

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Victoria Silva Amador

**TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS APLICADAS À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR *PAPER SPRAY***

Belo Horizonte
2021

UFMG/ICEX/DQ. 1.452

T. 661

Victoria Silva Amador

**TÉCNICAS DE PREPARO DE AMOSTRAS APLICADAS À
ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR *PAPER SPRAY***

Tese apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências - Química.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Piccin

Coorientador: Prof. Dr. Rodinei Augusti

Belo Horizonte
2021

Ficha Catalográfica

A481t Amador, Victoria Silva
2021 Técnicas de preparo de amostras aplicadas à
T espectrometria de massas com ionização por paper spray
[manuscrito] / Victoria Silva Amador. 2021.
[xviii], 146 f. : il.

Orientador: Evandro Piccin.
Coorientador: Rodinei Augusti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais - Departamento de Química.
Inclui bibliografia.

1. Química analítica - Teses. 2. Preparação de amostra (Química) - Teses. 3. Espectrometria de massa - Teses. 4. Cocaína - Teses. 5. Lidocaína - Teses. 6. Vinho e vinificação - Análise - Teses. 7. Cerveja - Teses. 8. Cachaça - Teses. 9. Corantes - Teses. I. Piccin, Evandro, Orientador. II. Augusti, Rodinei, Coorientador. III. Título.

CDU 043

Elaborada por Sérgio Ferreira da Silva - CRB6-2719.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



"Técnicas de Preparo de Amostras Aplicadas À Espectrometria de Massas Com Ionização Por Paper Spray"

Victória Silva Amador

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Evandro Piccin - Orientador
UFMG

Prof. Rodinei Augusti - Coorientador
UFMG

Prof. Boniek Gontijo Vaz
UFG

Profa. Júnia de Oliveira Alves Binatti
CEFET-MG

Profa. Zenilda de Lourdes Cardeal
UFMG

Profa. Adriana Nori de Macedo
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Boniek Gontijo Vaz, Usuário Externo**, em 16/07/2021, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Nori de Macedo, Professora do Magistério Superior**, em 16/07/2021, às 18:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rodinei Augusti, Professor do Magistério Superior**, em 16/07/2021, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Evandro Piccin, Professor do Magistério Superior**, em 16/07/2021, às 18:04, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Zenilda de Lourdes Cardeal, Professora do Magistério Superior**, em 16/07/2021, às 18:09, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Júnia de Oliveira Alves Binatti, Usuário Externo**, em 20/07/2021, às 14:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0836183** e o código CRC **E4237B56**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a DEUS, por ter me fortalecido e guiado até aqui.

À minha vó Nélia, meu maior exemplo de amor, dedicação, mulher firme, guerreira e sábia. Minha maior saudade! Ela não está aqui fisicamente pra compartilhar comigo essa vitória, mas sei que está dando pulinhos de alegria e gritando “uhuu” no céu.

Aos meus pais Hernane e Eliane, por serem acento e amor, sempre presentes fazendo o possível e impossível pra me verem realizada.

Ao Felipe por todo incentivo. Por me mostrar que juntos somos muito mais fortes, que desafios precisam ser encarados e que sonhos existem para serem realizados.

Aos meus irmãos Túlio e Marina pela amizade e por viverem as minhas conquistas como se fossem deles, vocês tornam a vida muito mais feliz!

Ao prof. Evandro e prof. Rodinei pela orientação, incentivo, por terem compartilhado conhecimentos e experiências as quais levarei por toda a vida.

Ao prof. Ricardo pela parceria e pela oportunidade de trabalhar com a eletroextração.

À prof. Zenilda por disponibilizar a infraestrutura de seu laboratório para que fosse possível realizar a etapa de evaporação concentrativa.

Ao Hebert, pela amizade, parceria e troca de conhecimentos durante todo o mestrado e doutorado.

À Rosi pela amizade conselhos, ensinamentos e pela temporada que compartilhamos os dias.

Aos amigos do LAMS Denise, Julia, Ana, Juliane, Mariana, Daphne, Keila, Bruno, Matheus, Jimmy, Odilon, Jaime, Tarlene, Millena, Bruna, Mardén e Victor que fizeram das tarde regradas a café e bolo momentos inesquecíveis!

Aos vizinhos do laboratório de espectrometria de massas Lucas, Júlia, Susana, Marina, Camila e Giovana que também fizeram parte dessa história.

Aos amigos do trabalho Gustavo e Marina, o incentivo e o apoio de vocês foram fundamentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À chefia, principalmente ao prof. Rubén Dario, aos professores e funcionários do DQ.

Aos órgãos de fomento CNPq e CAPES que tornaram a realização desta tese possível.

Caminhar sozinho é impossível! Sem a contribuição de cada um de vocês nada do que está apresentado neste trabalho teria sido possível!

“...o real não está na saída nem na chegada:
ele se dispõe para a gente é no meio da travessia.”

Guimarães Rosa

RESUMO

Ao longo dos últimos anos, a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) tem se destacado como uma técnica bastante promissora para aplicações em química analítica. Apesar do bom desempenho apresentado para análises de amostras complexas, a PS também sofre efeitos de matriz e supressão de ionização, principalmente quando o analito está presente em uma matriz complexa e em concentrações muito baixas. Visando melhorar a seletividade e sensibilidade da técnica, e reduzir efeitos de matriz e supressão iônica, neste trabalho a PS-MS foi associada a técnicas de preparo de amostras por (i) extração assistida por campo elétrico (ii) concentração evaporativa em um dispositivo analítico de papel e (iii) extração em fase sólida em *headspace*. O método que associou a extração assistida por campo elétrico com a PS-MS foi aplicado na análise de cocaína e lidocaína em amostras de saliva sintética, corante verde malaquita em água canalizada e bisfenol A em vinho tinto. Os resultados obtidos indicaram enriquecimentos dos sinais analíticos variando entre 14 e 110 vezes, de acordo com cada proposta desenvolvida. O método que associou a concentração evaporativa em um dispositivo de papel com a PS-MS promoveu enriquecimentos de sinais de corantes azo e triarilmetanos em até 12 vezes. Além disso, a concentração evaporativa em dispositivo de papel mostrou-se uma proposta viável para determinação colorimétrica de compostos cromóforos a partir de informações extraídas de imagens digitais. A metodologia foi aplicada na determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça a partir da reação com NaDDTC, que tem como produto a substância cromófora $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. O limite de detecção obtido foi igual a $0,3 \mu\text{g mL}^{-1}$ e de quantificação igual a $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, valores significativamente menores que métodos de determinação de $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ em papel descritos na literatura. Por fim, o método que utilizou preparo de amostras por *headspace* foi aplicado na pré-concentração e detecção de componentes voláteis de amostras de cachaças e cervejas. Polidimetilsiloxano imobilizado em papel e papel cromatográfico livre foram utilizados como adsorventes da extração por *headspace* e subsequente análise por PS-MS. Além de *clean up* amostral, a utilização do PDMS como adsorvente possibilitou associar sinais dos espectros obtidos via PS-MS a marcadores do envelhecimento de cachaça em barril de carvalho e de cervejas que apresentam milho como adjunto cervejeiro. De forma geral, associar a PS-MS com técnicas de preparos de amostras consolidadas promoveu vantagens como: *clean-up* amostral; pré-concentração dos analitos; obtenção de espectros de melhor interpretação e de métodos sensíveis e seletivos.

Palavras-chave: Espectrometria de massas com ionização por *paper spray*, preparo de amostra, eletroextração, concentração evaporativa, extração em fase sólida.

ABSTRACT

Over the past few years, paper spray ionization mass spectrometry (PS-MS) has emerged as a very promising technique for applications in analytical chemistry. The low costs of the ionization source, the facility of use and no need for pneumatic assistance make PS-MS a very attractive tool in chemical analysis. Despite the good performance presented for complex samples analysis, PS also has matrix effects and ionization suppression, especially when the analyte is in a complex matrix at low concentrations. In order to improve selectivity and sensitivity of the technique, and to reduce matrix effects and ionic suppression, in this work PS-MS was associated with sample preparation techniques: (i) extraction assisted by electric field, (ii) evaporative concentration in paper based analytical devices and (iii) headspace solid phase extraction. The method that associated electric field assisted extraction with PS-MS was applied for cocaine and lidocaine in synthetic saliva, malachite green dye in tap water and bisphenol A in red wine. The obtained results indicated enrichment of the analytical signals varying from 14 to 110 times, according to each proposal developed. The method that combined evaporative concentration in paper based analytical devices with PS-MS promoted up to 12 times enrichment of azo and triarylmethane dye signals. In addition, the evaporative concentration in a paper device was a viable proposal for colorimetric determination of chromophore compounds. The proposed method was employed to determine Cu^{2+} in cachaça, through reaction with NaDDTC which produces the chromophore substance $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. The limit of detection obtained was $0.3 \mu\text{g mL}^{-1}$ and the limit of quantification was $1.0 \mu\text{g mL}^{-1}$, lower values than those described on literature for $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ on paper surface determination. Finally, the method that utilized headspace solid phase extraction was employed to pre-concentrate volatile compounds of cachaça and beer. Polydimethylsiloxane immobilized on paper and free chromatographic paper were used as extraction adsorbents and directly analyzed by PS-MS. In addition to sample clean up, the use of PDMS as an adsorbent was able to associate PS-MS signals with markers for aging of cachaça in oak barrels and beers with corn as an adjunct ingredient. In general, associating PS-MS with consolidated preparation techniques promoted advantages such as: sample clean-up; pre concentration of analytes; and sensitive and selective methods.

Keywords: Paper spray mass spectrometry, sample preparation, electroextraction, evaporative concentration, solid phase extraction.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2-1: Número de publicações sobre a técnica espectrometria de massas em relação ao ano.....	5
Figura 2-2: Ilustração da ionização por paper spray.....	6
Figura 2-3: Amplitude do spray da PS observado para diferentes ângulos do vértice do papel: 30°, 60°, 90° e 120°. A formação de spray não foi observada em 150°.....	8
Figura 2-4: Imagem do momento inicial da ionização por PS. Condições de análise utilizadas: triângulo de papel de filtro, 10 µL de MeOH:H ₂ O 80/20 (v/v) e voltagem de formação do spray de 4,5 kV.....	9
Figura 2-5: Imagem de microscópio eletrônico de varredura de (A) papel de pesagem, (B) papel de impressora e (C) papel filtro qualitativo.....	11
Figura 2-6: Representação esquemática do método de espectrometria de massas com ionização por paper spray e pré-concentração em sistema superhidrofóbico.....	14
Figura 3-1: Ilustração da eletroextração trifásica proposta por Raterink [48].....	17
Figura 3-2: Microtubo de polipropileno modificado com parafuso de aço inoxidável para extração multifases com aplicação de campos elétricos.....	18
Figura 3-3: Dispositivo multipoços para eletroextração multifases com cones de papel posicionados sobre uma placa suporte. As três fileiras de cones à esquerda mostram que não há extração de analito (corante violeta de metila) sem a aplicação de potencial elétrico; as demais fileiras, com os cones em azul, apontam a extração com a aplicação de potencial elétrico.....	19
Figura 3-4: Estrutura da cocaína.....	20
Figura 3-5: Cromatogramas obtidos por LC-MS de (a) fluido oral, (b) urina e (c) plasma recolhidos de usuário de cocaína.....	21
Figura 3-6: Estrutura da lidocaína.....	22
Figura 3-7: Estrutura do corante verde malaquita.....	26
Figura 3-8: Estrutura do BPA.....	29
Figura 3-9: (A) Espectrômetro de massas Thermo modelo LCQ Fleet com analisador do tipo armadilha de íons e fonte de ionização por paper spray. (B) Detalhes da fonte por paper spray.....	32
Figura 3-10: Dispositivo multipoços para eletroextração multifases com microtubos de polipropileno. (A) Posição do sistema durante a extração. (B). Sistema aberto logo após o término do processo; (C) Ilustração de cada poço de extração do sistema. Dentro dos microtubos estão as fases: doadora e orgânica e o papel cromatográfico embebido em solução eletrolítica como fase aceptora.....	34
Figura 3-11: Otimização da eletroextração. Efeito do (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: 1000 µg L ⁻¹ de cocaína e lidocaína em saliva sintética. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 µmol L ⁻¹ de ácido acético.....	38
Figura 3-12: Estudo de viabilidade do uso de 1-octanol como fase orgânica no sistema EE-PS-MS. As fotos representam um sistema com duas fitas de papel cromatográfico acompanhado por 50 minutos - com obtenção de imagens de celular a cada 5 minutos - para estimar o tempo de evaporação do 1-octanol. À esquerda de cada imagem tem-se uma fita seca (referência) e, à direita uma fita embebida em 1-octanol. A evaporação do solvente foi acompanhada pela diferença de cor entre as fitas.....	40
Figura 3-13: Espectros de massas obtidos para análises de cocaína (m/z 304 destacado em vermelho) e lidocaína (m/z 235 destacado em vermelho) em saliva artificial por (A) PS(+)-MS e (B) EE-PS(+)-MS. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, MDMA (m/z 194). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase doadora: 1000 µg L ⁻¹ de cocaína e lidocaína em saliva sintética, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 µmol L ⁻¹ de ácido acético.....	41

Figura 3-14: Espectros EE-PS(+)-MS/MS dos sinais (A) lidocaína m/z 235 e (B) cocaína m/z 304. Energia de colisão de 20 V.	42
Figura 3-15: Intensidade analito/PI obtidos por EE-PS-MS e PS-MS para (A) cocaína e (B) lidocaína em saliva artificial em função das diferentes concentrações dos analitos: 250, 500 e 1000 µg L ⁻¹	43
Figura 3-16: Curvas de calibração obtidas utilizando o método EE-PS-MS para (A) cocaína e (B) lidocaína. Faixa de trabalho: 10,0 a 100,0 µg L ⁻¹ para cocaína e 10,0 a 90,0 µg L ⁻¹ para lidocaína. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano.....	44
Figura 3-17: Otimização do sistema de eletroextração para determinação do corante verde malaquita em água de torneira. (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: 100 µg L ⁻¹ de verde malaquita em água de torneira. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 µmol L ⁻¹ de ácido acético.	47
Figura 3-18: Espectro (A) PS(+)-MS e (B) EE-PS(+)-MS obtidos para 100 µg L ⁻¹ de corante verde malaquita (m/z 329 destacado em vermelho) em água de torneira. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, violeta de metila (m/z 372). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 µmol L ⁻¹ de ácido acético.	48
Figura 3-19: Espectro EE-PS(+)-MS/MS obtido para o corante verde malaquita, m/z 329, em água de torneira na concentração de 100 µg L ⁻¹ . Energia de colisão de 18 V. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 µmol L ⁻¹ de ácido acético.	49
Figura 3-20: Otimização do sistema de eletroextração para análise de BPA em amostras de vinho: (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: 100 µg L ⁻¹ de bisfenol A em vinho tinto. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio 50 µg mL ⁻¹ / hidróxido de sódio 50 µg mL ⁻¹ 1 : 1 (v/v).	51
Figura 3-21: Espectro (A) PS(-)-MS e (B) EE(-)-PS-MS obtidos para 100 µg L ⁻¹ de BPA (m/z 227 destacado em vermelho) em vinho tinto. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, nonilfenol (m/z 219). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio 50 µg mL ⁻¹ / hidróxido de sódio 50 µg mL ⁻¹ 1 : 1 (v/v).	52
Figura 3-22: Espectro EE-PS(-)-MS/MS obtido para 100 µg L ⁻¹ de BPA em vinho tinto. Energia de colisão de 22 V. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio 50 µg mL ⁻¹ / hidróxido de sódio 50 µg mL ⁻¹ 1:1 (v/v).	53
Figura 4-1: Representação ilustrativa de um sistema de concentração de analitos por evaporação concentrativa em membrana proposto por Fornells e colaboradores.....	58
Figura 4-2: Representação esquemática do evaporador concentrativo proposto Zhang e colaboradores	58
Figura 4-3: Dispositivo de pré-concentração em gotas. A) Ilustração dos canais circulares hidrofílicos criados sobre a superfície hidrofóbica do dispositivo. B) Imagem microscópica de uma gota de solução de vermelho allura confinada sobre a região dos círculos hidrofílicos.	59
Figura 4-4: Esquema da concentração evaporativa proposta por Wong e colaboradores [54] para concentrar lipoarabinomanano em urina. Por capilaridade, a amostra líquida desloca-se em direção à placa aquecedora na parte superior da fita.	

Quando a amostra atinge a região aquecida, o solvente se evapora e o analito é então pré concentrado.....	60
Figura 4-5: Imagem do dispositivo com oito pontas projetado por Abbas e colaboradores. As extremidades das pontas demonstram a região de acúmulo do analito.....	61
Figura 4-6: A) Representação gráfica do sistema RGB. B) Formação de tons no sistema RGB.....	62
Figura 4-7: Avaliação da seletividade do complexante DDTC frente a diferentes soluções contendo metais e uma solução com a mistura de todos eles. Solução de Cu^{2+} com concentração de 100 mg L^{-1} e demais metais com concentração de 5000 mg L^{-1}	65
Figura 4-8: A) Formato em estrela do dispositivo desenvolvido neste trabalho. B) Identificação das quatro zonas de detecção dentre as quais uma é utilizada como referência, três zonas de adição da amostra, região de adição de solvente e hastes de fixação do dispositivo no bloco metálico.	68
Figura 4-9: A) Sistema utilizado para a pré-concentração evaporativa. O dispositivo de papel é posicionado sobre um bloco metálico que serviu como suporte e garantiu o posicionamento ideal dos capilares de direcionamento do fluxo de gás (N_2). B) Aproximação da região do bloco de evaporação com os quatro capilares de passagem de ar direcionados às extremidades dos triângulos do μPAD	69
Figura 4-10: Reação de coordenação entre Na-DDTC e Cu^{2+} que resulta na formação do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, composto cromóforo de coloração amarela.	71
Figura 4-11: Gráfico das componentes R, G e B obtidas por imagens digitais para estudo de otimização da concentração de NaDDTC. Foram avaliadas as concentrações de 0,1%, 1% e 2% m/v. As imagens digitais foram geradas utilizando um scanner de mesa.	72
Figura 4-12: A) Tiras de papel cromatográfico em condição inicial, prévia à eluição, e após eluição com fases móveis compostas por acetonitrila, água, metanol, e misturas água e metanol nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (v/v). B) Gráfico de barras com os sinais R, G e B obtidos pelas imagens digitais de cada uma das fitas em função do solvente. Imagens digitais geradas através de scanner de mesa.....	73
Figura 4-13: Dados das componentes R G e B obtidos por imagens digitais para estudo de estabilidade da cor do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ em função do tempo. Imagens digitais geradas através de scanner de mesa.	74
Figura 4-14: A) Dispositivo de papel após pré-concentração evaporativa, mostrando a tonalidade amarela concentrada nas extremidades das zonas de detecção. B) Dispositivo de papel convencional (sem pré concentração) em que o metal e complexante foram adicionados na zona de detecção, mostrando a tonalidade amarela nas zonas de detecção . Condições: $2 \mu\text{L}$ de solução contendo $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cu^{2+} seguido de $5 \mu\text{L}$ de solução NaDDTC 1% foram adicionados ao dispositivo. Imagens digitais obtidas por um scanner de mesa após 5 minutos da adição do complexante. No triângulo superior das imagens, identificado como referência, não houve adição do complexante.	76
Figura 4-15: Curvas de calibração para $[\text{Cu}^{2+}]$ obtidas utilizando os μPADs A) com e B) sem pré-concentração evaporativa. Faixa de trabalho: $1,0 - 8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em A) e $4,0 - 8,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ em B). A intensidade da componente B (do sistema RGB) foi obtida através de imagens digitais geradas por um scanner de mesa.	77
Figura 5-1: Estrutura do polidimetilsiloxano (PDMS).	95
Figura 5-2: Diagrama das etapas de produção da cachaça	97
Figura 5-3: Representação esquemática da imobilização do PDMS no papel cromatográfico.	102
Figura 5-4: Materiais utilizados para montar o sistema de extração por headspace.	103
Figura 5-5: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS da cachaça prata com A) 100 mg, B) 200 mg e C) 300 mg de NaCl. Condições de extração por headspace: aquecimento a 50°C por 10 minutos.	106

Figura 5-6: Espectros da cachaça prata obtidos por HS-PDMS-PS(+)-MS em modo de ionização A) positivo e B) negativo.	107
Figura 5-7: Espectros PS(-)-MS obtidos em modo negativo para as diferentes frações da etapa de produção da cachaça: A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.	108
Figura 5-8: Espectros obtidos por HS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.....	110
Figura 5-9: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.....	112
Figura 5-10: Espectros obtidos por PS(-)-MS convencional em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.....	114
Figura 5-11: Espectros obtidos por HS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.....	115
Figura 5-12: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.....	116
Figura 5-14: Espectros obtidos por PS(+)-MS das cervejas A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte	118
Figura 5-15: Espectros obtidos por PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.	119
Figura 5-16: Espectros obtidos por HS-PS(+)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.....	120
Figura 5-17: Espectros obtidos por HS-PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.....	122
Figura 5-18: Espectros HS-PDMS-PS(+)-MS de diferentes marcas de cerveja comerciais: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.	123
Figura 5-19: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 3-1: Trabalhos descritos na literatura empregando PS-MS na análise de cocaína e seus adulterantes com interesse forense.....	23
Tabela 3-2: Condutividade, ponto de ebulição e viscosidade dos solventes avaliados como fase orgânica no sistema EE-PS-MS.	37
Tabela 4-1: Comparação entre os métodos μ PAD com e sem pré concentração evaporativa para as concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cobre.....	75
Tabela 4-2: Limites de detecção e quantificação obtidos para os métodos μ PAD com e sem pré concentração evaporativa.	77
Tabela 4-3: Teste de adição e recuperação de Cu em cachaça usando a metodologia que emprega μ PADs, pré-concentração evaporativa e detecção por imagens digitais.	78
Tabela 4-4: Determinação de cobre em cachaças pelo método μ PAD associado à pré-concentração evaporativa e detecção por imagens digitais.	79
Tabela 5-1: Atribuições dos sinais m/z identificados nos espectros obtidos por PS(-)-MS.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

μPAD	Dispositivo Microfluídico à Base de Papel (<i>microfluidic paper based devices</i>)
BG	Verde Brilhante (<i>Brilliant Green</i>)
BPA	Bisfenol A (<i>Bisphenol A</i>)
BZE	Benzoilecgonina
COC	Cocaína
DART	Análise Direta em Tempo Real (<i>Direct Analysis in Real Time</i>)
DESI	Dessorção Induzida por Ionização Electrospray Acoplada à Espectrometria de Massas (<i>Desorption electrospray ionization</i>)
EAA	Espectrometria de Absorção Atômica
EE	Eletroextração
ESI	Ionização por <i>Electrospray</i> (<i>Electrospray ionization</i>)
GC	Cromatografia Gasosa (<i>Gas Chromatography</i>)
GOM	Membrana de óxido de grafeno (<i>Graphene Oxide Membrane</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HS	Headspace
LC	Cromatografia Líquida (<i>Liquid Chromatography</i>)
LD	Limite de Detecção
LID	Lidocaína
LPME	Microextração por Fase Líquida (<i>Liquid-Phase Microextraction</i>)
LQ	Limite de Quantificação
m/z	Razão Massa Sobre Carga
MALDI	Ionização por Dessorção a Laser Assistida por Matriz (<i>Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization</i>)
MDMA	Metilenedioximetanfetamina
MG	Verde Malaquita (<i>Malachite Green</i>)
MIP's	Polímeros Molecularmente Impresso (<i>Molecularly Imprinted Polymers</i>)
MS	Espectrometria de Massas (<i>Mass Spectrometry</i>)
MS/MS	Espectrometria de Massas Sequencial
MOF's	Estrutura Metal-orgânica (<i>Metal Organic Frameworks</i>)
NIP's	Polímeros Não Impressos (<i>Non-Imprinted Polymers</i>)
PDMS	Polidimetilsiloxano
PI	Padrão Interno
PMMA	Polimetilmetacrilato

PS	Ionização <i>Paper Spray</i> (<i>Paper spray Ionization</i>)
PS(-)-MS	Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper Spray</i> em Modo Negativo
PS(+)-MS	Espectrometria de Massas com Ionização <i>Paper Spray</i> em Modo Positivo
PTFE	Politetrafluoretileno
SPE	Extração em Fase Sólida (<i>Solid Phase Extraction</i>)
SPME	Microextração por Fase Sólida (<i>Solid Phase Micro Extration</i>)
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS	1
Capítulo 2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS	4
1.1. Ionização por <i>paper spray</i> (PS)	6
1.2. Modificações na PS: recobrimentos no substrato poroso e/ou associação da PS a técnicas de preparo de amostras	10
Capítulo 3 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR <i>PAPER SPRAY</i> ASSOCIADA À TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA POR ELETROEXTRAÇÃO.....	16
2. ELETROEXTRAÇÃO.....	16
1. COCAÍNA E LIDOCAÍNA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS	20
2. CORANTE VERDE MALAQUITA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS	26
3. BISFENOL A EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS	29
4. MATERIAIS E MÉTODO	31
4.1. Amostras e reagentes	31
4.2. Materiais	31
4.3. Instrumentação	32
4.4. Preparo das amostras	32
4.4.1. <i>Saliva</i>	32
4.4.2. <i>Soluções padrão</i>	33
4.5. Sistema de eletroextração	33
4.6. Análise instrumental por PS-MS	35
4.6.1. <i>PS-MS convencional (sem eletroextração)</i>	35
4.6.1.1. <i>Cocaína e lidocaína em saliva artificial</i>	35
4.6.1.2. <i>Verde malaquita em água de torneira</i>	35
4.6.1.3. <i>Bisfenol A em vinho tinto</i>	36
4.6.2. <i>EE-PS-MS (com eletroextração)</i>	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	37
5.1. Extração de cocaína e lidocaína em saliva artificial	37
5.2. Extração de corante verde malaquita (MG) em água de torneira	46
5.3. Extração de BPA em vinho tinto	50
6. CONCLUSÃO.....	54
Capítulo 4 EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA EM DISPOSITIVO DE PAPEL APLICADA À DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COBRE EM CACHAÇA	55
1. MINIATURIZAÇÃO DE SISTEMAS ANALÍTICOS	55
2. EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA	57
3. ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS	62
4. DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E ALIMENTÍCIAS	63

5.	MATERIAIS E MÉTODO	67
5.1.	Amostras e reagentes	67
5.2.	Instrumentação	67
5.3.	Dispositivos μPAD	67
5.4.	Preparo das amostras	69
5.5.	Análises usando os dispositivos analíticos de papel	70
5.6.	Análises por espectrometria de absorção atômica (EAA)	70
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
6.1.	Deteção colorimétrica de Cu em cachaça	71
7.	CONCLUSÃO	80
EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA EM DISPOSITIVO DE PAPEL APLICADA À DETECÇÃO DE CORANTES AZO E TRIARILMETANOS.....		81
1.	INTRODUÇÃO	81
2.	MATERIAIS E MÉTODO	84
2.1.	Amostras, reagentes e materiais	84
2.2.	Instrumentação	84
2.3.	Preparo das amostras	84
2.4.	Pré-concentração evaporativa	85
2.5.	Análise por PS-MS	85
3.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	87
4.	CONCLUSÃO	92
Capítulo 5 USO DO POLIDIMETILSILOXANO (PDMS) IMOBILIZADO EM PAPEL CROMATOGRÁFICO PARA PREPARO DE AMOSTRA POR HEADSPACE E ANÁLISE POR PS-MS APLICADO NA ANÁLISE DE BEBIDAS		93
1.	MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA.....	93
2.	BEBIDAS ALCOOLICAS	96
2.1.	Cachaça	96
2.2.	Cerveja	99
3.	MATERIAIS E MÉTODO	101
3.1.	Amostras e reagentes	101
3.2.	Materiais	101
3.3.	Instrumentação	101
3.4.	Extração por headspace	102
3.5.	Análise instrumental por PS-MS	104
3.5.1.	<i>PS-MS com extração por headspace</i>	104
3.5.2.	<i>PS-MS convencional (sem extração)</i>	104
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	105
4.1.	Otimização das condições experimentais	105
4.2.	Caracterização das frações geradas pelo processo de produção da cachaça	108
4.3.	Caracterização do envelhecimento de cachaça em barril de carvalho	113

4.4. Cervejas comerciais	118
5. CONCLUSÃO	125
Capítulo 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	126
Capítulo 7 REFERÊNCIAS	128

Capítulo 1 – INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

1. INTRODUÇÃO

A espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) tem se destacado como uma técnica bastante promissora para aplicações em química analítica. O baixo custo da fonte de ionização, facilidade de operação e a não necessidade de assistência pneumática, aliados à grande sensibilidade e rapidez, fazem da PS-MS uma ferramenta muito atraente para análises químicas [1].

Durante a análise por PS-MS parte da matriz da amostra permanece retida no papel. Por isso, na maioria das vezes, técnicas de preparo de amostra são dispensadas [2]. Entretanto, assim como em qualquer técnica de análise direta, quando o composto de interesse está presente em quantidades muito pequenas numa matriz complexa, o sinal analítico pode ser suprimido pelos outros componentes da amostra [3]. Em casos como esses, o sucesso da análise está condicionado ao uso de técnicas de preparo de amostras para promover a eliminação de impurezas (*clean up* amostral) e/ou pré-concentração do analito [4].

Nessa conjuntura, uma linha de pesquisa bastante recente tem proposto modificações na ionização por PS a fim de promover análises mais seletivas e sensíveis. Inserido neste contexto, este trabalho visa combinar a PS-MS com três técnicas de preparo de amostras: (i) extração assistida por campos elétricos (eletroextração); (ii) concentração evaporativa em um dispositivo de papel e; (iii) extração em fase sólida. Na primeira proposta, um dispositivo multipoços possibilitou promover a eletroextração de 66 amostras simultaneamente. A metodologia foi aplicada na extração e pré-concentração de cocaína e lidocaína em saliva artificial, de corante verde malaquita em água de torneira e de bisfenol A de vinho tinto. Na segunda proposta, os analitos foram pré-concentrados nas extremidades triangulares de um dispositivo de papel através da passagem de fluxo vertical de ar. A metodologia foi aplicada na identificação de corantes azo e triarilmetanos. Além disso, a concentração evaporativa em dispositivo de papel mostrou-se uma proposta viável para determinação colorimétrica de compostos cromóforos a partir de informações extraídas de imagens digitais. A metodologia foi aplicada na determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça a partir da reação com NaDDTC, que tem como produto a substância cromófora $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Por fim, na terceira proposta um sistema *headspace* com adsorção dos analitos pelo papel cromatográfico da PS, na forma livre e

impregnado em PDMS, foi desenvolvido para extrair compostos voláteis de amostras de cachaça e cervejas.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Associar a ionização por *paper spray* a técnicas de preparo de amostras para o desenvolvimento de métodos mais seletivos e sensíveis do que a PS-MS convencional.

2.2. Objetivos específicos

- Associar a eletroextração com a PS-MS.
- Avaliar o método de eletroextração associado à PS-MS para aplicações em amostras de interesse forense, ambiental e alimentício.
- Desenvolver um dispositivo de papel com formato e dimensão que permita associar a concentração evaporativa com a PS-MS.
- Avaliar o método que associa a concentração evaporativa com a PS-MS na determinação de substâncias cromóforas.
- Avaliar, através da técnica PS-MS, a eficiência do papel cromatográfico e do polidimetilsiloxano (PDMS) em sorver analitos voláteis de um sistema *headspace*.

