forma de confecção dos dispositivos de VWSE.
- Avaliar o revestimento do dispositivo VWSE.
- Determinar as melhores condições de uso da análise automática.
- Determinar figuras de mérito referentes a metodologia para a sua validação e avaliação de desempenho.

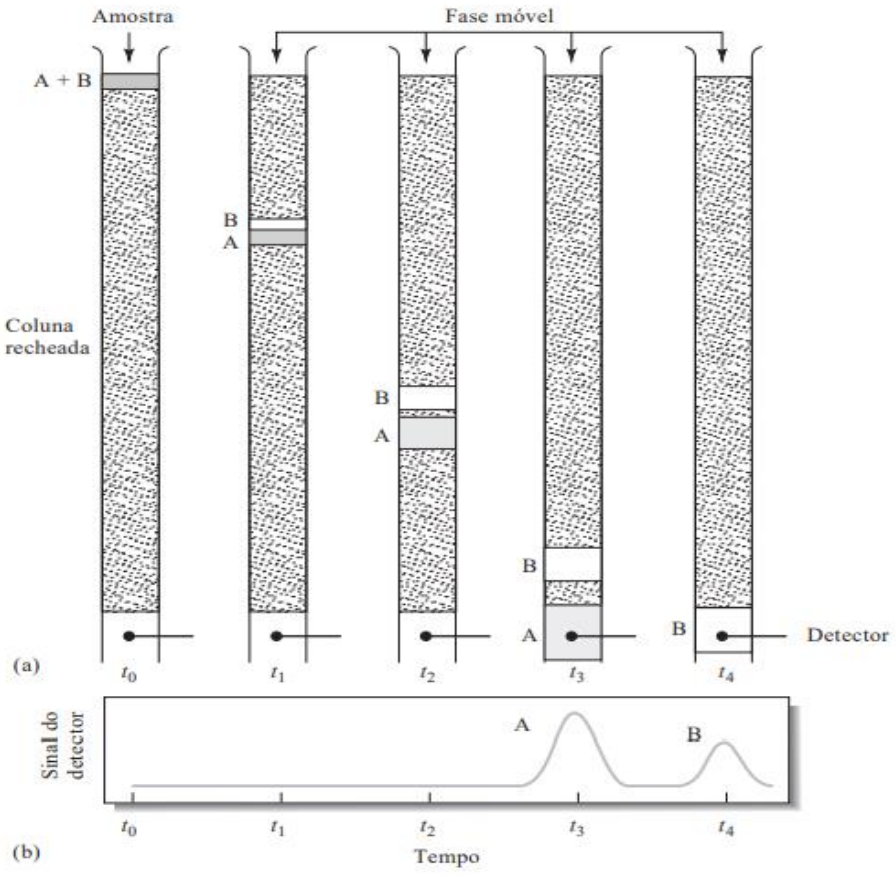
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Análises cromatográficas

A maior parte das misturas existentes são compostas de dezenas, centenas e até milhares de compostos. Na analítica, é de extrema importância a existência de técnicas capazes de analisar essas misturas de substâncias. Dentre as técnicas mais comuns para tal análise, pode-se destacar a cromatografia como uma das mais eficientes.

A cromatografia é uma técnica que efetua a separação dos compostos da mistura a partir da diferença da interação de cada analito com o meio em que se encontra. A partir desse princípio, foi desenvolvida uma metodologia na qual a mistura é transportada por um líquido ou gás, chamado de fase móvel, através de uma coluna revestida com um filme polimérico ou recheada com partículas porosas, a esse interior da coluna e dado o nome de fase estacionária. Os analitos interagem de forma diferente com a fase estacionária e até mesmo com a fase móvel e assim são separados e podem ser detectados ao eluirem da coluna dada a diferença do tempo que cada composto passa na coluna, como pode ser observado na Figura 1. [1]

Figura 1 – Ilustração de uma separação cromatográfica. [1]



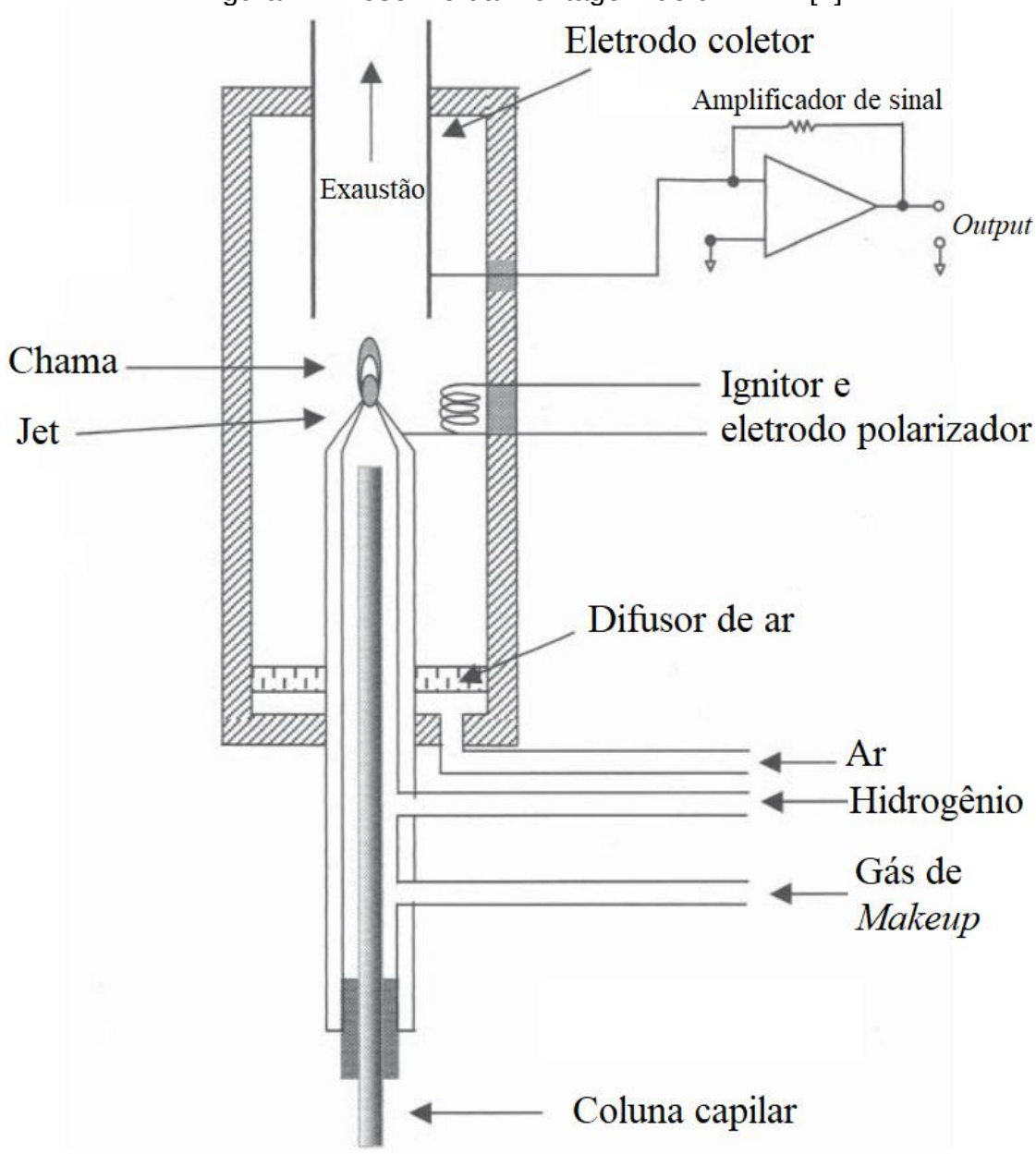
Na cromatografia gasosa (GC, do inglês gas chromatography), a substância utilizada como fase móvel é um gás inerte, também chamado de gás de arraste, com a função de apenas transportar os compostos pela coluna, através da fase estacionária. A separação dos compostos está atrelada a diferença do comportamento de partição dos compostos.

Conforme mais fase móvel é adicionada à coluna, as moléculas do soluto passam por uma série de transferências entre as fases móvel e estacionária, particionando entre elas. Essas transferências entre fases acontecem, pois, as moléculas sofrem um equilíbrio de partição, se distribuindo entre as fases segundo as suas interações. Como os analitos só se movimentam quando se encontram na fase móvel, a sua velocidade média durante a corrida cromatográfica depende da fração de tempo em que passa nessa fase. Moléculas que interagem mais fortemente com a fase estacionária sofrerão difusão e ficarão mais tempo retidas nessa fase em relação a moléculas que interagem de maneira mais fraca. Essa diferença no tempo que ficam retidas leva a um distanciamento dos analitos ao longo da coluna, o que leva a sua separação. [2]

A fim de identificar as substâncias que são separadas na técnica, é anexado ao final da coluna um detector que seja adequado para os analitos em questão. Existem diferentes detectores que podem ser aplicados conforme as características e propriedades das amostras analisadas. Dentre os detectores mais comuns, é importante destacar o detector de ionização em chama (FID, do inglês flame ionization detector), detector amplamente utilizado desde o desenvolvimento da cromatografia gasosa. O seu uso é justificado pelo baixo custo, manutenção mínima e facilitada, ótima resposta a compostos orgânicos, alta sensibilidade, linearidade e por ser uma técnica não seletiva, podendo ser utilizada para diversos compostos. [3]

No FID, os componentes que eluem da coluna cromatográfica são introduzidos em uma chama de hidrogênio e ar gerada no detector. Conforme os compostos da amostra queimam, são gerados íons que são detectados por placas coletoras, o sinal gerado pela detecção é então aumentado e traduzido em informação na forma de cromatogramas. O desenho da montagem do FID pode ser observado na Figura 2. [4]

Figura 2 – Desenho da montagem de um FID. [2]



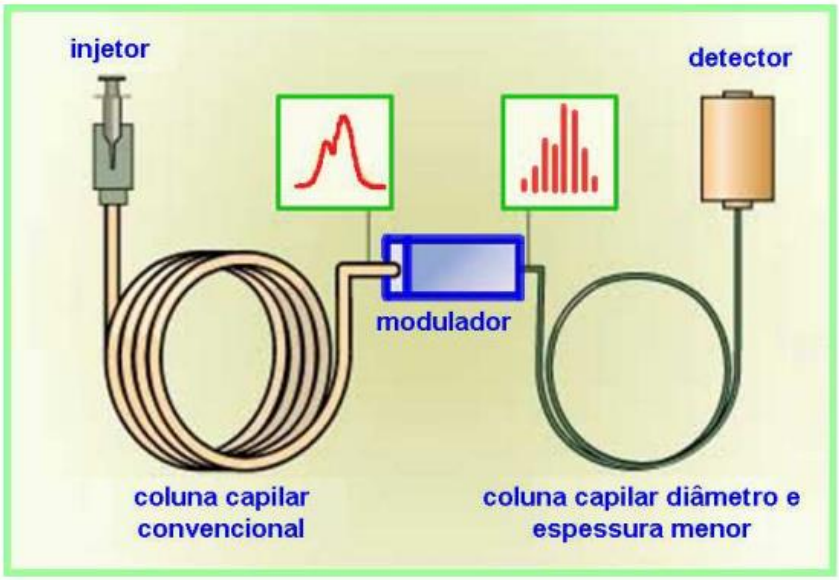
3.2 Cromatografia multidimensional

Com o avanço dos detectores e a sua melhora na capacidade de detecção, percebeu-se que muitas amostras já estudadas antes, na verdade, são muito mais complexas do que o havia sido presumido. Essa complexidade acaba por demandar uma resolução aprimorada além da já obtida com a cromatografia gasosa comum, pois os analitos apresentam propriedades muito semelhantes, o que causa uma coeluição deles, ou seja, a falta de resolução entre os picos cromatográficos. Desta forma, faz-se necessário a adição de um novo critério de separação. Chamamos

esses critérios de separação utilizados de dimensões e a partir da adição de novas dimensões, temos as técnicas multidimensionais. [5]

A cromatografia multidimensional abrangente é uma técnica que se utiliza de duas colunas cromatográficas acopladas em sequência com um modulador na interface entre as elas. O desenho esquemático do equipamento de cromatografia multidimensional pode ser observado na Figura 3. Na primeira coluna a amostra passa por uma separação cromatográfica convencional e o eluente dessa primeira separação é direcionada ao modulador onde tem sua banda cromatográfica modulada e comprimida e então injetada na segunda coluna, na qual é realizada uma separação mais rápida dado um comprimento menor desta segunda coluna. Desta forma, a sensibilidade e resolução são melhoradas significativamente em relação à técnica monodimensional. A ortogonalidade entre os mecanismos de separação de cada coluna, ou seja, a diferença no critério de separação nas colunas, é estatisticamente independente e fornece um resultado mais seletivo, capaz de separar amostras complexas que eram limitadas na cromatografia gasosa de uma dimensão (1D-GC, do inglês one dimensional gas chromatography). [6]

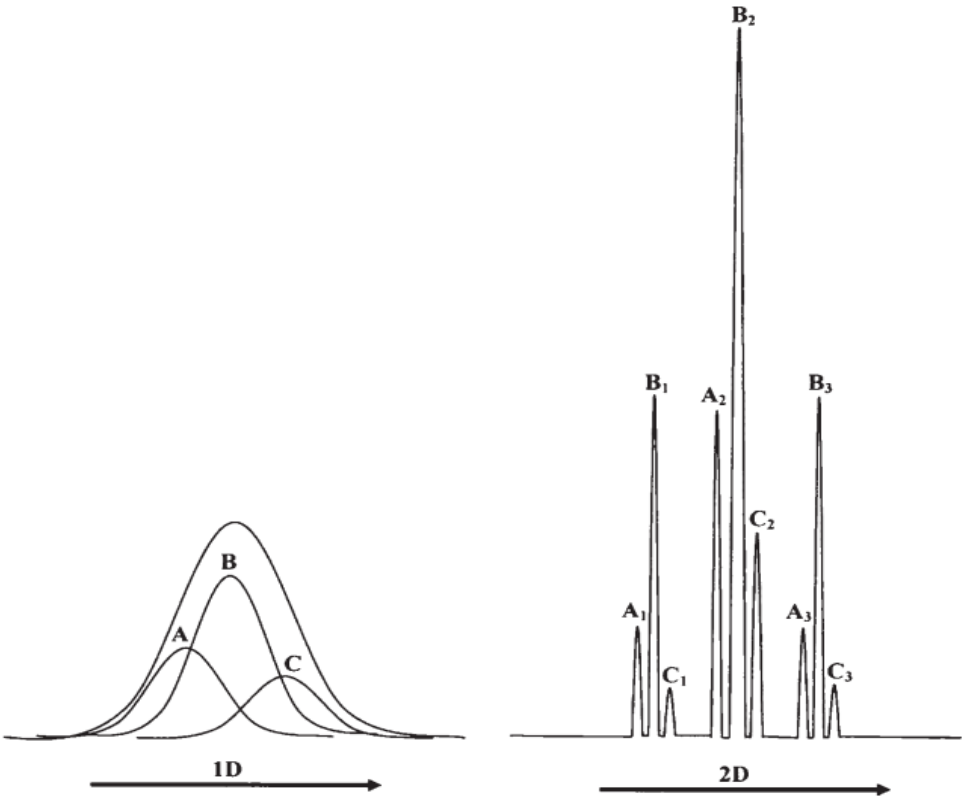
Figura 3 – Desenho esquemático de um cromatógrafo multidimensional. [7]



Os moduladores constituem a principal parte do equipamento de cromatografia multidimensional, servindo de interface entre as duas colunas, o que possibilita que o eluente da primeira seja injetado em formas de pulsos de bandas estreitas na segunda, evitando assim, a perda da separação já obtida na primeira coluna. Esse processo de modulação pode ser observado na Figura 4. Os

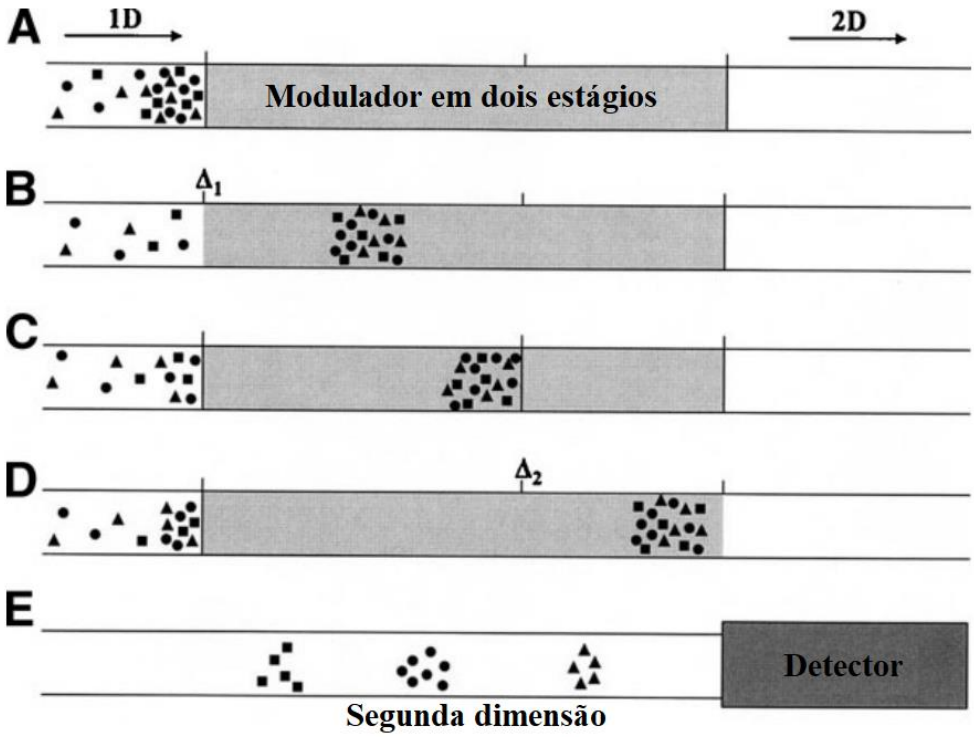
moduladores podem ser classificados em duas categorias, termais e os de controle de válvulas. [8]

Figura 4 – Processo de modulação de um pico cromatográfico com três componentes. [9]