Capítulo 2 - REVISÃO DA LITERATURA

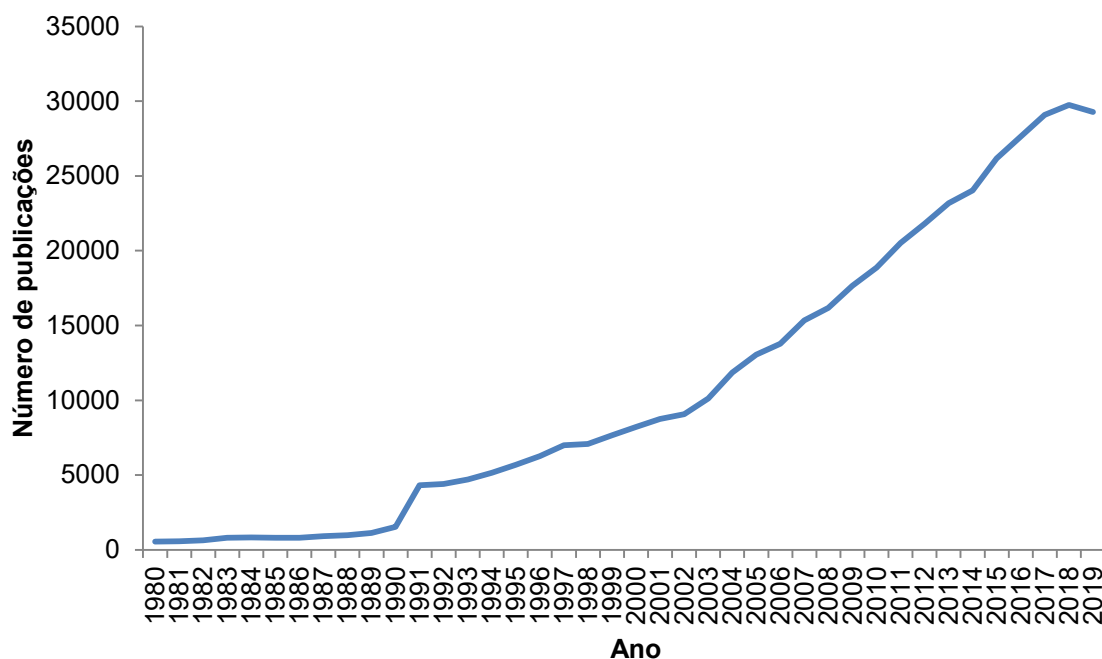
1. ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas (MS, do inglês *mass spectrometry*) é uma técnica analítica poderosa utilizada para identificar e caracterizar moléculas de amostras desconhecidas e quantificar compostos. A MS tem grande destaque entre os métodos espectrométricos de análise devido à sua alta sensibilidade, rapidez e pela vasta gama de analitos que podem ser determinados. Apresenta aplicabilidade em diversas áreas, tais como: química, farmácia, biologia, medicina, física dentre diversas outras [5].

Um espectrômetro de massas possui cinco componentes principais: (i) unidade de inserção de amostra; (ii) fonte de ionização, responsável por converter as moléculas da amostra em íons na fase gasosa; (iii) analisador de massas, onde os íons são separados de acordo com as respectivas m/z ; (iv) detector, onde os íons são “contados” e, por fim, um (v) sistema de aquisição de dados, que registra os sinais [5].

O crescimento e a consolidação da MS estiveram, em toda a sua história, condicionados principalmente ao desenvolvimento de novas técnicas de ionização. Nos primórdios da MS, a ionização de analitos em ambiente de alto vácuo foi a grande limitação da técnica. Por muitos anos a introdução da amostra no sistema de vácuo do espectrômetro de massas foi um grande desafio. A dificuldade de ionizar moléculas em solução e também espécies de alta massa molecular restringia a aplicabilidade da técnica a analitos gasosos de baixa massa molecular [5-7]. Em 1989, o desenvolvimento da ionização por *electrospray* (ESI, do inglês *electrospray ionization*), técnica de ionização à Pressão Atmosférica (IPA), proporcionou vantagens como: ionização de analitos diretamente de amostras líquidas de forma eficiente; ionização de pequenas e macromoléculas; interface ideal para a pressão atmosférica do ambiente da análise e o vácuo do interior do equipamento [8]. Além disso, a ESI se tornou uma interface ideal para o acoplamento da cromatografia líquida com a espectrometria de massas [9]. A Figura 2-1 apresenta o gráfico de número de publicações em espectrometria de massas em função do ano, construído através do banco de dados *Web of Science*, tópico pesquisado: “*mass spectrometry*” [10]. A partir de 1989, ano em que a ESI foi proposta, observa-se na curva do gráfico um degrau seguido de mudança na inclinação da reta, com significativo aumento do número de publicações por ano.

Figura 2-1: Número de publicações sobre a técnica espectrometria de massas em relação ao ano.



Fonte: Web of Science levantamento de citações [10]. Tópico pesquisado: “mass spectrometry”. Pesquisa realizada em 31/07/2021.

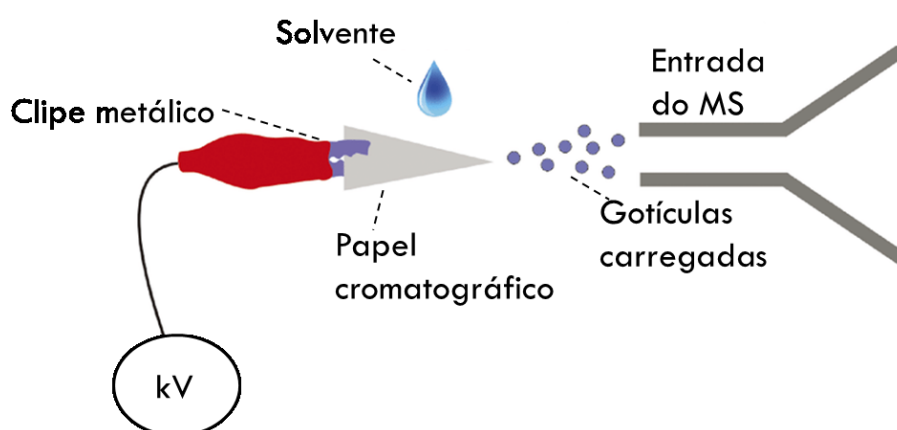
O gráfico da Figura 2-1 aponta também uma modificação na tendência a partir do ano de 2004, com significativo aumento do número de publicações por ano. Esse marco está relacionado ao desenvolvimento das primeiras técnicas de ionização ambiente: DESI [13], do inglês *Desorption Electrospray Ionization*, e DART [14], *Direct Analysis in Real Time*. A ionização ambiente possibilitou a geração de íons em ambiente externo ao espectrômetro [11], sem nenhum ou com mínimo preparo de amostra [12]. Após as primeiras propostas, houve um rápido desenvolvimento de novas fontes de ionização ambiente, dentre as quais podemos destacar a ionização por *paper spray* [1].

1.1. Ionização por *paper spray* (PS)

A *Paper Spray* (PS) é uma das mais recentes técnicas de ionização ambiente, proposta em 2009 por Wang *et al.* [15]. Ela tem ganhado destaque por sua instrumentação simples e de baixo custo, baixo consumo de amostra e de solvente, e nenhum consumo de gás de arraste [15], o que a torna ideal para análises *in loco* [16].

A PS utiliza de alta voltagem, na ordem de kV, aplicada sobre a base um papel triangular contendo o analito para inserir íons no espectrômetro de massas [1]. O processo consiste em colocar a amostra sobre um triângulo de papel cromatográfico, que é posicionado frente à entrada do espectrômetro de massas. Uma pequena quantidade – 10 a 50 μL – de solventes (ex: metanol ou misturas de metanol/água ou acetonitrila/água) é aplicada sobre o papel seguida da adição de uma alta voltagem em sua base. O solvente utilizado deve ser capaz de receber ou doar prótons (ácidos e bases de *Brönsted-Lowry*), favorecendo o processo de ionização que ocorre através de equilíbrios químicos estabelecidos entre moléculas de solvente e analitos. As moléculas carregadas são então arrastadas para a ponta do triângulo, onde a interface líquido/ar assume um formato cônico, denominado cone de Taylor [17]. Por fim, a dessolvatação dos íons ocorre de modo semelhante ao ESI, a tensão superficial desse cone é rompida e forma-se um *spray* de gotículas de solvente carregadas que adentram ao espectrômetro [2]. A Figura 2-2 ilustra o processo de ionização por *paper spray*.

Figura 2-2: Ilustração da ionização por *paper spray*.



Fonte: Adaptado de Meher, 2017 [18].

Ao entrar no espectrômetro de massas, as gotículas carregadas passam por um capilar aquecido. À medida que o solvente evapora, reduzem de tamanho e,

consequentemente, maior se torna a densidade de cargas. A força de repulsão entre as cargas aumenta até se igualar à tensão superficial do solvente da gotícula, que explode em diversas outras gotículas menores, processo conhecido como explosão coulômbica [19]. Esse processo se repete sucessivas vezes e o resultado é a formação de uma dispersão gasosa de íons, que é introduzida no analisador de massas [20].

Devido à pequena quantidade de solvente utilizado na PS, a utilização do gás inerte em contrafluxo, utilizado na ESI para favorecer a evaporação do solvente, é desnecessária. Isso torna a PS ideal para espectrômetros de massas em miniatura, utilizados comumente em análises *in loco* [1,21].

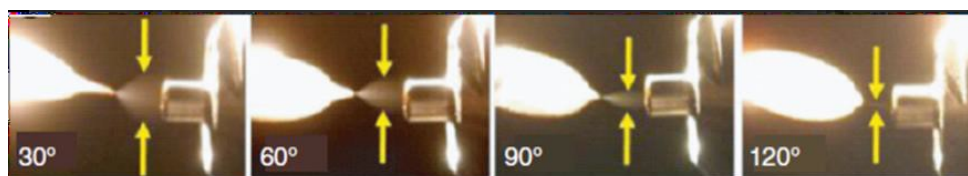
O sucesso de uma análise PS-MS está condicionado à otimização de alguns parâmetros, tais como o tipo do papel, ângulo da ponta do triângulo, seu posicionamento na entrada do espectrômetro, tipo e composição do solvente, voltagem aplicada na geração do *spray*, entre outros [22].

O material do substrato poroso é fundamental para eluição do analito carregado e formação do *spray*. O papel é formado por celulose e apresenta grupos hidroxilas em sua superfície, o que garante que o analito elua como em um processo cromatográfico. A velocidade de eluição adquirida por cada molécula depende de sua interação com a superfície do papel. Isto é, o papel age como um substrato capaz de: (i) separar os componentes de interesse de uma mistura e (ii) reter compostos da matriz, reduzindo significativamente efeitos de matriz. Esse fator é responsável pela boa capacidade da técnica em realizar análises de misturas e matrizes complexas. Logo, a escolha de um solvente com alta mobilidade sobre o papel e que seja capaz de interagir e arrastar o analito é de extrema importância [22,1].

Ainda no que se refere aos substratos, LIU et al. [1] estudaram a qualidade de espectros gerados durante a análise de medicamentos em sangue utilizando quatro tipos de papéis de filtro com diferentes porosidades (3, 4-7, 8 e 11 μm), papel cromatográfico e papel com fibras de vidro. A comparação entre as intensidades obtidas para o sinal do analito nos diferentes tipos de papéis apontou que o espectro gerado utilizando papel cromatográfico teve menor quantidade de sinais de *background* e maior intensidade sinal/ruído. Os piores resultados foram observados no espectro gerado pelo papel com fibras de vidro. Segundo os autores, a forte interação do analito com a sílica desfavoreceu a eluição dos compostos de interesse, o que não ocorreu com o papel [1]. Além disso, os autores discutem que os rigorosos processos de limpeza e produção do papel cromatográfico favorecem a obtenção de espectros mais limpos.

A angulação da ponta do triângulo também deve ser selecionada com critério. YANG e colaboradores [23] demonstraram que ela influencia diretamente na formação do *spray*. Os autores avaliaram os ângulos de 30°, 60°, 90°, 120° e 150°. A imagem do *spray* formado por cada um, na Figura 2-3, indica que quanto maior o ângulo, menor a dimensão do *spray*, menor a quantidade de íons que adentram o espectrômetro, e, conseqüentemente, menor intensidade do sinal analítico. Além disso, os autores mostraram que ângulos maiores necessitam de maior potencial elétrico para a formação do *spray*. O ângulo de 150°, por exemplo, necessitou de uma voltagem tão alta que gerou descargas elétricas no equipamento [23].

Figura 2-3: Amplitude do *spray* da PS observado para diferentes ângulos do vértice do papel: 30°, 60°, 90° e 120°. A formação de *spray* não foi observada em 150°.



Fonte: adaptado de Ouyang, 2010 [23].

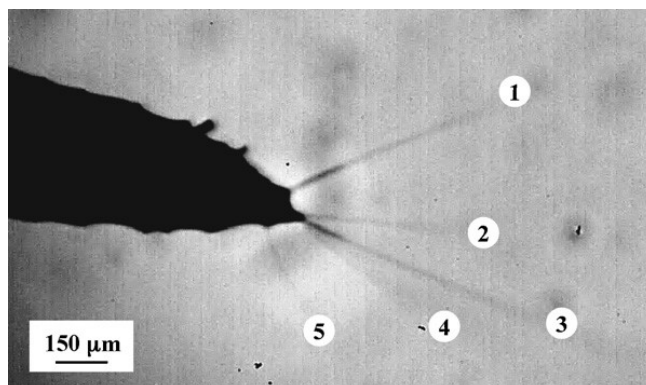
A distância da ponta do triângulo à entrada do espectrômetro também altera a qualidade do espectro gerado. Distâncias muito pequenas podem gerar aumento significativo da corrente, enquanto que distâncias maiores podem fazer com que grande quantidade de gotículas do *spray* não atinjam o espectrômetro de massas, inviabilizando a análise [1].

A voltagem de formação do *spray* também é um parâmetro importante que deve ser otimizado durante o desenvolvimento de um método PS-MS. Voltagens acima do ideal podem gerar altas descargas elétricas no equipamento e ocasionar danos. Já voltagens abaixo do valor ideal podem gerar um *spray* de gotículas sem força suficiente para atingir o equipamento, causando perda significativa dos compostos de interesse [1].

A composição do solvente da ionização é também um fator fundamental para o sucesso da análise. A Figura 2-4 apresenta uma fotografia do momento inicial da ionização por PS [24]. As condições de análise são: triângulo de papel de filtro, 10 µL de solvente MeOH:H₂O na proporção de 4/1 v/v e voltagem de 4,5 kV aplicada na base do papel. Observa-se claramente a formação de cinco jatos de *spray* próximos à ponta do triângulo, de acordo com a identificação numérica na imagem. Quando a viscosidade do solvente da ionização é aumentada, a maior tensão superficial do líquido dificulta ou até impede a formação dos jatos de *spray*. Testes realizados com

solução MeOH:H₂O 1/1 v/v apontou a redução de cinco para dois jatos de *sprays* e não houve formação de *sprays* quando utilizado água [24].

Figura 2-4: Imagem do momento inicial da ionização por PS. Condições de análise utilizadas: triângulo de papel de filtro, 10 µL de MeOH:H₂O 80/20 (v/v) e voltagem de formação do spray de 4,5 kV.



Fonte: Adaptado de Espy, 2012 [24].

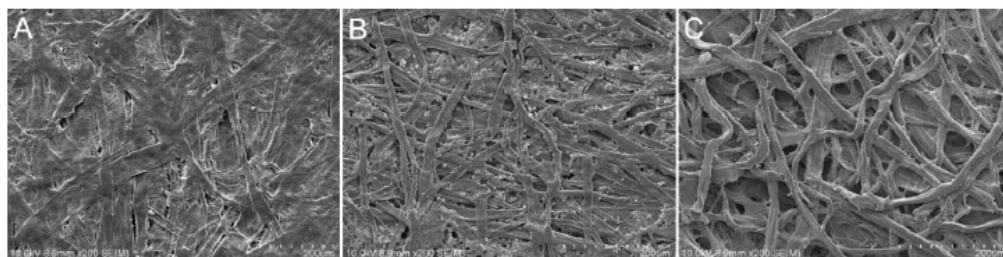
Além da composição do solvente, é importante avaliar se a quantidade de solvente utilizada é suficiente para manter o *spray* durante todo o período de aquisição do espectro. Tendo em vista que, na maioria dos processos de ionização por PS o solvente é adicionado apenas no momento inicial da análise, à medida que o processo de ionização ocorre o volume de solvente reduz. Estudos indicam que após cerca de 20 segundos do início da análise, é observada uma redução significativa no tamanho das gotículas que formam o *spray*. Esse fenômeno gera aumento da corrente instrumental e perda de estabilidade do sinal analítico [24].

1.2. Modificações na PS: recobrimentos no substrato poroso e/ou associação da PS a técnicas de preparo de amostras

Apesar do bom desempenho apresentado para análises de amostras complexas, a PS também sofre efeitos de matriz, principalmente de supressão do sinal do analito quando o composto de interesse está presente em uma matriz complexa e em baixas concentrações [3]. No que se refere a matrizes complexas, temos como exemplo: amostras forenses, clínicas, ambientais, dentre outras. Nessa conjuntura, linhas de pesquisas têm buscado meios para aumentar a sensibilidade da técnica. Para isso, modificações na superfície do papel utilizado como substrato na ionização, alterando sua interação com o analito, e combinações da PS-MS com técnicas rápidas de preparo de amostra têm sido propostas.

A interação do substrato poroso com a matriz tem grande impacto na difusão da amostra no papel, na geração do *spray* e conseqüentemente no espectro gerado na análise. Já descrito anteriormente, LIU e colaboradores (2010) mostraram que o papel cromatográfico apresenta melhor eluição do analito e conseqüentemente, maior intensidade sinal/ruído [1]. Han e colaboradores [25] demonstraram a importância da orientação dos microcanais de celulose na formação do *spray* quando avaliaram papel de filtro qualitativo, papel comum de impressora e de pesagem na detecção de citocromo em gel. Nos espectros obtidos utilizando papel de filtro foram observados sinais do analito de $[M + 8H]^{8+}$ até $[M + 13H]^{13+}$, enquanto que nos papéis de impressora e de pesagem, o sinal do analito não foi observado. Segundo os autores, apesar de os três tipos de papéis serem de celulose, o papel de filtro é o mais poroso (Figura 2-5). Essa propriedade favorece a migração das proteínas sobre a rede de microcanais de celulose. Além disso, a orientação dos poros no papel de filtro gera espaços para retenção de maior quantidade de solvente que os demais papéis (Figura 2-5 C), mantendo os sinais do espectro estáveis e intensos durante toda a análise [25].

Figura 2-5: Imagem de microscópio eletrônico de varredura de (A) papel de pesagem, (B) papel de impressora e (C) papel filtro qualitativo.



Fonte: adaptado de Han, 2015 [25].

A literatura aponta que o trabalho pioneiro em recobrir o papel para modificar a interação entre a amostra e a superfície do substrato foi desenvolvido em 2011 por Zhang e colaboradores [26]. No referido trabalho, os autores utilizaram papel cromatográfico comercial recoberto por sílica para determinação de drogas terapêuticas em manchas secas de sangue. O papel recoberto com sílica apresentou elevada eficiência para os analitos estudados, com sensibilidade de 5 a 50 vezes maior que os resultados obtidos com papel cromatográfico não recoberto. Segundo os autores, o aumento de sensibilidade foi promovido porque a sílica, diferentemente do papel cromatográfico, não adsorve o sangue, deixando-o disposto na sua superfície até secar. Dessa forma, o analito fica mais disponível e o processo de eluição, que ocorre durante a ionização por PS-MS, torna-se mais eficiente [26].

Ainda no que se refere ao recobrimento do substrato da ionização por *paper spray*, pesquisadores propuseram a modificação do papel da PS-MS por nanotubos de carbono para análise de proteínas em gel [25]. O recobrimento fez com que o substrato da ionização adquirisse características de nanomateriais, tais como: maior área de superfície, menor tamanho de poro e condutividade aprimorada. A maior área superficial aliada ao menor tamanho de poro aumentaram a capacidade de o material adsorver possíveis interferentes presentes na matriz amostral, reduzindo efeitos de matriz. Além disso, a maior condutividade do nanotubo favoreceu os processos de extração e eluição das proteínas durante a ionização. O recobrimento promoveu aumento da sensibilidade da técnica quando comparado com a PS-MS convencional [25].

Vidro também foi utilizado para modificar o papel da ionização por PS-MS [27]. No referido trabalho, a fibra de vidro foi utilizada como filtro para capturar agentes de guerra aerolizados do ar, dentre eles trimetil fosfato, metilfosfonato de dimetilo e metilfosfonato de diisopropil. Apesar de apresentar espectros parecidos com os obtidos por PS-MS convencional, os resultados mostraram que a fibra de vidro apresentou eficiência 40% maior na captura dos analitos do que o papel [27]. Em uma

proposta mais recente foi utilizado substrato de vidro modificado por estrutura metal-orgânica (*Metal Organic Framework* - MOFs) para analisar os mesmos analitos. A alta volatilidade dos agentes de guerra dificulta a análise por PS-MS, pois esses compostos não são retidos pela celulose. Em contrapartida, os microporos dos MOF's interagem fortemente com os analitos, retardando o processo de dessorção e aumentando o tempo em que o analito é detectado no espectro de massas [28].

Ureia também foi utilizada para modificar a superfície do papel da PS-MS [29] e, dessa forma, alterar a interação do substrato com o analito. Como a uréia é um excelente receptor de ânions, os autores do trabalho mostraram que o papel modificado adsorveu com eficiência ânions, tais como halogênios, sulfatos, fosfatos e nitratos, presentes em matrizes como urina e extrato da planta Ginkgo Biloba. Observou-se vantagens como: redução de efeitos de supressão iônica, diminuição da descarga elétrica do equipamento e melhora na sensibilidade da técnica em modo de ionização negativo. Aumentos na intensidade sinal/ruído de 2 a 109 vezes foram obtidos para determinação de ácido salicílico em urina e terpenos lactonas no extrato da Ginkgo Biloba [29].

Pereira e colaboradores propuseram, em 2017, o uso de polímeros molecularmente impressos (MIPs, do inglês *Molecularly Imprinted Polymers*) para maior seletividade e sensibilidade da técnica PS-MS [30,31]. MIPs são materiais que apresentam cavidades com afinidade específica a uma determinada classe de moléculas. Os autores sintetizaram o polímero diretamente sobre a membrana de celulose do papel e o aplicaram na análise de herbicidas em extratos de maçã, banana e uva [30]. O preparo da amostra consistiu em homogeneizar as frutas utilizando um liquidificador, em seguida adicionar metanol e, por último, filtrar a mistura em um sistema de filtração a vácuo. O papel modificado com o MIP foi colocado em contato com o extrato para "sequestrar" o analito. Em seguida, após seco, o substrato foi lavado com água deionizada para remoção da matriz. A análise foi realizada de forma similar à PS-MS convencional. Os resultados obtidos pelo MIP *spray* apresentaram sinais analíticos com intensidades mais elevadas do que os resultados obtidos utilizando papel recoberto por polímeros não impressos (NIPs, do inglês *non-imprinted polymers*). Em uma proposta mais recente, o MIP *spray* foi utilizado na determinação de cocaína em fluido oral [31]. Valores de 0,27 ng mL⁻¹ e 0,81 ng mL⁻¹ foram obtidos para LD e LQ, respectivamente. Quando comparado com espectros obtidos por PS-MS convencional, o MIP *spray* promoveu aumento de cerca de três vezes na intensidade do sinal analítico [31].

Nessa mesma linha, em 2019, Zargar e colaboradores [32] utilizaram grafite modificado por polímero molecularmente impresso como substrato da PS. Segundo os

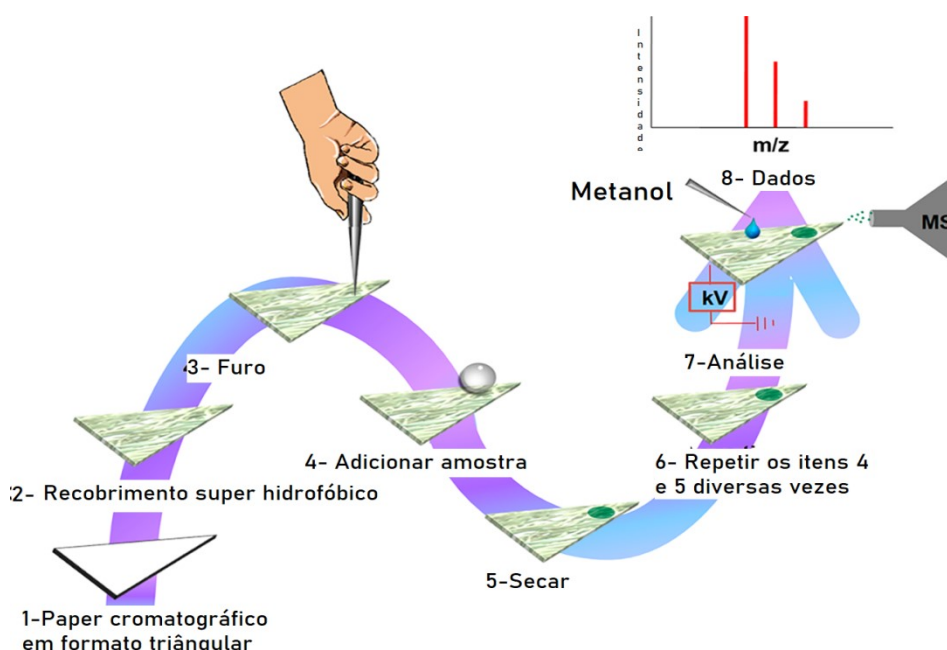
autores, a maior condutividade do grafite em relação aos demais substratos utilizados em modificações molecularmente impressas (como papel, madeira e fibras de vidro) facilitou significativamente o depósito do polímero na superfície. A modificação garantiu uma extração seletiva do pesticida propoxur em amostras de água. [32]. Ainda no que se referem a estudos envolvendo polímeros, Borges e coautores [33] modificaram a superfície do papel cromatográfico com polímeros condutores (polianilina, polipirrol e mistura desses dois polímeros) para analisar uma vasta diversidade de analitos forenses, tais como benzodiazepínicos, medicamentos e hormônios. Os resultados indicaram que o método proposto é mais sensível que o método convencional, que utiliza substrato de papel cromatográfico sem revestimento. O polímero condutor gerou campos elétricos elevados e sinais bastante estáveis [33].

Wei e colaboradores [4] utilizaram o óxido de grafeno modificado por membrana de nylon (GOM, do inglês *Graphene Oxide Membrane*) para extrair o corante verde malaquita de tecidos de peixes. O GOM, sintetizado através do depósito de um filme de óxido de grafeno sobre uma membrana de nylon triangular, foi utilizado como substrato para a ionização. O método foi denominado pelos autores de *GOM spray mass spectrometry*. Inicialmente o GOM foi colocado em contato com extratos de carne de peixe dopados com o analito. Na sequência, o substrato foi lavado com água deionizada e posteriormente posicionado em frente ao espectrômetro de massas para análise PS-MS. Resultados mostraram eficiência de extração próxima a 98% do analito. Além disso, o uso do corante hidrocloreto de rosanilina como padrão interno permitiu a quantificação do verde malaquita e de seu metabólito, verde leucomalaquita [4].

Politetrafluoretileno (PTFE), substância conhecida popularmente como teflon, em formato triangular também foi utilizado como substrato para ionização por PS [34]. Por ser altamente hidrofóbico, o teflon mantém os analitos em sua superfície, sem dispersá-los, reduzindo possíveis perdas. Em contrapartida, a alta capacidade isolante do material impede o transporte dos íons e a formação do *spray* da PS. Para contornar esse problema, um fio de ouro foi inserido da base até o vértice do triângulo e a voltagem foi aplicada pontualmente na base desse fio. O teflon *spray* foi aplicado na análise de metabólitos, drogas, peptídeos e proteínas em fluidos biológicos. Os espectros obtidos apresentaram alta razão sinal-ruído e permitiu a detecção dos analitos em baixos níveis de concentrações (ng mL^{-1}) [34]. Outra proposta que também utilizou substrato com superfície hidrofóbica, recobriu o papel com uma substância denominada pelos autores de 'super hidrofóbica', sintetizada a partir de diferentes silanos funcionalizados [35]. Um pequeno "defeito" nessa superfície foi feito próximo à ponta do triângulo. Assim que depositada no substrato, a amostra é automaticamente

direcionada para essa região. Após seca, sucessivas adições da amostra seguidas de secagem são realizadas, como mostra o diagrama da Figura 2-6. A localização pontual do analito no substrato gera um ponto de pré-concentração. O método promoveu significativo aumento na intensidade do sinal do analito no espectro, no caso, melamina em amostras de leite [35].

Figura 2-6: Representação esquemática do método de espectrometria de massas com ionização por paper spray e pré-concentração em sistema superhidrofóbico.



Fonte: adaptado de Basuri, 2019 [35].

No que se refere ao acoplamento de técnicas de preparo de amostra com a PS-MS, uma das primeiras propostas descritas na literatura foi o uso de cartuchos de extração em fase sólida de forma integrada à PS-MS [3]. O cartucho promove extração e pré-concentração do analito. Como consequência, a PS-MS torna-se menos susceptível a efeitos de matriz. O método promoveu aumento nos limites de detecção de 14 a 70 vezes para análise de drogas em plasma, quando comparados com a análise convencional por PS-MS [3].

A microextração por fase líquida (LPME, do inglês *Liquid-Phase Microextraction*) também foi utilizada para enriquecimento do sinal analítico da PS-MS [36]. Os analitos foram extraídos da amostra e pré-concentrados em uma gota de 2 μL de xileno. Comparando os dados obtidos com resultados da PS-MS convencional, sem preparo de amostras, houve aumento de sensibilidade de 100 a 700 vezes para

detecção de verde malaquita, violeta de metila e seus metabólitos em água de lagos. Limites de detecção de 2,2 a 3,1 e limites de quantificação de 6,5 a 13,7 ng L⁻¹ foram obtidos para o método proposto [36].

Deng e coautores (2016) acoplaram a microextração por '*slμg flow*' com a PS-MS para análise de traços de antibióticos (a saber: eritromicina, claritromicina, roxitromicina e d7-roxitromicina) em sangue e leite e de ácido perfluorooctanossulfônico e perfluorooctanóico em fluidos corpóreos [37]. Para a extração, uma pequena quantidade da amostra foi inserida em um capilar de vidro, seguido da adição de uma pequena quantidade de solvente orgânico, otimizado em acetato de etila. O capilar foi então submetido a movimentos circulares lentos de forma a favorecer a migração do analito para a fase orgânica. Em seguida, o solvente orgânico foi transferido para o papel e submetido à análise por PS-MS. O método obteve alta sensibilidade e boa precisão para quantificação de analitos em baixas concentrações presentes em matrizes complexas [37].

Em uma proposta de 2020, a microextração supramolecular foi associada à PS-MS para análise simultânea de quatro antidepressivos tricíclicos em urina [38]. Micelas reversas foram geradas na solução contendo a amostra através da adição de um solvente supramolecular, neste caso formado por moléculas de 1-decanol dispersas em tetrahidrofurano e água. Os analitos foram pré-concentrados e extraídos da matriz da amostra através das interações hidrofóbicas estabelecidas entre as moléculas de interesse e a cadeia orgânica do surfactante. O aglomerado de micelas imiscíveis na fase aquosa formou uma separação de fases com uma fase rica em analito e outra rica em solvente aquoso. Fatores de concentrações acima de 70 foram observados para os analitos de interesse [38].