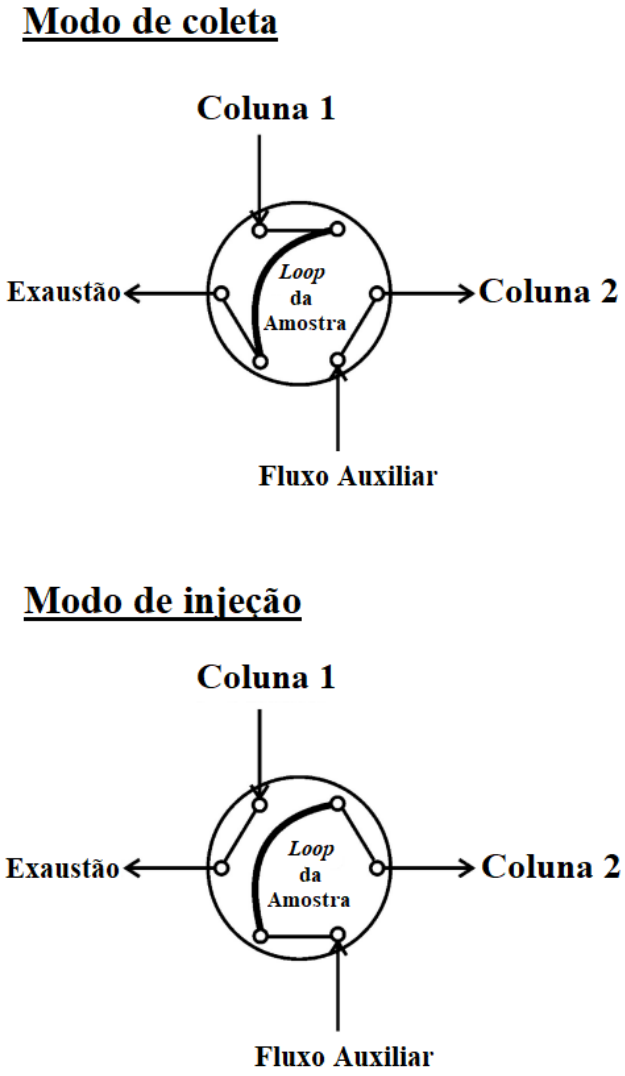
Para moduladores termais, o processo de isolamento, concentração e injeção do eluente da primeira coluna ocorre por meio do controle da temperatura do modulador. O eluente da primeira coluna é concentrado em uma banda estreita no modulador devido à uma baixa temperatura que retira energia cinética dos analitos. Com um rápido pulso de calor, essa banda é remobilizada e segue adiante no modulador. Para o caso de moduladores termais em dois estágios, a banda que foi remobilizada encontra outra barreira de “ponto frio” enquanto mais eluente é concentrado no início do modulador. Um segundo jato de calor injeta a banda dentro do modulador enquanto o processo se repete. O desenho esquemático do funcionamento de um modulador térmico em dois estágios pode ser observado na Figura 5. Moduladores de estágio único se diferem dos de dois estágios pela presença de apenas uma área de controle de temperatura, o que pode permitir a transferência de analitos não focados em uma banda estreita durante a reinjeção, fenômeno denominado “breakthrough”. [9]

Figura 5 – Desenho esquemático de um modulador térmico em dois estágios. [9]



Os moduladores de controle de válvulas podem funcionar em dois modos, a modulação de fluxo diferencial e a modulação de desvio de fluxo. A modulação de fluxo diferencial é baseada no redirecionamento do fluxo de gás utilizado, fazendo com que uma porção do eluente da primeira coluna seja coletada em pequenos ciclos das válvulas dentro do modulador e então seja reinjetada rapidamente com um gás de arraste independente a partir da mudança do fluxo do ciclo, processo exemplificado na Figura 6. Esse método apresenta certa limitação na fração de analitos que é transferida de uma coluna para a outra, não transferindo todo o eluente da primeira coluna. [10]

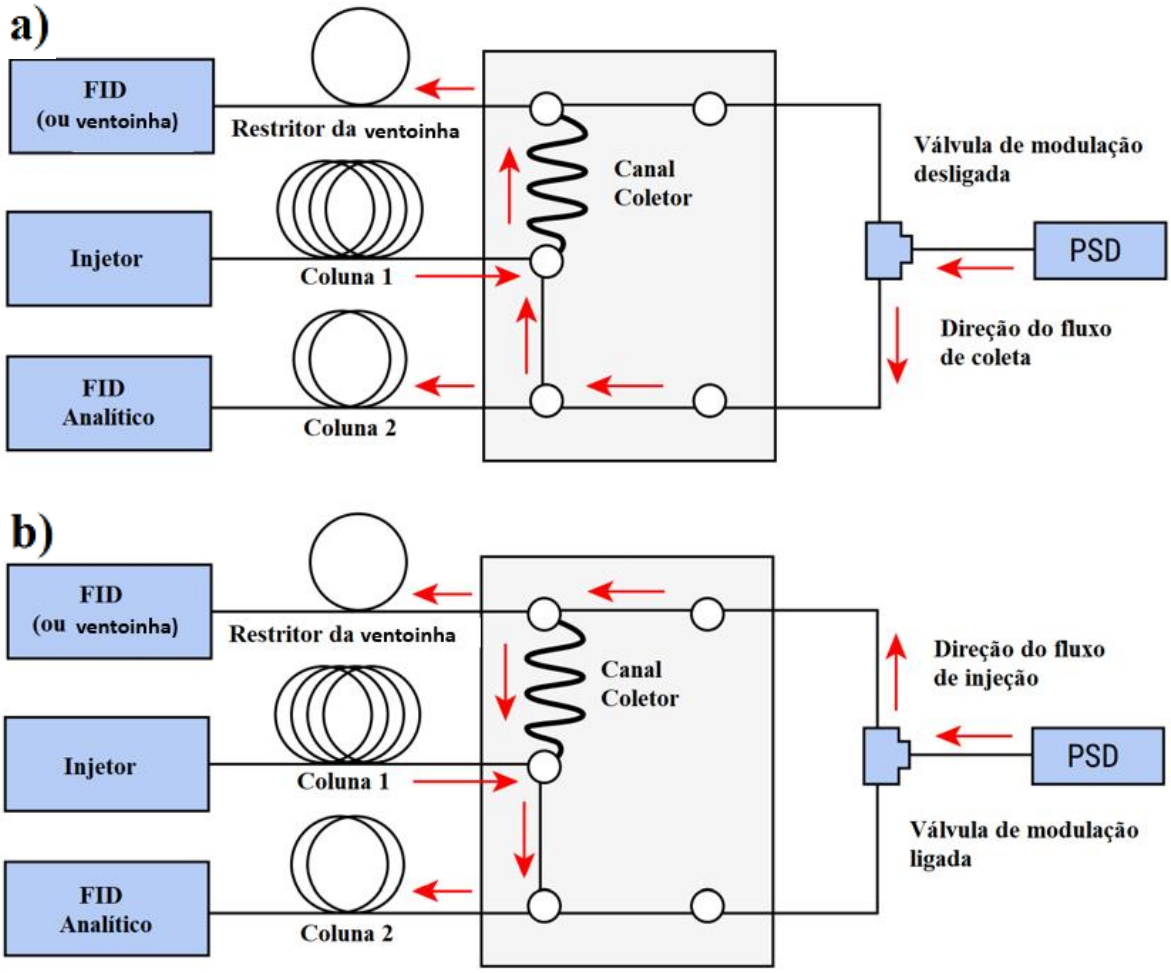
Figura 6 – Funcionamento de um modulador de fluxo diferencial. [10]



A modulação de desvio de fluxo, emprega o uso de válvulas solenoides que controlam a pressão de gás e assim alteram a transferência do eluente entre colunas. Quando o modulador está no modo de coleta, o fluxo auxiliar se divide em preencher a segunda coluna ao mesmo tempo que tem a função de carrear o eluente da primeira coluna para preencher um canal coletor, impedindo a sua entrada na segunda coluna no tempo incorreto. No modo de injeção, o sentido do fluxo auxiliar é alterado e agora expulsa rapidamente o que estava armazenado no canal coletor para dentro da segunda coluna. Diferentemente da modulação de fluxo diferencial, os fluxos das duas colunas cromatográficas estão conectados e comunicam um com o outro, possibilitando a transferência de 100% do eluente da primeira coluna para a segunda. Como exemplo de modulador de desvio de fluxo temos o modulador de tecnologia de fluxo capilar (CFT, em inglês *Capillary Flow Technology*) da *Agilent Technologies* que

resultou no aumento da utilização deste tipo de moduladores. O desenho esquemático do modulador CFT é apresentado na Figura 7. [11][12]

Figura 7 – Desenho esquemático do funcionamento do CFT em (a) modo de coleta e (b) modo de injeção. [12]



Pelo processo de modulação, obtém-se um grande aumento na sensibilidade devido à compressão de picos que é realizada, permitindo a melhor visualização dos analitos e identificação de substâncias coeluídas mantendo a separação realizada na primeira coluna. Para a modulação por válvulas o processo é simplificado sem utilizar de aditivos para resfriamento, o que torna a técnica mais barata e recomendada para compostos menos termolábeis. [13]

Apesar de ser uma técnica relativamente nova, o desenvolvimento de trabalhos utilizando GCxGC vem aumentando consideravelmente nos últimos anos. É possível destacar a adaptação de metodologias para utilização do GCxGC em diferentes ramos cujo amostras são demasiadamente complexas, como petroquímica, forense e ambiental. [14]

Em 2017, Kamatou e Viljoen realizaram um estudo comparativo para avaliar a diferença obtida para o uso da GCxGC e da 1D-GC para determinação de ésteres metílicos de ácidos graxos (FAME, do inglês Fatty Acid Methyl Esters) e óleos de palmeiras. Os pesquisadores constataram o aumento do poder de resolução da técnica multidimensional e consequentemente da detectabilidade, pois o número de FAMEs identificados na 1D-GC das amostras flutua em torno de 10 compostos enquanto para o GCxGC, esse número dobrou pela capacidade da técnica de separar substâncias que coeluiam no 1D-GC, além de apresentar uma melhor sensibilidade. [15]

Para avaliar a utilização do GCxGC com as técnicas mais utilizadas de preparo de amostras, em 2020, Zhang e seus colaboradores realizaram um estudo comparativo do perfilamento de compostos orgânicos voláteis (VOCS, do inglês volatile organic compounds) de bebidas fermentadas por GCxGC com os seguintes métodos de preparo de amostra: Headspace dinâmico, microextração líquido-líquido assistida por vórtex, extração sortiva em barra magnética, extração em fase sólida e microextração em fase sólida. Zhang evidencia também que o GCxGC é uma excelente técnica para perfilamento de amostras dado a sua excelente capacidade de separação. Quando utilizado as técnicas de preparo de amostra, os resultados obtidos são aprimorados, aumentando ainda mais o número de compostos identificados, chegando a centenas de analitos em uma única amostra. [16]

3.3 Preparo de amostras

O desenvolvimento de novos métodos de análise tem se tornado cada vez mais desafiador nos últimos anos devido à necessidade de se obter métodos que apresentem alta confiabilidade, sensibilidade, robustez, tempo e transferência de massa do analito. [17]

Com a crescente atenção dada à separação analítica e a detecção nos últimos tempos, os sistemas analíticos tiveram um grande desenvolvimento, o que fez os analistas perceberem que o preparo de amostra é essencial para os métodos analíticos modernos. Mesmo quando uma ótima técnica analítica é aplicada, qualquer erro no processamento da amostra leva a um erro substancial no resultado da análise. Com os avanços tecnológicos dos equipamentos de análise, os instrumentos passaram a ser muito sensíveis e por isso passaram a ter dificuldade de analisar amostras complexas. Em grande parte das análises químicas, a amostra que é

coletada não é adequada para uma determinação direta, precisando ser tratada primeiro para uma nova forma que permita sua análise. Os principais problemas encontrados em uma amostra bruta são a presença de uma mistura complexa de analitos que não permite uma análise seletiva e precisa, presença de interferentes ou efeitos da matriz.[18]

Um outro fator que levou ao desenvolvimento acelerado de novos métodos de preparo de amostra foi a preocupação crescente da população com aspectos ambientais e da indústria alimentícia para elevar a qualidade de vida, o que gerou uma demanda maior por esse tipo de amostras com alta complexidade e uma pressão por novas tecnologias para sua análise.[19]

O processo do método analítico pode ser simplificado em algumas poucas etapas, sendo elas, a amostragem, preparação da amostra e medição. Dentre elas é possível destacar a preparação da amostra como a mais dispendiosa e demorada da análise, e por isso, são dedicadas muitas pesquisas para o desenvolvimento de novos métodos que possam auxiliar nessa etapa e seguir os princípios da química verde, buscando simplicidade, celeridade e utilização de métodos e reagentes menos agressivos ao meio ambiente e aos analistas.[20]

O preparo de amostra é de suma importância para a obtenção de bons resultados e tem como objetivos:

- Reduzir ou eliminar efeitos de matriz ou compostos não desejados
- Melhorar a seletividade do analito alvo
- Pré-concentrar a amostra para aumentar a sensibilidade
- Estabilizar a amostra, alterando-a para um solvente inerte [17]

Nos últimos anos houve um rápido desenvolvimento das técnicas cromatográficas, tornando-as muito eficientes e com alto poder de detecção e separação e por isso tem sido cada vez mais utilizadas para análises rotineiras e por isso grande parte dos novos métodos de preparo de amostras desenvolvidos são voltados para a cromatografia.[21]

O preparo de amostras se faz necessário na cromatografia por diversos fatores, sendo eles: o aperfeiçoamento da detectabilidade de analitos, a melhora do perfil cromatográfico e o isolamento de analitos de suas matrizes. [22]

Para a GC, o principal fator que acaba por demandar um preparo de amostras, é a necessidade de isolar os analitos de matrizes aquosas, pois estas acarretam

danos ao equipamento como: sangramento da coluna, perda da capacidade de separação, aumento do ruído, perda da reprodutividade e repetitividade, além de poder contaminar o detector. [23]

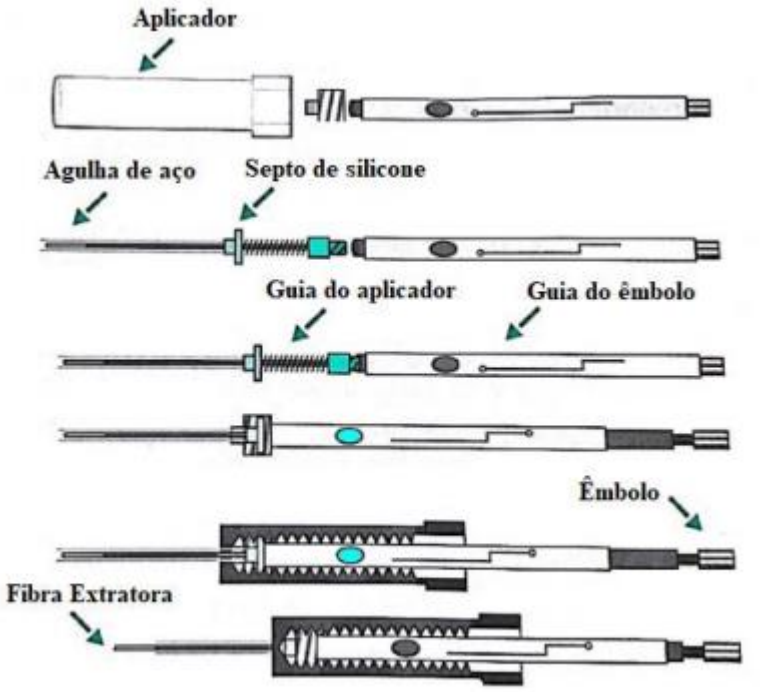
O preparo de amostras cromatográficas tem se tornado cada vez mais necessário em diversas áreas, principalmente no controle de qualidade da área alimentícia, no controle antidoping e análises ambientais. A razão dessa necessidade surge a partir do elevado número de compostos que precisam ser determinados ou então separados em uma única corrida cromatográfica, o baixo limite aceitável de algumas substâncias controladas e evitar resultados incorretos e não confiáveis e a análise de muitas amostras em um curto período. As características desejáveis para um preparo de amostras cromatográfico incluem uma extração eficiente e simultânea de diferentes compostos e obtenção de um extrato limpo com alta transferência de massas. [21]

3.3.1 Micro extração em fase sólida (SPME)

O método de SPME, foi introduzida na década de 90 como uma nova metodologia de amostragem e preparo de amostra. O SPME é considerado um dos métodos mais populares e bem estabelecidas para o pré-tratamento e enriquecimento de um amplo grupo de analitos de amostras complexas. O SPME foi desenvolvido para atender a demanda de um método de preparo de amostra rápida. [24] [25] [26]

O dispositivo do SPME é semelhante a uma seringa modificada no qual a fibra de sílica, num formato cilíndrico é conectada a um pequeno tubo de aço inoxidável para prover força mecânica adicional ao dispositivo e poder realizar o movimento de exposição e retenção da fibra, como observado na Figura 8. Durante o uso do SPME, ao abaixar o embolo, a fibra é exposta como uma agulha de seringa à amostra em um vial, onde irá ocorrer o equilíbrio dos analitos com a fase estacionária aderida a fibra. A fibra então é recolhida e novamente exposta no injetor do cromatógrafo para realizar a dessorção dos compostos por temperatura. [27]

Figura 8 – Desenho esquemático de um dispositivo de SPME. [23]



O SPME pode ser utilizado de duas diferentes formas. Pela imersão direta na amostra, na qual os analitos são extraídos por contato direto da amostra com a fibra, e pelo headspace, no qual a fibra é exposta na fase de vapor da amostra, para extração dos voláteis. [25]

Durante a exposição, se o tempo for suficiente, um equilíbrio de partição ocorre entre a matriz da amostra e a fase extratora, sendo a quantidade extraída proporcional à quantidade de fase extratora e ao equilíbrio atingido. Caso o SPME seja realizado em um curto período, a cinética observada das condições de convecção também deve ser considerada, e por isso se usado agitação durante a exposição, a quantidade de analito também é proporcional ao tempo de amostragem. [26]

Uma microextração é definida pela pequena quantidade de fase extratora em relação ao volume de amostra a ser utilizado. Isso possibilita a redução significativa da quantidade de solventes utilizados enquanto obtém-se um bom resultado comparado aos métodos convencionais. [28]

O método de SPME permite a combinação de amostragem e pré-concentração em uma única etapa analítica, o que gera uma economia de tempo total de análise, tornando-a mais simplificada e eliminando a necessidade do uso de solventes. O SPME é um dos métodos mais eficientes para extração devido ao seu elevado transporte de massa da amostra e baixo uso de solventes. [28]

Apesar de ser um método já consolidada, o SPME continua sendo de grande interesse por parte dos pesquisadores, seja para o seu aprimoramento ou para desenvolvimento e validação de novas metodologias analíticas. Em 2019, Douny e seus colaboradores propuseram um novo método para detecção de ácidos graxos de cadeia curta de amostras de um modelo gastrointestinal in vitro em GC utilizando SPME automático. O uso do SPME foi essencial para isolar os analitos e obter uma boa resposta de detecção, determinando sete compostos com boa seletividade e linearidade em uma única corrida de maneira rápida para diferentes tipos de amostras obtidas, encontrando valores de limite de detecção para os sete compostos na faixa de 8 a 72 mg L^{-1}, limites de quantificação de 16 a 144 mg L^{-1} e valores de recuperação na faixa de 97,7 a 122,4%. [29]

Também em 2019 Emmons e seus colaboradores fizeram um estudo sobre o desenvolvimento e otimização de um diferente dispositivo de SPME, nomeada microextração em fase sólida com filme fino (TF-SPME, do inglês Thin Film Solid Phase Microextraction), baseado no princípio de reduzir a espessura do filme da fibra do SPME e aumentar a sua área superficial, melhorando a capacidade e velocidade de extração, obtendo melhores valores de transferência de massa. [28]

3.3.2 Extração sortiva em parede de vial (VWSE)

Como observado, o método de SPME é uma opção muito atrativa para amostragem principalmente pelo seu baixo volume de fase extratora e área superficial relativamente alta. [30]