Os trabalhos apresentados neste capítulo indicam que associar a PS-MS a técnicas de preparo de amostra e/ou modificar a superfície do substrato da ionização são alternativas viáveis para o desenvolvimento de métodos mais sensíveis e seletivos que a PS-MS convencional.

Capítulo 3 – ESPECTROMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR PAPER SPRAY ASSOCIADA À TÉCNICA DE PREPARO DE AMOSTRA POR ELETROEXTRAÇÃO

2. ELETROEXTRAÇÃO

A Eletroextração (EE) é uma técnica de preparo de amostras que emprega campos elétricos em uma ou mais etapas para separação de compostos iônicos, obtenção de *cleanup* e pré-concentração do analito [39-41]. Ela é caracterizada pela aplicação de campo elétrico em um sistema bifásico, em que uma fase é aquosa e a outra é orgânica. O limite entre as fases age como uma barreira física. Quando o potencial elétrico é menor do que o necessário para o deslocamento do analito, as moléculas permanecem na fase que possuem maior afinidade. Uma vez que a força do campo é otimizada, os íons atravessam o limite entre as fases e migram rapidamente da fase doadora - que continha o íon inicialmente - para a aceptora - que recebe os íons durante o processo - de acordo com suas cargas e com o sentido do campo [42-44]. Em razão de que apenas moléculas carregadas são suscetíveis à aplicação de campos elétricos, a EE é uma técnica seletiva a íons e/ou moléculas ionizáveis (que apresentam sítios ácidos e básicos) [41], característica que a torna ideal para combinar com a espectrometria de massas.

A EE foi desenvolvida como técnica de purificação e teve sua aplicação consolidada na engenharia química. Na década de 90, ela foi adaptada pela primeira vez para uso na química analítica com o objetivo de transferir analitos de uma fase orgânica para uma fase aquosa [44-46].

Nos anos 2000 a extração por eletromembrana foi proposta, introduzindo o conceito de extração trifásica. Os analitos migram de uma fase aquosa, atravessam uma camada de solvente orgânico localizada nos poros da membrana e são retidos em uma terceira fase também aquosa [46,47].

Em 2013, um método mais simples de eletroextração trifásica (líquido-líquido-líquido) foi proposto por Raterink e colaboradores [48]. O sistema, desenvolvido em um microtubo de polipropileno consistiu em: uma camada de fase doadora aquosa líquida (amostra); uma camada de solvente orgânico imiscível; e uma fase aceptora aquosa suspensa na fase orgânica por uma ponteira de micropipeta. As três fases foram dispostas de acordo com a Figura 3-1. A fase orgânica age como uma barreira física entre as fases doadora e aceptora. Um fio de platina inserido no microtubo serve como eletrodo inferior e a ponta da pipeta, feita de material condutor, tem a função de contra eletrodo. A aplicação de campo elétrico entre os eletrodos inferior e superior promove a migração eletroforética seletiva de moléculas carregadas do analito

(acilcarnitinas, no trabalho em questão) da fase doadora para a fase aceptora (aquosa), onde são retidas e, em sequência, identificadas por nano-ESI-MS [48].

Figura 3-1: Ilustração da eletroextração trifásica proposta por Raterink [48]



Fonte: adaptado de Raterink, 2013 [48].

No trabalho mencionado, os autores destacaram a importância de otimizar a composição da fase orgânica, uma vez que propriedades tais como condutividade e viscosidade afetam diretamente o processo de extração. Além disso, como a resistência associada a essa fase é a maior do sistema, o filtro pode limitar a passagem da corrente elétrica e comprometer o processo de extração [48].

Uma abordagem mais recente desenvolvida em 2019 no Departamento de Química (DQ) da UFMG envolveu um dispositivo multipoços para promover a eletroextração de 66 amostras simultaneamente [49]. No trabalho, um parafuso inoxidável foi acoplado na parte inferior de microtubos de polipropileno para funcionar como eletrodo, como ilustrado na Figura 3-2. O microtubo, com volume de 2 mL, foi preenchido com 1 mL da amostra (fase doadora) e 1 mL da fase orgânica. Para suportar a fase aceptora, cones odontológicos de celulose foram suspensos na fase orgânica. A montagem do dispositivo multipoços, que foi construído utilizando materiais de baixo custo, envolveu o uso de um suporte para microtubos de polipropileno, sem o fundo de cada poço, disposto sobre uma placa metálica (Figura 3-3). Acima desse conjunto, posicionou-se uma placa de suporte para os cones odontológicos, constituída de material metálico condutor, a qual apresenta movimento vertical para ajuste de altura (Figura 3-3). Para promover a extração, tanto a placa metálica superior quanto a inferior do dispositivo apresentam contato elétrico para conexão com uma fonte de alta tensão de potencial elétrico ajustável de corrente contínua (fonte de eletroforese) [49].

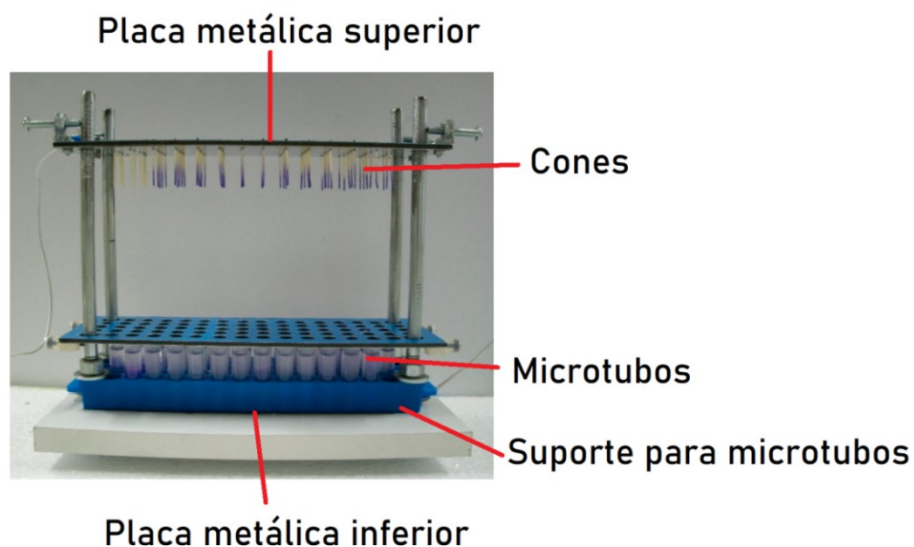
Figura 3-2: Microtubo de polipropileno modificado com parafuso de aço inoxidável para extração multifases com aplicação de campos elétricos.



Fonte: adaptado de Orlando, 2019 [49].

A Figura 3-3 apresenta também a efetividade do processo de eletroextração. Os cones foram mergulhados na fase orgânica do microtubo para extração de corante violeta de metila presente na fase doadora. Nos cones à esquerda, sem coloração azul, não foi aplicado campo elétrico entre os eletrodos. A ausência do pigmento azul indica que não ocorreu a extração. Por outro lado, os cones à direita, com coloração azul, representam o resultado obtido após aplicação de campo elétrico entre as placas. A cor azul, típica do corante de interesse, indica transferência e pré-concentração nas pontas dos cones [49].

Figura 3-3: Dispositivo multipoços para eletroextração multifases com cones de papel posicionados sobre uma placa suporte. As três fileiras de cones à esquerda mostram que não há extração de analito (corante violeta de metila) sem a aplicação de potencial elétrico; as demais fileiras, com os cones em azul, apontam a extração com a aplicação de potencial elétrico.



Fonte: adaptado de Orlando, 2019 [49].

O sistema foi aplicado na extração de corantes em carne de peixe com detecção por imagens digitais [49] e também de cocaína em saliva com detecção por LC-MS/MS [50]. Previamente à análise por LC-MS/MS, foi necessário realizar a dessorção dos analitos para transferi-los do cone para uma solução que pudesse ser injetada no cromatógrafo [50].

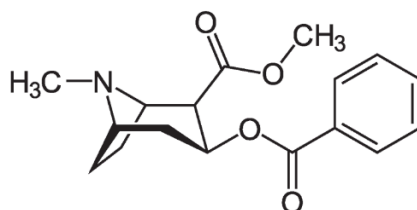
Os resultados mostraram que a alta seletividade da técnica contribuiu para eliminar efeitos de matriz. Além disso, a alta eficiência do processo de extração proporcionou o desenvolvimento de métodos com baixos limites de detecção [49,50].

Nesta tese, o sistema multipoços de eletroextração foi adaptado para que o papel cromatográfico recortado em formato triangular substituísse o cone odontológico da fase aceptora. Dessa maneira, após a eletroextração, o papel pode ser levado diretamente ao espectrômetro de massas para análise por PS-MS. Integrar a EE com a PS-MS possibilita eliminar a etapa de dessorção e, conseqüentemente, reduzir o tempo e o consumo de reagentes empregados na etapa de preparo de amostras. Denominou-se esta técnica de Eletroextração integrada à Espectrometria de Massas com Ionização por *Paper Spray* (EE-PS-MS). Esse trabalho foi publicado recentemente no periódico *Analyst* [51].

1. COCAÍNA E LIDOCAÍNA EM AMOSTRAS BIOLÓGICAS

A cocaína, de estrutura química apresentada na Figura 3-4, é um composto de caráter básico ($pK_a = 8,6$) extraído da *Erythroxylon coca*, uma planta nativa de florestas tropicais da América do Sul. Devido a sua alta capacidade de causar dependência psíquica, é considerada uma droga ilícita e atualmente está entre as drogas de abuso mais consumidas no mundo. No Brasil, a fiscalização, prevenção, e a repressão ao uso e ao tráfico desse tipo de droga são regulamentadas pela Lei nº 11343, de 23 de agosto de 2006 [52-55].

Figura 3-4: Estrutura da cocaína.

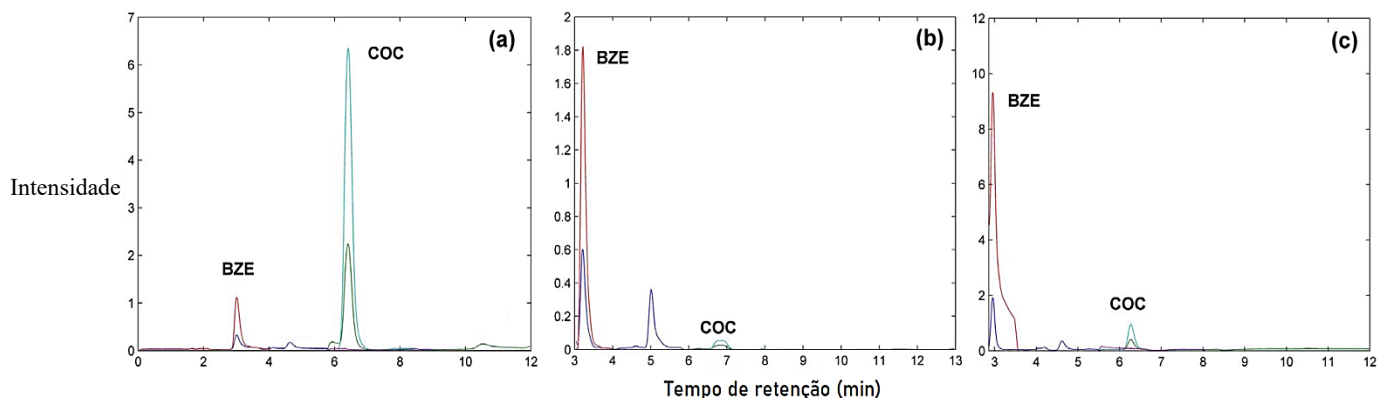


No corpo humano, a cocaína (COC) age como um estimulante do sistema nervoso central, inibindo o transportador de dopamina e aumentando a concentração da noradrenalina e serotonina na sinapse - região localizada entre os neurônios e onde agem os neurotransmissores. A euforia gerada nesse processo é um dos principais efeitos responsáveis pela sua capacidade de causar dependência [53-55].

A identificação de usuários de drogas ilícitas se dá através de estudos que procuram identificar a presença da droga e de seus metabólitos em fluidos biológicos [54]. As amostras biológicas de mais fácil acesso aos analistas são aquelas obtidas de forma não invasiva, tais como fluidos orais e urina [56,57].

Estudos de identificação de drogas ilícitas em fluidos biológicos indicam que a maior concentração de cocaína, em sua forma não metabolizada, é encontrada na saliva [20]. A Figura 3-5 apresenta cromatogramas obtidos por LC-MS de (a) fluido oral, (b) urina e (c) plasma provenientes de um usuário de cocaína [58]. O cromatograma (a) mostra a predominância de COC no fluido oral. Em contraste, na urina e no plasma, cromatogramas (b) e (c), há predominância da forma metabolizada, benzoilecgonina (BZE) [58].

Figura 3-5: Cromatogramas obtidos por LC-MS de (a) fluido oral, (b) urina e (c) plasma recolhidos de usuário de cocaína.



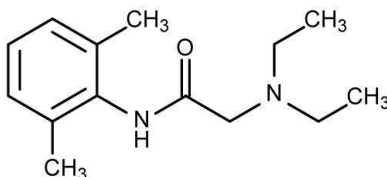
Fonte: Adaptada de Fiorentin, 2017 [58].

Em relação à faixa de concentração de COC encontrada em fluidos orais, Fiorentin e colaboradores analisaram 124 amostras de saliva de usuários de drogas por LC-MS e detectaram cocaína em 75% dos casos, com concentração média de $38,8 \pm 69,6 \text{ ng mL}^{-1}$ [58]. Em trabalho apresentado na literatura, Malaca e colaboradores quantificaram por UHPLC-MS/MS uma concentração de $35,1 \text{ ng mL}^{-1}$ de cocaína em uma amostra recolhida de usuário [59].

A cocaína é comercializada ilegalmente na forma cristalizada/pó (cloridrato de cocaína) ou misturada a bicarbonato de sódio ou amônia para adquirir forma de pequenas pedras (crack). Enquanto a *vía* de uso da forma cristalizada é por aspiração, as pedras de crack são fumadas em cachimbos [60]. A maioria das amostras de cocaína apreendida pela polícia contém adulterantes que são adicionados com a intenção de aumentar o volume do produto, ampliando assim a rentabilidade [61]. Substâncias como trigo, ácido bórico, glicose, sacarose e bicarbonato de sódio são as principais utilizadas. Além disso, a fim de mascarar a fraude, compostos anestésicos e/ou estimulantes, que “imitam” os efeitos psicoativos da cocaína, são adicionados à mistura. Como exemplos têm-se a cafeína, levamisol, fenacetina, benzocaína e lidocaína [60-62]. No Brasil, todos os produtos químicos passíveis de utilização como insumos na elaboração de substâncias entorpecentes, psicotrópicas ou que determinem dependência física ou psíquica são controlados e fiscalizados desde 2001 através da lei nº 10.357 [63].

A lidocaína, 2-(dietilamino)-N-(2,6-dimetilfenil) acetamido, de estrutura química apresentada na Figura 3-6, é utilizada na medicina como um anestésico local. Apesar de sua baixa toxicidade, em altas concentrações no organismo pode causar alterações nos batimentos cardíacos e na pressão arterial [64].

Figura 3-6: Estrutura da lidocaína.



A literatura apresenta diversos trabalhos que utilizam a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* para detecção e quantificação de cocaína e seus principais adulterantes em matrizes diversas. A Tabela 3-1 apresenta alguns desses trabalhos no que se refere aos analitos estudados, à matriz da amostra, aos limites de quantificação (LQ) e detecção (LD) obtidos para a cocaína e, quando utilizado, o preparo de amostra e/ou modificação realizada na técnica.

Tabela 3-1: Trabalhos descritos na literatura empregando PS-MS na análise de cocaína e seus adulterantes com interesse forense.

Ano	Analitos	Matriz da amostra	LQ / LD cocaína	Preparo de amostra e/ou modificações na análise PS-MS	Ref
2014	Cocaína, anfetamina, metanfetamina, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA), 3,4-metilenodiox-N-metilanfetamina, (MDMA), 3,4-metilenodiox-N-etilanfetamina (MDEA), morfina e Δ 9-tetrahydrocannabinol (THC))	Sangue	1,0 / 0,05 ng mL ⁻¹	Extração dos analitos de uma mancha de sangue seco: uma tira de papel de filtro contendo uma pequena quantidade de sangue seco foi inserida em um capilar de nanospray. Em seguida, adicionou-se solvente de elevada afinidade aos compostos de interesse para extração e formação do spray da ionização por PS.	[65]
2014	Cocaína	Superfícies (vidro, mármore, pele, madeira e unhas)	- / 2 µg mL ⁻¹	Os resíduos de cocaína foram diretamente extraídos das superfícies pelo substrato (papel triangular) da ionização por PS.	[66]
2015	Cocaína	trigo, farinha, ácido bórico e bicarbonato de sódio, lidocaína e cafeína	- / 0,05 % m/m	Uma massa da amostra foi solubilizada em metanol e, o extrato obtido foi analisado por PS-MS.	[61]
2016	cocaina, cafeína, benzocaína, lidocaína e fenacetina	Mistura de todos analitos	- / 0,5 mg mL ⁻¹	Separação prévia do analito por cromatografia em camada delgada. O analito foi revelado em câmara de luz ultravioleta, ressuspenso em MeOH e, por fim, o extrato foi analisado por PS-MS.	[62]
2017	cocaina, levamisol, cafeína, lidocaína e fenacetina	Mistura de todos analitos	- / 6,51 mg mL ⁻¹	Separação prévia do analito por cromatografia em papel. O reagente de Dragendorff, usado em testes colorimétricos para a detecção de alcalóides, foi utilizado como agente revelador. Os pontos revelados foram recortados e analisados por PS-MS.	[60]
2017	cocaína, 3,4-metilenodioxianfetamina (MDA),	Selos de 25I-NBOMe	3,34 / 1,0 ng mL ⁻¹	O selo de 25I-NBOMe foi utilizado como substrato	[67]

	3,4-metilenodioxo-N-metilanfetamina (MDMA), 3,4-metilenodioxo-N-etilamfetamina (MDEA), meta-clorofenilpiperazina (m-CPP), metanfetamina (MA), dietilamida do ácido lisérgico (LSD) e dimetoxibroanfetamina (DOB)	(papél mata-borrão), folha de <i>Cannabis sativa</i>		da PS. Extrato da folha de <i>Cannabis sativa</i> em acetoneitrila foi seco sobre o papel e em seguida, analisado utilizando acetoneitrila como solvente da ionização por PS.	
2017	Cocaína	Fluido oral	1,0 / 0,17 ng mL ⁻¹	Papel modificado com polímero molecularmente impresso por substrato para cocaína.	[31]
2018	cocaína, benzoilecgonina, amfetamina e metanfetamina	Sangue	1,7 / 1,0 ng mL ⁻¹	Uso de papel hidrofóbico (superfície modificada por tricloro (3,3,3-trifluoropropil)silano)	[68]
2019	Cocaína e diazepam	Amostras de sangue seco	-	A ionização foi realizada diretamente no fio de tecido (hidrofobicamente modificado) em que o sangue secou.	[69]
2019	Cocaína e mais 29 drogas de abuso das classes dos opióides, benzodiazepinas, derivados de fentanil, metanfetaminas, metilenodioxifenetilaminas substituídas, catinonas, antidepressivos e antipsicóticos	Fluido oral	1,30 / 0,39 ng mL ⁻¹	A ionização foi realizada diretamente nos swabs utilizados na coleta da amostra.	[57]
2020	Cocaína, anfetamina, benzoilecgonina, morfina, cetamina, MDMA, metanfetamina, 6-acetilmorfina	Urina	- / 50 ng mL ⁻¹	A análise foi realizada <i>in loco</i> utilizando um espectrômetro de massas miniatura.	[70]
2020	Cocaína	Urina	5,16 / 17,21 ng mL ⁻¹	O substrato da ionização por PS foi substituído por um capilar de polipropileno, a técnica foi intitulada <i>Fiber spray ionization mass spectrometry (FSI-MS)</i> .	[71]
2021	Cocaína e lidocaína	Saliva sintética	- / 3,1 µg L ⁻¹	Os analitos foram extraídos da amostra por prepare de amostra por eletroextração.	[51]

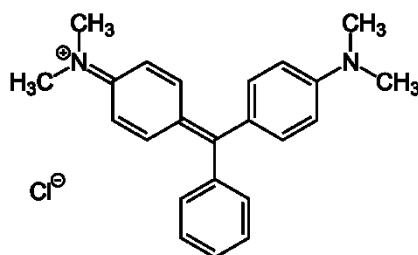
Observa-se através da Tabela 3-1 que, com o passar dos anos, propostas de modificação na ionização por PS foram apresentadas, as quais reduziram significativamente os limites de detecção e quantificação dos métodos.

Neste trabalho, um método que utiliza preparo de amostra por eletroextração e análise por PS-MS foi desenvolvido para detecção e quantificação simultânea de cocaína e lidocaína em amostras de saliva sintética.

2. CORANTE VERDE MALAQUITA EM AMOSTRAS AMBIENTAIS

Corantes triarilmetano são moléculas orgânicas sintéticas com estruturas contendo três grupos fenil centrais. Por apresentarem tonalidades fortes e vivas, essas moléculas são amplamente utilizadas nas indústrias farmacêutica, têxtil e alimentícia. O corante verde malaquita (*malachite green*, MG), de estrutura molecular apresentada na Figura 3-7 e nome IUPAC 4 - [(4-dimetilaminofenil) -fenil-metil] -N, N-dimetil-anilina, é comumente encontrado na forma de sais de cloreto, e em solução aquosa dissocia em Cl^- e M^+ . O MG é um triarilmetano com aplicações que não se restringem a colorante: ele é amplamente utilizado na piscicultura como antifúngico no tratamento e prevenção de infecções em peixes [72-75].

Figura 3-7: Estrutura do corante verde malaquita



Em solução aquosa, o MG é rapidamente absorvido pelos tecidos dos peixes. Metabólitos altamente estáveis permanecem retidos no organismo desses animais por longos períodos [76]. A ingestão de produtos provenientes da aquicultura é a principal via de acesso do MG e seus metabólitos ao corpo humano.

O MG e seus metabólitos são mutagênicos, carcinogênicos e teratogênicos ao organismo dos seres vivos [73,76]. Ainda, além de problemas relacionados à saúde, o MG é um contaminante ambientalmente persistente [75,77].

Tendo em vista os problemas ambientais e de saúde desencadeados pelo uso do MG, agências reguladoras de diversos países, tais como Brasil, China, Estados Unidos e países da União Europeia, proibiram o uso do corante na aquicultura [4,78]. Ainda assim, devido ao baixo custo, fácil manuseio e alta eficiência como antifúngico, o MG continua sendo utilizado ilegalmente em pisciculturas por todo o mundo [77].

No que se refere ao controle de alimentos provenientes da aquicultura, a União Europeia regulamenta a sensibilidade mínima exigida para testes regulatórios - para a soma de MG e verde leucomalachita (seu principal metabólito) - em $2 \mu\text{g kg}^{-1}$ [79]. Enquanto o órgão estadunidense *Food and Drug Administration* (FDA) é ainda mais

rigoroso, exige sensibilidade mínima de $1 \mu\text{g kg}^{-1}$ [80]. Entretanto, não há controle estabelecido para determinação dessas substâncias em águas.

A necessidade de identificar atividades ilegais relacionadas ao uso do MG, aliada à crescente preocupação com a preservação ambiental, torna necessário o desenvolvimento de métodos analíticos para detecção do corante. Levando-se em conta a baixa sensibilidade exigida a métodos de detecção de MG e seus metabólitos, etapas de preparo amostral com a finalidade de extrair e/ou pré-concentrar o analito são necessárias. Dentre as técnicas de preparo de amostras mais utilizadas têm-se a extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid phase extraction*) [81], extração líquido-líquido e QuEChERS [79,82] associadas à cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas [77,80].

Métodos que utilizam a PS-MS para a determinação de MG e verde leucomalachita em águas de lago [36], de criação de peixes [83], e em tecidos do animal [4] foram propostos. Na análise de tecidos, [4] carne de carpas criadas em ambiente contendo MG passaram por sucessivas etapas de preparo a fim de se obter um extrato contendo o analito. Inicialmente, a amostra foi homogeneizada e, em seguida adicionou-se uma solução extratora composta por 30 mL de acetonitrila + 1,5 mL de cloridrato de hidroxilamina + 1,5 mL de ácido p-toluenossulfônico + 2 mL de solução aquosa de acetato de amônio. A mistura solução extratora + carne foi agitada, ultra-sonicada e centrifugada. Uma membrana de formato triangular de N^+ -nylon modificada com óxido de grafeno foi colocada em contato com a solução sobrenadante para extrair seletivamente as moléculas de interesse. Em seguida, essa membrana foi utilizada como substrato para a ionização por PS. Um limite de detecção de $0,65 \text{ mg kg}^{-1}$ foi obtido para determinação de MG [4].

Na análise da água de lago [36], os autores utilizaram a microextração em fase líquida: os analitos foram extraídos da amostra e pré-concentrados em uma gota de 2 μL de xileno. Na sequência, a gota foi levada para análise por PS-MS. Limites de detecção de 6,5 e 7,7 ng L^{-1} foram encontrados para MG e verde leucomalachita, respectivamente [36].

No estudo de água de criação de peixes [83], uma mistura de clorofórmio com pequena quantidade de líquido iônico foi utilizada para extrair o analito da matriz da amostra. Na sequência, a solução foi levada para análise por PS-MS. Limite de quantificação de $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi obtido para análise de MG [83].

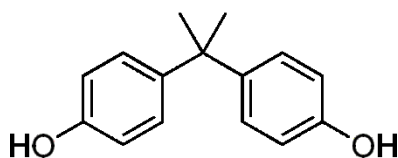
De maneira geral, os trabalhos desenvolvidos mostraram que a PS-MS, aliada a técnicas de preparo de amostras adequadas, é eficiente para identificação do corante e seu metabólito em baixos níveis de concentrações. Nesta tese, um método

EE-PS-MS foi desenvolvido para pré-concentrar e detectar verde malaquita em água canalizada.

3. BISFENOL A EM AMOSTRAS ALIMENTÍCIAS

Bisfenol A (BPA, do inglês *bisphenol A*), nome IUPAC 4,4'- (propano-2,2-diil) difenol, é um composto orgânico sintético de carácter ácido ($pK_a = 9,7$) que apresenta em sua estrutura dois grupos hidroxifenil (Figura 3-8). É utilizado na produção de plásticos de policarbonato e resinas epóxi, materiais comumente aplicados na formulação de brinquedos, canos e embalagens em geral [84]. O contato entre embalagem e conteúdo pode levar à transferência de BPA para os alimentos [85] e, por esse motivo, a alimentação é a *via* de acesso da substância ao organismo humano. Após ingerido, mesmo em baixas concentrações (nível de picograma) [86], o BPA pode se ligar aos receptores de estrogênio e causar alterações no funcionamento da tireoide, cérebro, órgãos reprodutores e sistema imunológico [87]. Ainda, estudos apontam que o aumento da concentração de BPA em urina está associado à diabetes, abortos recorrentes e infertilidade [85,87].

Figura 3-8: Estrutura do BPA.



As descobertas sobre os riscos do BPA à saúde são recentes, assim como a implementação de resoluções para fiscalização, controle e restrições de uso. Em 1970 não havia evidências da transferência de BPA para alimentos e, por isso, acreditava-se que o uso de embalagens contendo a substância era seguro [87]. Na década de 80, a Agência de Proteção Ambiental dos EUA emitiu pela primeira vez um alerta sobre a possibilidade de contaminação de alimentos pelas embalagens [87]. Logo em seguida, o país estabeleceu um limite máximo de ingestão de BPA em $50 \mu\text{g kg}^{-1}$ de peso corporal por dia [88]. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, através da resolução N° 105, de 19 de maio de 1999 [89], estabeleceu em 3 mg/kg/dia o limite máximo permitido de migração da substância para o alimento. Em 2008, com novos estudos que comprovaram a gravidade do BPA ao organismo, esse valor foi reduzido para $0,6 \text{ mg/kg/dia}$ [90] através da Resolução N° 17, que se encontra em vigência até a presente data. Em 2011 o uso da substância para a fabricação de mamadeiras e artigos similares destinados à alimentação de lactentes foi proibido [91].

O desenvolvimento de métodos analíticos voltados à identificação de BPA em alimentos faz-se necessário [92]. De maneira geral, alimentos são amostras com

matrizes complexas em que contaminantes estão em baixas concentrações e, por isso, etapas de tratamento da amostra são necessárias. A literatura aponta que o BPA já foi encontrado em diversas classes de alimentos tais como: vinho [95], leite [93], frutos do mar enlatados [94], fórmulas infantis [95], mel [96], frutas e vegetais [97]. A técnica comumente empregada para detecção dessa substância é a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas.

A literatura científica descreve o uso da PS-MS para determinar a concentração de BPA em embalagens de produtos alimentícios. Chen e colaboradores [98] analisaram por PS-MS quarenta e duas amostras de embalagens, dentre elas copos plásticos, mamadeiras, garrafas de água mineral e de bebidas energéticas. O material estudado foi recortado em formato triangular e analisado diretamente por PS-MS. Os autores determinaram BPA nas faixas de concentrações de 12 a 67 mg kg⁻¹, de acordo com o tipo de amostra analisada. O limite de detecção obtido para o método foi de 0,1 µg mL⁻¹ [98]. A literatura não descreve trabalhos em que a PS-MS foi aplicada na detecção de BPA em alimentos.

O vinho é uma bebida alcoólica proveniente da fermentação de uvas [99]. Sua composição é predominantemente de compostos fenólicos, açúcares e álcoois. Durante os processos de fabricação e estocagem, a bebida é mantida em tanques revestidos por resinas epóxi [100], material que contém o BPA como principal matéria prima. Devido à alta solubilidade do BPA em álcoois, produtos com alto teor alcoólico, como o vinho, favorecem significativamente a transferência dessas moléculas do recipiente para a solução [101]. Por conseguinte, o monitoramento de BPA em amostras de vinho é fundamental para assegurar a qualidade do produto.

Brenn-Struckhofova e Cichna-Markl [92], por exemplo, desenvolveram um método baseado em cromatografia líquida acoplada à fluorescência para detecção de BPA em amostras comerciais de vinhos tintos e brancos. Vinte e oito amostras comercializadas em garrafas de vidro e Tetra Brik® foram analisadas. As concentrações obtidas variaram entre 0,2 e 1,6 µg L⁻¹ [92]. Apesar dos baixos níveis de BPA encontrados, o controle da substância é essencial para garantir a segurança dos consumidores da bebida.

Neste capítulo da tese, um método EE-PS-MS foi desenvolvido para pré-concentração de análise de BPA em amostras de vinho tinto.

4. MATERIAIS E MÉTODO

4.1. Amostras e reagentes

Água canalizada foi recolhida no departamento de Química da UFMG. Vinhos tintos seco foram adquiridos em supermercados da região de Belo Horizonte, Minas Gérias.

Foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: metanol, acetonitrila e 1-octanol grau HPLC da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA); acetato de etila, cloreto de amônio, fosfato de potássio monobásico e bibásico, sulfato de sódio, carboximetilcelulose sal dissódico, citrato de sódio, fosfato de sódio bibásico e tetraborato de sódio da Synth (Diadema, SP, BR); ácido fórmico e acetato de sódio da Merck (Darmstadt, GE); ácido acético glacial, hexano, cloreto de cálcio dihidratado, cloreto de potássio e cloreto de sódio da Vetec (Duque de Caxias, RJ, BR); hidróxido de amônio, hidróxido de sódio e α -amilase da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA); tris(hidroximetil)aminometano da Amresco (Cleveland, OH, USA); água deionizada obtida em um sistema modelo Millipak 40 Express (Milli-Q, Corporação Millipore, Bedford, MA, USA).

Os padrões de cocaína, lidocaína e metilenodioximetanfetamina (MDMA) utilizados foram adquiridos da LGC Standards (Teddington, UK); verde malaquita, violeta de metila, bisfenol A e nonilfenol da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA).

4.2. Materiais

Dispositivo multipoços de eletroextração.

Fonte de eletroforese (KASVI, China) modelo K33-300V empregada na aplicação da tensão elétrica.

Duas placas condutoras de metal inerte (aço inoxidável) localizadas nas extremidades superior e inferior do dispositivo. A superior foi utilizada para aplicar tensão elétrica sobre a fase aceptora. A inferior foi utilizada para aplicar tensão elétrica na fase doadora.

Placa polimérica com perfurações em fenda para encaixe dos papéis no dispositivo de extração.

Microtubos de polipropileno com capacidade de 2 mL com parafuso de aço inoxidável inserido na parte inferior. O parafuso, que serviu como eletrodo para a extração, foi inserido em um furo previamente confeccionado na parte inferior de cada microtubo e selado com cola vinílica pela parte exterior de forma a garantir a total vedação.

Conectores tipo banana macho e fêmea com cabos.

Papel cromatográfico Whatman modelo nº 1 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) recortado em formato retangular.

Agitador do tipo Vortex da marca VELP SCIENTIFICA, utilizado para agitação dos microtubos contendo a fase doadora e a fase orgânica.

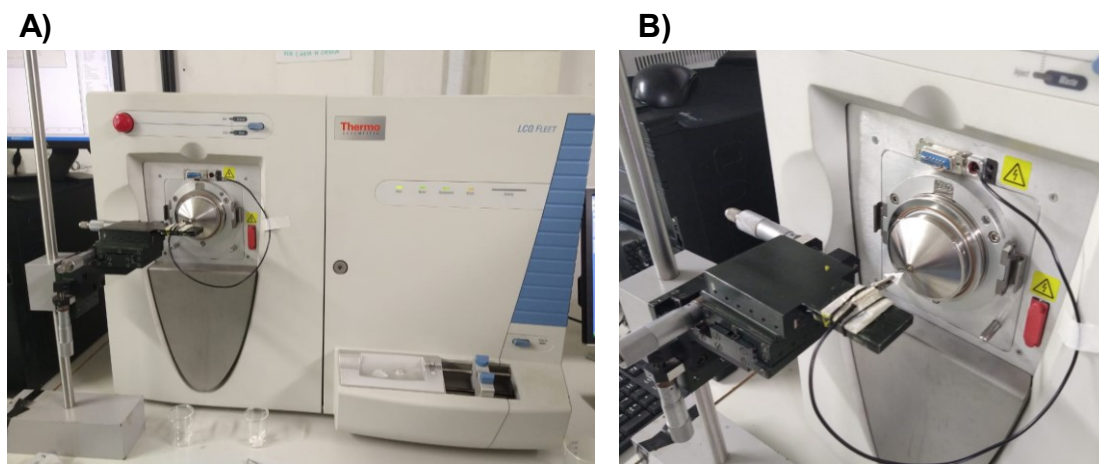
4.3. Instrumentação

Um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) com analisador do tipo armadilha de íons foi utilizado para as análises desenvolvidas neste trabalho (Figura 3-9 A).

A plataforma de ionização *paper spray* (PS) foi construída em laboratório utilizando um suporte com microposicionador xyz, que possibilitou o alinhamento do papel à entrada do espectrômetro de massas. Um clipe metálico, conectado ao espectrômetro de massas através de um fio de cobre, foi utilizado para aplicação do potencial elétrico na base do papel da PS (Figura 3-9 B).

O software Thermo Scientific Xcalibur foi utilizado no controle e aquisição de dados.

Figura 3-9: (A) Espectrômetro de massas Thermo modelo LCQ Fleet com analisador do tipo armadilha de íons e fonte de ionização por *paper spray*. (B) Detalhes da fonte por *paper spray*.



4.4. Preparo das amostras

4.4.1. Saliva

A saliva artificial utilizada neste estudo foi preparada segundo o trabalho descrito por Arain e colaboradores [102]. Para isto, foram utilizados α -amilase ($0,084 \text{ g L}^{-1}$) e os sais KCl ($0,625 \text{ g L}^{-1}$), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($0,166 \text{ g L}^{-1}$), K_2HPO_4 ($0,804 \text{ g L}^{-1}$), KH_2PO_4 ($0,326 \text{ g L}^{-1}$), e carboximetilcelulose sal dissódico ($10,0 \text{ g L}^{-1}$).

4.4.2. Soluções padrão

Os padrões de cocaína, lidocaína, MDMA (utilizado como PI na análise de COC e LID em saliva), verde malaquita, violeta de metila (PI na análise de VM em água de torneira), bisfenol A e nonilfenol (PI na análise de BPA em vinho tinto) foram pesados e diluídos em metanol na proporção adequada para obter soluções estoque de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Volumes previamente calculados das soluções estoque foram adicionados às amostras para atingir as concentrações estudadas.

4.5. Sistema de eletroextração

O dispositivo multipoços para eletroextração multifases com microtubos de polipropileno é apresentado na Figura 3-10. Tem-se em (A) o sistema fechado, que corresponde à posição utilizada durante o processo de extração e, em (B), o sistema aberto, logo após o término da EE. O dispositivo apresenta 66 poços para extração simultânea. Cada poço de extração, ilustrado em (C), contém um microtubo de polipropileno modificado com parafuso de aço inoxidável com:

- fase doadora: amostra. Neste trabalho foram estudadas: (i) saliva artificial dopada com cocaína e lidocaína; (ii) água canalizada dopada com verde malaquita; e (iii) vinho tinto dopado com bisfenol A;
- fase orgânica: solvente orgânico imiscível com as fases doadora e aceptora;
- fase aceptora: papel cromatográfico embebido em ácido acético $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ para extração de cátions; hidróxido de amônio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ / hidróxido de sódio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1 : 1 v/v para extração de ânions.

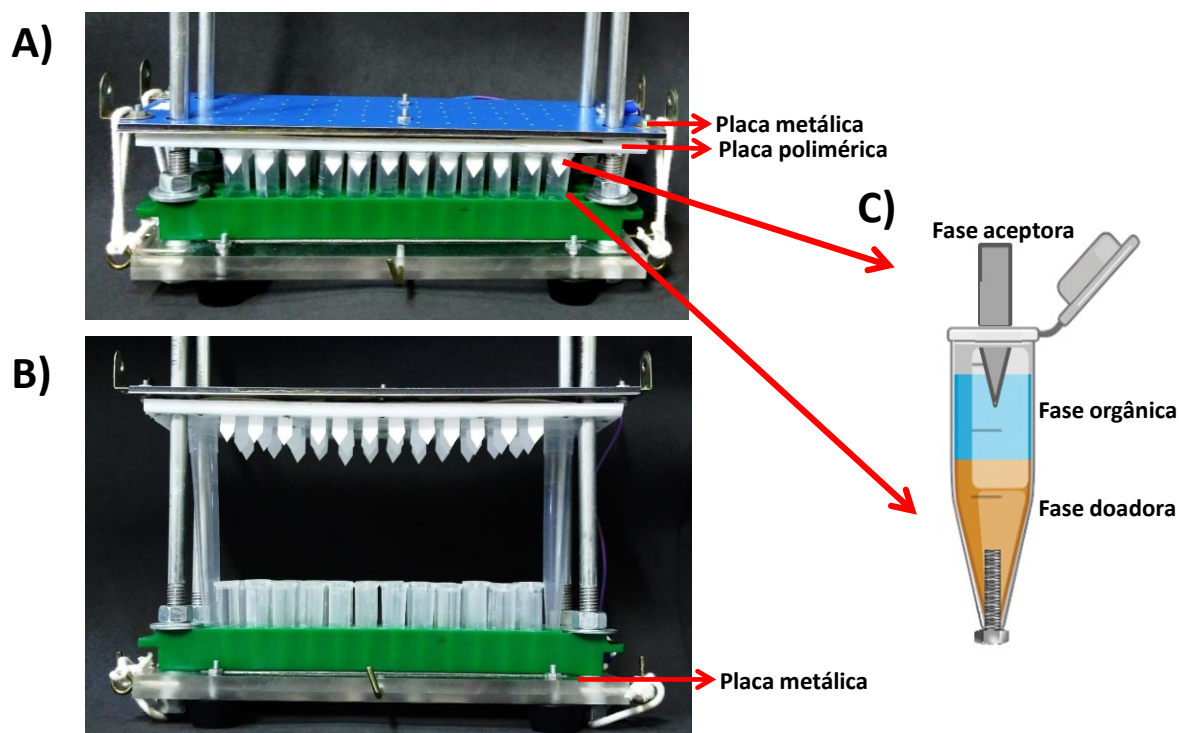
A montagem do sistema de extração consistiu em adicionar ao microtubo 1 mL da fase doadora seguido de 1 mL da fase orgânica, formando uma mistura heterogênea bifásica. Essa solução foi levada para o agitador do tipo vortex por 15 segundos a 3000 rpm e, em seguida, posicionada no dispositivo multipoços.

O papel cromatográfico (fase aceptora) foi encaixado em perfurações do tipo fenda da placa de polipropileno, placa branca identificada na Figura 3-10 (A), de maneira que uma das pontas do triângulo ficasse em contato com a fase orgânica (Figura 3-10 C). A outra extremidade, de base retangular, foi fixada entre as placas polimérica e metálica. A placa metálica, em azul na Figura 3-10 (A), posicionada acima

da placa de polipropileno, agiu como eletrodo superior. A placa metálica posicionada na base do suporte, em contato com os parafusos dos microtubos, serviu como contra eletrodo.

Para promover a extração, um campo elétrico foi aplicado entre os dois eletrodos por tempo e intensidade otimizados. Para extrair analitos carregados positivamente (cocaína, lidocaína e verde malaquita), o eletrodo inferior foi conectado na fonte de eletroforese pelo polo positivo enquanto o superior pelo polo negativo. Para extrair ânions, como o BPA⁻, a conexão dos polos foi invertida.

Figura 3-10: Dispositivo multipoços para eletroextração multifases com microtubos de polipropileno. (A) Posição do sistema durante a extração. (B) Sistema aberto logo após o término do processo; (C) Ilustração de cada poço de extração do sistema. Dentro dos microtubos estão as fases: doadora e orgânica e o papel cromatográfico embebido em solução eletrolítica como fase aceptora.



Alguns parâmetros foram avaliados de forma a otimizar o desempenho do processo de extração: solvente da fase orgânica, tempo e intensidade de aplicação do potencial elétrico. No estudo de composição da fase orgânica foram avaliados os solventes 1-octanol, mistura 1-octanol/metanol 10:1 v/v, hexano e acetato de etila. O potencial elétrico aplicado foi avaliado em 100 V, 200 V e 300 V. A aplicação de

potencial elétrico foi avaliada por 5, 10 e 15 minutos. A composição da solução eletrolítica utilizada para embeber o papel cromatográfico da fase aceptora foi selecionada baseando-se em trabalhos da literatura que utilizaram extração multifásica.

Como supracitado, três abordagens foram avaliadas para a aplicação da metodologia: (i) forense, saliva sintética dopada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína como fase doadora; (ii) ambiental, água de torneira dopada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de corante verde malaquita; e (iii) alimentícia, vinho tinto dopado com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA.

Estudos mais aprofundados foram realizados para a primeira abordagem. Após a otimização dos principais parâmetros para extrair simultaneamente $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína da saliva, avaliou-se a extração dos analitos nas concentrações de 250 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$. Em seguida, curvas analíticas matricizadas com faixa de trabalho entre 10 e $100 \mu\text{g L}^{-1}$ foram construídas.

4.6. Análise instrumental por PS-MS

4.6.1. PS-MS convencional (sem eletroextração)

4.6.1.1. Cocaína e lidocaína em saliva artificial

Uma alíquota de $5 \mu\text{L}$ de saliva artificial dopada com cocaína e lidocaína foram adicionados no centro do triângulo de papel cromatográfico, o qual foi posicionado na plataforma *paper spray* a $0,5 \text{ cm}$ de distância da entrada do espectrômetro de massas. $5 \mu\text{L}$ do padrão interno, MDMA ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram aplicados sobre a amostra. Em seguida, para promover a ionização e eluição do analito, um volume otimizado de solvente ($25 \mu\text{L}$ de metanol) foi adicionado e iniciou-se a análise com a aplicação de tensão elétrica otimizada na base do papel.

Metanol, acetonitrila e mistura metanol/água 9:1 foram testados como solvente para a ionização por PS. O potencial elétrico aplicado na base do papel triangular da PS-MS foi avaliado em 3,5; 4,0 e 4,5 kV. A temperatura do capilar foi de $275 \text{ }^\circ\text{C}$ e os demais parâmetros instrumentais foram estabelecidos pelo *tune* de calibração do equipamento: 40 V voltagem do capilar e 115 V voltagem das lentes. Os espectros foram obtidos em modo de ionização positivo *full scan* na faixa de *m/z* 100 – 400 e registrados por 24 segundos.

4.6.1.2. Verde malaquita em água de torneira

$5 \mu\text{L}$ de água de torneira dopada com verde malaquita foram adicionados no centro do triângulo de papel cromatográfico, o qual foi posicionado na plataforma

paper spray a 0,5 cm de distância da entrada do espectrômetro de massas. Em seguida, 5 µL do padrão interno, violeta de metila ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram aplicados sobre a amostra e um volume otimizado de solvente (25 µL de metanol) foi adicionado. As condições instrumentais das análises foram as mesmas do tópico anterior, que descreve a análise de cocaína e lidocaína em saliva sintética.

4.6.1.3. *Bisfenol A em vinho tinto*

5 µL de vinho tinto dopado com BPA foram adicionados sobre o centro do triângulo de papel cromatográfico, o qual foi posicionado na plataforma *paper spray* a 0,5 cm de distância da entrada do espectrômetro de massas. Em seguida, 5 µL do padrão interno, nonilfenol ($1 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram aplicados sobre a amostra e volume otimizado de solvente foi adicionado.

Metanol, acetonitrila e mistura metanol/água 9:1 foram testados como solvente para a ionização por PS. Potencial elétrico aplicado na base do papel triangular da PS-MS foi avaliado em 3,0; 3,5 e 4,0 kV. A temperatura do capilar foi de 275 °C e os demais parâmetros instrumentais foram estabelecidos pelo *tune* de calibração do equipamento: voltagem do capilar de -12 V e voltagem das lentes de -86 V. Os espectros foram obtidos em modo de ionização negativo, em *full scan* na faixa de m/z 150 – 250 e registrados por 24 segundos.

4.6.2. *EE-PS-MS (com eletroextração)*

Após a etapa de eletroextração, o papel cromatográfico foi retirado do dispositivo multipoços. Sua parte retangular, que durante a extração esteve fixada na placa metálica, foi recortada e desprezada. A parte remanescente (extremidade triangular que esteve em contato com a fase orgânica durante a extração) foi posicionada na plataforma *xyz* do *paper spray* a 0,5 cm de distância da entrada do equipamento. 5 µL do padrão interno foram adicionados ao centro do papel e, em seguida, as análises por PS-MS foram realizadas nas mesmas condições das análises convencionais, descritas nos tópicos 4.6.1.1, 4.6.1.2 e 4.6.1.3, de acordo com cada analito.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1. Extração de cocaína e lidocaína em saliva artificial

Os solventes 1-octanol, 1-octanol/metanol 10:1 (v/v), acetato de etila e hexano foram avaliados para compor a fase orgânica na extração de cocaína e lidocaína em saliva artificial. A fase aceptora foi composta por papel cromatográfico embebido em 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético. Potencial elétrico de 300 V foi aplicado no sistema por 10 minutos. A escolha desses solventes foi feita tendo em vista que são comumente utilizados em sistemas de extrações de múltiplas fases que empregam campos elétricos [48-50] e, ainda, são solventes de fácil obtenção em laboratórios de pesquisa química. Além disso, apresentam propriedades distintas em termos de condutividade, ponto de ebulição, viscosidade (Tabela 3-2) e polaridade, garantindo que boa diversidade de solventes fosse avaliada. O 1-octanol é um álcool primário com cadeia carbônica formada por oito carbonos. Acetato de etila é um éster com cadeia carbônica contendo quatro carbonos apenas. O hexano é um hidrocarboneto apolar de cadeia saturada composta por seis carbonos. Alguns autores destacam a boa eficiência de filtros orgânicos compostos por mistura entre dois solventes orgânicos: um imiscível em água (para garantir a imiscibilidade da fase orgânica nas fases doadora e aceptora) com um miscível (para aumentar a condutividade da fase orgânica) [48,49]. Dessa maneira, além da fase orgânica formada apenas por 1-octanol, a sua mistura com 10% de metanol foi avaliada.

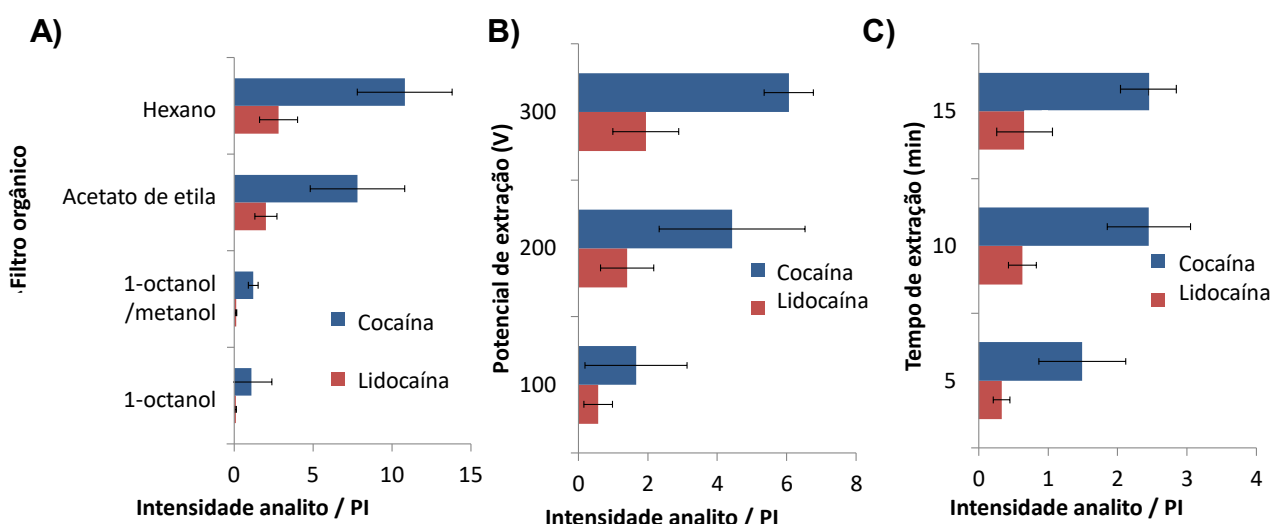
Tabela 3-2: Condutividade, ponto de ebulição e viscosidade dos solventes avaliados como fase orgânica no sistema EE-PS-MS.

Solvente	Condutividade (κ / mS/cm) [103]	Ponto de ebulição ($^{\circ}\text{C}$) [103]	Viscosidade (mPa s^{-1} a 20 $^{\circ}\text{C}$)
Octanol	$1,4 \times 10^{-6}$	194	7,3
Metanol	$2,0 \times 10^{-1}$	64	0,59
Acetato de etila	$1,0 \times 10^{-9}$	77	0,45
Hexano	$1,0 \times 10^{-16}$	69	0,32

O volume e a composição do solvente da ionização por PS foram otimizados em 25 μL de metanol, uma vez que foi a composição que gerou sinais mais estáveis no espectro de massas. No gráfico da Figura 3-11 (A) estão apresentadas as intensidades dos sinais dos analitos relativas às intensidades dos sinais do padrão interno (analito/PI) em função de cada solvente estudado. As barras de erros referem-

se às variabilidades dos dados obtidos em triplicatas. Os solventes 1-octanol e a mistura 1-octanol/metanol 10:1 (v/v) apresentaram resultados similares e, entre os quatro tipos de fases orgânicas avaliadas, foram os que apresentaram menor eficiência de extração tanto para a cocaína quanto para lidocaína. Esperava-se, no entanto, que a melhor eficiência de extração fosse obtida para a mistura 1-octanol/metanol 10:1 (v/v), uma vez que, entre as quatro composições de solventes avaliadas é a que apresenta maior condutividade (Tabela 3-2). Entretanto, o hexano, solvente que apresenta menor condutividade e menor capacidade de solvatação dos analitos, apresentou a melhor eficiência de extração.

Figura 3-11: Otimização da eletroextração. Efeito do (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína em saliva sintética. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético.



A interação entre a fase orgânica e o papel cromatográfico foi o fator predominante para o melhor desempenho do hexano. O hexano é o solvente de menor viscosidade e o de segunda menor temperatura de ebulição, quando comparado com os outros solventes estudados. O tempo necessário para remover o papel do sistema de eletroextração e posicioná-lo na plataforma da PS-MS foi suficiente para a completa evaporação do hexano remanescente no papel. Assim, a eluição do analito e a formação do *spray* da ionização foram influenciadas apenas pelo solvente utilizado para promover a ionização por PS (metanol). Em contrapartida, quando o 1-octanol foi utilizado como fase orgânica, o tempo entre remover o papel do sistema da

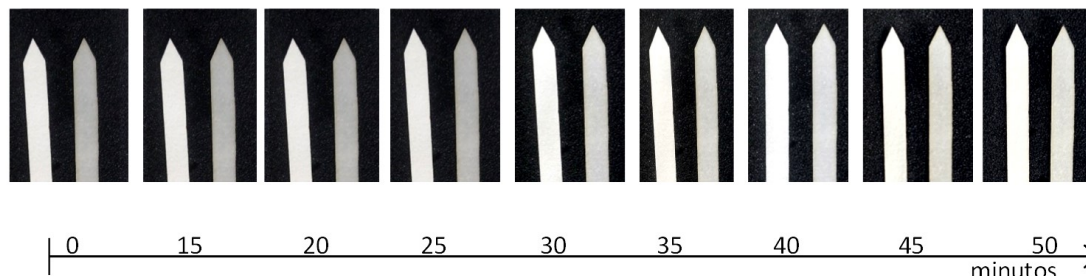
eletroextração e posicioná-lo na plataforma PS não foi suficiente para sua evaporação. Essa evaporação, como discutido adiante, é bastante demorada, o que comprometeria a rapidez do método. Assim, testou-se as análises por PS-MS com o papel ainda contendo bastante quantidade do solvente orgânico.

A alta viscosidade do 1-octanol associada à sua elevada temperatura de ebulição, valores apresentados na Tabela 3-2, possivelmente causaram interferências no processo de geração do *spray* da ionização por PS. Solventes muito viscosos dificultam ou até mesmo impedem a formação do cone de *Taylor*. Além disso, a alta tensão superficial do solvente dificulta a geração do *spray* de gotículas carregadas, fenômeno que ocorre quando as forças eletrostáticas existentes entre os íons da amostra rompem a tensão superficial do solvente.

Com a finalidade de estimar o tempo necessário para que o papel cromatográfico embebido em 1-octanol ficasse seco, a evaporação desse solvente foi monitorada em condições ambiente de temperatura e pressão por 50 minutos, com obtenção de imagens de celular a cada 5 minutos. O sistema utilizado para essa avaliação, apresentado na Figura 3-12, foi composto por duas fitas de papel cromatográfico de mesmo formato e dimensão: à esquerda uma fita seca (referência) e, à direita, uma fita embebida em 1-octanol. A evaporação do solvente foi acompanhada pela diferença de cor entre as fitas. A fita encharcada apresenta coloração mais escura do que a fita seca e, à medida que o solvente evapora, as tonalidades se aproximam. Nos primeiros 15 minutos não foram observados alterações significativas no sistema, por isso as imagens não foram apresentadas. Após 25 minutos de experimento houve significativo clareamento do tom da fita embebida em solvente (Figura 3-12). Porém, mesmo após 50 minutos, o papel apresentava aspecto molhado e oleoso, o que indica que o solvente persistia sobre sua superfície.

Diante disso, observou-se que mais de 50 minutos são necessários para a evaporação completa do 1-octanol sobre a fita de papel cromatográfico, o que inviabiliza o seu uso como filtro orgânico para o método EE-PS-MS. Portanto, a fase orgânica utilizado nos demais experimentos foi o hexano.

Figura 3-12: Estudo de viabilidade do uso de 1-octanol como fase orgânica no sistema EE-PS-MS. As fotos representam um sistema com duas fitas de papel cromatográfico acompanhado por 50 minutos - com obtenção de imagens de celular a cada 5 minutos - para estimar o tempo de evaporação do 1-octanol. À esquerda de cada imagem tem-se uma fita seca (referência) e, à direita uma fita embebida em 1-octanol. A evaporação do solvente foi acompanhada pela diferença de cor entre as fitas.



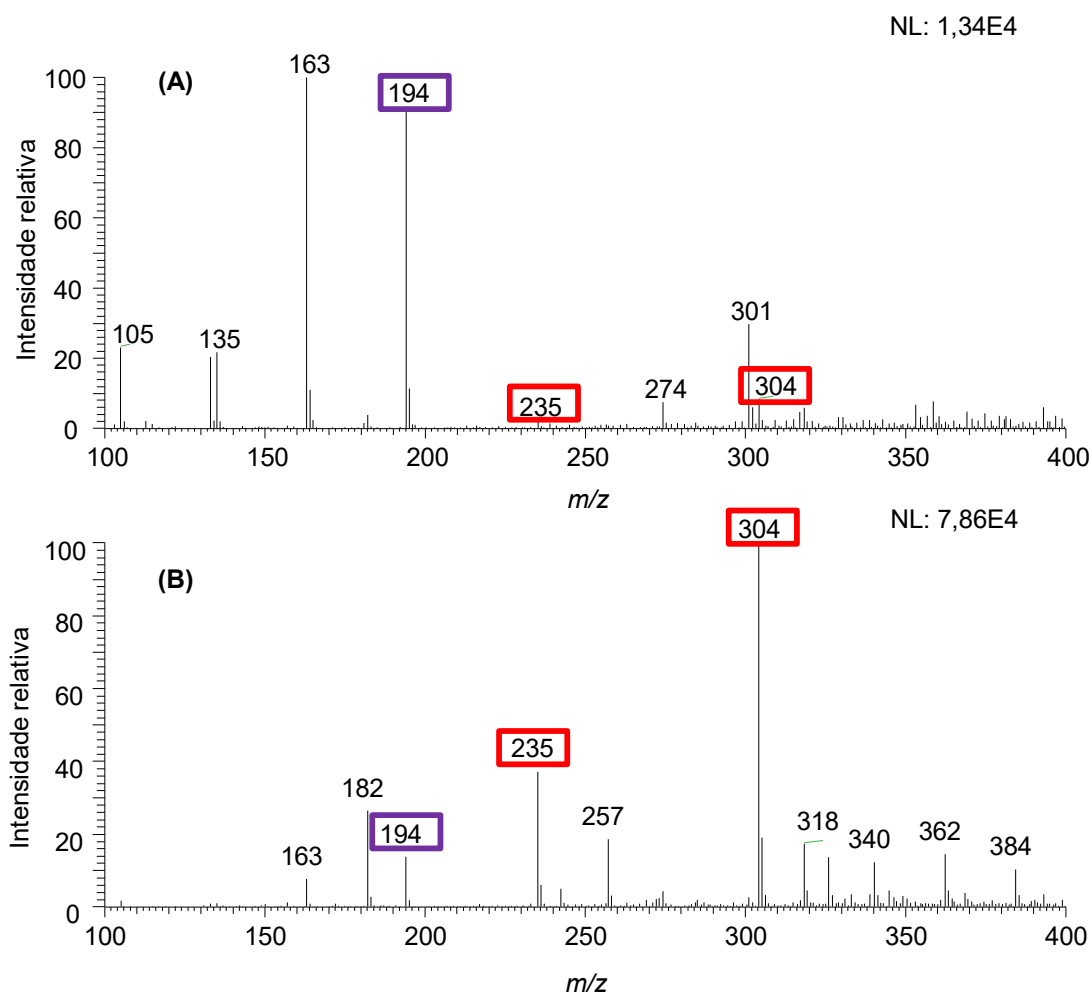
O potencial de extração da EE foi avaliado em 100, 200 e 300 V por 10 minutos. O gráfico da Figura 3-11 (B) indica que o aumento do potencial elétrico de extração promoveu o aumento do sinal do analito/PI. Em sistemas que aplicam campos elétricos para promover o transporte de íons, a taxa de transporte de carga é acelerada com o aumento do campo elétrico. Porém, campos elétricos muito altos podem comprometer a reprodutibilidade de análises químicas devido ao efeito Joule (aquecimento devido ao movimento de cargas). Tendo em vista que 300 V é o valor máximo alcançado pela fonte de eletroforese utilizada neste trabalho e que não foram observados comprometimentos na reprodutibilidade do sistema quando esse potencial foi aplicado, o mesmo foi selecionado para o método.

O tempo de aplicação do potencial elétrico de 300 V foi avaliado por 5, 10 e 15 minutos. O gráfico da Figura 3-11 (C) apresenta os valores de intensidade analito / PI obtidos em função do tempo. De 5 para 10 minutos houve aumento significativo na eficiência da extração dos analitos. Porém, comparando os resultados obtidos para 10 e 15 minutos, o sinal dos analitos apresentaram intensidades praticamente constantes, indicando que a extração foi efetivada durante os 10 minutos iniciais de extração. Assim, o tempo utilizado nas extrações seguintes deste trabalho foi de 10 minutos.

Após otimizar as condições de extração, o desempenho do sistema EE-PS-MS foi comparado ao desempenho da PS-MS convencional (ou seja, sem etapas de preparo da amostra). A Figura 3-13 apresenta em (A) o espectro de massas obtido por PS-MS sem extração prévia, e em (B) o espectro registrado após a eletroextração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína em saliva sintética. Em (A) os sinais atribuídos aos analitos apresentaram baixas intensidades. O sinal da lidocaína (m/z 235) está em nível de ruído instrumental enquanto o da cocaína (m/z 304) apresenta intensidade

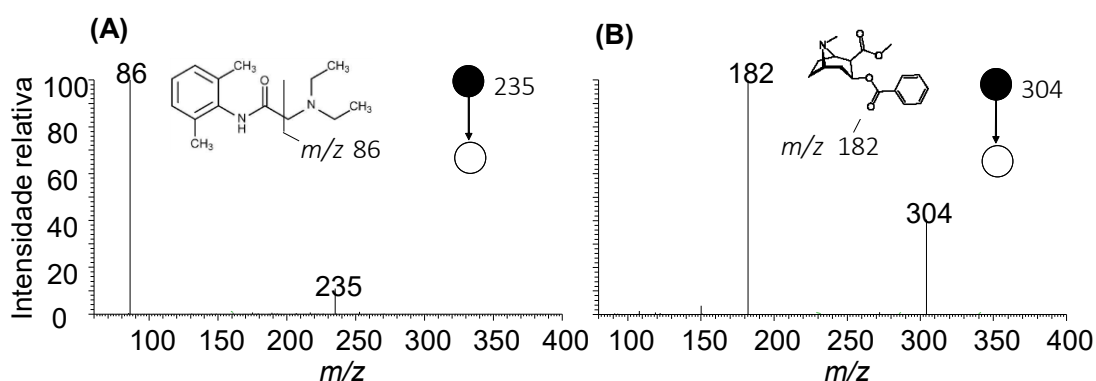
relativa de aproximadamente 10%. Em contraste, os sinais associados ao MDMA (padrão interno - m/z 194) e seu produto de degradação (m/z 163) são os mais intensos do espectro. Em contrapartida, após a eletroextração, espectro (B), os sinais atribuídos à lidocaína e cocaína adquiriram intensidades significativamente maiores. O sinal referente à cocaína, m/z 304, é o mais intenso do espectro e o da lidocaína, m/z 235, apresenta intensidade relativa de 40%, evidenciando a extração simultânea dos analitos durante a etapa de EE. O sinal atribuído ao MDMA, m/z 194, apresenta intensidade relativa próxima a 20%.