O fundamento do SPME é o equilíbrio de difusão que ocorre entre a amostra e a fase extratora. Para facilitar a difusão na fase extratora, é necessário aumentar a área superficial da extração, aumentando a sensibilidade, e diminuir o diâmetro da fase para tornar o fenômeno de transporte de massa mais eficiente, levando menos tempo para adsorção e dessorção dos analitos. [28]

A partir dessa ideia de otimização dos fenômenos de transferência de massa, são pensados novos dispositivos de amostragem por equilíbrio, também chamados de dispositivos de extração sortiva, nos quais o revestimento com a fase extratora seja diferente e apresente uma cinética de extração melhorada. Estudos teóricos sugerem que a amostragem com baixas espessuras de filme integradas a diferentes

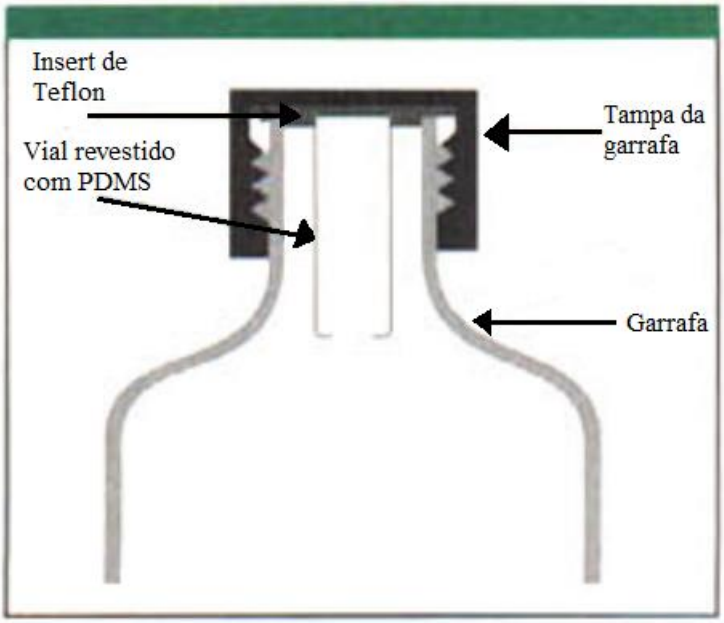
contêineres de amostra que possibilitam maior área superficial, podem levar a uma análise simplificada e validada de diferentes analitos. [30]

Outro fator que leva aos estudos desses novos dispositivos é que a sensibilidade do SPME pode ser relativamente baixa, devido ao pequeno volume de fase extratora que reveste a fibra. [31]

Dentre os dispositivos de extração sortiva mais utilizados podemos citar a extração sortiva em barra magnética (SBSE, do inglês Stirr Bar Sorptive Extraction), dispositivo feito a partir do revestimento de uma barra de agitação magnética com polidimetilsiloxano (PDMS). Apesar do aumento da quantidade de fase extratora e assim o aumento também da sensibilidade, por conta da espessura da fase, o SBSE apresenta tempos de adsorção e dessorção maiores que o de SPME comum, além de ser necessário uma grande quantidade de amostra para realização do experimento e uma quantidade considerável de solvente para fazer a dessorção líquida. [28]

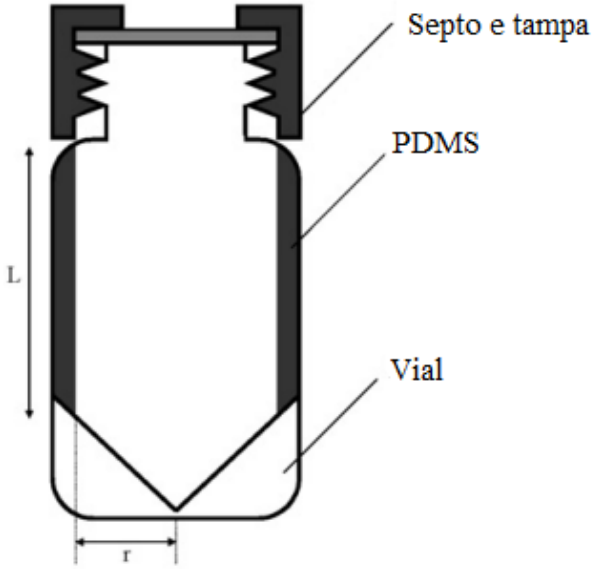
Seguindo esta linha de desenvolvimento, Wohleb e colaboradores (2003) desenvolveram em um vial revestido com PDMS para ser utilizado em injeção direta no cromatógrafo após o preparo da amostra. A este dispositivo, foi dado o nome de extração direta por vial (DVE, do inglês Direct Vial Extraction). O vial revestido era colocado anexado a uma tampa de teflon que era utilizada para fechar uma garrafa, como mostrado na Figura 9. A amostra era colocada na garrafa que ficava variando na posição 0 e 45° para que o vial pudesse ser preenchido diversas vezes. O método se mostrou viável, apresentando recuperação de 90% dos analitos após 8 horas, porém ainda demandando uma grande quantidade de amostra, assim como o SBSE. [32]

Figura 9 – Desenho esquemático do dispositivo de DVE. [32]



Para contornar os problemas do DVE e do SBSE, Kawaguchi e seus colaboradores (2009) desenvolveram um novo método de preparo de amostras denominado extração sortiva em parede de vial (VWSE). No dispositivo de VWSE, um vial de tamanho convencional tem sua parede interna revestida com PDMS, como mostrado na Figura 10. Por se tratar de um vial convencional, o uso da metodologia é facilitado, permitindo a miniaturização do método, utilizando pequenas quantidades de amostra e solvente e possibilitando o uso do amostrador automático para injeção direta no equipamento de cromatografia. O método de VWSE apresentou um limite de detecção de 0,1 ng mL^{-1} e limite de quantificação de 0,5 ng mL^{-1} de progesterona em soro humano após 30 minutos de equilíbrio e 10 minutos de dessorção líquida do dispositivo. A recuperação observada foi de 97,9%. Em relação ao SBSE, o VWSE se mostrou mais simples, rápido e com maior sensibilidade, além da própria miniaturização. [31]

Figura 10 – Desenho esquemático do dispositivo de VWSE. [31]



3.4 Automação em química

Os métodos clássicos da química analítica vêm sendo melhorados e até mesmo substituídos por novos métodos instrumentais ao longo dos últimos anos, acompanhando o progresso nas áreas da física, eletrônica, mecânica e computação. As novas tecnologias que são desenvolvidas nessas áreas são prontamente aplicadas para gerar aprimoramentos em equipamentos que já são utilizados ou até mesmo criar instrumentos para auxiliar o processo laboratorial oferecendo soluções com maior sensibilidade, robustez e celeridade. [33]

Dentre as tecnologias desenvolvidas, observa-se uma tendência cada vez maior da aplicação de robôs e microprocessadores combinados para uma instrumentação automatizada, aplicada principalmente no preparo de amostras e reagentes e na aquisição de dados. [33]

A automação é definida como a integração de diferentes conhecimentos para realizar afazeres rotineiros autonomamente a fim de facilitar a sua execução. Para a química, isso é aplicado na rotina laboratorial ou em grandes indústrias, garantindo um processo rápido e eficaz. Por ser realizado de forma padronizada por máquinas, o processo tende a não ocorrência de erros operacionais, um dos principais problemas de um processo manual, assegurando assim maior precisão. [34]

As vantagens da automação relacionadas à substituição da mão de obra humana pelos novos métodos automáticos se estendem também à segurança, pois permite a execução de tarefas mais perigosas e extenuantes, sem a ação direta do analista, poupando-o. Há também a vantagem de otimização das metodologias de

análise, obtendo maior rendimento, qualidade, robustez de processos, consistência da produção, redução de custos e despesas. Apesar dos inúmeros pontos positivos da automação química, há uma grande desvantagem atribuída ao seu elevado custo de implantação e desenvolvimento. [35]

Os estudos de automação têm se tornado cada vez mais importantes pelo desenvolvimento de métodos que podem ser aplicadas diretamente na indústria, tanto no processo industrial quanto nos métodos de análise do controle de qualidade. Uma tecnologia desenvolvida recentemente de grande uso para química foi o desenvolvimento do SPME automático que tornou os resultados ainda mais confiáveis, reprodutivos e reduziu quantidade de fibras danificadas ao longo dos processos. Em 2012, Barros e seus colaboradores realizaram um estudo de desenvolvimento e validação de uma metodologia de análise de voláteis em vinho a partir do uso de SPME headspace automático. A partir da otimização do método, os resultados obtidos foram muito bons, apresentando ótima resposta de linearidade para grandes faixas de concentração, limites de detecção e quantificação na faixa de $\mu g\ L^{-1}$. Os valores obtidos para precisão e exatidão não excederam um erro de 15%, considerando a baixa concentração utilizada nos experimentos, um resultado que evidencia a vantagem do uso de métodos automatizadas. [36]

Em 2020, Figueiredo e seus colaboradores desenvolveram um estudo para utilização do Arduíno para automatização da medição em análises físico-químicas, obtendo sucesso na prototipagem de um modelo para injeção e pré-concentração da amostra de maneira automática para análises fotométricas, eletroanalíticas e medição de umidade atingindo forte correlação linear entre o volume injetado e a massa acumulada no sistema. O sistema foi capaz ainda de fornecer gráficos satisfatórios que permitem a determinação de concentrações e propriedades de amostras desconhecidas. [37]

3.5 Validação analítica

Com o desenvolvimento de novos métodos analíticos, surgiu a necessidade de avaliar a credibilidade destes métodos, garantindo que o método servirá a função proposta ou seguirá alguma legislação vigente. A esse processo de demonstrar e confirmar as características da performance de um método, se dá o nome de validação. [38]

O processo de garantia de qualidade de laboratórios utiliza então dos métodos de validação estipulados por grandes órgãos de acreditação, como Anvisa e INMETRO aqui no Brasil, para investigar se os resultados obtidos durante a utilização de um método são aceitáveis e confiáveis, sempre gerando dados de alta qualidade. [39]

Para realizar então a validação de um novo método, são avaliados vários parâmetros a depender do tipo de técnica empregada e dos fins para quais o método for utilizado. Dentre os parâmetros validados pode-se citar a linearidade, a precisão, a exatidão e os limites de detecção e quantificação. Segundo a RDC n° 166 de 2017 da Anvisa, que estabelece critérios para a validação de métodos analíticos, esses parâmetros podem ser definidos por: [40]

- A linearidade de um método deve ser demonstrada por meio da sua capacidade de obter respostas analíticas diretamente proporcionais à concentração de um analito em uma amostra. [40]
- A precisão deve avaliar a proximidade entre os resultados obtidos por meio de ensaios com amostras preparadas conforme descrito no método analítico a ser validado e deve ser expressão por meio da repetibilidade e da precisão intermediária. [40]
- A exatidão de um método analítico deve ser obtida por meio do grau de concordância entre os resultados individuais do método em estudo em relação a um valor aceito como verdadeiro e deve ser expressa pela relação percentual de recuperação do analito de concentração conhecida adicionado à amostra ou pela relação entre concentração média experimental e a concentração teórica. [40]
- O limite de detecção deve ser demonstrado pela obtenção da menor quantidade do analito presente em uma amostra que pode ser detectado, porém, não necessariamente quantificado, sob as condições experimentais estabelecidas. [40]
- O limite de quantificação é a menor quantidade do analito em uma amostra que pode ser determinada com precisão e exatidão aceitáveis sob as condições experimentais estabelecidas. [40]

4 METODOLOGIA

Todos os equipamentos e vidrarias utilizadas para o desenvolvimento desse trabalho foram disponibilizados pelo laboratório IntechLab do CEFET-MG, e se encontram no prédio escolar do Campus Nova Gameleira do CEFET-MG em Belo Horizonte.

4.1 Preparo do dispositivo de VWSE

Os vials revestidos foram preparados com base na metodologia de Kawaguchi [31] e Oliveira [23], utilizando vials convencionais de cromatografia de 2,0 mL (tamanho) da marca Agilent e realizando uma extração de PDMS, que será utilizado no revestimento do dispositivo. Os vials foram previamente lavados com água Mili-Q® em ultrassonificação (lavadora ultrassônica L-220 da Schuster, com capacidade de 1,0 L e frequência de 20 kHz) por dois ciclos de 30 minutos a 50 °C. Após a lavagem, houve a secagem em estufa de secagem e esterilização (marca Solab SL-100) por 30 minutos a 100 °C, a massa dos vials foram medidas e anotadas. Após a limpeza completa, foram realizadas as etapas de extração do PDMS, revestimento dos vials por *spin coating* e secagem do tolueno residual.

4.1.1 Extração do PDMS

A extração do PDMS ocorreu a partir do preparo de uma solução adicionando cerca de 5,0 g de um adesivo comercial de silicone (Silicone Acético Branco – Tekbond. Composição: Polidimetilsiloxano; Metiltriacetóxisilano; ácido acético; sílica; dimetilsiloxilano hidroxiterminado) em 25,0 mL de Tolueno P.A. (marca: Neon e lote: 49784). A mistura foi homogeneizada em agitador magnético durante três horas a 300 rpm e temperatura ambiente e foi posteriormente centrifugada a 14000 rpm por 2 minutos em uma centrífuga Eppendorf modelo 5410. Após a decantação, o sobrenadante foi separado e reservado por 72 horas à temperatura ambiente. Após o tempo de espera, uma fração da solução foi transferida em uma placa de Petri, para obtenção de um filme, a placa de Petri sofreu tratamento térmico a 150 °C em estufa por 48 horas e então levada para caracterização. O restante da solução foi levado para a etapa de revestimento dos vials.

4.1.2 Caracterização por análise termogravimétrica

A análise termogravimétrica foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais no Campus Nova Gameleira do CEFET-MG, no equipamento Shimadzu DTG-60H nas seguintes condições, massa: 10 mg; gás: nitrogênio; vazão: 50 mL min^{-1}; taxa de aquecimento: 10 °C min^{-1}; temperatura inicial: 25 °C; temperatura final: 900 °C.

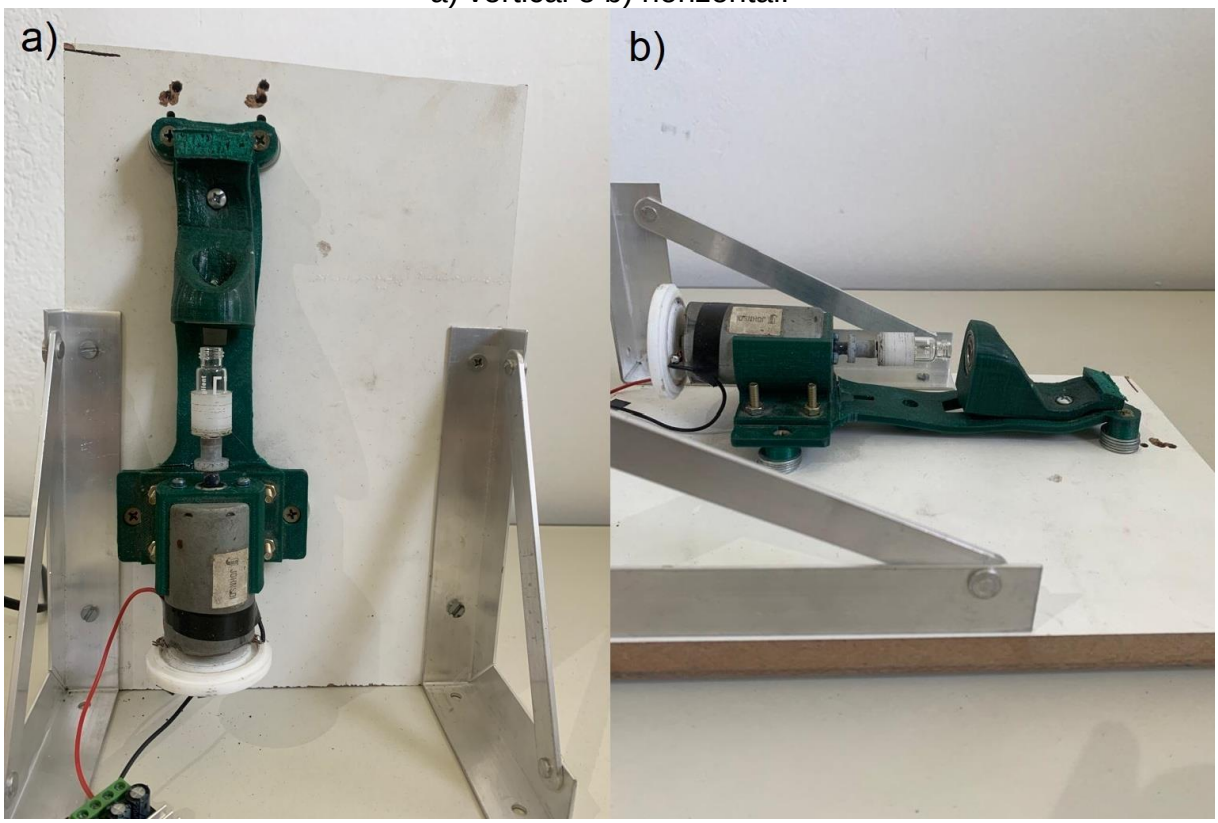
4.1.3 Caracterização por espectroscopia na região do infravermelho

A análise espectroscópica na região do infravermelho foi realizada no Laboratório de Caracterização de Materiais no Campus Nova Gameleira do CEFET-MG, no equipamento da Shimadzu Corporation, modelo IRPrestige-21, com transformada de Fourier FTIR-8400S e acessório ATR, nas seguintes condições, preparo de amostra: reflectância total atenuada (ATR); e faixa de trabalho 4000 – 400 cm^{-1}.

4.1.4 Revestimento do vial

Para o revestimento do vial, foram usados 200 µL da solução de PDMS extraído e os seguintes equipamentos: um torno mecânico da FortG, modelo FG004-BV20L, um soprador de calor para aquecimento externo da Worker, modelo STW1500-460060, e um protótipo desenvolvido pelos pesquisadores do IntechLab e adaptado para a rotação do vial na posição vertical e horizontal (Figura 11), utilizado para realizar a evaporação do solvente à temperatura ambiente.

Figura 11 – Fotografia do protótipo de *spin coating*, adaptado para vials em posição a) vertical e b) horizontal.



Os experimentos de confecção dos vials revestidos foram realizados em cinco condições de operação diferentes, destacados no Quadro 1.

Quadro 1 – Diferentes condições de experimento de revestimento.

Método	Equipamento utilizado	Rotação	Tempo da operação
1	Torno mecânico com auxílio de soprador de calor externo	250 rpm	5 minutos
2	Torno mecânico com auxílio de soprador de calor externo	390 rpm	5 minutos
3	Torno mecânico com auxílio de soprador de calor externo	1080 rpm	5 minutos
4	Protótipo IntechLab na posição vertical	3600 rpm	24 horas
5	Protótipo IntechLab na posição horizontal	600 rpm	24 horas

Após a secagem do filme depositado, os vials confeccionados foram levados para tratamento térmico em estufa a 150 °C por 48 horas para vaporização total do tolueno e cura do polímero.

Foram medidas as massas dos vials posteriormente ao processo de revestimento, e ao final do tratamento na estufa para comparação das massas depositadas em relação à massa inicial.

4.2 Preparo de solução estoque de alcanos

A solução foi preparada a partir de um padrão líquido da Agilent Technologies, de mistura de alcanos em diferentes concentrações, sendo eles: pentano 8,800% (C5), hexano 4,700% (C6), heptano 4,800% (C7), octano 4,900% (C8), nonano 5,100% (C9), decano 10,325% (C10), undecano 5,200% (C11), dodecano 21,125% (C12), tetradecano 10,825% (C14), pentadecano 5,400% (C15), hexadecano 10,925% (C16), heptadecano 5,500% (C17) e octadecano 2,400% (C18). A solução estoque foi preparada a partir da transferência de 304 µL da solução padrão para um balão volumétrico de 100 mL em tetraidrofurano HPLC (THF), a fim de garantir a solubilização do padrão de alcanos e facilitar sua homogeneização com água. A solução foi transferida em um frasco de vidro âmbar, hermeticamente fechada e devidamente identificado. As demais soluções foram preparadas a partir dessa solução, porém, em matriz aquosa (mistura 50% THF e água Mili-Q®).

4.3 Análise cromatográfica GCxGC-FID

Para realização da análise das amostras de alcanos, foi utilizado um cromatógrafo gasoso Agilent Technologies 8890 configurado para utilização em cromatografia multidimensional, dispondo de uma coluna capilar DB-5MS de 20,0 m de comprimento, 0,180 mm de diâmetro interno e 0,18 µm de espessura de filme como primeira coluna, uma coluna capilar HP-INNOWAX de 5,0 m de comprimento, 0,250 mm de diâmetro interno e 0,15 µm de espessura de filme e um detector FID. As condições definidas para a realização das análises cromatográficas foram as seguintes: hidrogênio como gás de arraste, com fluxo de 0,5 mL min^{-1} na primeira coluna e 22 mL min^{-1} na segunda coluna; temperatura do injetor de 250 °C, modo de injeção splitless; aquecimento com temperatura programada inicial de 50 °C por 1 min, aumento de 8 °C min^{-1} até 226 °C; detector FID ajustado com fluxo de hidrogênio 40

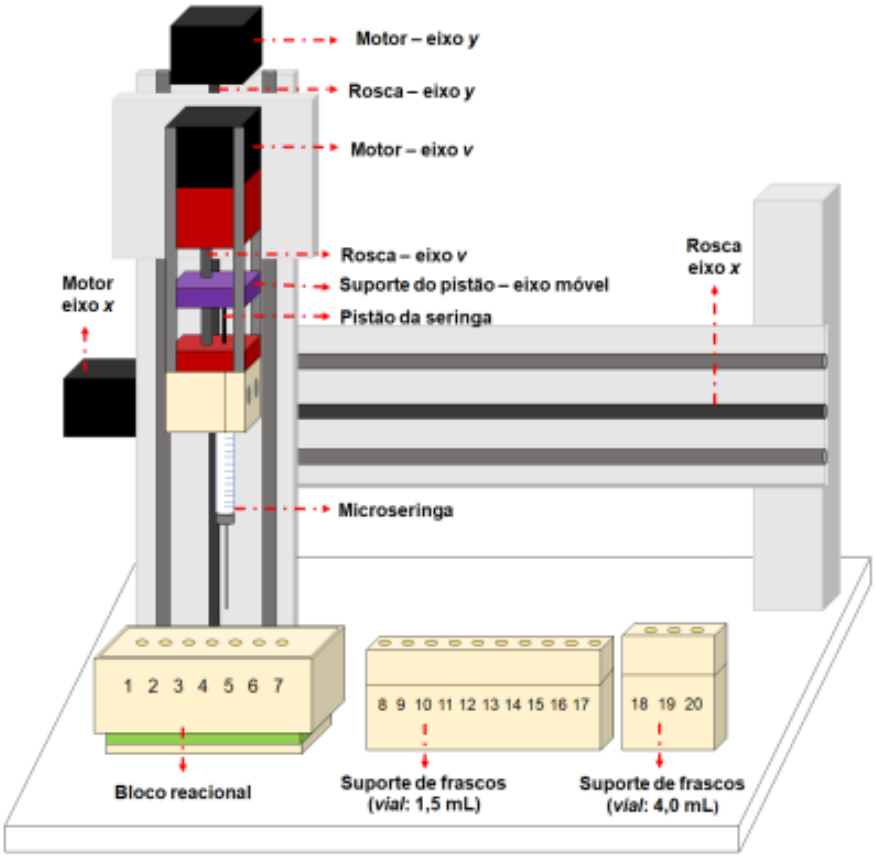
mL min^{-1} e fluxo de ar sintético 450 mL min^{-1} , com nitrogênio como gás de make-up com fluxo 30 mL min^{-1} , e temperatura da chama de 300 °C

4.3.1 Desenvolvimento de metodologia de preparo de amostra automático utilizando o VWSE

Para avaliar a amostra sem realização do seu preparo pelo VWSE, foi realizada a análise direta em GCxGC de uma solução dos alcanos 1 parte por milhão (ppm, mg L^{-1}) do alcano menos concentrado (C18) em THF.

O preparo da amostra foi realizado empregando um protótipo de preparador amostral automático para análise cromatográfica, desenvolvido por Lopes em 2022 [35] (Figura 12). O dispositivo VWSE é posicionado no bloco reacional e a amostra no suporte de frascos, onde também estão dispostos um vial com solvente a ser utilizado e um vial com insert de 300 µL para a coleta da amostra para injeção no cromatógrafo.

Figura 12 - Desenho do protótipo do preparador amostral automático. [35]



O processo de preparo de amostra utilizando o preparador automático ocorre em três etapas, a extração dos analitos, dessorção líquida e limpeza do VWSE.

A extração dos analitos é realizada a partir da transferência de 1,0 mL da amostra para o VWSE que sofre agitação por 30 minutos. Após o tempo de extração, a amostra no VWSE é descartada e então 500 µL de solvente são despejados no VWSE para realizar a dessorção líquida sob 10 minutos de agitação.

Ao fim da dessorção líquida, são realizadas duas limpezas em sequência com água Mili-Q® e ciclohexano, cada uma por 10 minutos sob agitação. Todas essas etapas ocorrem sob aquecimento de 50 °C. Ao final do processo, o vial do VWSE é levado para tratamento térmico em estufa a 150 °C por 10 minutos. O extrato obtido na dessorção líquida é levado para análise cromatográfica.

Foram realizados então os seguintes testes, dispostos no Quadro 2:

Quadro 2 – Diferentes condições de experimento com VWSE automático.

Teste	Amostra	Solvente usado na dessorção	Extração dos analitos
A	1 ppm em THF/água 50%	Ciclohexano	30 minutos, 1 extração
B	1 ppm em THF/água 50%	Metanol	30 minutos, 1 extração
C	1 ppm em THF/água 50%	Acetonitrila	30 minutos, 1 extração
D	1 ppm em THF/água 50%	Ciclohexano	2 extrações de 15 minutos, total 30 minutos

4.4 Avaliação da melhor condição de confecção dos vials

Para realizar a avaliação de qual o melhor método de confecção, utilizou-se uma solução de 1 ppm do alcano menos concentrado (C18) em 50% de água e THF, a ser preparada e analisada em triplicata em cada vial. Foram avaliadas as médias e variâncias obtidas para cada substância da amostra para dedução do resultado com maiores valores de média e menores variâncias.

4.5 Avaliação da equivalência dos vials produzidos

O vial produzido a partir do método de confecção que apresentou os melhores resultados foi então confeccionado novamente para obtenção de três vials

semelhantes. Para avaliar a equivalência entre os vials produzidos por uma mesma metodologia, utilizou-se uma solução de 1 ppm do alcano menos concentrado (C18) em 50% de água e THF, foram realizadas triplicatas para cada vial. Com os resultados obtidos, foram realizados teste T, para medir a equivalência das médias, e teste F para as variâncias.

4.6 Otimização de parâmetros do método de extração e pré-concentração VWSE

O VWSE foi aplicado empregando a metodologia desenvolvida para o preparo de amostra automático, tendo o volume de amostra utilizado sendo fixado em 1,0 mL. O método foi aplicado diretamente a amostra, portanto, o primeiro parâmetro a ser otimizado é o tempo de contato da matriz aquosa com a fase extratora. Foram testados os tempos de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos.

Para a dessorção líquida, foi realizada a otimização dos parâmetros de volume de solvente utilizado e tempo de contato do solvente extrator com a fase extratora saturada. Foram testados os volumes de 100; 150; 300 e 500 µL e os tempos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 minutos.

Por fim foram testadas diferentes temperaturas a qual o processo foi submetido, sendo testado à 25; 37,5 e 50 °C.

4.7 Parâmetros de validação analítica do VWSE

A validação do método seguiu os critérios definidos no “Formulário Padrão: Planilha para verificação e validação de métodos” do INMETRO. Os parâmetros avaliados foram: Linearidade, repetibilidade, tendência de recuperação, precisão intermediária, limite de detecção e limite de quantificação.

4.7.1 Linearidade

Para avaliar a linearidade do método, foram analisados padrões de alcanos em diferentes concentrações, tomando a concentração do menos concentrado (C18) como referencial. Foi realizada uma triplicata das soluções nas concentrações de C18 de 0,200; 0,400; 0,600; 0,800; 1,000 e 1,300 mg L^{-1}, obtendo uma regressão linear. Também foram realizados testes estatísticos de resíduos e o teste de Cochran para avaliar a homoscedasticidade.

4.7.2 Precisão (repetibilidade) e precisão intermediária

Para avaliar a repetibilidade, foram analisadas seis réplicas em um mesmo dia das soluções nas concentrações de C18 de 0,400 (nível baixo); 0,600 (nível médio) e 0,800 mg L^{-1} (nível alto). Os ensaios foram repetidos quatro dias depois para avaliar a precisão intermediária ao comparar os resultados obtidos em diferentes condições.

4.7.3 Tendência de recuperação

Para avaliar a tendência de recuperação, os valores de concentração obtidos nos testes de repetibilidade para o nível baixo, médio e alto, foram comparados ao valor referencial da concentração teórica de cada solução, obtendo a recuperação a partir da razão entre concentração calculada e concentração teórica.

$$Recuperação\ (\%) = \frac{conc_{calculada}}{conc_{teórica}} * 100$$

4.7.4 Limites de detecção e quantificação

Para determinar os limites de detecção e quantificação, foram analisados 10 brancos de ciclohexano que foram tratadas pelo método utilizando VWSE. Através dos valores encontrados de volume ruído nos tempos de retenção nos quais seriam detectados os alcanos, foram calculados os limites de detecção e quantificação, sendo o limite de detecção calculado a partir do valor encontrado referente a concentração obtida através da regressão linear do teste de linearidade utilizando o volume ruído, acrescido do valor de t na distribuição bicaudal de t-Student para 95% de confiança e 9 graus de liberdade que multiplica o desvio padrão obtido para as concentrações dos volumes ruído.

$$LD = conc._{volume\ ruído} + t * s_{concentrações\ calculadas\ a\ partir\ dos\ volumes\ ruído}$$

O limite de quantificação foi calculado a partir do valor encontrado referente a concentração obtida através da regressão linear do teste de linearidade utilizando o volume ruído, acrescido de dez vezes o desvio padrão obtido para as concentrações dos volumes ruído.

$$LQ = conc._{volume\ ruído} + 10 * s_{concentrações\ calculadas\ a\ partir\ dos\ volumes\ ruído}$$

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

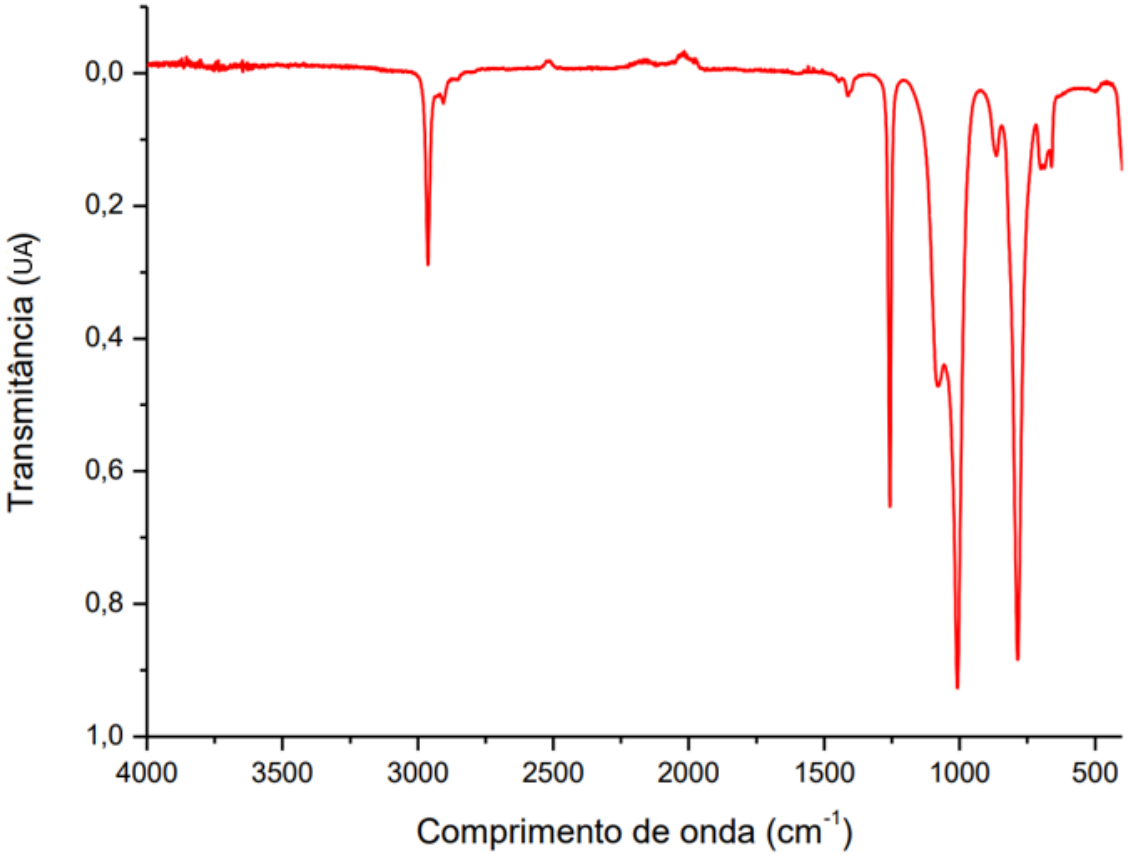
Nesse capítulo do trabalho serão apresentados todos os resultados obtidos para o projeto proposto. Nas próximas páginas estarão dispostos os dados de: caracterização do PDMS extraído para revestimento dos dispositivos de VWSE por análise termogravimétrica e espectroscopia na região do infravermelho, avaliação dos dispositivos produzidos, resultados do desenvolvimento da metodologia de preparo de amostra por VWSE automático, a avaliação do melhor método de confecção do VWSE e da equivalência dos dispositivos produzidos por uma mesma metodologia.

5.1 Caracterização do PDMS utilizado no revestimento

A fim de se certificar a presença de PDMS na cola de silicone utilizada, foi preparado um filme polimérico com o extrato obtido de tolueno a partir da cola. Esse filme polimérico foi preparado em uma placa de Petri e levado para análise espectrométrica na região do infravermelho e termogravimétrica. Na análise do infravermelho, o objetivo era verificar a presença de grupos funcionais característicos do PDMS e realizar a comparação com os espectros obtidos em trabalhos anteriores de pesquisadores do IntechLab, pois no banco de dados NIST não há padrão de referência para o PDMS. Na Figura 13 é apresentado o espectro obtido para o filme polimérico analisado.

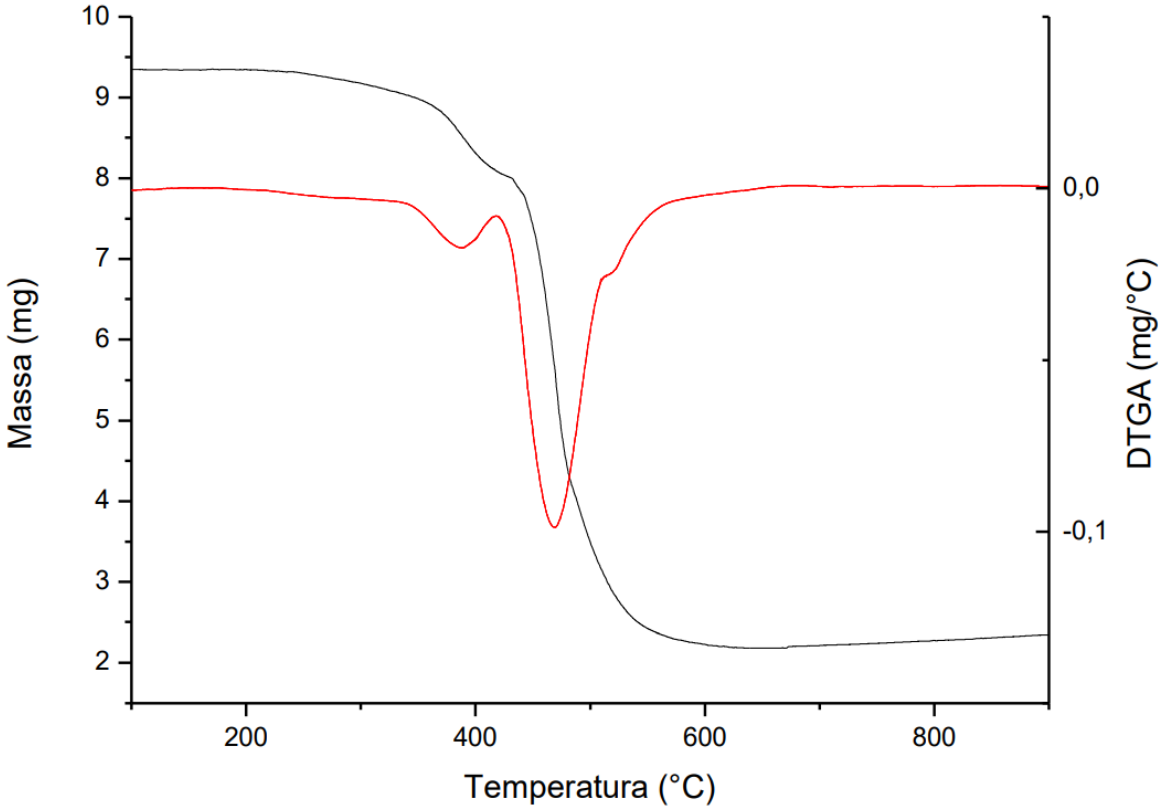
As bandas características para o PDMS são referentes às vibrações das ligações com o silício, que ocorrem em torno de 1200, 1080 e 802 cm^{-1}, sendo a banda de 1200 referente à vibração de deformação angulares simétrica C – H na ligação com Si – CH_3. A banda de 1080 cm^{-1} é associada ao estiramento assimétrico Si – O – Si. Por fim, a banda em 802 cm^{-1} indica o estiramento da ligação Si – CH. É possível observar também um conjunto de bandas em torno de 2900 cm^{-1} que são características das vibrações axiais simétricas e assimétricas de átomos de hidrogênio ligados aos carbonos sp_3. [23]

Figuras 13 – Espectro de infravermelho obtido para a amostra de PDMS.