Figura 3-13: Espectros de massas obtidos para análises de cocaína (m/z 304 destacado em vermelho) e lidocaína (m/z 235 destacado em vermelho) em saliva artificial por (A) PS(+)-MS e (B) EE-PS(+)-MS. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, MDMA (m/z 194). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase doadora: 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína em saliva sintética, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em 300 $\mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético.



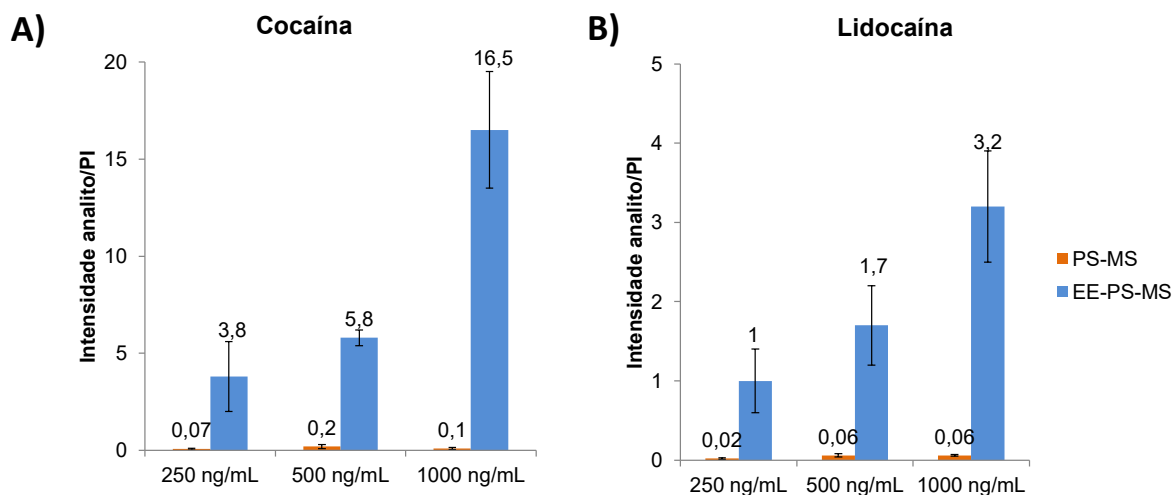
Os sinais observados no espectro EE-PS-MS atribuídos às moléculas de lidocaína (m/z 235) e cocaína (m/z 304) foram confirmados por espectrometria de massas sequencial. A energia de colisão utilizada para fragmentar os íons foi de 20 V. Os espectros MS/MS apresentaram fragmentos característicos dos íons precursores, de acordo com a Figura 3-14, indicando que os sinais m/z 235 e 304 obtidos nos espectros EE-PS-MS referem-se às moléculas dos analitos. A lidocaína gerou o sinal m/z 86 referente à amina terciária ilustrada em (A) e a cocaína gerou o sinal de m/z 182 referente à perda do ácido benzoico ilustrado em (B).

Figura 3-14: Espectros EE-PS(+)-MS/MS dos sinais (A) lidocaína m/z 235 e (B) cocaína m/z 304. Energia de colisão de 20 V.



Além da análise da saliva sintética dopada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína e lidocaína, as concentrações de 250 e $500 \mu\text{g L}^{-1}$ para esses analitos também foram avaliadas. Os gráficos da Figura 3-15 apresentam os valores de intensidades dos sinais da (A) cocaína e da (B) lidocaína em relação ao PI obtidos por EE-PS-MS e PS-MS, de acordo com a concentração.

Figura 3-15: Intensidade analito/PI obtidos por EE-PS-MS e PS-MS para (A) cocaína e (B) lidocaína em saliva artificial em função das diferentes concentrações dos analitos: 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$.

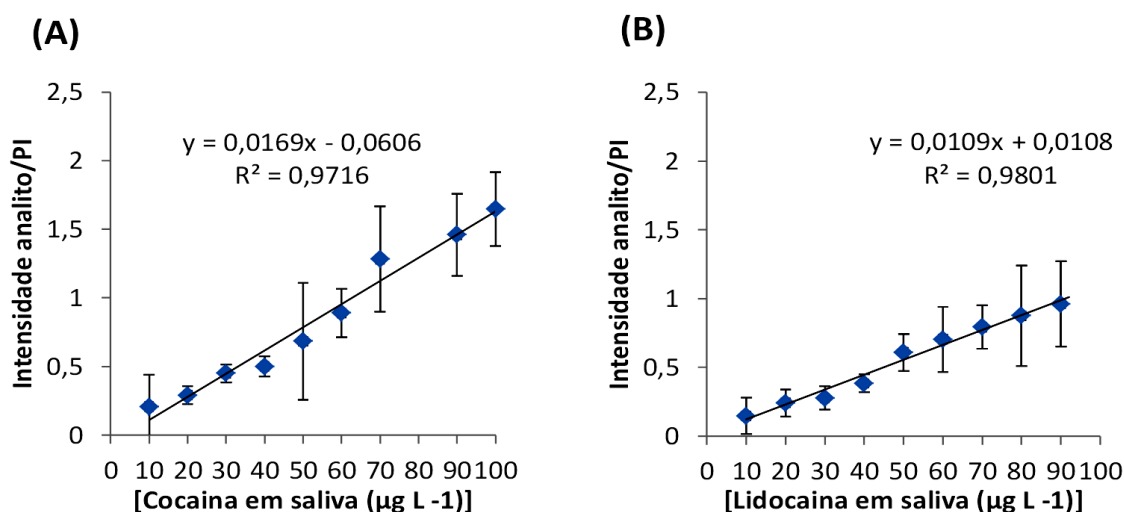


Como observado, para os três níveis de concentrações estudadas, os sinais dos analitos nos espectros EE-PS-MS tiveram considerável aumento nas intensidades quando comparados aos sinais observados na PS-MS convencional (sem extração). Ademais, os dados obtidos por EE-PS-MS apontam tendência de aumento na intensidade dos sinais à medida que se aumenta a concentração dos analitos. Em contraste, os resultados obtidos por PS-MS não indicam essa tendência. Como pode ser observado, há um aumento do sinal analítico de 250 para 500 $\mu\text{g L}^{-1}$, tanto para lidocaína quanto para cocaína. Entretanto, o sinal obtido para 500 $\mu\text{g L}^{-1}$ de cocaína é mais intenso do que aquele obtido para 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ (Figura 3-15 A). Com relação à lidocaína, os sinais obtidos para as duas concentrações apresentaram as mesmas intensidades (Figura 3-15 B). Esse comportamento possivelmente está relacionado a efeitos de supressão iônica. Por apresentar matriz de composição complexa, a saliva é altamente suscetível a efeitos de matriz, principalmente supressão iônica, fenômeno comum às técnicas de injeção direta de amostras em espectrometria de massas.

As relações entre os sinais obtidos pelos métodos EE-PS-MS e PS-MS indicam enriquecimentos máximos de 57 e 110 vezes para a lidocaína e cocaína, respectivamente.

Após a otimização dos parâmetros da extração, curvas analíticas matrizadas (em saliva sintética) foram construídas para ambos os compostos, cocaína e lidocaína. A faixa de concentração estudada foi de 10,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$, que é aquela comumente usada em estudos de quantificação de cocaína em saliva [50]. A Figura 3-16 apresenta as curvas obtidas. O ponto referente à concentração de 80,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a cocaína e 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para a lidocaína foram removidos, uma vez que foram classificados como outlier pelo teste de resíduo padronizado de Jackknife. As barras de erros referem-se aos desvios padrão dos dados obtidos em quintuplicatas.

Figura 3-16: Curvas de calibração obtidas utilizando o método EE-PS-MS para (A) cocaína e (B) lidocaína. Faixa de trabalho: 10,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para cocaína e 10,0 a 90,0 $\mu\text{g L}^{-1}$ para lidocaína. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano.



Como parâmetro de comparação, tentou-se construir curvas de calibração para o método PS-MS convencional (sem extração prévia) utilizando a mesma faixa de trabalho estudada. No entanto, como já observado anteriormente na avaliação de diferentes concentrações do analito, o método PS-MS sem extração prévia demonstrou apresentar limites de detecção bem mais altos que o EE-PS-MS. Visto que para a concentração de 250, 500 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$ observou-se sinais pouco intensos dos analitos nos espectros PS-MS, não foi possível construir uma curva analítica para a faixa de trabalho de 10,0 a 100,0 $\mu\text{g L}^{-1}$.

As linearidades das curvas construídas foram avaliadas por meio do método dos mínimos quadrados ordinários. Apesar de a curva analítica da cocaína ter

apresentado maior sensibilidade (representada pela inclinação), a da lidocaína apresentou maior coeficiente de determinação, com $R^2_{LID} = 0,9801$ e $R^2_{COC} = 0,9716$.

Os valores mínimos detectáveis (LDs) obtidos para os analitos foram calculados utilizando o desvio padrão de 10 amostras brancas e a inclinação da curva analítica, de acordo com a equação 3.1:

$$LD = \frac{3s_{br}}{m} \quad (\text{Equação 3-1}) \quad \text{Eurachem [104].}$$

Em que s_{br} é desvio padrão das medidas do branco e m é a inclinação da reta.

Valores de 3,1 e 3,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram obtidos para os LD's da cocaína e lidocaína, respectivamente. Taxas de recuperação de cocaína em amostras brancas nos níveis 10,0; 50,0; e 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram de 88,0 a 115,5%, revelando o potencial da metodologia EE-PS-MS para determinações quantitativas. Valores de recuperação obtidos para lidocaína nos níveis 10, 50 e 90 $\mu\text{g L}^{-1}$ variaram de 89,0 a 112,8%. Ainda assim, melhores resultados em termos de linearidade e reprodutibilidade podem ser obtidos com o uso de padrões internos marcados isotopicamente.

Cabe ressaltar que o valor de LD obtido para cocaína neste trabalho (3,1 $\mu\text{g L}^{-1}$) se aproxima de valores encontrados em trabalhos que utilizaram técnicas cromatográficas acopladas à espectrometria de massas. Fiorentin e colaboradores [58], por exemplo, obtiveram LD de 1,7 $\mu\text{g L}^{-1}$ ao analisar salivas de usuários de drogas por LC-MS. Bouvarel e colaboradores [105] obtiveram um limite de detecção de 4,2 $\mu\text{g L}^{-1}$ ao desenvolver uma metodologia que utiliza um polímero molecularmente impresso para extração de cocaína em saliva seguido de separação por cromatografia nano-líquida e detecção por ultravioleta. Em contraste, Li e colaboradores [66] utilizaram a PS-MS, sem aplicação de etapas de preparo de amostras, para analisar amostras líquidas contendo cocaína e obtiveram LD de 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [66]. Finalmente, de Paula e colaboradores [61] obtiveram LD de 0,5 mg g^{-1} para análise do extrato de amostras em pó. Diante desses dois últimos exemplos, verifica-se que a eletroextração reduziu significativamente o limite de detecção do método que utiliza PS-MS convencional.

5.2. Extração de corante verde malaquita (MG) em água de torneira

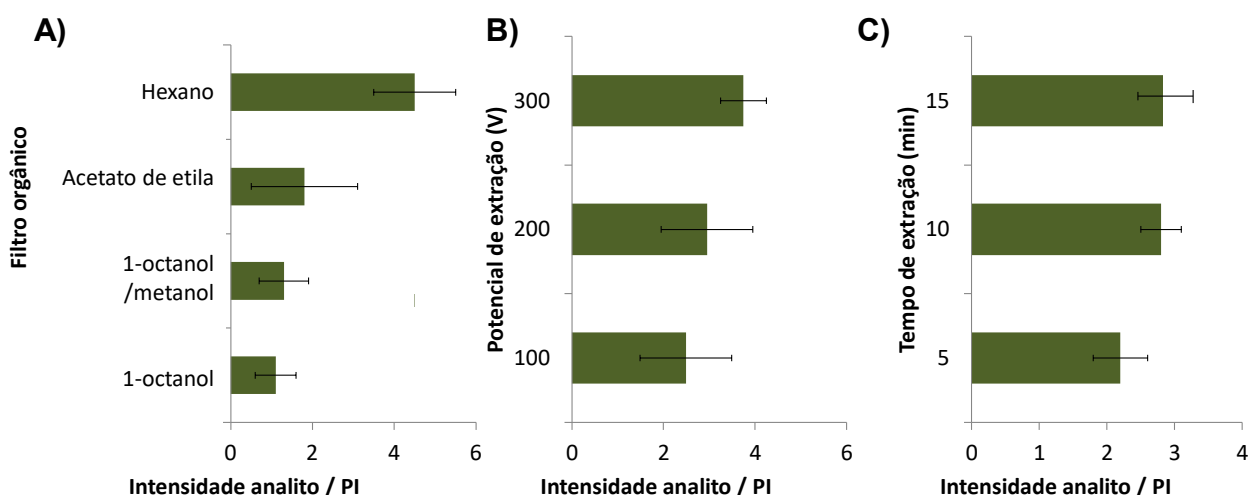
Como um segundo exemplo de aplicação, a metodologia EE-PS-MS foi utilizada na detecção de corante verde malaquita em água de torneira.

Os mesmos parâmetros avaliados para as extrações de cocaína e lidocaína em saliva foram otimizados para extração de MG de água de torneira: composição da fase orgânica (também chamada filtro orgânico), intensidade e tempo de aplicação do campo elétrico.

Os solventes 1-octanol, 1-octanol/metanol 10:1 (v/v), acetato de etila e hexano foram avaliados para compor o filtro orgânico. O potencial elétrico da EE foi avaliado em 100, 200 e 300 V por 5, 10 e 15 minutos. Os gráficos da Figura 3-17 apresentam valores de intensidade analito/PI para os parâmetros estudados. A saber, violeta de metila foi utilizado como padrão interno. A fase doadora foi composta por água de torneira dopada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de verde malaquita e a aceptora por papel cromatográfico embebido em solução de ácido acético a $300 \mu\text{mol L}^{-1}$. As barras de erros referem-se aos desvios padrões obtidos para triplicatas.

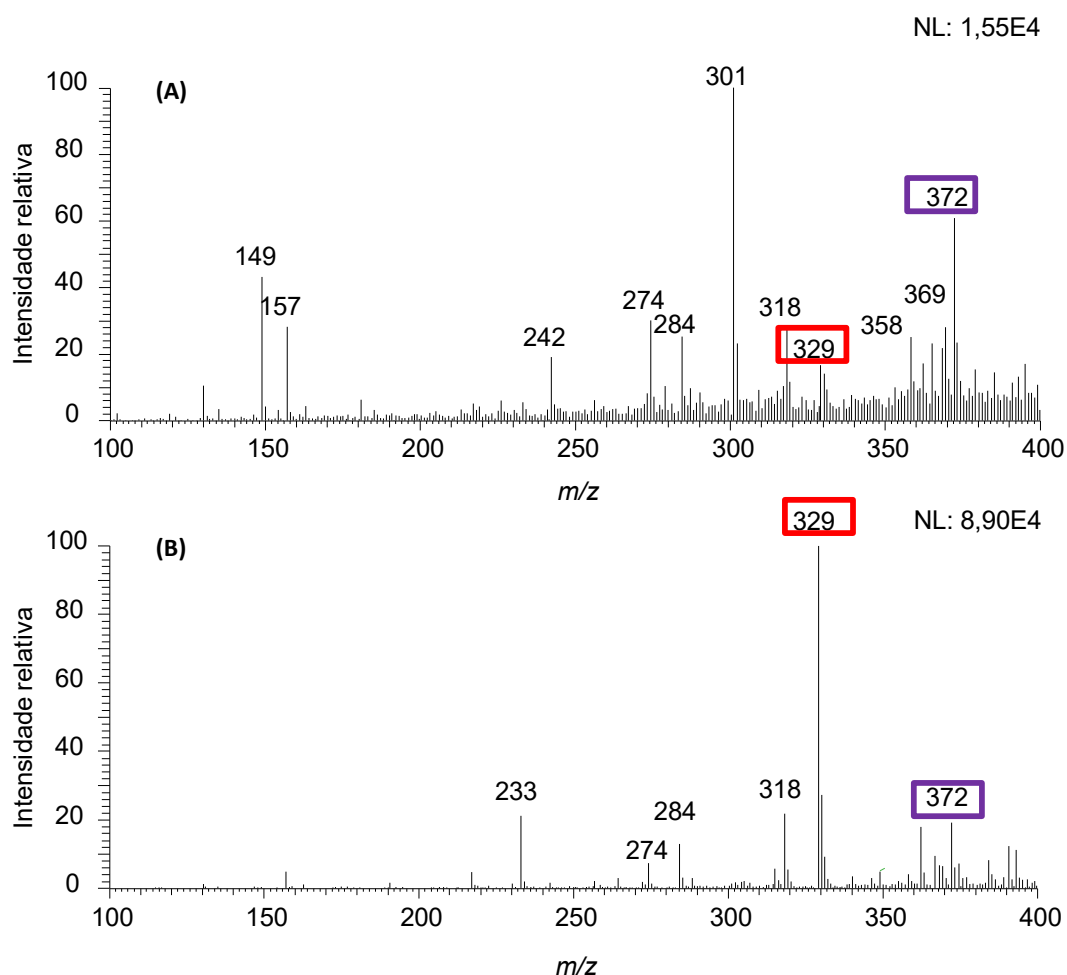
O gráfico (A) da Figura 3-17 indica que hexano é o solvente ideal para a fase orgânica. O gráfico em (B) indica que o maior sinal do analito no espectro de massas foi obtido para extração a 300 V. Em (C) observa-se que de 5 para 10 minutos de aplicação do potencial elétrico houve aumento na eficiência de extração do corante. Porém, não foram notadas diferenças significativas nas intensidades do MG entre as extrações realizadas por 10 e 15 minutos, indicando que a extração foi efetivada durante os 10 minutos iniciais de extração. Em vista disso, a extração do corante MG nos experimentos seguintes foi realizada por 10 minutos.

Figura 3-17: Otimização do sistema de eletroextração para determinação do corante verde malaquita em água de torneira. (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de verde malaquita em água de torneira. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético.



Após a etapa de otimização, o desempenho do método EE-PS-MS foi comparado ao da PS-MS convencional (sem etapas de preparo da amostra). A Figura 3-18 apresenta em (A) o espectro PS-MS obtido sem extração prévia e em (B) o espectro obtido após a eletroextração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de MG em água de torneira. O espectro (A) indica a baixa intensidade do sinal atribuído ao MG, m/z 329, com intensidade relativa de aproximadamente 20%. Em contraste, o sinal do violeta de metila, m/z 372, utilizado como padrão interno, apresentou intensidade de aproximadamente 60%. Após a etapa extração, a intensidade do sinal atribuído ao analito aumentou significativamente. O sinal referente ao MG é o mais intenso do espectro B) e o padrão interno apresenta intensidade de aproximadamente 20%. Além disso, comparando-se os dois espectros, alguns sinais observados em (A), como m/z 149, 157 e 242, não estão presentes em (B), indicando que a EE reduziu interferências da matriz amostral no espectro. A eletroextração associada à PS-MS promoveu um aumento de 14 vezes na intensidade do sinal do corante MG.

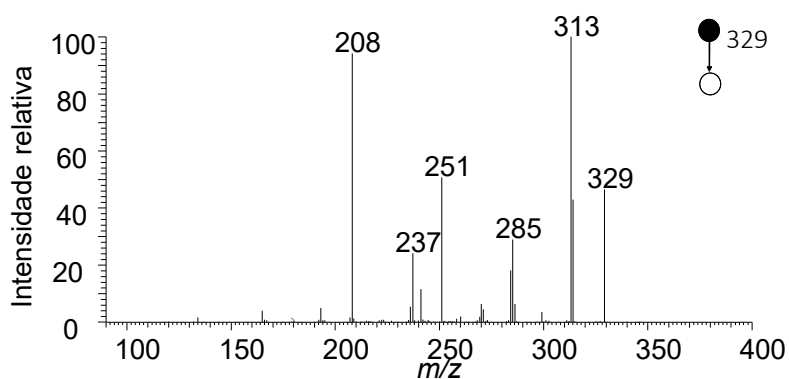
Figura 3-18: Espectro (A) PS(+)-MS e (B) EE-PS(+)-MS obtidos para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de corante verde malaquita (m/z 329 destacado em vermelho) em água de torneira. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, violeta de metila (m/z 372). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético.



O sinal do espectro EE-PS-MS atribuído à molécula de MG foi comprovado por espectrometria de massas sequencial (MS/MS). A energia de colisão utilizada para fragmentar o íon de m/z 329 foi de 18 V. O espectro MS/MS apresenta fragmentos

característicos do íon precursor (Figura 3-19). O sinal de m/z 285 refere-se à perda de uma amina secundária (C_2H_6N) de 44 Da. O sinal de m/z 208, mais intenso do espectro, refere-se à perda do grupo fenildimetilamina ($C_8H_{11}N$) de 121 Da, como ilustrado na Figura 3-19. Além disso, a fragmentação do padrão de MG apresentou perfil espectral similar ao da Figura 3-19, indicando que o sinal m/z 329 obtido no espectro EE-PS-MS refere-se à molécula MG.

Figura 3-19: Espectro EE-PS(+)-MS/MS obtido para o corante verde malaquita, m/z 329, em água de torneira na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$. Energia de colisão de 18 V. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em $300 \mu\text{mol L}^{-1}$ de ácido acético.



Após mostrar-se efetiva na pré-concentração e análise de cocaína e lidocaína em saliva artificial, a EE-PS-MS também apresentou bons resultados na extração e análise de MG em água de torneira. Estudos quantitativos não foram realizados nessa etapa do trabalho.

5.3. Extração de BPA em vinho tinto

Na terceira aplicação desenvolvida, o método EE-PS-MS foi utilizado na análise de BPA em vinho tinto.

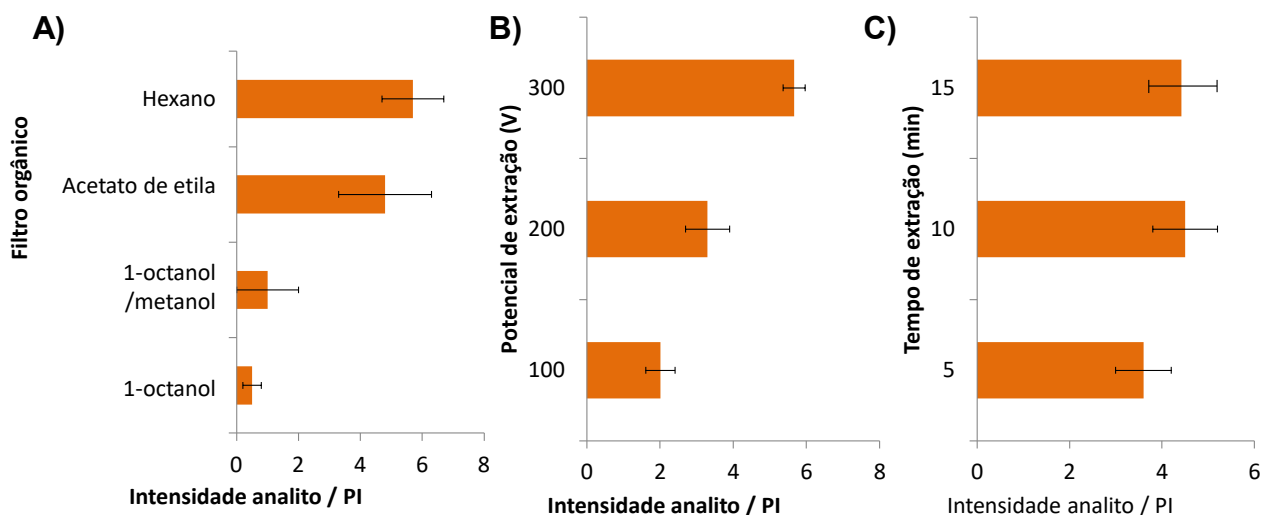
Visto que o método EE-PS-MS foi eficiente para análise de cocaína, lidocaína e MG, moléculas que “respondem” à aplicação de potencial elétrico através da formação de cátion, nesta etapa do trabalho avaliou-se a extração e detecção do ânion BPA⁻.

Para promover a transferência de BPA⁻ da fase doadora para a fase aceptora foi necessário inverter os polos da fonte de eletroforese e alterar o pH da fase aceptora. Quando a fase aceptora é ácida, a grande disponibilidade de íons H⁺ no meio favorece a neutralização do ânion, ocasionando ausência de resposta à aplicação de potencial elétrico. Em vista disso, a solução de ácido acético, utilizada para embeber o papel cromatográfico da fase aceptora nos métodos anteriores, foi substituída por solução hidróxido de amônio 50 µg mL⁻¹ / hidróxido de sódio 50 µg mL⁻¹ 1:1 (v/v). Apesar de a base forte, quando utilizada individualmente, apresentar melhor eficiência para reter o analito, ela causou aumento significativo da corrente elétrica do sistema de extração. Por isso, optou-se por sua mistura com uma base fraca.

Os mesmos parâmetros estudados para a extração da cocaína, lidocaína e MG foram otimizados para extrair BPA das amostras de vinho: filtro orgânico, potencial elétrico e tempo de extração. A escolha da concentração estudada do analito na fase doadora, de 100 µg L⁻¹, foi baseada nos níveis de migração máximos de BPA permitidos em alimentos estabelecidos pela União Européia e China de 600 µg L⁻¹ e Japão de 2,5 mg kg⁻¹ [86,106].

Os solventes 1-octanol, mistura 1-octanol/metanol 10:1 (v/v), acetato de etila e hexano foram avaliados para compor a fase orgânica. O potencial elétrico da EE foi avaliado em 100, 200 e 300 V. O tempo de aplicação do potencial elétrico foi avaliado por 5, 10 e 15 minutos. A Figura 3-20 apresenta os resultados obtidos para os três parâmetros em função da razão entre os sinais do analito e padrão interno (analito/PI). A barra de erros refere-se à variabilidade dos dados obtidos em triplicatas.

Figura 3-20: Otimização do sistema de eletroextração para análise de BPA em amostras de vinho: (A) filtro orgânico, (B) potencial de extração e (C) tempo de extração. Resultados apresentados em função da razão entre as intensidades do sinal do analito e do padrão interno. Fase doadora: $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de bisfenol A em vinho tinto. Fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ / hidróxido de sódio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1 : 1 (v/v).



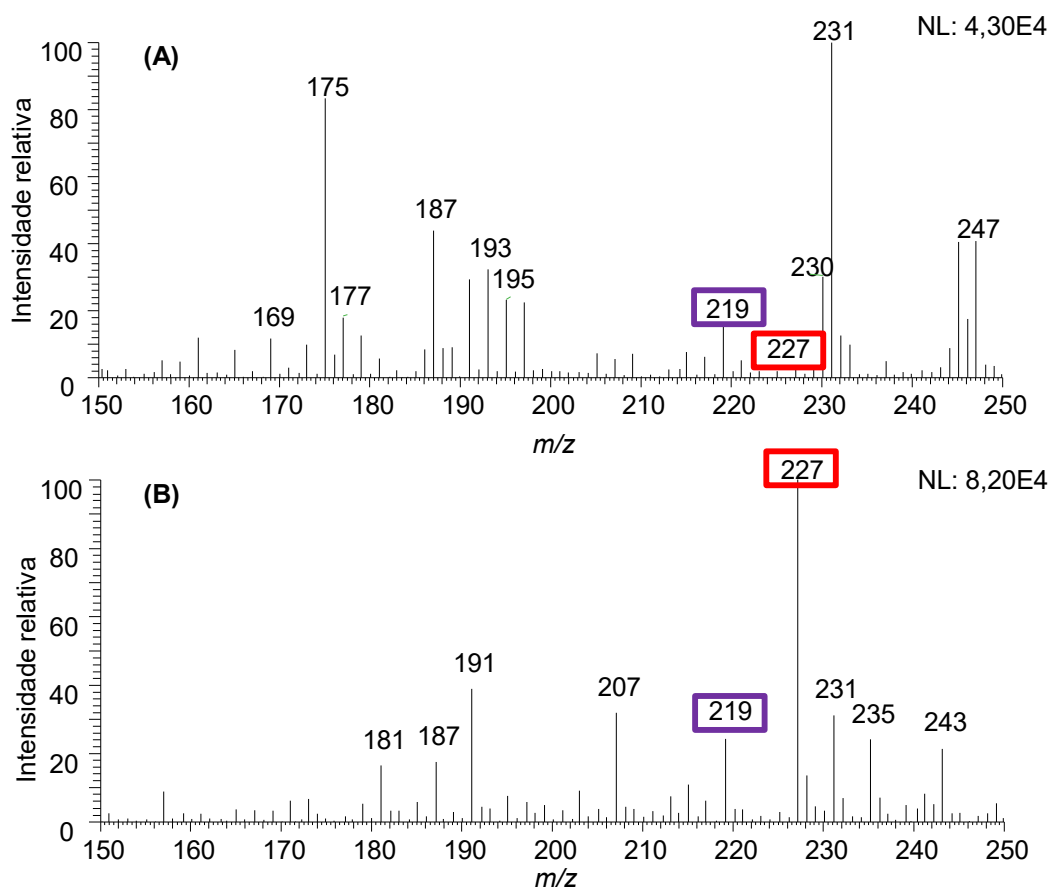
Os gráficos (A), (B) e (C) da Figura 3-20 apontam que, de maneira similar aos métodos desenvolvidos para cocaína, lidocaína e MG, as condições ótimas para extração do BPA em vinho tinto foram: hexano como filtro orgânico e aplicação de potencial elétrico de 300 V por 10 minutos.

A Figura 3-21 apresenta em (A) espectro PS-MS sem extração prévia, e em (B) espectro adquirido após a eletroextração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA em vinho tinto. Sinais provenientes da matriz presentes em (A), tais como os íons m/z 169, 175, 177 e 247, não são observados em (B), evidenciando a alta seletividade da etapa de extração. Em extrações multifásicas assistidas por campo elétrico, moléculas da matriz amostral que não conseguem passar pela interface entre as fases permanecem retidas na fase doadora.