Para a análise termogravimétrica do filme de PDMS (Figura 14) é possível observar, com a 1ª derivada (DTGA), que há duas perdas de massa, a primeira em torno de 390 °C e a segunda por volta de 460 °C. Essas perdas são referentes ao início da degradação oxidativa do PDMS e a degradação completa até o núcleo de sílica. [41]

Figura 14 – Análise termogravimétrica da amostra de PDMS.



A partir da comparação do infravermelho e da termogravimetria obtidos com os realizados por Oliveira em 2021 [23] para caracterização do PDMS, é possível confirmar que se tratar do mesmo polímero.

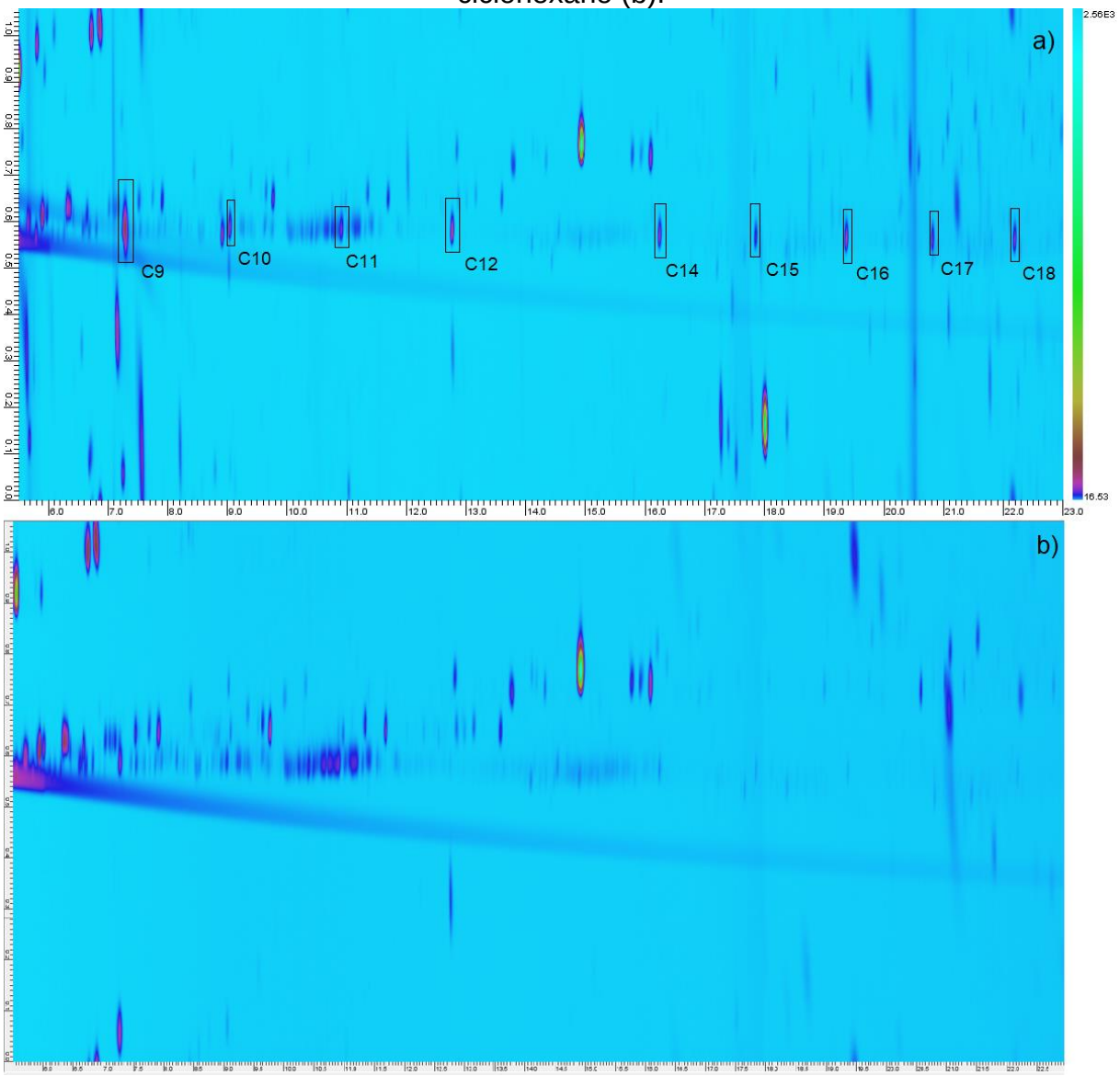
5.2 Desenvolvimento de metodologia de preparo de amostra automático utilizando o VWSE

Em relação à análise cromatográfica, buscou-se desenvolver um método em que houvesse melhor resolução entre os compostos e definição dos picos cromatográficos dos alcanos. O GCxGC foi escolhido como técnica para análise por seu alto poder de resolução e detectabilidade, pois dessa forma é possível avaliar com maior confiança quantos compostos estão sendo extraídos, se há perda da fase extratora na análise e detectar quantidades muito baixas de analitos. [6]

A partir da definição das condições de uso do preparador amostral automático, a fim de escolher o melhor solvente a ser utilizado como extrator da dessorção líquida foram realizados os testes A, B e C. Nestes testes foram analisados também o solvente puro e o branco do método, ou seja, análise do solvente a ser utilizado após passar por todo o processo analítico como controle. Os brancos do método e os cromatogramas obtidos para os solventes puros são equivalentes, apresentando os

mesmos picos com intensidade semelhante. Na Figura 15 é possível observar o cromatograma obtido no teste A, o perfil cromatográfico da amostra de alcanos e o branco do ciclohexano. O perfil obtido é satisfatório com uma boa separação dos compostos.

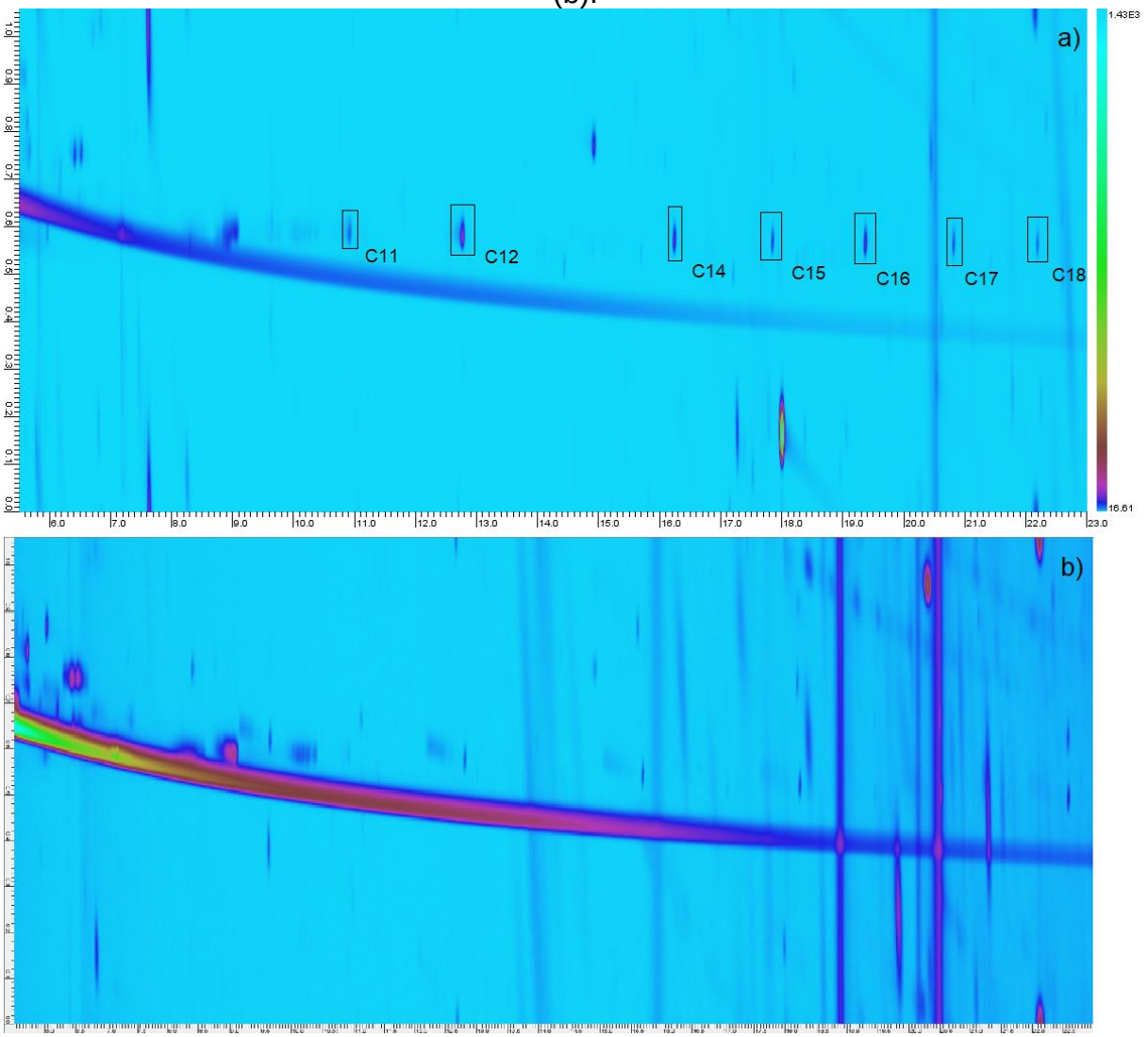
Figura 15 – Cromatograma obtido para o experimento A (a) e o branco do ciclohexano (b).



É possível observar no cromatograma do teste A vários picos espalhados pelo cromatograma que são referentes a impurezas presentes no solvente utilizado pois o cromatograma do teste B e o branco do ciclohexano são equivalentes a não ser pelos picos dos analitos do teste. Essas várias impurezas encontradas são justificadas pelo uso de solventes P.A. e não de grau analítico, porém estão em concentrações baixíssimas e só foram detectadas pela alta detectabilidade do GCxGC e sua modulação que é capaz de aumentar muito os sinais obtidos. [9]

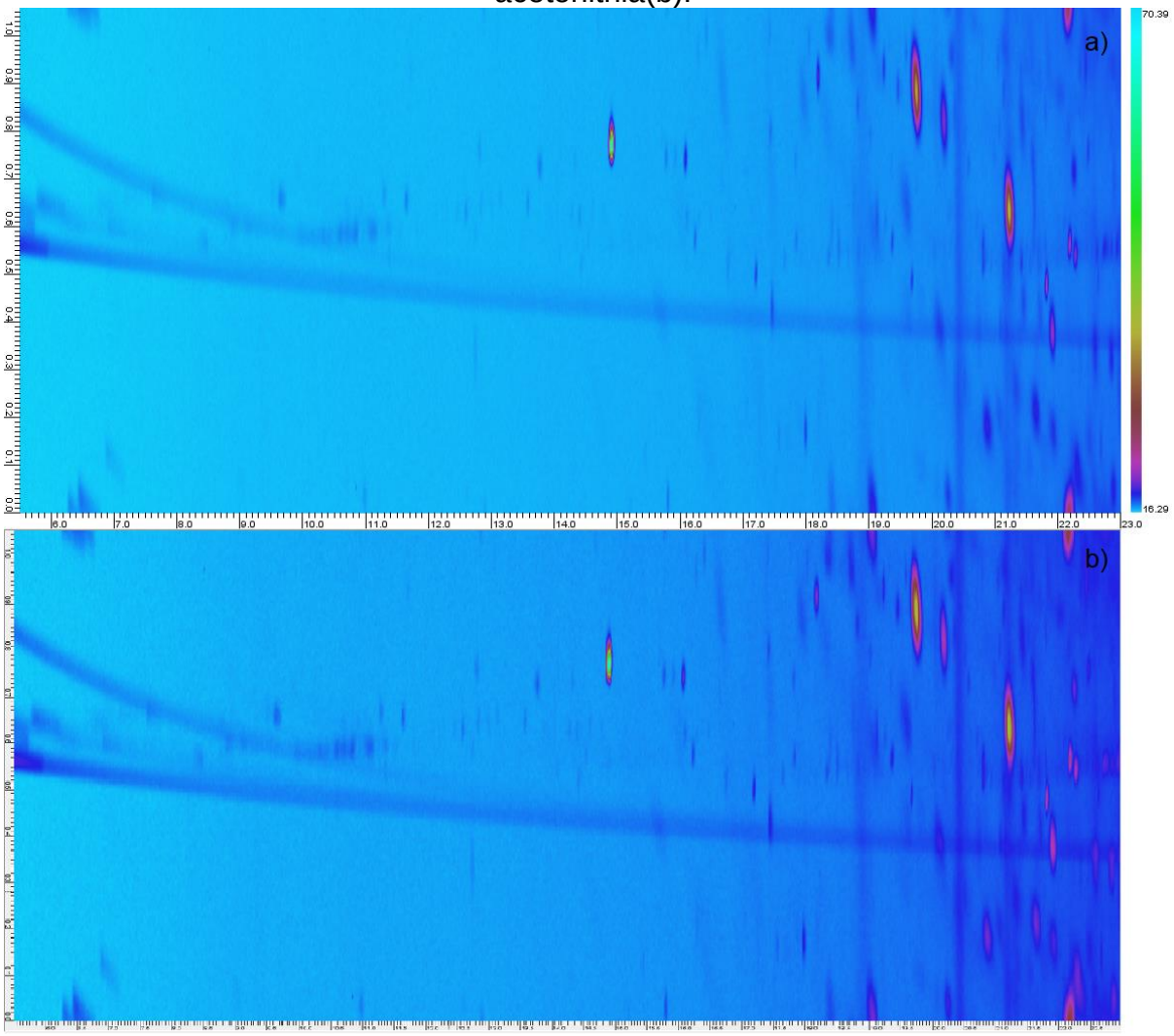
Na Figura 16 é possível observar o cromatograma obtido no teste B, o perfil cromatográfico da amostra de alcanos e o branco do metanol. O comportamento referente às impurezas do solvente também é observado. O perfil dos alcanos é mantido, porém com intensidade reduzida, demonstrando uma menor capacidade de extração dos analitos do PDMS, resultado esse esperado pelo caráter apolar dos analitos que tem uma atração maior pelo polímero do que por um solvente polar.

Figura 16 – Cromatograma obtido para o experimento B (a) e o branco do metanol (b).



Na Figura 17, é possível observar o cromatograma do teste C e o branco da acetonitrila. O comportamento referente às impurezas do solvente também é observado. Apesar da acetonitrila poder ser considerada de mesopolaridade (polaridade média) e ser esperada uma extração aprimorada dos alcanos do PDMS em relação ao metanol, isso não foi observado. Não foi possível enxergar os alcanos no extrato obtido com acetonitrila.

Figura 17 – Cromatograma obtido para o experimento C (a) e o branco da acetonitrila(b).



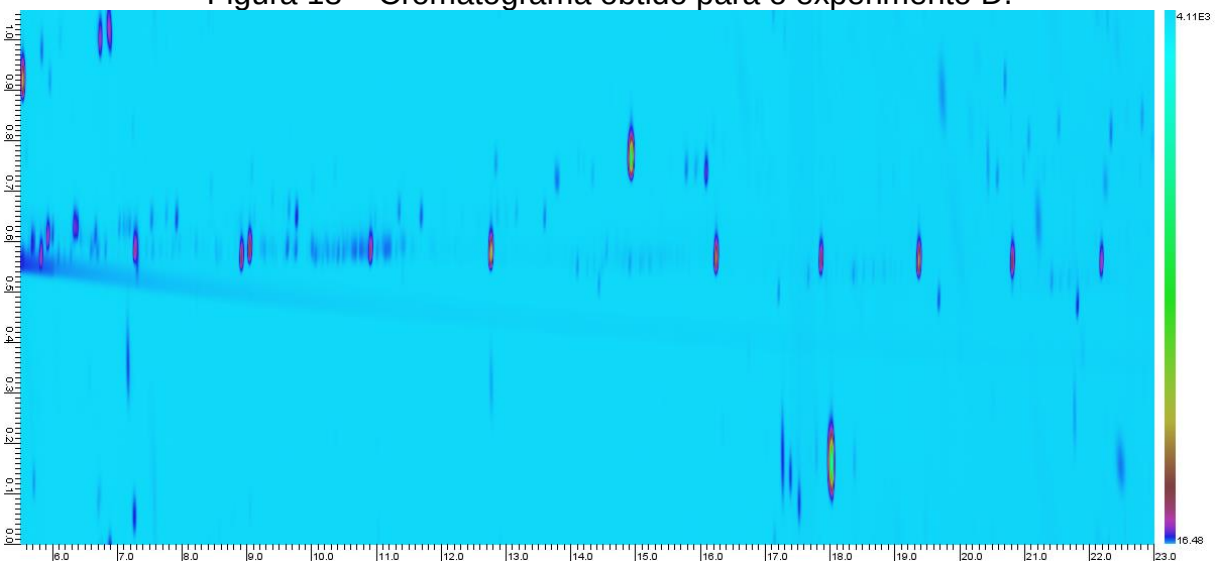
A partir desses resultados, foi possível definir que o ciclohexano devido à sua apolaridade foi o solvente que obteve a melhor resposta de extração dos alcanos adsorvidos pelo PDMS no dispositivo de VWSE. Porém os valores obtidos de volume dos picos para o experimento A em relação ao padrão analisado diretamente sem a realização do preparo de amostras foram inferiores, como pode ser visto na Tabela 1, que apresenta a comparação dos valores obtidos de volume para o pico referente ao C12, sendo esse o de maior intensidade, em todos os experimentos.

Tabela 1 – Volumes obtidos para os picos de C12 nos experimentos.

Teste	Volume do pico do C12
Amostra sem tratamento	49178,0000
A	14764,6797
B	11647,4083
C	Não há

Podemos observar que apesar da aplicação do método de preparo com o VWSE nos testes A, B e C para isolamento dos analitos de uma matriz aquosa, os valores obtidos eram bem inferiores aos obtidos para a injeção direta de uma amostra de mesma concentração em matriz 100% THF. Para contornar esse efeito observado, foi realizado um novo teste, denominado teste D, para avaliação do efeito do particionamento da extração de 30 minutos em duas extrações subsequentes de 15 minutos. O cromatograma referente a este teste pode ser observado na figura 18.

Figura 18 – Cromatograma obtido para o experimento D.



O valor de volume obtido para C12 nas condições do teste D foi de 73031,4038. Esse resultado corrobora para evidenciar a aplicabilidade do método do VWSE para preparo de amostra, unindo as etapas de amostragem, isolamento da matriz e pré-concentração. Esse efeito pode ser explicado pela difusão que ocorre na superfície dos poros do PDMS, como há a renovação da amostra a partir da segunda extração, a solução torna-se novamente mais concentrada que o ambiente do interior dos poros, aumentando a difusão dos analitos para a adsorção no polímero. [2]

5.3 Avaliação dos diferentes métodos de revestimento do vial

A fim de avaliar o processo de revestimento do VWSE, foram comparadas as massas dos dispositivos antes e depois do processo de revestimento, para definir a quantidade de PDMS depositada em cada metodologia. As massas obtidas estão organizadas na Tabela 2.

Tabela 2 – Massas obtidas para os vials durante o processo de revestimento.

Método de revestimento	Massa inicial do vial	Massa após revestimento	Massa após tratamento térmico	Massa de PDMS depositada
1	2,057 g	2,091 g	2,068 g	11 mg
2	2,026 g	2,049 g	2,036 g	10 mg
3	2,036 g	2,054 g	2,048 g	12 mg
4	2,030 g	2,051 g	2,043 g	13 mg
5	2,034 g	2,059 g	2,047 g	13 mg

A massa depositada de PDMS nos dispositivos foram muito próximas, que mostra boa reprodutibilidade em relação à quantidade de fase extratora com que o VWSE é revestido, pois a quantidade da solução de PDMS utilizada em todos os métodos de deposição foi igual.

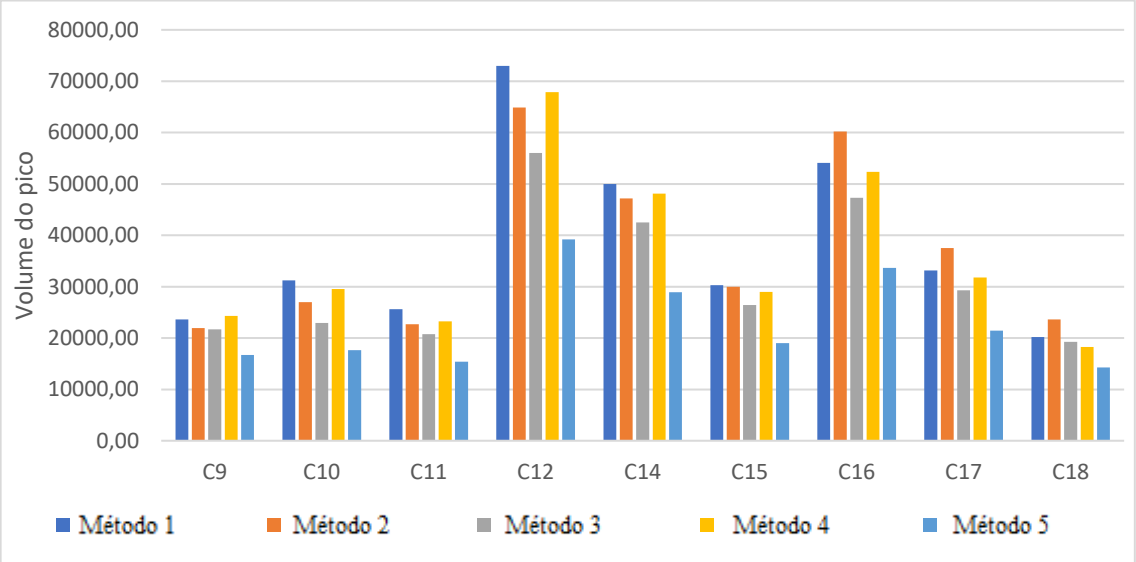
A área da superfície revestida calculada experimentalmente foi de aproximadamente 486,95 mm^2 e sendo a densidade média do PDMS aproximadamente 965 kg m^{-3}, temos que o volume aproximado do revestimento de PDMS é 13,47 mm^3 e a espessura calculada para o filme de 27,66 µm. O valor está dentro do esperado quando compara ao trabalho de Oliveira, que avaliou a espessura do filme de PDMS obtido em condições semelhantes para revestimento de um liner cromatográfico por microscopia. [23]

Para comparar a ação extratora desses dispositivos e observar a diferença que os métodos de confecção causam na forma que ocorre o revestimento, foi realizada uma avaliação da matriz de dados obtidas e comparou-se graficamente os resultados das triplicatas da amostragem com cada vial. Na Tabela 3 é apresentada a matriz de dados obtida nas triplicatas e na Figura 19 é possível observar que para as médias obtidas para os alcanos analisados, o vial 1, confeccionado no torno mecânico a 250 rpm e com soprador de calor perpendicular ao vial, apresentaram melhor resposta geral e por isso foi definido como o melhor método de confecção. Essas diferenças observadas entre os vials mesmo com um volume de fase extratora semelhante pode ser devido à forma com que ocorreu o revestimento, que altera tanto a área que é revestida pelo PDMS quanto a espessura desse filme, que impactam diretamente na mecânica de trapeamento dos analitos.

Tabela 3 – Resultados obtidos para avaliação do melhor método de confecção.

Método 1 - torno mecânico/soprador de calor 250 rpm						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	23285,938	24885,4917	22739,745	23637,0581	1115,13294	4,72%
C10	32573,94	30703,2139	30450,8271	31242,6602	1159,80749	3,71%
C11	24098,294	28071,4514	24706,9698	25625,5719	2139,94543	8,35%
C12	76379,352	68876,2727	73624,0533	72959,8926	3795,37623	5,20%
C14	49458,918	49333,2203	51164,6191	49985,5859	1023,00509	2,05%
C15	28798,938	28392,1646	33649,5403	30280,2142	2925,00166	9,66%
C16	55366,358	51584,5802	55255,9101	54068,9494	2152,23548	3,98%
C17	32632,093	32445,1429	34362,6351	33146,6236	1057,2372	3,19%
C18	18433,432	21343,5698	20748,9146	20175,3056	1537,52904	7,62%
Método 2 - torno mecânico/soprador de calor 390 rpm						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	19634,29	22891,1069	23199,2668	21908,2213	1975,3007	9,02%
C10	26051,613	28008,5042	26983,5146	27014,5441	978,814345	3,62%
C11	24008,77	21331,9295	22804,3585	22715,0193	1340,65465	5,90%
C12	64751,409	62317,9554	67480,9247	64850,0964	2582,89903	3,98%
C14	47574,603	43711,997	50160,2111	47148,9371	3245,11325	6,88%
C15	28777,571	26740,7997	34500,8059	30006,3921	4023,29783	13,41%
C16	55460,728	52397,7238	72794,3585	60217,6034	10998,9352	18,27%
C17	32899,983	35116,6595	44484,1712	37500,2711	6148,94784	16,40%
C18	20317,128	22158,6302	28389,1606	23621,6396	4230,21567	17,91%
Método 3 - torno mecânico/soprador de calor 1080 rpm						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	19457,145	21565,2273	24071,1382	21697,8367	2309,8535	10,65%
C10	18752,744	27810,3148	22269,4729	22944,1773	4566,32406	19,90%
C11	18322,735	21813,8797	22044,5646	20727,0598	2085,39842	10,06%
C12	50677,733	62043,6194	55433,2547	56051,5356	5708,11257	10,18%
C14	40924,409	45806,0497	40853,5156	42527,9913	2839,10316	6,68%
C15	25920,847	27596,5082	25672,3497	26396,5684	1046,57988	3,96%
C16	44621,383	50859,0366	46507,397	47329,2722	3199,01387	6,76%
C17	28875,705	30530,8561	28397,7997	29268,1203	1119,36349	3,82%
C18	16983,744	21829,258	19037,0332	19283,345	2432,12954	12,61%
Método 4 - protótipo na vertical 3600 rpm						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	25317,455	23280,7111	24403,8773	24334,0144	1020,16751	4,19%
C10	31821,083	26884,5837	29959,2939	29554,9867	2492,9608	8,43%
C11	24643,128	21419,2809	23621,0405	23227,8164	1647,50299	7,09%
C12	71927,981	64931,8536	66686,7589	67848,8646	3639,9612	5,36%
C14	48423,037	47755,4859	48153,7297	48110,751	335,844602	0,70%
C15	28855,538	28261,4175	29757,5389	28958,1649	753,321953	2,60%
C16	51613,066	50328,1396	55068,8059	52336,6703	2451,77124	4,68%
C17	31028,813	29905,6618	34408,6191	31781,0314	2343,82808	7,37%
C18	17417,683	17965,8082	19469,4825	18284,3246	1062,33687	5,81%
Método 5 - protótipo na horizontal 600 rpm						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	18462,447	13758,1792	17959,9021	16726,8429	2583,18816	15,44%
C10	19329,449	14306,6908	19196,8681	17611,0026	2862,38565	16,25%
C11	16154,271	13677,3406	16392,3007	15407,9706	1503,48753	9,76%
C12	43772,607	31311,722	42599,0207	39227,7831	6880,57726	17,54%
C14	30181,007	24737,5227	31884,8625	28934,464	3733,16465	12,90%
C15	19258,121	16858,242	20891,0604	19002,4743	2028,52712	10,68%
C16	34763,636	29444,4314	36680,7783	33629,6152	3749,09073	11,15%
C17	21966,507	18874,1792	23385,0229	21408,5696	2306,59882	10,77%
C18	13065,863	14302,8172	15388,0151	14252,2318	1161,90211	8,15%

Figura 19 – Histograma obtido para avaliação do melhor método de confecção dos vials.

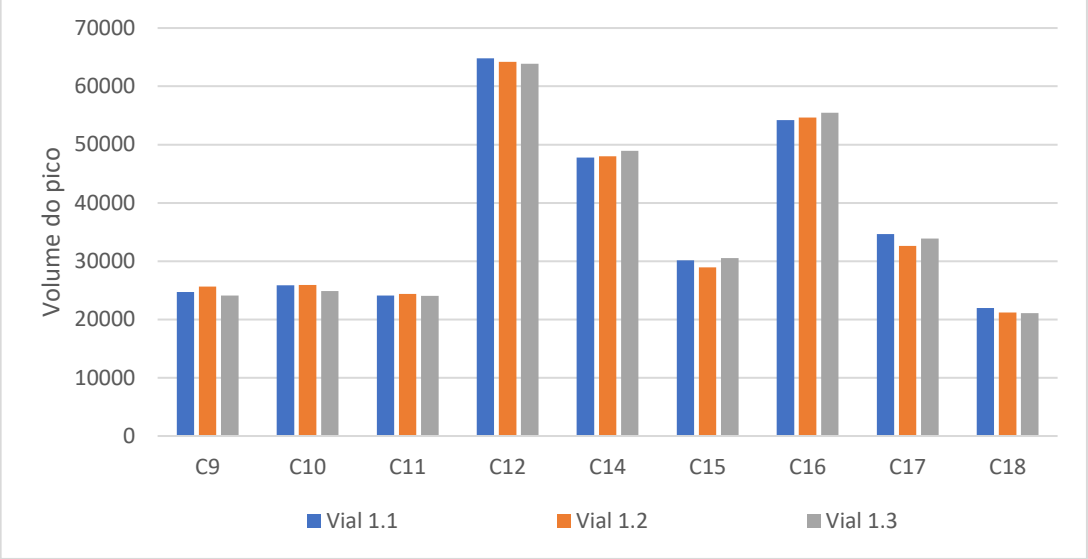


A partir da confecção de três vials utilizando o método 1, foi realizado o experimento de equivalência, no qual realizou-se novamente uma avaliação da matriz de dados obtidas e comparou-se graficamente os resultados das triplicatas da amostragem com cada vial feito a partir dessa metodologia. Na Tabela 4 é apresentada a matriz de dados obtida nas triplicatas e na Figura 20 é possível perceber que a intensidade média das triplicatas dos sinais de cada dos alcanos tem valores muito próximos.

Tabela 4 – Resultados obtidos para teste de equivalência dos vials 1.

Vial 1.1						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	21846,13	27319,22	25022,83	24729,39	2748,32	11,11%
C10	27146,94	28023,03	22426,07	25865,35	3010,542	11,64%
C11	24696,33	26563,3	21115,6	24125,08	2768,409	11,48%
C12	75023,15	64125,83	55290,22	64813,06	9884,399	15,25%
C14	55188,11	44804,04	43386,76	47792,97	6443,463	13,48%
C15	33315,18	28936,9	28239,69	30163,93	2751,246	9,12%
C16	63036,89	50170,2	49437,86	54214,98	7648,768	14,11%
C17	37056,8	32685,51	34266,44	34669,58	2213,357	6,38%
C18	24827,91	19894,64	21175,47	21966,01	2559,879	11,65%
Vial 1.2						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	25159,94	27697,21	24056,97	25638,04	1866,622	7,28%
C10	27804,96	25087,38	24849,12	25913,82	1642,103	6,34%
C11	24955,68	24543,03	23688,22	24395,64	646,4605	2,65%
C12	70276,86	63056,96	59215,19	64183,01	5616,147	8,75%
C14	49831,45	48624,2	45524,34	47993,33	2221,778	4,63%
C15	29707,4	29533,43	27544,27	28928,36	1201,816	4,15%
C16	56727,81	54868,45	52311,48	54635,91	2217,328	4,06%
C17	34033,2	32876,21	30901,7	32603,7	1583,437	4,86%
C18	22614,48	21607,21	19272,18	21164,62	1714,545	8,10%
Vial 1.3						
	Teste 1	Teste 2	Teste 3	Média	Desvio	CV
C9	25680,53	26013,33	20650,7	24114,85	3004,656	12,46%
C10	26672,27	23540,42	24403,79	24872,16	1617,603	6,50%
C11	24465,13	24220,34	23404,47	24029,98	555,3634	2,31%
C12	70852,59	60672,21	60028,69	63851,16	6071,943	9,51%
C14	53191,07	46463,68	47112,85	48922,54	3710,885	7,59%
C15	32161,57	29731,77	29713	30535,45	1408,298	4,61%
C16	59470,83	52085,95	54890,03	55482,27	3727,894	6,72%
C17	34984,32	32277,73	34314,81	33858,95	1409,705	4,16%
C18	21800,78	20334,25	21184,6	21106,54	736,3743	3,49%

Figura 20 – Histograma obtido para avaliação da equivalência dos vials.



Para atestar a equivalência dos vials foram realizados testes estatísticos para verificação dos dados obtidos nas triplicatas analisadas. Foi feito teste T para verificação da semelhança estatística das médias e o teste F para semelhança de variâncias para o comportamento de cada alcano. Para os dois testes, se o resultado obtido de p-valor fosse maior que 0,05, é possível afirmar a equivalência estatísticas dos valores de média e variância com 95% de confiança. Na Tabela 5 é apresentado o conjunto de resultados que confirmam que o vials apresentam uma capacidade extratora equivalente estatisticamente, portanto, podem ser utilizados para obtenção de mesmos resultados nas análises. É possível destacar que apenas a variância quando comparada entre o vial 1.1 e 1.3 para o C11 não foi equivalente, o que mostra que o erro obtido para os dispositivos é semelhante.

Tabela 5 – Resultados dos testes T e F pareados realizados para avaliação da equivalência dos vials.

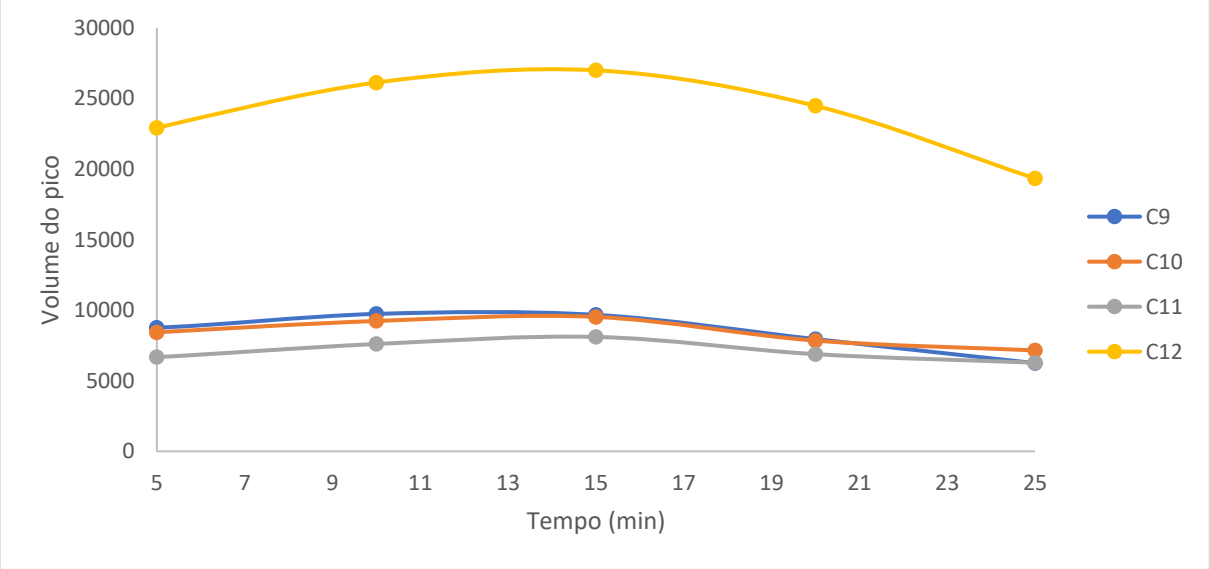
Alcano	p-valor 1x2 (Variância)	p-valor 1x3 (Variância)	p-valor 2x3 (Variância)	p-valor 1x2 (Média)	p-valor 1x3 (Média)	p-valor 2x3 (Média)
C9	0,3157	0,4555	0,2785	0,6604	0,8067	0,4972
C10	0,2293	0,2240	0,4925	0,9816	0,6412	0,4775
C11	0,0517	0,0386	0,4246	0,8771	0,9588	0,4987
C12	0,2440	0,2740	0,4611	0,9281	0,8927	0,9479
C14	0,1063	0,2491	0,2639	0,9618	0,8055	0,7287
C15	0,1602	0,2076	0,4214	0,5153	0,8452	0,2071
C16	0,0775	0,1919	0,2613	0,9315	0,8092	0,7524
C17	0,3385	0,2886	0,4422	0,2589	0,6210	0,3631
C18	0,3097	0,0764	0,1557	0,6757	0,6061	0,9596

5.4 Otimização de parâmetros do método de extração e pré-concentração VWSE

O método de preparo de amostra utilizando o VWSE é baseado nos princípios fundamentais dos equilíbrios termodinâmicos de adsorção e absorção entre as substâncias presentes na amostra e o revestimento do dispositivo. Desta maneira, os resultados dependem diretamente do tempo necessário para que ocorra o equilíbrio entre as fases, ou seja, a sua cinética de extração do meio amostral.