O sinal de m/z 175, com alta intensidade no espectro da Figura 3-21 (A) e ausente em (B), foi atribuído, de acordo com a literatura, à molécula acetato de 3-mercaptohexila, uma das substâncias responsáveis pelo aroma frutado do vinho [107]. O sinal m/z 219, observado nos dois espectros, foi atribuído à molécula do padrão interno, nonilfenol. No espectro obtido por PS-MS convencional sem extração (A), o sinal atribuído ao BPA (m/z 227) apresenta intensidade em nível de ruído. Isto significa

que a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA em vinho tinto encontra-se abaixo do limite de detecção do método PS-MS. Enquanto o nonilfenol (m/z 219) apresenta intensidade relativa de aproximadamente 20%. Em contraste, no espectro (B), obtido por EE-PS-MS, o sinal atribuído ao BPA é o sinal mais intenso, e o nonilfenol apresenta intensidade relativa de cerca de 30%.

Figura 3-21: Espectro (A) PS(-)-MS e (B) EE(-)-PS-MS obtidos para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA (m/z 227 destacado em vermelho) em vinho tinto. O retângulo roxo destaca o sinal atribuído ao padrão interno, nonilfenol (m/z 219). Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano, fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ / hidróxido de sódio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1 :1 (v/v).

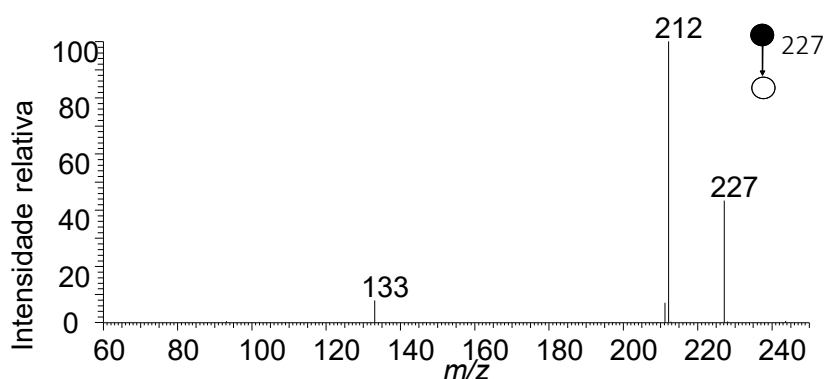


A eletroextração associada à PS-MS promoveu um aumento de 64 vezes na intensidade do sinal do BPA em vinho tinto.

O sinal do espectro EE-PS-MS atribuído à molécula de BPA foi comprovado por espectrometria de massas sequencial. A energia de colisão utilizada para

fragmentar o íon foi de 22 V. O espectro MS/MS, apresentado na Figura 3-22, é compatível com o perfil de fragmentação do padrão BPA, indicando que o sinal m/z 227 obtido no espectro EE-PS-MS refere-se à molécula do analito. O íon m/z 212, mais intenso do espectro da Figura 3-22, refere-se à perda de um grupo metil (CH_3). O sinal m/z 133 refere-se à perda de um fenol, como indicado na Figura 3-22.

Figura 3-22: Espectro EE-PS(-)-MS/MS obtido para $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de BPA em vinho tinto. Energia de colisão de 22 V. Parâmetros da EE: tempo de extração: 10 minutos, potencial elétrico de extração: 300 V, filtro orgânico: hexano fase aceptora: papel cromatográfico embebido em solução hidróxido de amônio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ / hidróxido de sódio $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ 1:1 (v/v).



Alimentos são em sua maioria amostras complexas contendo compostos de interesse em baixas concentrações, principalmente contaminantes. Os espectros EE-PS-MS indicam, através da remoção de sinais provenientes da matriz, alta seletividade do método proposto. O aumento significativo do sinal do analito no espectro evidencia a alta eficiência de extração, o que contribuiu para aumentar a sensibilidade da análise. O método proposto foi capaz de identificar BPA em níveis abaixo dos limites máximos permitidos em alimentos pela União Européia e China, o que não seria possível sem a etapa de eletroextração.

6. CONCLUSÃO

Neste capítulo, uma metodologia que associou pela primeira vez a extração assistida por campo elétrico com a PS-MS foi aplicada com sucesso na análise de cocaína e lidocaína em amostras de saliva sintética, corante verde malaquita em água canalizada e bisfenol A em vinho tinto.

As adaptações feitas no sistema multifásico de eletroextração foram fundamentais para realizar a adsorção dos analitos diretamente no papel. Com isso, etapas de preparo amostral envolvendo dessorção e solubilização do analito foram eliminadas, o que reduziu o volume de solvente utilizado, geração de resíduos e, principalmente, tempo de análise.

Nas três aplicações propostas, a EE associada à PS-MS promoveu significativos enriquecimentos dos compostos de interesse. Aumentos nas intensidades dos sinais analíticos variaram entre 14 e 110 vezes, de acordo com cada proposta desenvolvida. A pré-concentração e remoção de componentes da matriz promoveram a obtenção de espectros de melhor interpretação.

Capítulo 4 EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA EM DISPOSITIVO DE PAPEL APLICADA À DETERMINAÇÃO COLORIMÉTRICA DE COBRE EM CACHAÇA

1. MINIATURIZAÇÃO DE SISTEMAS ANALÍTICOS

A miniaturização de instrumentos analíticos tem revolucionado a química analítica. Inúmeras vantagens tais como praticidade, redução do tempo de análise, baixo consumo de reagentes, pouca geração de resíduos e possibilidade de realizar análises em campo são proporcionadas em sistemas de tamanho reduzido [108,109].

A miniaturização de um sistema analítico vai além do que simplesmente reduzir a escala de sistemas conhecidos [109,110]. A redução do tamanho dos dispositivos aumenta a velocidade das reações e afeta processos químicos relacionados à mistura de soluções, separação analítica e detecção [110-112].

A microfluídica é uma área da ciência e tecnologia que utiliza dispositivos com canais de dezenas a centenas de μm para a manipulação de pequenos volumes de líquidos ou gases [110,111]. Quando acionados por capilaridade, os dispositivos microfluídicos tem a vantagem de não necessitar de equipamento de alimentação externa. Dessa forma, o movimento de um líquido dentro dos microcanais em direção a superfícies funcionalizadas ou câmaras de reação ocorre de forma espontânea [113]. Os dispositivos podem ser fabricados em geometrias variadas a partir de materiais diversos, os quais determinam valor, aplicabilidade e grau de complexidade da análise. Vidro [114], polímeros [115,116] e papel [117] são os materiais mais utilizados.

O uso de substratos de vidro é muito comum na microfluidica devido à transparência óptica, boa resistência química e propriedades de superfície bem conhecidas [114]. No entanto, procedimentos de fabricação, baseados na fotolitografia, demandam infraestrutura especializada e de alto custo. Devido às várias possibilidades de métodos de microfabricação, os substratos poliméricos são uma alternativa viável ao vidro [118]. A diversidade de materiais poliméricos, com amplas propriedades químicas, permite a seleção do material ótimo conforme aplicação [114-116,118,119].

Os dispositivos microfluídicos baseados em papel, ou simplesmente μPAD (do inglês, *microfluidic paper-based analytical device*), têm ganhado destaque pelo baixo custo, simplicidade de produção e facilidade de uso, armazenamento, transporte e descarte. Eles são dispositivos portáteis que exigem pequenos volumes de amostras e

reagentes para detectar uma vasta quantidade e classes de analitos [110,111,113,117,120-123].

Para detecção dos compostos de interesse, os dispositivos podem ser combinados a técnicas analíticas consolidadas como eletroquímica [124], fluorimetria [125], e espectrometria de massas [126]. Ainda, quando a análise envolve reações colorimétricas, plataformas eletrônicas populares, como *scanner* de mesa, câmera digital e de celular, podem ser utilizadas para gerar dados analíticos. O baixo custo, facilidade de acesso e simples manuseio desses equipamentos têm favorecido significativamente a aplicação dos dispositivos microfluídicos em colorimetria [108,113,121,122].

2. EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA

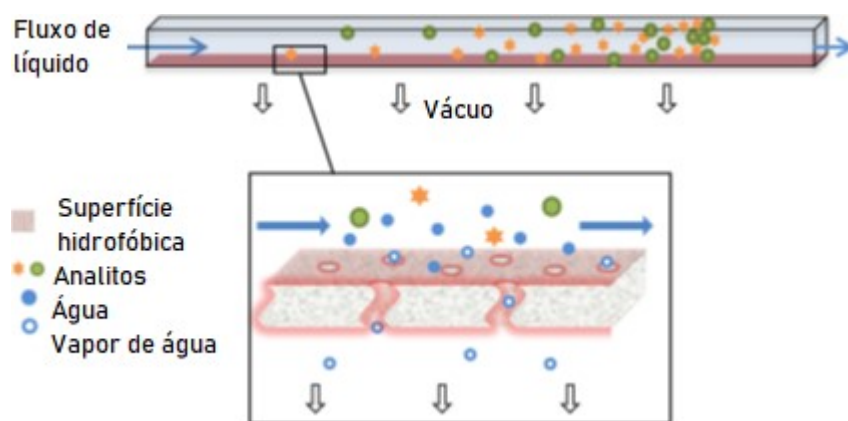
Técnicas de pré-concentração de analitos têm sido cada vez mais estudadas devido à necessidade de identificação e quantificação de substâncias em baixas concentrações. Isso se torna ainda mais crucial quando se trata de amostras com matrizes complexas em que o composto de interesse pode ser suprimido por componentes da amostra [127].

As técnicas de pré-concentração descritas na literatura podem ser classificadas em diferentes tipos de acordo com o princípio empregado. Como exemplos, podem-se citar: (1) adsorção do analito em um substrato, como as técnicas de extração em fase sólida e a microextração em fase sólida [128,129]; (2) extração do analito utilizando um líquido imiscível à matriz da amostra, para este caso tem-se como um dos principais exemplos a extração líquido-líquido [130]; (3) extração eletrocínica, que requer indução de campo elétrico para gerar e conduzir fluxo de moléculas carregadas no interior da amostra [131]; (4) uso de membranas porosas que fazem exclusão e adesão de moléculas de acordo com o tamanho e, por fim, [132] (5) evaporação concentrativa, que consiste em usar meios para evaporar o solvente e/ou a matriz da amostra [133].

A técnica de evaporação concentrativa consiste no uso de calor, diferença de pressão ou fluxo de gases para evaporar solventes. A redução do volume da amostra promove a concentração da substância de interesse [132]. Essa técnica pode ser aplicada de maneira convencional (isolada) e também combinada a outras técnicas pré-concentrativas com o objetivo de aumentar a eficiência do processo. Fornells e colaboradores [132], por exemplo, propuseram um concentrador microfluídico evaporativo de polimetilmetacrilato (PMMA). Uma membrana de politetrafluoretileno, material hidrofóbico, contendo poros de tamanhos controlados foi posicionada na base do concentrador (Figura 4-1, linha rosa). Uma placa de aquecimento possibilitou o controle da temperatura do experimento. Uma bomba de HPLC conectada a uma válvula de injeção manteve a passagem da amostra no interior da membrana em fluxo contínuo. Para realizar a concentração, fez-se necessário uma região de vácuo na parte externa do canal, de acordo com a Figura 4-1. O aquecimento do sistema gerou vapores de água provenientes da matriz da amostra. Essas moléculas foram impulsionadas, através dos poros da membrana, para a região externa (vácuo). O tamanho controlado dos poros da membrana impediu a perda dos compostos de interesse. Os autores reportaram um fator de concentração do analito, no caso cafeína, de 27 vezes em uma hora de experimento. Além disso, os estudos de otimização da temperatura de aquecimento do sistema mostraram um aumento

exponencial do fator de concentração com o aumento da temperatura, com maiores fatores de enriquecimento alcançados em temperaturas mais altas [132].

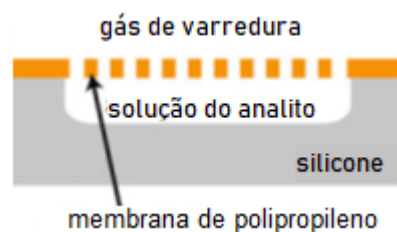
Figura 4-1: Representação ilustrativa de um sistema de concentração de analitos por evaporação concentrativa em membrana proposto por Fornells e colaboradores.



Fonte: Adaptado de E. Fornells, 2017 [132].

Outra proposta, apresentada por Zhang e colaboradores [134] realizou a evaporação concentrativa com o uso de uma membrana de polipropileno (PP). Neste trabalho, a evaporação do solvente (água) da amostra ocorreu por meio da diferença de pressão exercida pela passagem de um fluxo de ar (N_2) em um canal fabricado em um dispositivo microfluídico. Uma membrana hidrofóbica porosa, representada pela linha tracejada amarela na Figura 4-2, separa as fases líquida (solução do analito) e vapor do sistema (passagem do gás de varredura). A passagem desse gás inerte reduz a pressão parcial do vapor da água e, dessa maneira, favorece a sua evaporação. Os autores reportaram um fator de concentração de 16 vezes para o analito vermelho de fenol. Os autores também mostraram uma relação exponencial decrescente entre fator de concentração e a taxa de fluxo da solução aquosa (amostra) no dispositivo [134].

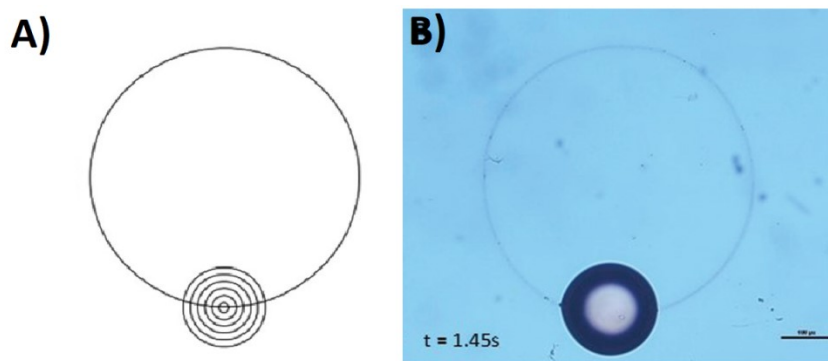
Figura 4-2: Representação esquemática do evaporador concentrativo proposto Zhang e colaboradores



Fonte: Adaptado de Hainan Zhang, 2016 [134].

Tucker e colaboradores [127], por outro lado, utilizaram uma lâmina de vidro recoberta por um material comercial hidrofóbico (Aculon[®]) para construir um dispositivo de pré-concentração em gotas. Canais circulares sobre a superfície hidrofóbica foram criados utilizando um laser (Figura 4-3 A), nos quais o vidro da lâmina, material hidrofílico, ficou exposto. Soluções aquosas contendo o corante vermelho allura em diferentes concentrações foram preparadas e utilizadas para demonstrar o confinamento do analito. Ao adicionar uma gota da solução sobre a lâmina, o anel inteiro, incluindo o de maior tamanho representado na Figura 4-3 A, foi preenchido com o líquido. Quando a gota inicia o processo de evaporação – nesse caso, em condições de temperatura e pressão ambiente - seu volume diminui até se romper em gotas menores. Por repulsão à superfície hidrofóbica, essas gotas menores são rapidamente confinadas sobre a região dos canais circulares hidrofílicos. A secagem da solução sobre o dispositivo leva a uma área de alta concentração do analito (Figura 4-3 B). Os autores aplicaram o dispositivo na detecção colorimétrica de cádmio em amostras aquosas. Resultados indicaram aumento de 20 vezes na intensidade do sinal analítico [127].

Figura 4-3: Dispositivo de pré-concentração em gotas. A) Ilustração dos canais circulares hidrofílicos criados sobre a superfície hidrofóbica do dispositivo. B) Imagem microscópica de uma gota de solução de vermelho allura confinada sobre a região dos círculos hidrofílicos.

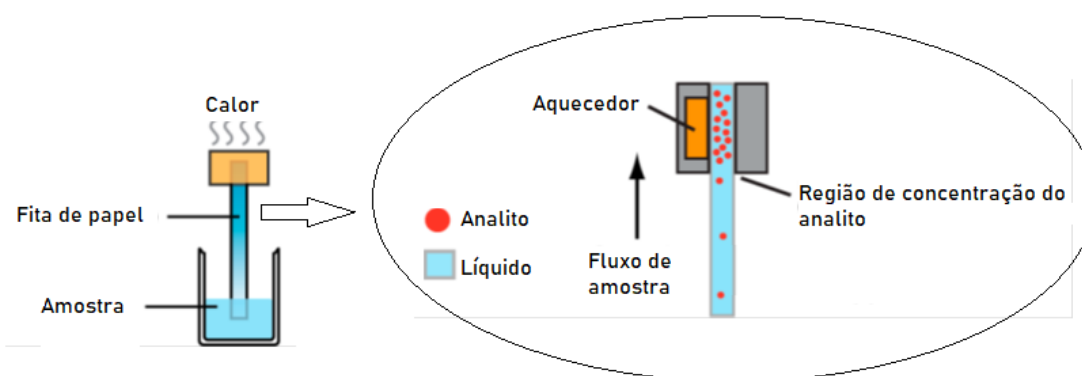


Fonte: Adaptado de Tucker, 2020 [127].

Outra proposta, apresentada por Wong e colaboradores [128], empregou cromatografia líquida em papel associada a uma placa condutora de calor. Essa placa foi posicionada na ponta superior do papel, de acordo com o sistema da Figura 4-4. Nesse sistema, o analito de interesse é impulsionado, por capilaridade, até uma das extremidades do papel cromatográfico. A placa de aquecimento promove a evaporação pontual do solvente, favorecendo a continuidade do fluxo e a consequente

concentração do analito de interesse. O trabalho foi aplicado na análise de lipoarabinomanano, um biomarcador da doença tuberculose, em urina. A quantificação do analito foi feita através de detecção colorimétrica, resultado de imunoensaio quimioluminescente. Os dados obtidos apontaram uma concentração do analito de aproximadamente 20 vezes [128].

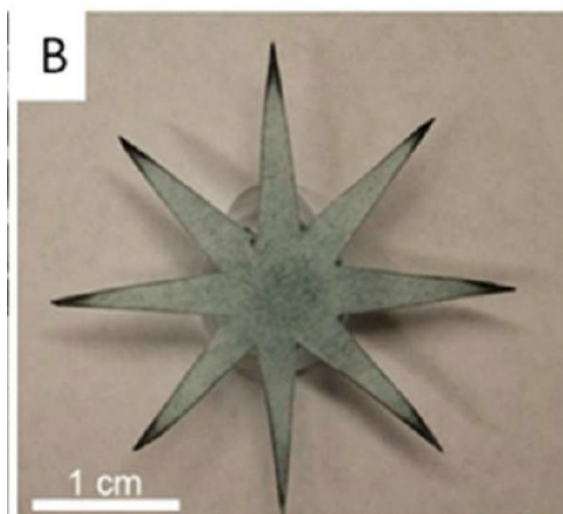
Figura 4-4: Esquema da concentração evaporativa proposta por Wong e colaboradores [54] para concentrar lipoarabinomanano em urina. Por capilaridade, a amostra líquida desloca-se em direção à placa aquecedora na parte superior da fita. Quando a amostra atinge a região aquecida, o solvente se evapora e o analito é então pré concentrado.



Fonte: Adaptado de Wong, 2014 [128].

Outro trabalho envolvendo pré-concentração foi desenvolvido em dispositivos microfluídicos em papel por Abbas e colaboradores [135]. Nesse sistema, promoveu-se a pré-concentração através de um dispositivo em papel com formato de uma estrela de oito pontas, Figura 4-5. Adições da amostra e de um solvente de arraste são realizadas no centro da estrela. O tamanho menor das pontas em relação ao centro da estrela promove maior rapidez na secagem do solvente. Essa característica gera um rápido fluxo de solvente em direção às pontas da estrela, promovendo a separação dos compostos da amostra e pré-concentrando alguns desses compostos nessa região. O dispositivo foi aplicado de maneira eficiente na separação e pré-concentração de: caroteno e clorofila em extratos de espinafre e; solução contendo mistura dos corantes fluoresceína e rodamina 6G. As detecções foram feitas por imagens óticas, fluorescência e espectroscopia Raman. Os autores reportaram os menores limites de detecção para μ PADs apresentados na literatura científica até então, com valores de 100 aM (10^{-18} M) para fluoresceína 100 zM (10^{-19} M) para a rodamina 6G [135].

Figura 4-5: Imagem do dispositivo com oito pontas projetado por Abbas e colaboradores. As extremidades das pontas demonstram a região de acúmulo do analito.



Fonte: Adaptado de Abbas, 2014 [135].

Além de ser feito em papel, um material de baixo custo, de uso diversificado e comum, o dispositivo em formato de estrela é pequeno (Figura 4-5), produzido de maneira simples (através de recorte) e pode ser ideal para análises *point-of-care*.

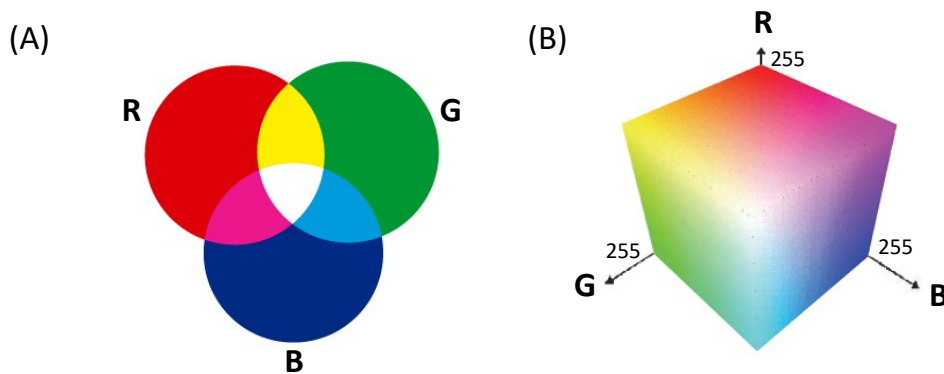
Nesse capítulo, apresenta-se o desenvolvimento de um dispositivo para acoplamento a um sistema de evaporação concentrativa por fluxo de ar. O formato dos dispositivos permite detecção por espectrometria de massas e colorimetria por meio de obtenção de imagens digitais.

3. ANÁLISE DE IMAGENS DIGITAIS

A maneira mais comum de se extrair informações de imagens digitais é através da decomposição em um sistema de cores. O RGB representa o padrão de cores utilizado nos monitores e câmeras fotográficas [136]. Ele é descrito pelas frequências das cores vermelho (R, em $\lambda \approx 630$ nm), verde (G, em $\lambda \approx 545$ nm) e azul (B, em $\lambda \approx 435$ nm), de acordo com a Figura 4-6 (A) [136,137].

A tonalidade de um pixel, unidade formadora básica de uma imagem digital, é descrita a partir da combinação entre R, G e B. A intensidade de cada cor no sistema RGB é medida em canais que variam de 0 a 255. O canal 0 em R, G e B significa completa ausência de uma cor e manifesta tonalidade preta. O canal 255, de intensidade máxima nos três tons, resulta na manifestação da cor branca. Levando em conta que há 256 canais em cada componente (R, G e B), a combinação entre eles fornece mais de 16 milhões de possibilidades de cores (Figura 4-6 (B)) [138].

Figura 4-6: A) Representação gráfica do sistema RGB. B) Formação de tons no sistema RGB.



Fonte: Adaptado de [138] e [139].

Canais obtidos através da decomposição da imagem em RGB são informações analíticas úteis para calibração, classificação e monitoramento de processos [140]. O uso do sistema RGB para gerar dados analíticos tem como vantagens: rapidez de aquisição, simplicidade dos aparelhos necessários (como câmeras digitais, *scanners* e celular) e, além disso, gera menor tamanho de arquivo quando comparado a imagens espectroscópicas [136].

4. DETERMINAÇÃO DE COBRE (II) EM AMOSTRAS AMBIENTAIS E ALIMENTÍCIAS

O cobre é um metal necessário ao funcionamento do organismo humano, pois faz parte de diversos processos fisiológicos. Contudo, a ingestão em excesso é tóxica e está relacionada a distúrbios gastrointestinais, icterícia, insuficiência renal, lesão hepática e Alzheimer [141,142].

Estudos comprovam que bebidas destiladas em destiladores de cobre apresentam melhor qualidade sensorial do que as destiladas em destiladores de alumínio, aço inoxidável ou porcelana [143]. A melhora no sabor é ocasionada porque o cobre do destilador proporciona redução da acidez, dos teores de aldeídos e de compostos de enxofre, responsáveis por sabores e cheiros indesejáveis à bebida. Entretanto, destiladores de cobre tem como desvantagem a alta concentração do metal que é transferida para a bebida na forma de Cu^{2+} [144,145]. Em geral, elementos como Cu^{2+} , As^{5+} , Pb^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} são encontrados em bebidas destiladas, mas o que geralmente apresenta maior concentração dentre esses é o Cu^{2+} [141].

Em virtude disso, a concentração de Cu^{2+} em bebidas destiladas é controlada pelas agências reguladoras em diversos países. No Brasil, o MAPA limita a concentração máxima permitida de Cu^{2+} em cachaça em 5 mg L^{-1} [146]. Quando se trata de produto para exportação esse valor é ainda menor, países como México e Estados Unidos limitam a concentração de Cu^{2+} em 2 mg L^{-1} [147-150].

No Brasil, os métodos oficiais para a determinação de cobre em cachaça empregam espectrometria de absorção atômica (EAA) com atomização por chama e também espectrofotometria molecular no ultravioleta-visível com uso de ditioicarbamatos como reagentes cromóforos [141,151]. Todavia a aplicação desses métodos exige equipamentos não portáteis e de alto investimento para o pequeno produtor.

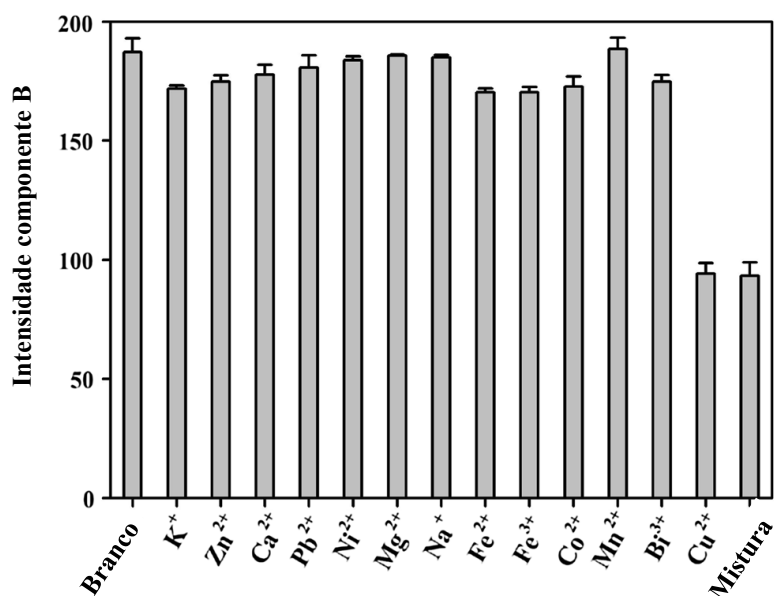
A reação entre Cu^{2+} e dietilditioicarbamato de sódio (NaDDTC) é comumente utilizada para promover a detecção colorimétrica do metal [152,153]. A reação entre duas moléculas do sal e um átomo de Cu^{2+} gera o complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, com coloração amarelo-acastanhado de intensidade estável por horas [141,150]. O complexo formado não é solúvel em água e, em vista disso, processos de centrifugação, filtração e solubilização em clorofórmio fazem parte do preparo da amostra [152,153]. Apesar de o DDTC^- não ser seletivo ao cobre e formar complexos com uma variedade de íons metálicos, estudos comprovam que ele apresenta alta afinidade aos átomos de Cu^{2+} [144,153].

A literatura científica apresenta aplicações do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ para determinação de cobre em bebidas destiladas. Fernandes e colaboradores [144], por

exemplo, desenvolveram um microdispositivo de papel para quantificação de Cu^{2+} em cachaças por imagens digitais. O dispositivo analítico foi projetado em papel cromatográfico com um diâmetro de 15 mm utilizando uma impressora de impressão em cera. Após 5 minutos da adição de 20 μL da amostra seguidos de 40 μL NaDDTC (tempo estimado para estabilização do complexo) as imagens digitais foram obtidas utilizando um *scanner*. O referido trabalho apresenta vantagens como a não necessidade de extração do complexo por um solvente orgânico, análises rápidas e baixo custo. Um limite de quantificação de 4,7 mg L^{-1} foi obtido [144], indicando que o método pode ser aplicado para monitoramento do metal em amostras destinadas ao comércio brasileiro (limite máximo permitido de $[\text{Cu}^{2+}] = 5 \text{ mg L}^{-1}$). Entretanto, o LQ obtido inviabiliza a aplicação do método para determinação do metal em cachaças destinadas à exportação (limite máximo permitido de $[\text{Cu}^{2+}] = 2 \text{ mg L}^{-1}$). Garcia e colaboradores [150] desenvolveram método para detectar $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ em tequila. Após adição do complexante na solução da amostra, o complexo formado foi extraído da amostra por extração líquido-líquido em clorofórmio. Em seguida, o solvente foi evaporado, e após reconstituição em acetonitrila, o analito foi co-cristalizado com ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e detectado por MALDI-TOF-MS [150].

A literatura também apresenta métodos de determinação de Cu^{2+} em amostras ambientais através da reação do analito com DDTC⁻. Xie e colaboradores [142], por exemplo, desenvolveram um sistema microfluídico para quantificar cobre em água canalizada através da reação colorimétrica do metal com NaDDTC sobre papel de filtro. Os autores utilizaram um celular para obter imagens do produto da reação, através das quais foram obtidos os dados analíticos. O trabalho avaliou a seletividade do método ao comparar o sinal analítico gerado por uma amostra contendo 100 mg L^{-1} de Cu^{2+} com o sinal analítico gerado por amostras de 5000 mg L^{-1} de K^+ , Zn^{2+} , Ca^{2+} , Pb^{2+} , Ni^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Fe^{3+} e Co^{2+} . O sinal analítico obtido para a solução de Cu^{2+} foi comparado com o sinal obtido para a solução de cada metal, e também com o da mistura entre todos eles. O resultado (Figura 4-7) mostra que, com exceção do Cu^{2+} , os demais metais apresentaram sinais analíticos na componente B (do sistema de cores RGB) próximos ao branco, indicando que os metais avaliados não interferem no sinal analítico do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. A mistura entre todos os metais apresentou sinal próximo ao da solução de Cu^{2+} . Mesmo com os íons metálicos estudados presentes na solução em concentrações bem mais elevadas que a do Cu^{2+} , a formação do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ não foi prejudicada. Segundo os autores, não houve interferências no sinal analítico da solução de cobre devido à alta estabilidade da ligação formada entre ele e o DDTC⁻. Dentre os íons metálicos avaliados, a ligação do sal com o cobre (II) é a mais favorecida [142].

Figura 4-7: Avaliação da seletividade do complexante DDTc frente a diferentes soluções contendo metais e uma solução com a mistura de todos eles. Solução de Cu^{2+} com concentração de 100 mg L^{-1} e demais metais com concentração de 5000 mg L^{-1} .



Fonte: Adaptado de Xie, 2019 [142].

Outro trabalho que utilizou o sistema Cu-DDTC foi apresentado por Sereshti e colaboradores [154]. Os autores utilizaram o NaDDTC como agente extrator para Cu^{2+} , Fe^{2+} e Zn^{2+} em tecidos de algas e em água. O precipitado formado foi centrifugado, seco e dissolvido em ácido nítrico para detecção por ICP-OES. Uddin e colaboradores em 2013 [136] e Arvand e colaboradores [152], em 2014, propuseram métodos UV-vis para análise de Cu^{2+} em água ambiental. Em ambos os trabalhos o NaDDTC também foi empregado como agente extrator. Os precipitados formados foram removidos da amostra por extração líquido-líquido, sendo que para essa etapa Uddin utilizou clorofórmio e Arvand tetracloreto de carbono. Wang e colaboradores, por outro lado, empregaram a cromatografia líquida com detecção por UV aliada ao preparo da amostra por SPE [155]. Solução contendo NaDDTC foi adicionada a uma solução contendo Cu^{2+} e, após tempo de reação de 5 minutos, a mistura passou por um cartucho de SPE contendo uma esponja de nanotubo de carbono como adsorvente. Em seguida, as moléculas de $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ retidas na esponja de nanotubo de carbono foram eluídas em solução de acetonitrila. O solvente foi então evaporado em temperatura ambiente, e por fim, o resíduo foi dissolvido em metanol e injetado no cromatógrafo. Os autores reportaram redução de aproximadamente dez vezes no limite de detecção do método, quando comparado com trabalhos que utilizaram apenas o UV-vis como técnica de análise [155].

A literatura também descreve o uso da bis(ciclohexanona)oxaldihidrazona ($C_{14}H_{22}N_4O_2$), conhecida como cuprizona, como reagente cromóforo utilizado na detecção colorimétrica de Cu^{2+} . Duas moléculas de cuprizona reagem com o Cu^{2+} produzindo um complexo de coloração azul escuro [156]. Franco e colaboradores [156] desenvolveram um dispositivo de papel de filtro funcionalizado com cuprizona para determinar o teor de Cu^{2+} em cachaça. O dispositivo consistiu em um círculo de papel contendo o reagente imobilizado e delimitado por barreira hidrofóbica de cera. Após imobilização da cuprizona na superfície do papel, o dispositivo foi inserido numa solução contendo o analito. As imagens digitais foram obtidas utilizando um celular. Limites de detecção de $0,034 \text{ mg L}^{-1}$ e quantificação de $0,103 \text{ mg L}^{-1}$ foram obtidos [156]. Por outro lado, Pessoa e colaboradores [157] desenvolveram um método de detecção colorimétrica do quelato cobre-cuprizona diretamente em uma placa de porcelana contendo seis poços. Soluções contendo o analito e o complexante foram adicionadas diretamente nesses poços. A captura das imagens digitais da placa de porcelana foi realizada utilizando uma câmera digital. Um dispositivo portátil, construído a partir de uma caixa de plástico preto, foi desenvolvido para garantir a reprodutibilidade das análises e minimizar a reflexão ou efeitos de sombra causados por luz externa. Os limites de detecção e quantificação obtidos foram de $0,078 \text{ mg L}^{-1}$ e $0,26 \text{ mg L}^{-1}$, respectivamente [157].

Neste capítulo da tese, a microfluídica foi aliada à pré-concentração evaporativa para o desenvolvimento de um dispositivo de papel para detecção colorimétrica de $Cu(DDTC)_2$ em cachaça.

5. MATERIAIS E MÉTODO

5.1. Amostras e reagentes

As amostras de cachaça produzidas em alambiques de cobre, de quatro marcas diferentes, foram adquiridas em supermercados da região de Belo Horizonte. A saber: Fazenda Nicarágua, Jequitinhonha, Segredo do Patriarca e Liberação. Uma outra amostra, da cachaça Dose Mineira, foi adquirida diretamente de um produtor da cidade de São Domingos do Prata, MG.

Foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: solução padrão de Cu^{2+} 1000,00 mg L⁻¹ da Carlo Erba (Sabadell, BCN, ES), dietilditiocarbamato de sódio (NaDDTC) da Nuclear (Nova York, NY, USA), álcool etílico anidro 99,8% P.A. da Synth (Diadema, SP, BR), hexano da Vetec (Duque de Caxias, RJ, BR), acetato de etila da Synth (Diadema, SP, BR), metanol, acetonitrila e octanol grau HPLC da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) e água deionizada obtida em um sistema modelo Millipak 40 Express (Mili-Q, Corporação Millipore, Bedford, MA, USA),

5.2. Instrumentação

Um sistema de evaporação e aquecimento Pierce Reacti-Vap Modelo 18780 (Rockford, IL, USA) conectado a um cilindro de nitrogênio foi utilizado na etapa de evaporação concentrativa.

As imagens digitais foram obtidas com um *scanner* de mesa da marca Canon (modelo CanoScan Lide 110) com resolução de 600 dpi. Os parâmetros RGB foram obtidos usando o software ImageJ (domínio público, desenvolvido pela Universidade de Wiscosin).

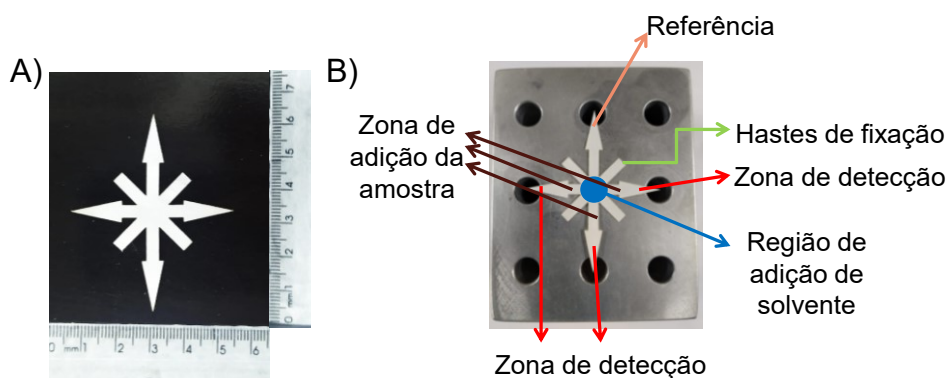
Um espectrômetro de absorção atômica Varian modelo AA240FS (Melbourne, VIC, AU) com atomização por chama foi empregado para o desenvolvimento do método de referência.

5.3. Dispositivos μ PAD

Papel cromatográfico Whatman modelo nº 1 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) foi empregado para construção dos μ PADs. O formato em estrela de 5,5 cm x 6,5 cm está apresentado na Figura 4-8 A. O modelo foi desenvolvido no software CoreIDRAW® Graphics Suite 2020 (Trial Version) e transferido para o papel cromatográfico através de uma máquina de corte a laser Zumaq modelo ZM 4040 (Santo André, SP, BR).

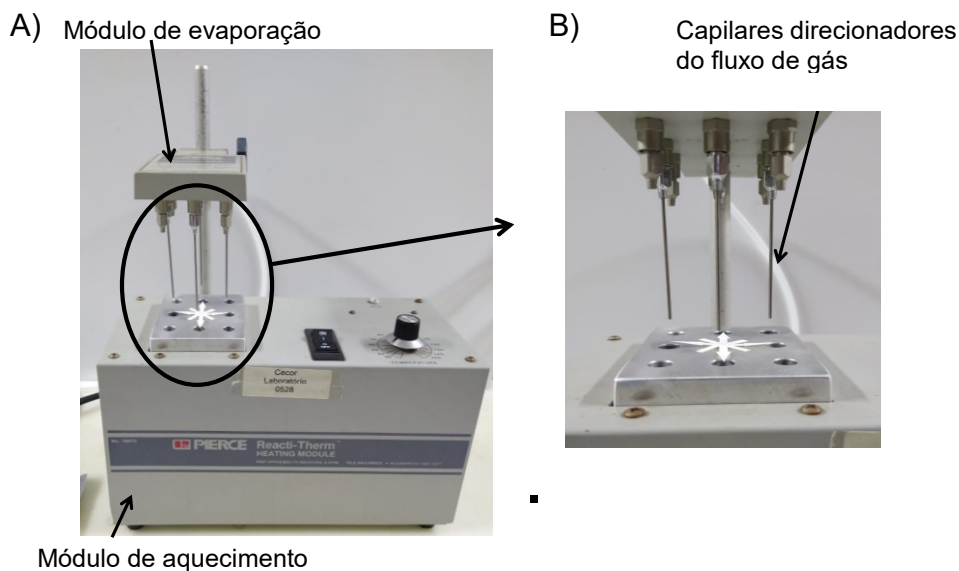
O formato do dispositivo em estrela (Figura 4-8 B) possui as seguintes funcionalidades: (i) seu centro é a região de adição de solventes; (ii) a região estreita entre o centro e o triângulo é o ponto de adição de amostra e por onde corre o fluxo do solvente/solução responsável por transportar o analito até as zonas de detecção; (iii) possui três zonas de detecção em formato triangular, permitindo análises em triplicata e uma zona de mesmo formato para ser empregada como referência; (iv) quatro hastes para fixar o dispositivo no bloco metálico do sistema de evaporação. O formato triangular das extremidades do dispositivo foi desenvolvido visando o acoplamento direto com a PS-MS.

Figura 4-8: A) Formato em estrela do dispositivo desenvolvido neste trabalho. B) Identificação das quatro zonas de detecção dentre as quais uma é utilizada como referência, três zonas de adição da amostra, região de adição de solvente e hastes de fixação do dispositivo no bloco metálico.



O tamanho do dispositivo foi definido para seu encaixe ideal no bloco metálico do equipamento de evaporação, como ilustrado nas fotos das Figura 4-8 B e Figura 4-9. O bloco de evaporação foi utilizado com quatro saídas de ar através de capilares direcionados às extremidades do μ PAD. Como observado, os vértices de cada um dos quatro triângulos são posicionados nos centros dos poços do bloco metálico, para que os mesmos sejam atingidos pelo fluxo de gás, como mostra a foto da Figura 4-9 B. Apesar de o bloco de evaporação utilizado nos experimentos estar acoplado ao módulo de aquecimento (Figura 4-9 A), não houve aquecimento do sistema. O módulo de aquecimento foi utilizado apenas como suporte para fixar a placa metálica e garantir o direcionamento ideal do fluxo de gás.

Figura 4-9: A) Sistema utilizado para a pré-concentração evaporativa. O dispositivo de papel é posicionado sobre um bloco metálico que serviu como suporte e garantiu o posicionamento ideal dos capilares de direcionamento do fluxo de gás (N_2). B) Aproximação da região do bloco de evaporação com os quatro capilares de passagem de ar direcionados às extremidades dos triângulos do μ PAD.



5.4. Preparo das amostras

Para os estudos de otimização e construção da curva analítica, soluções com diferentes concentrações de Cu^{2+} foram preparadas a partir da diluição da solução padrão em solução aquosa (água Mili-Q) contendo 40% (v/v) de etanol (que é o teor médio de etanol comumente encontrado em amostras de cachaça). Para os testes de adição e recuperação, volumes previamente calculados do padrão do metal foram adicionados à amostra de cachaça.

Soluções estoque de NaDDTC nas concentrações de 0,1%; 1% e 2% (m/v) foram preparadas através da solubilização em água Mili-Q de quantidade de massa do sal previamente calculada.

Na análise por espectrometria de absorção atômica, o método adição de padrão foi utilizado. Adicionou-se alíquotas do padrão do metal em seis balões volumétricos de 5 mL para atingir as concentração de $Cu^{2+} = 1,0; 2,0; 3,0; 4,0$ e $5,0 \mu g mL^{-1}$. Em seguida, foi adicionado em cada balão 1,0 mL da amostra e completou-se o volume com água Mili-Q.

5.5. Análises usando os dispositivos analíticos de papel

Inicialmente, o dispositivo foi posicionado no bloco metálico e fixado através das hastes com auxílio de fitas adesivas. 2 µL de solução contendo Cu²⁺ foram adicionados às três zonas de adição de amostra do dispositivo e também à zona de referência. Em seguida, iniciou-se a passagem de ar direcionado pelos capilares às extremidades dos triângulos. Solvente com composição otimizada (mistura H₂O/MeOH 2:1) foi adicionado à região de adição de solvente com frequência e tempo também otimizados (30 µL a cada 30 segundos, tempo total de pré-concentração foi de 3 minutos). Foram avaliados os solventes: água, metanol, acetonitrila e as misturas de água e metanol nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (v/v). O volume, frequência de aplicação e o tempo total de adição do solvente foram definidos durante os experimentos por meio de avaliação da quantidade de solvente retida no papel.

Ao término do processo de evaporação concentrativa, 5 µL de solução de NaDDTC foram adicionados às zonas de detecção e, após tempo otimizado em 5 minutos, foram feitas imagens dos dispositivos utilizando um *scanner* de mesa. A estabilidade do tom do complexo foi avaliada por 30 minutos, com monitoramento da cor da imagem a cada cinco minutos.

5.6. Análises por espectrometria de absorção atômica (EAA)

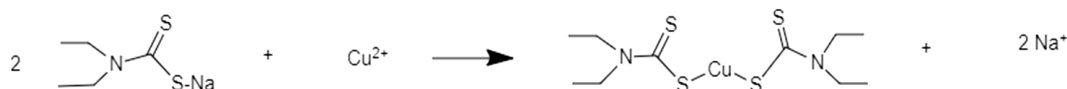
Uma lâmpada de catodo oco para cobre (marca Hitachi) foi utilizada operando a 10mA. Condições instrumentais utilizadas: comprimento de onda de 324,8nm, largura da fenda de 1,3nm, altura do queimador de 7,5mm e vazão do gás combustível de 2,2 L/min (ar-acetileno).

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Detecção colorimétrica de Cu em cachaça

As otimizações das condições de análise foram realizadas utilizando uma solução contendo $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ de Cu^{2+} . No estudo de otimização da concentração de NaDDTC, $2 \mu\text{L}$ da solução de Cu^{2+} foram adicionados às zonas de detecção, seguidos por $5 \mu\text{L}$ de solução do sal e, logo em seguida, as imagens foram obtidas. Nessa etapa não foi realizada a pré-concentração evaporativa, uma vez que o objetivo era avaliar a intensidade da cor do complexo. A reação química entre o Cu^{2+} e o NaDDTC (Figura 4-10) com formação de composto cromóforo foi avaliada nas concentrações de 0,1%; 1% e 2% m/v do sal. Os valores de concentrações estudados foram selecionados de acordo com estudos já realizados para esse sistema [127,135]. Imediatamente após a mistura entre metal e complexante foi observada uma região de coloração amarela sobre o papel cromatográfico, indicando a formação do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$.

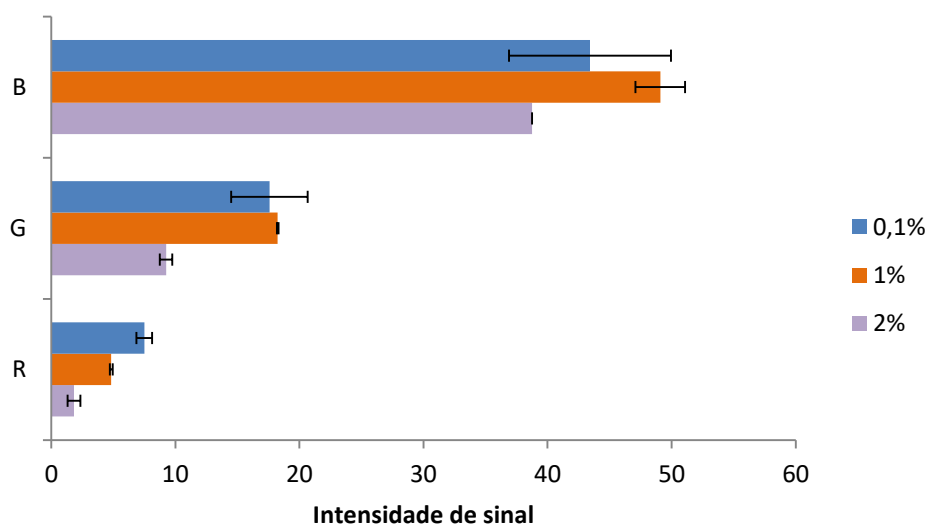
Figura 4-10: Reação de coordenação entre Na-DDTC e Cu^{2+} que resulta na formação do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$, composto cromóforo de coloração amarela.



Para todos os resultados apresentados neste capítulo, o sinal do branco, obtido utilizando a imagem da zona de referência, foi subtraído dos sinais das zonas de reação. O objetivo da subtração de sinais foi garantir a remoção de interferências de fundo geradas pela tonalidade do papel cromatográfico e também minimizar os efeitos de variações na intensidade da luz que podem ocorrer durante a obtenção das imagens.

Os resultados apresentados na Figura 4-11 mostram que a componente B do sistema de cores aditivas RGB foi a que apresentou maior intensidade para a coloração do complexo formado, visualmente amarelo. Além disso, a concentração de 1% m/v de NaDDTC foi a que proporcionou maiores sinais analíticos para as componentes B e G. Para a componente R, a concentração de 0,1% m/v apresentou maior intensidade de sinal. Embora mais concentrada, em nenhuma das condições a solução contendo 2% m/v do sal proporcionou maior sinal analítico. A solução contendo 1% m/v do sal foi utilizada nas etapas seguintes deste trabalho.

Figura 4-11: Gráfico das componentes R, G e B obtidas por imagens digitais para estudo de otimização da concentração de NaDDTC. Foram avaliadas as concentrações de 0,1%, 1% e 2% m/v. As imagens digitais foram geradas utilizando um scanner de mesa.



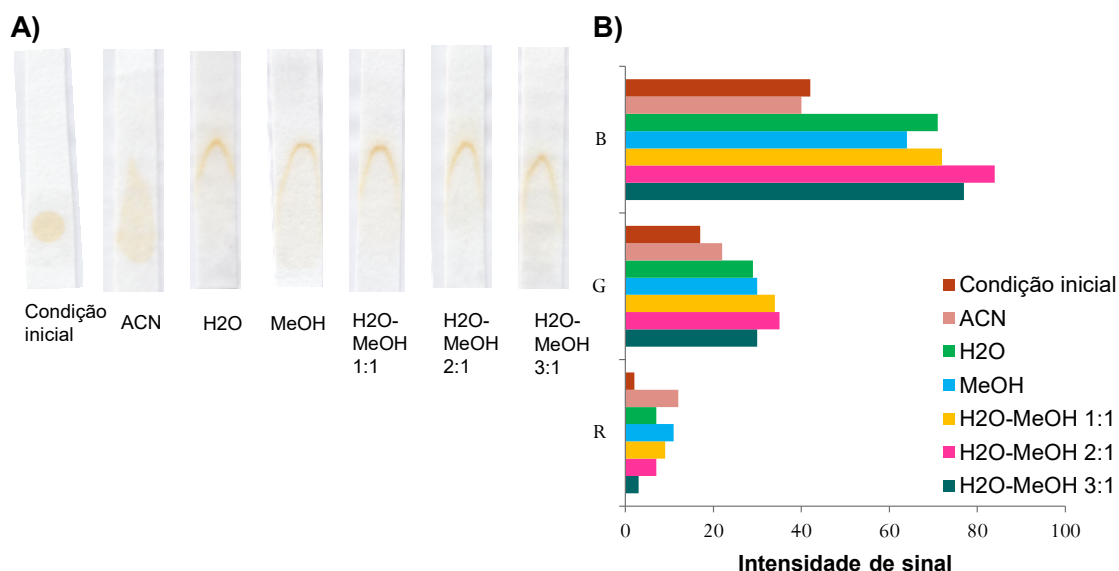
Em continuidade à otimização, a capacidade de arraste do analito na etapa de pré-concentração foi avaliada para os seguintes solventes: água, metanol, acetonitrila e as misturas de água e metanol nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (v/v). Para esses testes, 2 μL de solução de Cu^{2+} 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados na base de uma tira de papel cromatográfico seguido de 5 μL de solução de NaDDTC 1% m/v. A reação gerou uma pequena região circular de tonalidade amarela característica do complexo (Figura 4-12 A). Em seguida, essa tira foi colocada em um béquer contendo 1 mL do solvente avaliado e então aguardou-se cinco minutos para o processo de eluição. Observou-se que à medida que o solvente arrastava o complexo, a coloração amarelada foi tornando-se cada vez mais clara até desaparecer totalmente, indicando que à medida que o complexo foi arrastado sobre o papel o complexo se desfez. Solventes apolares como hexano, octanol e acetato de etila também foram testados nessa etapa do trabalho, mas os mesmos resultados de perda da coloração do complexo foram observados. Apesar de o complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ já ter sido amplamente estudado, não foram encontrados trabalhos que realizaram estudos de cromatografia em papel ou de pré-concentração em dispositivo de papel.

A forma encontrada para evitar a degradação do complexo pelo arraste do solvente foi realizar a eluição apenas da solução de Cu^{2+} e, ao fim do processo, adicionar a solução do complexante. Deste modo, a etapa de otimização do solvente de eluição consistiu em: adicionar 2 μL de solução de Cu^{2+} a 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ na base da fita de papel cromatográfico, posicionar a fita em um béquer contendo 1 mL do

solvente a ser avaliado, aguardar cinco minutos para o processo de eluição, remover a fita do béquer e, por fim, adicionar 5 μL de solução de NaDDTC 1% m/v para identificar a região em que o Cu^{2+} foi pré-concentrado. Por último, escanear as fitas e obter as intensidades das componentes RGB da região de maior intensidade de cor.

A Figura 4-12 A mostra imagens obtidas utilizando um *scanner* de mesa das fitas de acordo com cada solvente de arraste avaliado. A fim de comparação, a imagem da condição inicial mostra o complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ formado pela mistura das soluções de Cu e NaDDTC, nos volumes e concentrações otimizadas, sem passar por processo de eluição. Como observado, a acetonitrila (ACN) apresentou os piores resultados para eluição do complexo. Em contrapartida, água, metanol (MeOH) e suas misturas apresentaram boa capacidade para eluição.

Figura 4-12: A) Tiras de papel cromatográfico em condição inicial, prévia à eluição, e após eluição com fases móveis compostas por acetonitrila, água, metanol, e misturas água e metanol nas proporções de 1:1, 2:1 e 3:1 (v/v). B) Gráfico de barras com os sinais R, G e B obtidos pelas imagens digitais de cada uma das fitas em função do solvente. Imagens digitais geradas através de scanner de mesa.



Os resultados dos estudos de otimização do solvente de eluição, apresentados no gráfico de barras da Figura 4-12 B), indicam que as maiores intensidades de sinal - para componentes B e G - foram obtidas com a utilização da mistura $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ 2:1 (v/v). Dessa maneira, essa mistura de solventes foi considerada a composição ideal para eluição e pré-concentração do Cu^{2+} sobre o papel cromatográfico e, em vista disso, foi a composição utilizada nos experimentos posteriores.

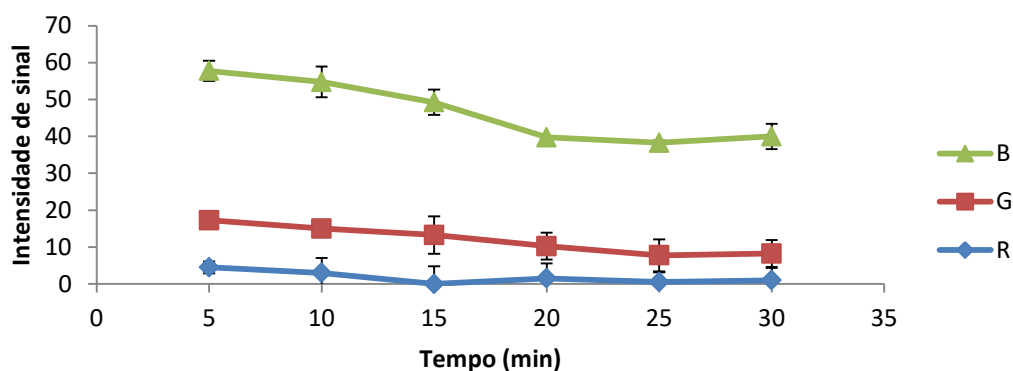
A passagem do fluxo de N_2 foi importante para o processo de pré-concentração. O gás inerte posicionado de maneira vertical nas extremidades

triangulares do dispositivo reduz a pressão parcial do vapor do solvente naquela região e, assim, favorece o processo de evaporação. Esse fenômeno gera um rápido fluxo de solvente do centro do dispositivo (região de adição de solvente) para as zonas de detecção nas pontas dos triângulos, arrastando o analito da zona de adição da amostra para as extremidades e, ao mesmo tempo, os concentrando.

A pressão do fluxo de ar necessária aos experimentos foi extremamente baixa, com valor abaixo da capacidade mínima de medição do manômetro do cilindro. Por isso, a velocidade exata do fluxo de ar não foi determinada. Esse parâmetro foi padronizado de forma manual ao manter a válvula de passagem de gás do cilindro na mesma posição em todos os experimentos.

A última etapa da otimização consistiu em avaliar a estabilidade da intensidade de cor do complexo sobre o papel em função do tempo. Após a adição do NaDDTC nas zonas de detecção, o dispositivo foi monitorado por 30 minutos, com obtenção de imagens a cada 5 minutos. Os resultados, apresentados na Figura 4-13, mostram que a intensidade do sinal obtido para a componente B reduziu durante os 20 minutos iniciais. Nos 10 minutos seguintes, o sinal manteve-se estável. Observou-se ao fim do experimento redução de cerca de 30% na intensidade do sinal da componente B. Em relação à componente G, o sinal reduziu de maneira constante durante todo o experimento, atingindo metade da intensidade inicial. O sinal obtido pela componente R foi extremamente baixo e, por isso, não foi possível extrair informações referentes à estabilidade da coloração do complexo. Levando em consideração que a maior intensidade do sinal analítico foi observada em 5 minutos após a adição de NaDDTC nas zonas de detecção, esse foi o tempo selecionado para escanear os dispositivos de papel nos experimentos subsequentes.

Figura 4-13: Dados das componentes R G e B obtidos por imagens digitais para estudo de estabilidade da cor do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ em função do tempo. Imagens digitais geradas através de scanner de mesa.



Após a otimização dos parâmetros experimentais, avaliou-se o método proposto na detecção de cobre nas concentrações 5 e 2 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que são aquelas previstas nas legislações brasileira e internacional, respectivamente, para comercialização de cachaças. A critério de comparação, foram avaliadas a intensidade de cor na componente B tanto no dispositivo submetido à concentração evaporativa quanto no dispositivo convencional (sem pré concentração). O experimento convencional (sem pré-concentração) consistiu em adicionar metal e complexante diretamente nas zonas de detecção, sem qualquer eluição.

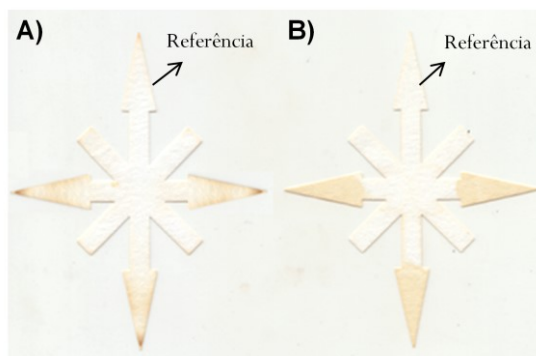
A Tabela 4-1 apresenta os valores de sinal analítico obtidos e os respectivos desvios padrão. Para 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, o sinal analítico gerado pelo dispositivo após a pré concentração evaporativa foi de 38 enquanto que no dispositivo sem pré concentração não foi detectada a presença do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. Para 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, os sinais obtidos foram de 17 e 68 para os sistemas sem e com pré-concentração evaporativa, respectivamente. Assim, a combinação do dispositivo de papel com a concentração evaporativa gerou aumento de quatro vezes na intensidade do sinal analítico.

Tabela 4-1: Comparação entre os métodos μPAD com e sem pré concentração evaporativa para as concentrações de 2,0 e 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cobre.

	<i>Sinal analítico para [Cu]: 2,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (limite internacional)</i>	<i>Sinal analítico para [Cu]: 5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (limite brasileiro)</i>
<i>μPAD sem pré concentração</i>	<LQ	17 \pm 1
<i>μPAD com pré concentração</i>	38 \pm 3	68 \pm 3

A Figura 4-14 apresenta imagens digitalizadas dos dispositivos utilizados em experimentos com uso de pré-concentração (A) e sem uso de pré-concentração evaporativa (B) para solução de Cu^{2+} a 25,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A coloração amarela nas extremidades das zonas de detecção em A) demonstra que o Cu^{2+} foi arrastado. Por outro lado, em B) não há deslocamento do complexo. A tonalidade da cor em A) é visivelmente mais intensa do que em B), indicando que houve pré-concentração do composto. No triângulo superior das imagens, identificado como referência, não houve adição do complexante.

Figura 4-14: A) Dispositivo de papel após pré-concentração evaporativa, mostrando a tonalidade amarela concentrada nas extremidades das zonas de detecção. B) Dispositivo de papel convencional (sem pré concentração) em que o metal e complexante foram adicionados na zona de detecção, mostrando a tonalidade amarela nas zonas de detecção. Condições: 2 μL de solução contendo 25,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Cu^{2+} seguido de 5 μL de solução NaDDTC 1% foram adicionados ao dispositivo. Imagens digitais obtidas por um scanner de mesa após 5 minutos da adição do complexante. No triângulo superior das imagens, identificado como referência, não houve adição do complexante.

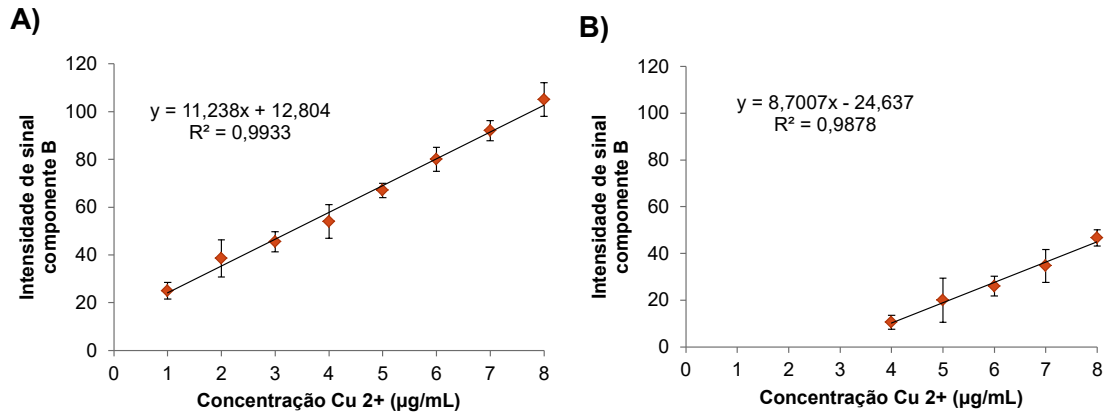


O método proposto foi então empregado para determinação de Cu^{2+} em amostras de cachaça. A curva de calibração construída apresentou faixa ótima de trabalho entre 1,0 a 8,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ do metal. Com a finalidade de demonstrar o aumento de sensibilidade quando usada a concentração evaporativa, buscou-se construir curvas analíticas de mesma faixa de trabalho usando o sistema sem a etapa de pré-concentração. Entretanto, com base no valor de LQ obtido, a faixa ótima de trabalho para a curva de calibração construída foi de 4,0 a 8,0 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de Cu^{2+} .

Para construção da curva de calibração, foram utilizados os valores de intensidade da componente B (do sistema RGB) obtidos das partes de maior tonalidade das imagens.

Ambas as curvas apresentaram linearidade avaliada por meio do método dos mínimos quadrados ordinários. O método que utilizou o μPAD aliado à pré-concentração evaporativa gerou uma curva com coeficiente de determinação igual a 0,9933 e coeficiente angular de 11,238 (Figura 4-15 A). A curva de calibração do método desenvolvido no dispositivo convencional - sem pré-concentração - (Figura 4-15 B) apresentou coeficiente de determinação igual a 0,9878 e sensibilidade menor, com coeficiente angular de 8,7.