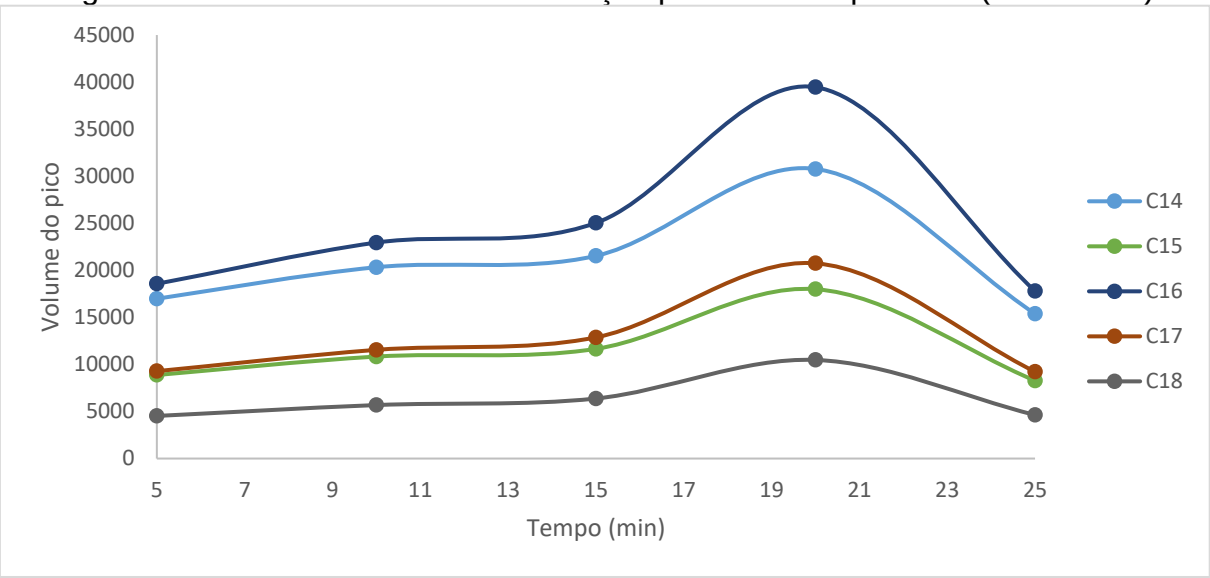
Foram testados tempos de contato da amostra com a fase extratora de 2,5; 5; 10; 15; 20 e 25 minutos, em triplicata, a fim de encontrar o menor tempo no qual o equilíbrio tende a ser alcançado. É mostrado na Figura 21 e 22 as curvas de cinética encontradas para os alcanos analisados, obtidas a partir das médias de cada ponto. É notável a existência de dois comportamentos diferentes para as curvas observadas, podendo ser divididas em alcanos mais leves (C9 a C12) e mais pesados (C14 a C18).

Figura 21 – Curva de cinética de extração para alcanos leves (C9 a C12).



Para os alcanos mais leves, o valor máximo obtido para a extração é alcançado em torno de 13 minutos, sendo observado um decréscimo na resposta analítica após 15 minutos de contato das fases. Possivelmente o contato prolongado das fases saturadas sob aquecimento promove uma dessorção de uma parcela dos alcanos mais leves, resultando numa extração menos eficiente.

Figura 22 – Curva de cinética de extração para alcanos pesados (C14 a C18)

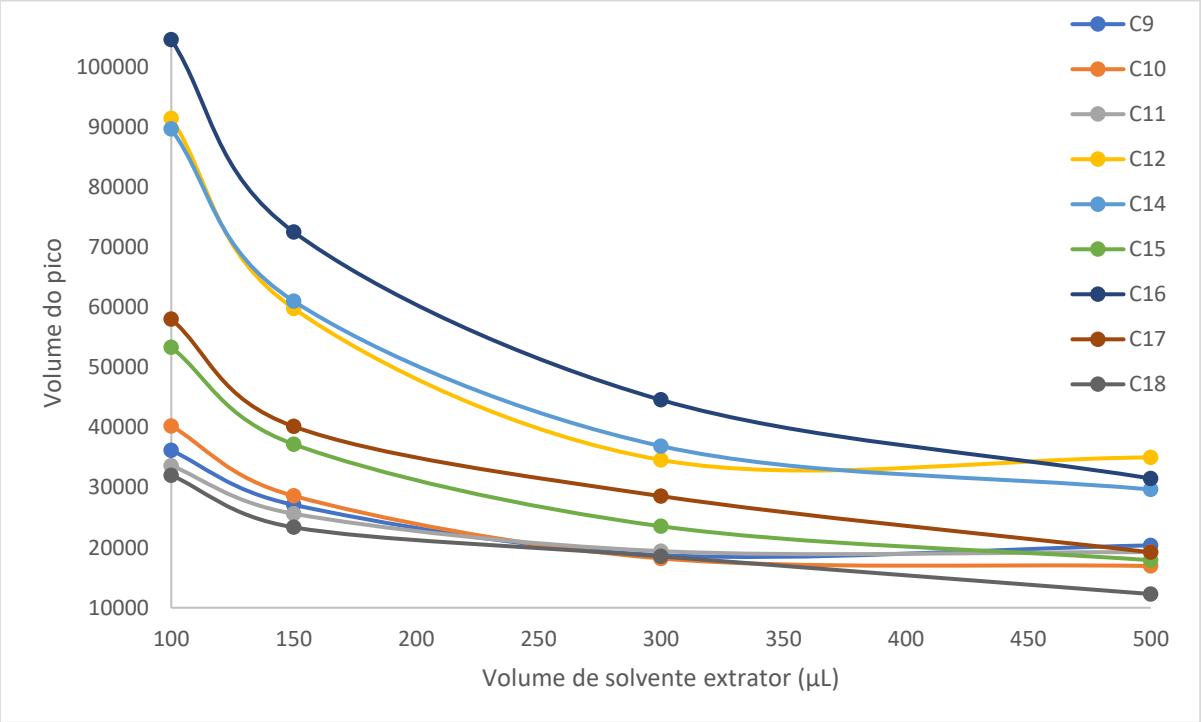


Para os alcanos mais pesados, é possível observar que a extração tem seu valor máximo obtido em 20 minutos, e depois começa a decrescer assim como os mais leves. Dado esse comportamento geral da amostra somado a uma otimização de tempo total do método, foi definido a utilização do tempo de 10 minutos para alcançar um equilíbrio que atendesse todos os analitos ao mesmo tempo, evitando que houvesse o efeito de decréscimo da resposta analítica dos alcanos mais leves e sem perder muito da resposta dos mais pesados, obtendo uma extração muito rápida, que apesar de não ótima, é muito eficiente.

Para a etapa de dessorção líquida, foram otimizados dois parâmetros que impactam diretamente na eficiência da recuperação dos compostos da trapeados na fase extratora, o volume de ciclohexano utilizado para dessorção e o tempo de contato do solvente com o dispositivo saturado.

Foram testados os volumes de 100; 150; 300 e 500 µL de ciclohexano e os tempos de 2,5; 5; 7,5; 10 e 15 minutos, em triplicata. Para o volume utilizado, é possível observar na Figura 23 as curvas obtidas na otimização desse parâmetro.

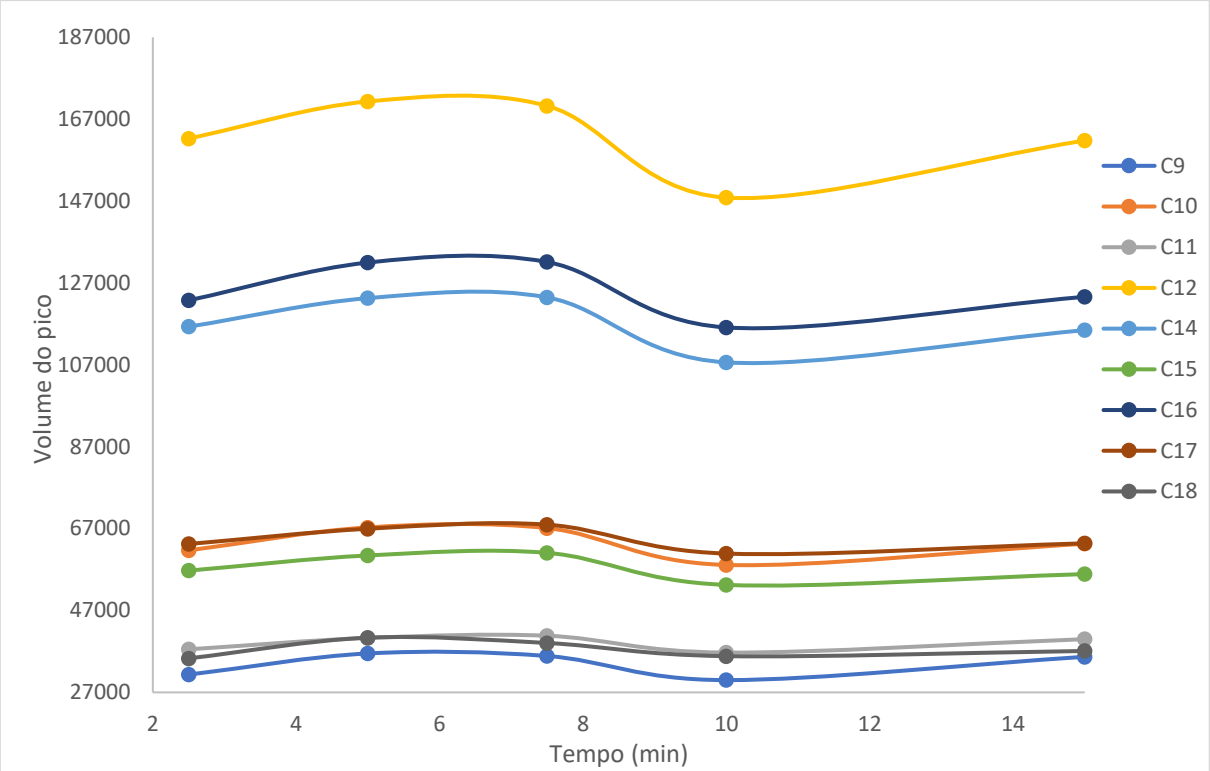
Figura 23 – Curva de otimização de volume de solvente extrator utilizado na dessorção.



A partir das curvas obtidas é possível definir que o volume de solvente extrator utilizado no qual se obtém melhor resposta é o de 100 µL. Apesar da quantidade total de analito extraído da fase extratora ser menor quanto menor o volume de solvente utilizado, a concentração obtida no extrato é alta devido ao pequeno volume obtido, aumentando a resposta.

Para o tempo de contato entre solvente e fase extratora durante a dessorção líquida, é possível observar na Figura 24 as curvas obtidas na sua otimização.

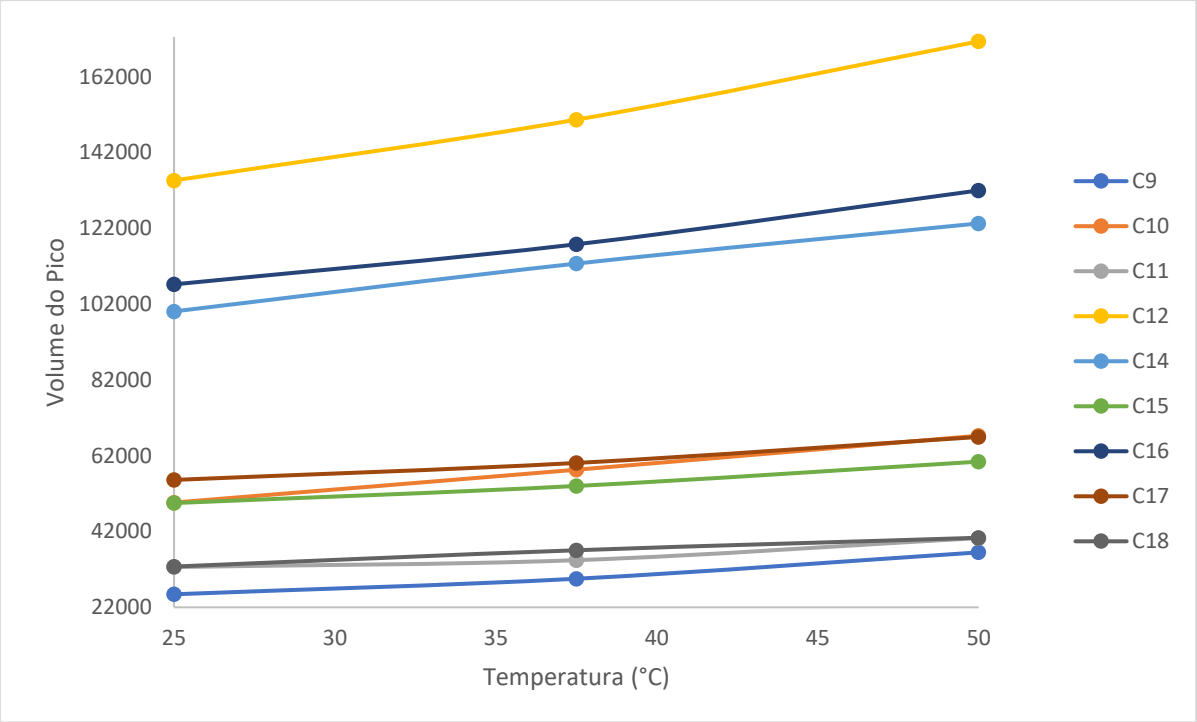
Figura 24 – Curva de otimização de tempo de dessorção líquida



Nas curvas obtidas para o tempo de contato, é possível determinar que o solvente obtém sua saturação entre 5 e 7,5 minutos e depois passa por um decréscimo na resposta analítica, possivelmente pelo contato prolongado das fases sob aquecimento que promove uma nova adsorção, assim como ocorre com o tempo de contato entre amostra e fase extratora. Dessa forma foi determinado o tempo de 5 minutos por obter uma ótima resposta, sendo que o ganho entre 5 e 7,5 minutos não é expressivo.

Por fim, foi realizada uma otimização referente a temperatura a qual o processo de preparo de amostra é submetido, sendo testados 25, 37,5 e 50 °C, em triplicata. As curvas obtidas durante a otimização do parâmetro podem ser observadas na Figura 25.

Figura 25 – Curva de otimização da temperatura do método.



Ao observar as curvas de temperatura é possível determinar que o aumento da temperatura também leva ao aumento da quantidade extraída de analitos, porém, por se tratar de um solvente orgânico volátil, o ciclohexano ao ser submetido a temperaturas maiores que 50 °C ao longo do processo de preparo, leva a evaporação do solvente, impossibilitando a análise nesses casos. Por isso foi escolhido a temperatura máxima em que não há comprometimento do volume de solvente extrator, ou seja, de 50 °C.

5.5 Validação analítica

As soluções padrão utilizadas para a validação foram preparadas a partir do estoque de alcanos descrito no item 4.2 e sendo assim, por ter como base de cálculo o analito de menor concentração (C18) e tendo concentrações relativas definidas, os níveis de concentração em ppm utilizados na linearidade estão descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Níveis de concentração utilizados na validação.

	Níveis*					
Analito	**20%**	**40%**	**60%**	**80%**	**100%**	**130%**
C9	0,426	0,852	1,278	1,704	2,130	2,769
C10	0,860	1,720	2,580	3,440	4,300	5,590
C11	0,434	0,868	1,302	1,736	2,170	2,821
C12	1,760	3,520	5,280	7,040	8,800	11,44
C14	0,902	1,804	2,706	3,608	4,510	5,863
C15	0,452	0,904	1,356	1,808	2,260	2,938
C16	0,910	1,820	2,730	3,640	4,550	5,915
C17	0,458	0,916	1,374	1,832	2,290	2,977
C18	0,200	0,400	0,600	0,800	1,000	1,300

*Concentrações obtidas em mg L^{-1} (ppm).

Para avaliação da existência de uma correlação linear entre a concentração dos analitos e a resposta analítica, foram realizados três testes sobre o conjunto de dados obtidos durante a validação. O primeiro teste realizado foi o teste de resíduos para avaliação da presença de valores anômalos que inviabilizar a análise de linearidade. Com os resíduos definidos é realizado então a determinação das suas variâncias que serão utilizadas no teste de homoscedasticidade, o teste de Cochran, avaliando se as variâncias obtidas são constantes durante a análise. Por fim é realizada uma regressão linear a partir dos dados obtidos e o seu coeficiente R^2, que avalia o ajuste dos dados ao modelo linear determinado.

As especificações utilizadas para análises dos testes de linearidade estão demonstradas na Tabela 7.

Tabela 7 – Especificações utilizadas para linearidade.

Parâmetro avaliado	**Especificação**
Coeficiente de determinação (R^2)	$R^2 \geq 0,9$
Verificação da ausência de valores aberrantes	Não deve haver valores anômalos
Avaliação da homogeneidade da variância dos resíduos	Dados devem ser homocedásticos $C_{calculado} < C_{tabelado}$

Os resultados obtidos para linearidade estão dispostos na Tabela 8.

Tabela 8 – Resultados obtidos para linearidade.

Analito	R^2	Existência de valores anômalos	Homogeneidade dos resíduos*	Resultado
C9	0,5032	Não há	0,5332 (Homocedástico)	Reprovado
C10	0,9060	Não há	0,5979 (Homocedástico)	Aprovado
C11	0,9459	Não há	0,5064 (Homocedástico)	Aprovado
C12	0,9468	Não há	0,3994 (Homocedástico)	Aprovado
C14	0,9498	Não há	0,3671 (Homocedástico)	Aprovado
C15	0,9487	Não há	0,5314 (Homocedástico)	Aprovado
C16	0,9535	Não há	0,5874 (Homocedástico)	Aprovado
C17	0,9006	Não há	0,3765 (Homocedástico)	Aprovado
C18	0,9108	Não há	0,5974 (Homocedástico)	Aprovado

*****$C_{tabelado}$ = 0,6161.

Para o C9, a faixa utilizada de 0,426 a 2,769 mg L^{-1} não apresentou um bom ajuste ao modelo linear, não garantindo uma proporção direta linear entre concentração e resposta analítica, e por isso, não pode ser validado.

Os demais analitos foram aprovados no teste de linearidade para as faixas de concentração utilizadas, podendo então seguir na validação de outros parâmetros pois há correlação direta linear entre sinal analítico e concentração.

A partir da curva definida na linearidade, foram realizados ensaios de precisão (repetibilidade) e precisão intermediária (reprodutibilidade), sendo avaliado a variação entre seis replicatas de um ponto da curva, a fim de determinar o grau de dispersão entre os resultados obtidos. Para a precisão intermediária essa análise é repedida é um dia diferente da repetibilidade.

Para isso, foi realizada a comparação destas replicatas para três diferentes níveis da curva obtida, sendo eles 40, 60 e 80% para todos os analitos. Com os valores encontrados em cada repetição, é feito a média, desvio padrão e desvio padrão relativo (DPR). Para definir um nível de aceitação para o resultado encontrado, foi calculado também o Horwitz Ratio (HorRat), um parâmetro normalizado de avaliação

de performance que indica a aceitação de um método de análise. O HorRat é a razão encontrada entre o DPR calculado e o DPR estimado através da equação de Horwitz:

$$DPR\ (\%)Horwitz = \ 2^{(1-0{,}5\log\ (Concentração\ teórica))}$$

Para considerar uma análise com um nível de dispersão aceitável, assume-se que o HorRat deve ser menor ou igual a 2.

Os resultados encontrados para o ensaio de precisão estão dispostos nas tabelas 9.

Tabela 9 – Resultados obtidos para precisão (repetibilidade).

Analito	Nível	DPR (%)	Horwitz DPR (%)	HorRat	Resultado
C10	40 %	4,17	14,75	0,28	Aprovado
	60 %	6,57	13,87	0,47	Aprovado
	80 %	7,80	13,28	0,59	Aprovado
C11	40 %	4,21	16,34	0,26	Aprovado
	60 %	6,91	15,38	0,45	Aprovado
	80 %	7,63	14,73	0,52	Aprovado
C12	40 %	5,31	13,24	0,40	Aprovado
	60 %	7,58	12,46	0,61	Aprovado
	80 %	10,23	11,93	0,86	Aprovado
C14	40 %	6,96	14,64	0,48	Aprovado
	60 %	10,86	13,77	0,79	Aprovado
	80 %	13,88	13,19	1,05	Aprovado
C15	40 %	13,43	16,24	0,83	Aprovado
	60 %	9,01	15,28	0,59	Aprovado
	80 %	12,71	14,64	0,87	Aprovado
C16	40 %	5,78	14,62	0,40	Aprovado
	60 %	12,17	13,76	0,88	Aprovado
	80 %	7,38	13,17	0,56	Aprovado
C17	40 %	21,95	16,21	1,35	Aprovado
	60 %	12,05	15,25	0,79	Aprovado
	80 %	11,940	14,61	0,82	Aprovado
C18	40 %	26,91	18,37	1,47	Aprovado
	60 %	16,68	17,28	0,97	Aprovado
	80 %	19,60	16,55	1,18	Aprovado

Os resultados obtidos demonstram que o método analisado é preciso para os analitos em questão, dentro da sua faixa de linearidade, podendo ser utilizado para obter resultados com baixa dispersão.

Para a precisão intermediária, além de avaliar o HorRat para determinar a dispersão dos resultados, também é realizado um teste F para comparar se as

variâncias observadas no primeiro e segundo dia são equivalentes estatisticamente com 95 % de confiança, sendo essa hipótese verdadeira quando o F calculado é menor do que o F tabelado, que para o conjunto de dados é 5,050.

Os resultados obtidos para precisão intermediária estão dispostos na tabela 10.

Tabela 10 – Resultados obtidos para precisão intermediária (reprodutibilidade).

Analito	Nível	HorRat	Resultado	F calculado	Resultado
C10	40%	0,42	Aprovado	2,63	Aprovado
	60%	0,78	Aprovado	4,17	Aprovado
	80%	0,44	Aprovado	4,39	Aprovado
C11	40%	0,03	Aprovado	1,51	Aprovado
	60%	0,09	Aprovado	3,11	Aprovado
	80%	0,05	Aprovado	3,93	Aprovado
C12	40%	0,06	Aprovado	2,23	Aprovado
	60%	0,12	Aprovado	1,72	Aprovado
	80%	0,08	Aprovado	4,50	Aprovado
C14	40%	0,58	Aprovado	2,24	Aprovado
	60%	0,72	Aprovado	1,54	Aprovado
	80%	0,84	Aprovado	4,52	Aprovado
C15	40%	0,09	Aprovado	3,22	Aprovado
	60%	0,11	Aprovado	3,53	Aprovado
	80%	0,09	Aprovado	4,94	Aprovado
C16	40%	0,07	Aprovado	3,22	Aprovado
	60%	0,13	Aprovado	1,66	Aprovado
	80%	0,07	Aprovado	1,20	Aprovado
C17	40%	0,13	Aprovado	4,09	Aprovado
	60%	0,14	Aprovado	1,63	Aprovado
	80%	0,10	Aprovado	1,08	Aprovado
C18	40%	0,15	Aprovado	2,41	Aprovado
	60%	0,16	Aprovado	1,99	Aprovado
	80%	0,11	Aprovado	3,22	Aprovado

O método se mostrou reprodutível, sendo preciso e apresentando variância equivalente à do primeiro dia de análise.

Para avaliar a exatidão do método, foram analisados também a tendência de recuperação para as seis replicatas dos níveis 40, 60 e 80% utilizados na precisão, retornando a porcentagem da razão entre concentração recuperada média para cada nível e a concentração teórica utilizada. Como especificação para este teste, devido

as baixas concentrações utilizadas, é utilizado como referência valores de recuperação entre 80 e 120%.

Os resultados obtidos para tendência de recuperação estão dispostos na tabela 11.

Tabela 11 – Resultados obtidos para recuperação (exatidão).

Analito	Nível	Concentração teórica (ppm)	Concentração média recuperada (ppm)	Recuperação (%)	Resultado
C10	40%	1,720	1,618	94	Aprovado
	60%	2,580	2,340	91	Aprovado
	80%	3,440	3,397	99	Aprovado
C11	40%	0,868	0,864	100	Aprovado
	60%	1,302	1,245	96	Aprovado
	80%	1,736	1,701	98	Aprovado
C12	40%	3,520	3,309	94	Aprovado
	60%	5,280	4,841	92	Aprovado
	80%	7,040	6,514	93	Aprovado
C14	40%	1,804	1,715	95	Aprovado
	60%	2,706	2,535	94	Aprovado
	80%	3,608	3,461	96	Aprovado
C15	40%	0,904	0,905	100	Aprovado
	60%	1,356	1,252	92	Aprovado
	80%	1,808	1,770	98	Aprovado
C16	40%	1,820	1,712	94	Aprovado
	60%	2,730	2,623	96	Aprovado
	80%	3,640	3,919	108	Aprovado
C17	40%	0,916	0,740	81	Aprovado
	60%	1,374	1,328	97	Aprovado
	80%	1,832	2,093	114	Aprovado
C18	40%	0,400	0,326	82	Aprovado
	60%	0,600	0,606	101	Aprovado
	80%	0,800	0,925	116	Aprovado

O método demonstrou ser exato para os analitos em questão, se adequando para utilização possibilitando a recuperação de um valor próximo ao real apresentado nas amostras.

Para a determinação dos limites de detecção e quantificação, os volumes obtidos nas análises dos brancos no exato tempo de retenção de cada analito foi utilizado para determinação junto a curva obtida na linearidade para determinar o valor

de concentração teórica observada para os valores de volume obtido. Esse valor de concentração teórica junto do desvio padrão do conjunto de concentração encontrado para os dez brancos foi utilizado como base de cálculo para determinar o os limites segundo os cálculos do item 4.7.4.

Os valores encontrados de limite de detecção e quantificação obtidos estão dispostos na tabela 12.

Tabela 12 – Resultados obtidos para limite de detecção e quantificação

Analito	Limite de detecção (ppm)	Limite de quantificação (ppm)
C10	0,637	0,664
C11	0,402	0,423
C12	1,028	1,051
C14	0,011	0,031
C15	0,132	0,158
C16	0,043	0,078
C17	0,034	0,058
C18	0,011	0,047

Os valores encontrados para limite demonstram o grande poder de detectabilidade do método de preparo utilizado junto a um GCxGC, atingindo concentrações de traços para alguns analitos, evidenciando o seu potencial para ser testado em novos analitos que se encontram em quantidades ínfimas em amostras complexas.

Em 2015, Nobre desenvolveu e validou um método de determinação de alcanos em águas de produção utilizando SPME. Neste método Nobre obtém recuperações entre 77 e 104% para alcanos de C8 a C20 na faixa de 5 µg L^{-1}, com DPR na faixa de 10%, com alguns analitos alcançando a faixa dos 20%. Ao comparar com o VWSE automático é possível ver que seu desempenho é comparável ao de métodos bem estabelecidas como o SPME, podendo ser utilizado como uma alternativa mais barata e de fácil automatização. [42]

Em 2021, Hakme e Poulsen desenvolveram uma pesquisa avaliando o desempenho de um sistema automático de extração em micro-fase sólida (µSPE), uma miniaturização do cartucho de extração em fase sólida (SPE), para análise de resíduos de pesticidas em cereais utilizando cromatografia gasosa. Nesse estudo, o método é capaz de obter recuperações entre 70 e 120% e apresenta um DPR de no máximo 20% para compostos na faixa de µg kg^{-1} (equivalente a faixa de µg L^{-1}). Ao comparar com os resultados obtidos para a validação do VWSE automático, é notável a semelhança entre os resultados obtidos, conseguindo uma recuperação na faixa de

81 a 116% e DPR’s em grande maioria abaixo de 15%, com alguns casos na faixa dos 20%. Essa comparação demonstra que ambas demonstram uma alta performance na análise de traços e corroboram para a utilização de métodos automáticos para atingir ótimos resultados, apesar dos resultados semelhantes, o VWSE automático foi capaz de obter resultados um pouco melhores. [43]

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A partir deste trabalho foi possível atestar a viabilidade do projeto de automação do preparo de amostras cromatográficas utilizando um dispositivo VWSE. Foi observada a sua capacidade de isolar analitos com caráter apolar de uma matriz aquosa e realizar sua pré-concentração.

Com os experimentos realizados acerca da confecção dos dispositivos de VWSE, determinou-se que a condição em que se obtém um filme polimérico de PDMS de melhor resposta para o tratamento da amostra foi a metodologia que utilizava um torno mecânico a 250 rpm, horizontalmente com secagem forçada por soprador de calor. Esse método obtido é muito rápido, fácil e barato, o que permite o revestimento de vários vials em um curto espaço de tempo e reflete na possibilidade do uso de mais de um dispositivo para agilizar o processo de análise.

Foi possível obter facilmente três dispositivos confeccionados com capacidade de extração equivalentes estatisticamente, o que demonstra uma boa reprodutibilidade do método obtido e corrobora para a possibilidade do uso de vários dispositivos em simultâneo.

A partir dos experimentos de otimização dos parâmetros de preparo utilizando VWSE, foi possível definir condições de análise de 10 minutos de contato entre amostra e fase extratora, 100 µL de ciclohexano na dessorção líquida por 5 minutos a 50 °C como ótimas para os analitos em questão, possibilitando ótimos resultados na etapa de validação.

A partir da validação das principais figuras de mérito do método foi possível determinar que o VWSE automático é um método muito preciso, reprodutível e exato para alcanos em baixas concentrações, apresentando resposta linear para quantidades muito baixas além de possibilitar sua utilização em análises de traços desses compostos, dado os limites de detecção e quantificação baixíssimos, na faixa de µg L^{-1}.

7 REFERÊNCIAS

[1] SKOOG; WEST; HOLLER; CROUCH. Fundamentos de Química Analítica. Tradução da 8. ed. norte-americana, São Paulo, 2006. 1026 p.

[2] VITHA, M. F. **Chromatography Principles and Instrumentation.** 1 ed. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2017.

[3] SPANJERS, C. S.; BEACH C. A.; JONES, A. J.; DAUENHAUER, P. J. Increasing Flame Ionization Detector (FID) Sensitivity Using Post-Column Oxidation-Methanation. **Royal Society of Chemistry: Analytical Methods**. n. 9, p. 1928-1934. 2017

[4] HOLM, T; Aspects of the mechanism of the flame ionization detector. **Journal of Chromatography A**. v. 842, p. 221-227. 2000.

[5] RAMOS, L. Comprehensive Analytical Chemistry **Handbook**, Volume 55, Comprehensive two dimensional gas chromatography, Elsevier, 2009.

[6] MÜHLEN, C. V.; ZINI, C. A.; CARAMÃO, E. B.; MARRIOTT, P. J. Caracterização de amostras petroquímicas e derivados utilizando cromatografia gasosa bidimensional abrangente (GCxGC). **Química Nova.** v. 29, n. 4, p. 765-775. 2006.

[7] MACHADO, M. E. **Determinação de compostos orgânicos sulfurados em carvão e petróleo por cromatografia gasosa monodimensional e bidimensional abrangente.** 196 p. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

[8] XU, X., VAN STEE, L. L. P.; WILLIAMS, J.; BEENS, J.; ADAHCHOUR, M.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN U. A. Th.; LEVIEVELD, J. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) measurements of volatile organic compounds in the atmosphere**. Atmospheric Chemistry and Physics**. v. 3, p. 665-682, 2003.

[9] MONDELLO, L.; TRANCHIDA, P. Q.; DUGO, P.; DUGO, G. Comprehensive two-dimensional gas chromatography-mass spectrometry: a review. **Mass Spectometry Reviews**. v. 27, p. 101-124, 2008.

[10] SEELEY, J. V. Recent advances in flow-controlled multidimensional gas chromatography. **Jornal of Chromatography A.** v. 1255, p. 24-37, 2012.

[11] BAHAGHIHAT, H. D.; FREYE, C. E.; SYNOVEC, R. E. Recent advances in modulator technology for comprehensive two dimensional gas chromatography. **Trends in Analytical Chemistry**. p. 1-13, 2018.

[12] Agilent Technologies. **Manual G4566A: Reverse Fill/Flush CFT GC x GC Differencial Flow Modulator.** 2ed, Estados Unidos, 2021. 62 p.

[13] ADAHCHOUR, M.; BEENS, J.; VREULS, R. J. J.; BRINKMAN, U. A. Th. Recent developments in comprehensive two-dimensional gas chromatography (GCxGC) I.

Introdution and instrumental set-up. **Trends in Analytical Chemistry.** v. 25, n. 5, p. 438-454, 2006.

[14] DIMANDJA, J. –M. D. Introduction and historical background: the “inside” story of comprehensive two-dimensional gas chromatography. Chapter 1. **Basic Multidimensional Gas Chromatography.** Volume 12, Snow, NH, Editor, p. 1-40. Separation Science and Technology, 2020.

[15] KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M. Comparison of fatty acid methyl esters of palm and palmist oils determined by GCxGC-ToF-MS and GC-MS/FID. **South African Journal of Botany**. v. 112, p. 483-488, 2017.

[16] ZHANG, P.; CARLIN, S.; LOTTI, C.; MATTIVI, F.; VRHOVSEK, U. On sample preparation methods for fermented beverage VOCs profiling by GCxGC-TOFMS. **Metabolomics**. n. 102, p. 10, 2020.

[17] NIU, Z.; ZHANG, W.; YU, C.; ZHANG, J.; WEN, Y. Recent advances in biological sample preparation methods coupled with chromatography, spectrometry and electrochemistry analysis techniques. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 102, p. 123-146, 2018.

[18] KANU, A. B. Recent developments in sample preparation techniques combined with high-performance liquid chromatography: A critical review. **Journal of Chromatography A.** v. 1654, 2021.

[19] CHEN, Y.; GUO, Z.; WANG, X.; QIU, C. Review Sample Preparation. **Journal of Chromatography A.** v. 1184, p. 191-219, 2008.

[20] MOLINER-MARTINEZ, Y.; HERRÁEZ-HERNÁNDEZ, R.; VERDÚ-ANDRÉS, J.; MOLINS-LEGUA, C.; CAMPÍNS-FALCÓ, P.; Recent advances of in-tube solid-phase microextraction. **Trends in Analytical Chemistry.** v. 71, p. 205-213, 2015

[21] RUBIO, S. Twenty years of supramolecular solvents in sample preparation for chromatography: achievements and challenges ahead. **Analytical and Bioanalytical Chemistry.** v. 412, p. 6037-6058, 2020.

[22] KONING, S.; JANSSEN, H.G.; BRINKMAN, U. A. T. Modern Methods of Sample Preparation for GC Analysis. **Chromatographia**. v. 69, p. S33-S78. 2009

[23] DE OLIVEIRA, J.B. **Desenvolvimento de método analítico para análise IT-SPME (in-tube) de esteroides para aplicação em antidoping**. 2022. 77p. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

[24] OUYANG, G.; PAWLISZYN, J. SPME in environmental analysis. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**. v. 386, p. 1059-1073, 2006.

[25] HASHEMI, B.; ZOHRABI, P.; SHAMSIPUR, M. Recent developments and applications of diferente sorbents for SPE and SPME from biological samples. **Talanta**. v. 187, p. 337-347. 2018.

[26] LORD, H.; PAWLISZYN, J. Evolution of solid-phase microextraction technology. **Journal of Chromatography A.** v. 885, p. 153-193, 2000.

[27] AULAKH, J. S.; MALIK, A. K.; KAUR, V.; SCHMITT-KOPPLIN, P. A review on solid phase microextraction – high performance liquid chromatography (SPME-HPLC) analysis of pesticides. **Critical Reviews in Analytical Chemistry**. p. 72-85. 2007.

[28] EMMONS, R. V.; TAJALI, R.; GIONFRIDDO, E. Development, Optimization and Applications of Thin Film Solid Phase Microextraction (TF-SPME) Devices for Thermal Desorption: A Comprehensive Review. **Separations.** v. 6, n. 39, 2019.

[29] DOUNY, C.; DUFOURNY, S.; BROSE, F.; VERACHTERT, P.; RONDIA, P.; LEBRUN, S.; MARZORTI, M.; EVERAERT, N.; DELCENSERIE, V.; SCIPPO, M.-L. Development of na analytical method to detect short-chain fatty acids by SPME-GC-MS in samples coming from na *in vitro* gastrointestinal model. **Journal of Chromatograph B**. v. 1124, p. 188-196, 2019.

[30] REICHENBERG, F.; SMEDES, F.; JONSSON, J.; MAYER, P. Determining the Chemical activity of hydrophobic organic compounds in soil using Polymer coated vials. **Chemistry Central Journal.** v. 2, n. 8, 2008.

[31] KAWAGUCHI, M.; FUJII, S.; ITOH, N.; ITO, R.; NAKAZAWA, H.; TAKATSU, A. Development of vial wall sorptive extraction and its application to determination of progesterone in human sérum. **Journal of Chromatography A**. v. 1216, p. 7553-7557, 2009.

[32] WOHLEB, R.; OKIRO, M.; WOLCOTT, J. Direct Vial Extraction for sample preparation in the analysis of chlorinated pesticides. **LC GC North America**. v. 21, n. 9, 2003.

[33] GUTZ, I. G. R.; Quimiometria e automação em química analítica: Algumas contribuições. São Paulo, 1985. 259 p.

[34] MAGALHÃES, A. C.; **Automação de um processo químico de dosagem industrial supervisionado por Interface Homem-Máquina.** 2017. 63p. Trabalho de conclusão de curso (Engenharia de Controle e Automação) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

[35] LOPES, F. C. **Desenvolvimento de um preparador amostral automático para análise cromatográfica.** 2022. 83 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro Federal de Educação Tecnológica de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2022.

[36] BARROS, E. P.; MOREIRA, N.; PEREIRA, G. E.; LEITE, S. G. F.; REZENDE, C. M.; DE PINHO, P. G. Development and validation of automatic HS-SPME with gas chromatography-ion trap/mass spectrometry method for analysis of volatiles in wines. **Talanta.** v. 101, p. 177-186, 2012.

[37] DE FIGUEIREDO, C. H. S.; GAMA, G. B. L.; DA PAZ, J. N.; KLESI, J. V. B.; DE OLIVEIRA, L. S. **Utilização do arduino como plataforma de automação em medidas físico-químicas**, 2020. Trabalho de conclusão de curso (Curso Técnico em Química) - Escola Técnica Estadual ETEC Irmã Agostina (Jardim Satélite - São Paulo), São Paulo, 2020.

[38] **AOAC International**, "AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals," Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 2002.

[39] TAVENIERS, I.; DE LOOSE, M.; BOCKSTAELE, E. V.; Trends in quality in the analytical laboratory. II. Analytical method validation and quality assurance. **Trends in Analytical Chemistry**. v. 23, n. 8, p. 535-552, 2004.

[40] BRASIL. Ministério da Saúde. **RDC n° 166**, de 24 de julho de 2017.

[41] ZHANG, B.; ZHANG, P.; ZHANG, H.; YAN, C.; ZHENG, Z.; WU, B.; YU, Y. A transparente, Highly Stretchable, Autonomous Self Healing Poly(dimethylsiloxane) Elastomer. **Macromolecular Rapid Communications**. v. 38, n. 15, 2017.

[42] NOBRE, C. A. **Validação de um método cromatográfico – Microextração em fase sólida (CG-MEFS) para determinação de n-alcanos em água de produção.** 2015. 82 p. Dissetação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.

[43] HAKME, E.; POULSEN, M. E. Evaluation of the automated micro-solid phase extraction clean-up system for the analysis of pesticide residues in cereals by gas chromatography-Orbitrap mass spectrometry. **Journal of Chromatography A.** v. 1652, 2021.