Figura 4-15: Curvas de calibração para $[Cu^{2+}]$ obtidas utilizando os μ PADs A) com e B) sem pré-concentração evaporativa. Faixa de trabalho: 1,0 – 8,0 $\mu g mL^{-1}$ em A) e 4,0 – 8,0 $\mu g mL^{-1}$ em B). A intensidade da componente B (do sistema RGB) foi obtida através de imagens digitais geradas por um scanner de mesa.



Limites de detecção e quantificação foram avaliados de acordo com as normas do Guia Eurachem [121], conforme as equações abaixo. O s_{br} é desvio padrão das medidas do branco e m é a inclinação da curva. Os resultados encontrados estão apresentados na Tabela 4-2:

$$LD = \frac{3s_{br}}{m} \quad (\text{Equação 4-1})$$

$$LQ = \frac{10s_{br}}{m} \quad (\text{Equação 4-2}) \quad \text{Eurachem [104].}$$

Tabela 4-2: Limites de detecção e quantificação obtidos para os métodos μ PAD com e sem pré-concentração evaporativa.

	LD ($\mu g mL^{-1}$)	LQ ($\mu g mL^{-1}$)
μ PAD com pré-concentração	0,3	1,0
μ PAD sem pré-concentração	0,9	3,2

Pode-se afirmar que o método que utiliza os μ PADs sem pré-concentração não atende as normas vigentes para produtos destinados à exportação, uma vez que o limite de quantificação obtido encontra-se acima do valor máximo de $[Cu^{2+}]$ permitido pelas legislações internacionais de 2 $\mu g mL^{-1}$. Contudo, a associação do dispositivo com a pré-concentração evaporativa reduziu significativamente o limite de quantificação. O valor de LQ igual a 1,0 $\mu g mL^{-1}$, abaixo do valor máximo de $[Cu^{2+}]$ permitido pelas legislações internacionais, possibilita o uso do método para o monitoramento de bebidas destinadas aos mercados nacional e internacional.

O uso da pré-concentração evaporativa com o μ PAD reduziu os limites de quantificação e detecção, quando comparados com um método desenvolvido

recentemente em μ PADs, também baseado em detecção colorimétrica do complexo $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ [144]. No referido trabalho, os autores apresentaram LQ de $4,7 \mu\text{g mL}^{-1}$. Assim, a pré-concentração evaporativa proposta neste trabalho possibilitou a detecção colorimétrica de Cu^{2+} sobre papel em níveis abaixo daqueles encontrados na literatura.

A repetitividade foi avaliada para soluções de Cu^{2+} na concentração $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ com $n = 7$. Os valores de concentrações obtidos ficaram entre de $3,7$ a $4,2 \mu\text{g mL}^{-1}$, com coeficiente de variação igual a 9%. O Manual de Garantia Da Qualidade Analítica do MAPA [158] indica que o critério de aceitação para o teste é: coeficiente de variação $< 10\%$. Dessa forma, conclui-se que os resultados obtidos apresentaram baixa dispersão. A precisão intermediária foi avaliada em dias diferentes também para $[\text{Cu}^{2+}] = 4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados obtidos apresentaram coeficiente de variação de 19%.

Em seguida, a Cachaça IV foi utilizada para testes de adição e recuperação em diferentes concentrações de Cu^{2+} . Essa amostra foi escolhida por apresentar a menor concentração do metal. Para a Cachaça IV, as análises por EAA mostraram uma concentração de cobre de $0,27 \mu\text{g mL}^{-1}$, menor concentração entre as amostras estudadas, além de estar abaixo do limite de detecção do método proposto neste trabalho.

Concentrações conhecidas de Cu^{2+} foram adicionadas à amostra e, em seguida, a recuperação do método foi avaliada. De forma a avaliar a recuperação em diferentes faixas da curva de calibração, as amostras trabalhadas nesse estudo foram fortificadas com as concentrações de $2,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, $4,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $6,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ do metal. Os resultados estão apresentados na Tabela 4-3, que mostra valores muito próximos aos adicionados, com taxa de recuperação variando entre 92,5 e 105%.

Tabela 4-3: Teste de adição e recuperação de Cu em cachaça usando a metodologia que emprega μ PADs, pré-concentração evaporativa e detecção por imagens digitais.

$[\text{Cu}]$ adicionada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$[\text{Cu}]$ identificada ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Desvio (%)	% recuperação
2,0	$2,1 \pm 0,1$	5,0	105,0
4,0	$3,7 \pm 0,3$	7,5	92,5
6,0	$6,1 \pm 0,4$	1,7	101,7

Em seguida, o método proposto foi aplicado na determinação de cobre (II) em cachaças de cinco marcas comerciais diferentes. Valores obtidos por EAA foram utilizados como referência.

Os valores obtidos para $[Cu^{2+}]$ em amostras de cachaças por EAA e pelo método μ PAD associado à pré-concentração evaporativa e detecção por imagens digitais estão apresentados na Tabela 4-4. Teste estatístico de comparação entre os métodos com dois graus de liberdade a 95% de nível de confiança foram aplicados para avaliar o método proposto. Inicialmente realizou-se um teste F para comparações de variâncias, o qual apontou que a precisão dos dois conjuntos de dados das cachaças I, II e III são estatisticamente iguais. Em seguida, aplicou-se o teste t para métodos com precisões estatisticamente iguais. Os resultados indicaram que os valores obtidos pelo método proposto são estatisticamente iguais aos de referência.

Tabela 4-4: Determinação de cobre em cachaças pelo método μ PAD associado à pré-concentração evaporativa e detecção por imagens digitais.

	$[Cu^{2+}]$ método EAA ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$[Cu^{2+}]$ método μ PAD com concentração evaporativa ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Cachaça I	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,2
Cachaça II	2,3 ± 0,1	2,2 ± 0,1
Cachaça III	3,2 ± 0,1	3,3 ± 0,1
Cachaça IV	0,2 ± 0,1	< LQ
Cachaça V	0,4 ± 0,1	< LQ

Os valores da Tabela 4-4 indicam que as Cachaças IV e V apresentaram valores abaixo do limite de quantificação do método. A Cachaça III é uma amostra envelhecida, com tom levemente amarelado. A concordância entre o valor de $[Cu^{2+}]$ obtido e o método de referência indica que: subtrair o sinal da zona de referência dos sinais obtidos nas zonas de detecção é uma maneira eficiente de remover interferências causadas pela matriz da amostra. Principalmente quando se trata de análise de bebidas envelhecidas, as quais apresentam coloração levemente amarelada assim como o complexo $Cu(DDTC)_2$.

As cinco amostras avaliadas estão abaixo do limite máximo de $[Cu^{2+}]$ permitido pela legislação brasileira ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Além disso, o método que associa o dispositivo de papel com a pré-concentração evaporativa identificou que as Cachaças II e III não se encontram dentro do padrão exigido para cachaças destinadas a exportação (limite máximo permitido de $[Cu^{2+}] = 2 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Resultados obtidos para os testes de repetitividade, adição e recuperação e determinação de $[Cu^{2+}]$ em amostras comerciais de cachaças garantem a confiabilidade do método. O uso do dispositivo de papel combinado ao sistema de pré-

concentração evaporativa com obtenção de dados analíticos por imagens digitais é uma alternativa promissora para o monitoramento da concentração de cobre em cachaça.

7. CONCLUSÃO

Neste capítulo foi apresentada uma alternativa viável aos métodos que requerem instrumentação mais sofisticada para monitoramento de Cu^{2+} em cachaça. Um dispositivo combinado a um sistema de pré-concentração evaporativa foi desenvolvido. O dispositivo, de papel cromatográfico com formato em estrela, tem como vantagens: facilidade de fabricação, manuseio e descarte, baixo custo e análises rápidas.

A associação do dispositivo de papel com a pré-concentração evaporativa possibilitou a determinação de Cu^{2+} a partir da reação com NaDDTC, que tem como produto a substância cromófora $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$. A detecção colorimétrica do $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ tem como principal vantagem a não necessidade de extração e solubilização do complexo em solventes orgânicos, etapas necessárias aos métodos convencionais de detecção de cobre. O composto de interesse foi determinado de maneira rápida, simples, com baixo consumo de amostra e solventes. O método é preciso e sensível, apresentando boa concordância com o método de referência (EAA).

Este capítulo apresenta, pela primeira vez na literatura, um método de determinação de $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ usando uPADs e colorimetria em que se atingiu valor de LQ abaixo de $2 \mu\text{g mL}^{-1}$, que é o necessário para determinar cobre em cachaças destinadas a exportação.

EVAPORAÇÃO CONCENTRATIVA EM DISPOSITIVO DE PAPEL APLIACADA À DETECÇÃO DE CORANTES AZO E TRIARILMETANOS

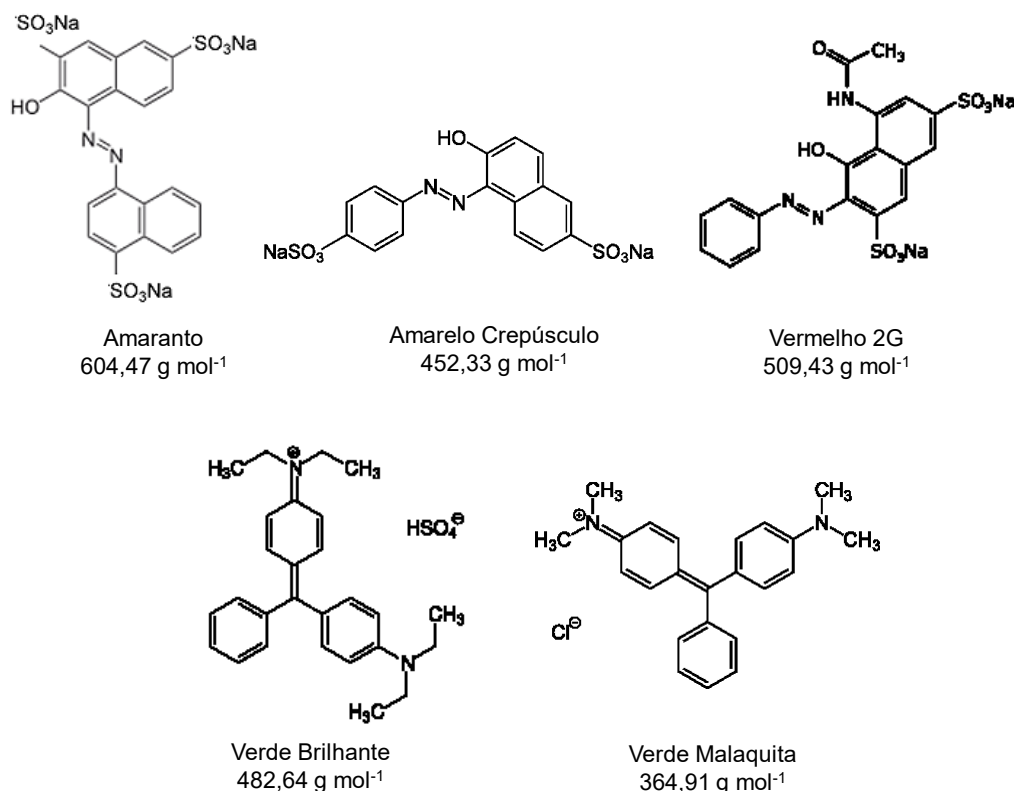
1. INTRODUÇÃO

Estima-se que mais de 700 mil toneladas de corantes sintéticos são produzidas anualmente no mundo [159,160]. Esses compostos têm aplicações nas indústrias têxtil, cosmética, alimentícia, farmacêutica, papelreira, dentre outras. Os corantes normalmente apresentam estruturas moleculares aromáticas e são classificados com base em seu cromóforo, como exemplo: azo, di- e triarilmetanos, dentre diversos outros [161].

Devido a perdas durante o processo de fixação da cor, entre 20% a 50% dos corantes têxteis são descartados em efluentes. Cerca de meia tonelada da substância é lançada diariamente no ambiente, desencadeando problemas ambientais, como aumento da alcalinidade, baixa oxigenação e alta concentração de sólidos dissolvidos nos cursos d'água [161]. Além disso, a elevada estabilidade dessas moléculas as tornam substâncias de difícil biodegradação [162-165].

A classe dos corantes azo, moléculas com estrutura contendo um grupo $-N=N-$ entre dois anéis aromáticos (Figura 4-16), engloba a maior parte dos corantes sintéticos. Atualmente há mais de três mil corantes azo disponíveis para uso [161,166]. A principal aplicação dessas substâncias são em alimentos industrializados como sucos, refrigerantes, energéticos, condimentos, balas, bebidas infantis e medicamentos. Além da cor atrativa, os corantes alimentícios garantem a boa aparência dos alimentos [165,166]. No entanto, a ingestão dessas substâncias está relacionada a problemas de saúde como alergia, asma, danos ao DNA e a alterações comportamentais em crianças, como hiperatividade [164-166].

Figura 4-16: Estrutura dos corantes amaranço, amarelo crepúsculo, vermelho 2G, verde brilhante e verde malaquita.



O uso dos corantes artificiais é estritamente regulamentado sob as leis alimentares existentes. A ANVISA, através do Informe Técnico n. 68, de 3 de setembro de 2015 [167], permite o uso de dez corantes azo em alimentos, sendo eles: amaranço, amarelo crepúsculo, azorrubina, ponceau 4R, vermelho 40, tartrazina, vermelho 2G, marrom HT, litol rubina BK e negro brilhante BN. As quantidades permitidas nos alimentos variam para os diferentes produtos. Para bebidas não alcoólicas, por exemplo, a quantidade máxima permitida para uso do amarelo crepúsculo é de 0,02 g para cada 100 mL e do amaranço de 0,01 g / 100 mL [168]. Embora o uso do corante vermelho 2G seja permitido, a ANVISA não limita a ingestão diária desse corante. Em contrapartida, a Europa banuiu o uso do vermelho 2G desde 2007 [169].

O verde brilhante (*brilliant green*, BG), também conhecido como verde malaquita G, é um triarilmetano amplamente utilizado nas indústrias têxteis, papelaria, de borracha e plástico. Apesar de o BG não ter sido estudado extensivamente como o MG (apresentado no capítulo anterior), a similaridade química entre as duas moléculas indica que o BG é tão tóxico quanto MG (Figura 4.16) [170]. A coloração e as principais aplicações dos corantes supracitados estão apresentadas na Tabela 4-5.

Tabela 4-5: Cor e as principais aplicações dos corantes vermelho 2G, amarelo crepúsculo, amaranto, verde malaquita e verde brilhante

<i>Nome</i>	<i>Classe</i>	<i>Coloração conferida</i>	<i>Principais aplicações</i>
Vermelho 2G	Azo	Vermelho	Indústria alimentícia (compostos cárneos como salsichas e hamburgueres) [171].
Amarelo crepúsculo	Azo	Laranja/Vermelho	Indústria alimentícia (refrigerantes e gelatinas) [172].
Amaranto	Azo	Vermelho escuro/marrom	Indústria alimentícia (bebidas e sorvetes) [172].
Verde Malaquita	Triarilmetano	Verde	Fungicida e indústria têxtil [4].
Verde brilhante	Triarilmetano	Verde	Indústrias têxtil e papelreira [172].

Convencionalmente, a determinação de corantes azo é realizada por espectrofotometria UV/VIS. O referido método demanda extrações sequenciais com metanol contendo 5% de hidróxido de amônio [173]. Em contrapartida, técnicas mais sensíveis como a cromatografia líquida acoplada a espectrometria são utilizadas para determinar MG e BG. A literatura científica também descreve o uso de diferentes técnicas analíticas, como HPLC–UV [174], HPLC-MS [175], eletroforese capilar [176] e imagens digitais [163] para determinar corantes artificiais. No que se refere ao uso da PS-MS, a técnica foi utilizada, sem etapas de pré-concentração do analito, para determinar corante sudan em pimenta em pó [177], e os corantes sudan, verde malaquita, rodamina B, violeta de metila e azul de metileno em bebidas [178].

Neste capítulo, a concentração evaporativa em um dispositivo de papel foi associada à PS-MS para pré-concentrar e detectar os triarilmetanos MG e BG em água canalizada e os corantes azo vermelho 2G e amarelo crepúsculo.

2. MATERIAIS E MÉTODO

2.1. Amostras, reagentes e materiais

Água canalizada foi recolhida no Departamento de Química da UFMG.

Foram utilizados os seguintes reagentes e soluções: metanol e acetonitrila de grau HPLC da J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). Os padrões dos corantes azo: vermelho 2G e amarelo crepúsculo foram da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) e amaranço da Fluka (Munique, BY, DE); os padrões dos corantes triarilmetano verde malaquita, verde brilhante e violeta de metila foram da Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA). Água deionizada foi obtida em um sistema modelo Millipak 40 Express (Mili-Q, Corporação Millipore, Bedford, MA, USA).

Papel cromatográfico Whatman modelo nº 1 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, Inglaterra) foi utilizado para construção dos μ PADs.

O dispositivo de papel utilizado na etapa de pré-concentração destes experimentos é de mesmo modelo e dimensões do utilizado na proposta anterior, referente a determinação colorimétrica de cobre em cachaça. O formato em estrela de 5,5 cm x 6,5 cm foi definido para o encaixe ideal do μ PAD no bloco metálico do equipamento de evaporação. O modelo foi desenvolvido no software CoreIDRAW® Graphics Suite 2020 (Trial Version) e transferido para o papel cromatográfico através da máquina de corte a laser Zumaq modelo ZM 4040 (Santo André, SP, BR).

2.2. Instrumentação

Um sistema de evaporação e aquecimento Pierce Reacti-Vap Modelo 18780 conectado a um cilindro de nitrogênio foi utilizado na etapa de evaporação concentrativa.

Um espectrômetro de massas LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) com fonte de ionização por *paper spray* e analisador do tipo armadilha de íons foi utilizado neste trabalho. O software Thermo Scientific Xcalibur foi utilizado no controle e aquisição de dados.

2.3. Preparo das amostras

Soluções estoque dos corantes azo nas concentrações de 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas através da solubilização do sal em água Mili-Q. Em seguida, soluções 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em água Mili-Q.

Soluções estoque de MG, BG e violeta de metila nas concentrações de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram preparadas através da solubilização do sal em água Mili-Q. Em seguida, soluções 100 e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ foram preparadas a partir da diluição da solução estoque em água canalizada.

2.4. Pré-concentração evaporativa

O dispositivo de papel foi posicionado no bloco metálico e fixado pelas hastes com auxílio de fitas adesivas. $2 \mu\text{L}$ da solução contendo os corantes foram adicionados às três zonas de adição de amostra do dispositivo. Em seguida, iniciou-se a passagem de ar direcionado pelos capilares às extremidades dos triângulos. Solvente de composição otimizada ($40 \mu\text{L}$ de mistura ACN/ H_2O 9:1) foi adicionado à região de adição de solvente com frequência de 30 segundos por tempo total de 3 minutos.

A composição do solvente da concentração evaporativa foi avaliada por meio do deslocamento dos corantes vermelho 2G (solução $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizada para otimizar as condições de pré-concentração dos corantes azo) e verde malaquita (solução $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ utilizada para otimizar as condições de pré-concentração dos corantes triarilmetano) sobre o dispositivo. As misturas de MeOH/ H_2O e ACN/ H_2O nas proporções de 9:1, 5:1 e 2:1 foram estudadas. O volume, frequência de aplicação e o tempo total de adição do solvente foram definidos durante os experimentos por meio de avaliação visual da quantidade de solvente retida no papel.

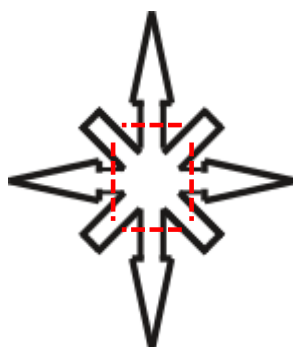
2.5. Análise por PS-MS

Ao término da etapa de pré-concentração evaporativa, as quatro extremidades triangulares do μPAD foram recortadas de acordo com as linhas tracejadas indicadas na Figura 4-17. Em seguida foram posicionadas na plataforma PS de forma que o vértice mais próximo ao equipamento estivesse a $0,5 \text{ cm}$ de distância da entrada do MS. Na sequência, $2 \mu\text{L}$ de solução do PI seguidos de $30 \mu\text{L}$ de MeOH foram adicionados ao centro do triângulo e iniciou-se a análise com voltagem de $4,0 \text{ kV}$ aplicada na base do papel.

Solução $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ do corante amaranto foi utilizada como PI para a análise dos demais corantes azo. Os espectros dos corantes azo foram adquiridos em modo de ionização negativo na faixa de m/z 400 a 600. As condições instrumentais utilizadas foram: temperatura do capilar de $275 \text{ }^\circ\text{C}$, potencial aplicado no capilar de -12 V e potencial das lentes de -86 V .

Solução de violeta de metila $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ foi utilizada como PI para o estudo dos triarilmetanos. As condições instrumentais utilizadas para análise dos corantes MG e BG foram: temperatura do capilar de $275 \text{ }^\circ\text{C}$, voltagem do capilar de 40 V e voltagem das lentes de 115 V . Os espectros foram registrados em modo de ionização positivo na faixa de m/z $300 - 500$.

Figura 4-17: Representação do dispositivo de papel utilizado nos experimentos. As linhas tracejadas, em vermelho, indicam a região de recorte das extremidades triangulares para análise por PS-MS.



Como critério de comparação, análises por PS-MS convencional (sem etapas de preparo da amostra) também foram realizadas. Para essa etapa, $2 \mu\text{L}$ da amostra a ser analisada foram adicionados sobre o centro de um papel cromatográfico recortado em formato triangular. Na sequência, $2 \mu\text{L}$ da solução do PI seguidos de $30 \mu\text{L}$ de MeOH foram adicionados sobre a amostra e iniciou-se a análise com aplicação de voltagem na base do papel. As condições instrumentais utilizadas foram as mesmas das análises realizadas após a etapa de pré-concentração evaporativa.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As condições para desenvolver a etapa de concentração evaporativa foram otimizadas em: adição de 40 μL de mistura ACN/ H_2O 9:1 na região de adição de solvente a cada 30 segundos. O tempo de pré-concentração foi de 3 minutos.

Com a finalidade de minimizar possíveis flutuações de sinais intrínsecos à fonte de ionização, a intensidade absoluta dos analitos foi avaliada em função da intensidade absoluta do PI. O aumento promovido pela pré-concentração na intensidade dos sinais de interesse foi avaliado através de comparação com o método PS-MS convencional.

As Figuras 4-18 e 4-19 apresentam espectros obtidos por PS-MS de soluções 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ dos corantes azo: vermelho 2G e amarelo crepúsculo, respectivamente. Os espectros (A) foram obtidos por PS-MS convencional, sem preparo das amostras, e os espectros (B) foram obtidos via PS-MS após etapa de pré-concentração evaporativa em dispositivo.

Figura 4-18: Espectros obtidos por (A) PS(-)-MS convencional (sem preparo de amostra) e (B) PS(-)-MS após concentração evaporativa de solução 100 $\mu\text{g L}^{-1}$ de vermelho 2G. O retângulo em verde destaca o sinal atribuído ao padrão interno, amaranto (m/z 537), e em vermelho o Sinal atribuído ao analito vermelho 2G (m/z 464).

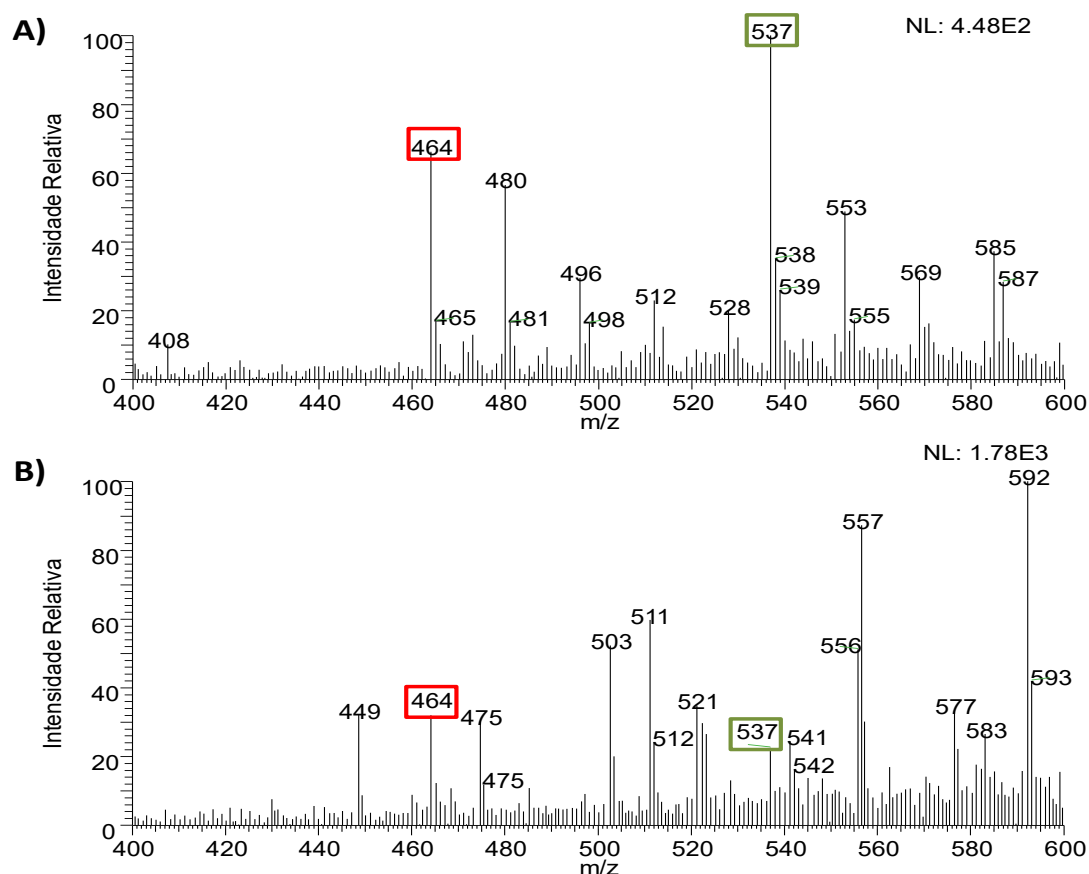
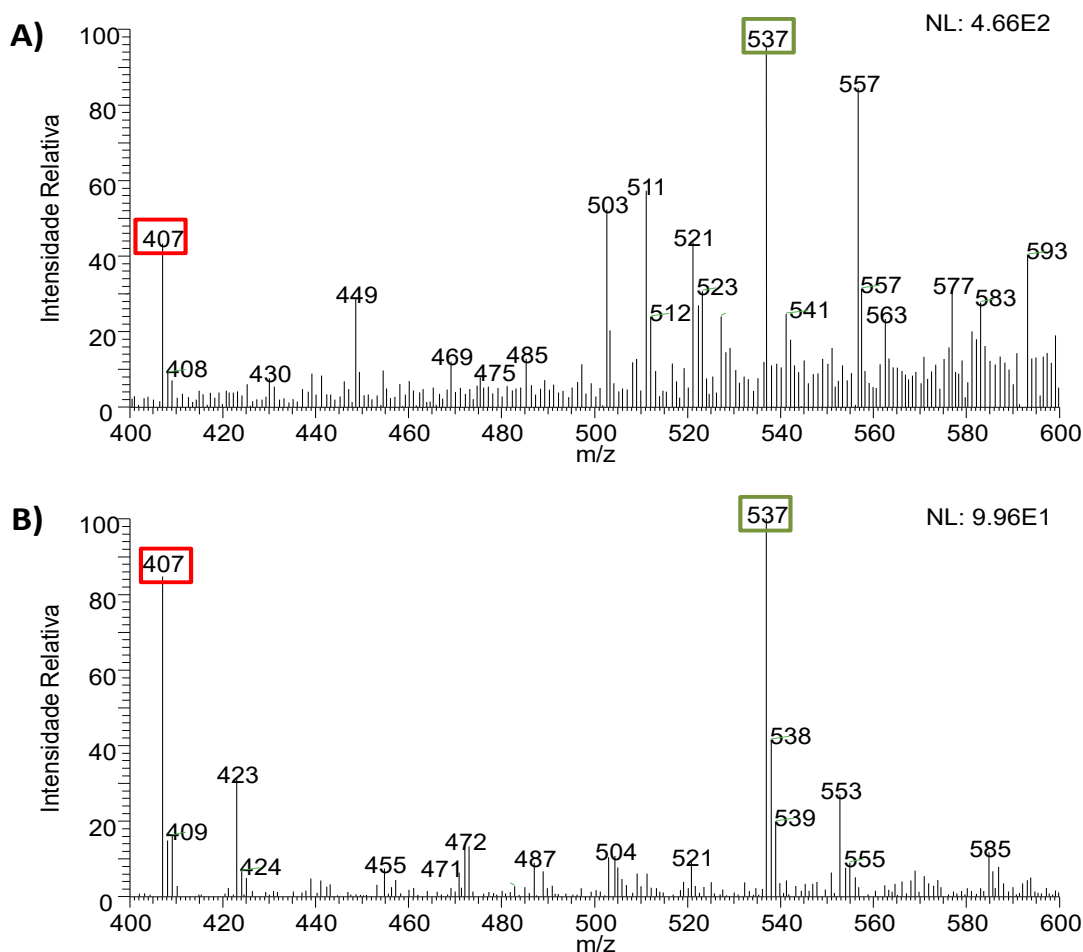


Figura 4-19: Espectros obtidos por (A) PS(-)-MS convencional (sem preparo de amostra) e (B) PS(-)-MS após concentração evaporativa de solução $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de amarelo crepúsculo. O retângulo em verde destaca o sinal atribuído ao padrão interno, amaranço (m/z 537), e em vermelho o sinal atribuído ao analito amarelo crepúsculo (m/z 407).



O sinal m/z 464 observado nos espectros da Figura 4-18 refere-se à molécula do vermelho 2G ionizada na forma de $[M - 2\text{Na}^+ + \text{H}^+]$ e o m/z 537 é atribuído ao PI, amaranço, ionizado na forma de $[M - 3\text{Na}^+ + 2\text{H}^+]$. Comparando os espectros (A) e (B) da Figura 4-18 observa-se em (B) o aumento dos sinais de m/z 592 e 557, de composições não identificadas. Embora seja visualizada redução na intensidade relativa do sinal do analito (m/z 464) após a etapa de pré-concentração, o mesmo fenômeno também é observado para o sinal do PI (m/z 537). Diferentemente do observado em (A), em (B) o sinal referente ao analito é mais intenso que o PI. A evaporação concentrativa em μPAD promoveu aumento de 2,7 vezes na intensidade do sinal referente ao corante vermelho 2G no espectro de massas.

Observa-se no espectro obtido por PS-MS para o corante amarelo crepúsculo após a concentração evaporativa (Figura 4-19 B) redução de sinais de fundo, quando comparados com o espectro obtido sem etapas de preparo da amostra (Figura 4-19

A). Além disso, há aumento de 1,5 vezes na intensidade do sinal de m/z 407 referente ao amarelo crepúsculo, ionizado na forma $[M - 2Na^+ + H^+]$.

No que se refere ao estudo dos corantes triarilmetanos MG e BG, as Figura 4-20 e 4-21 apresentam espectros obtidos por PS-MS da água canalizada dopada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ e $1000 \mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os espectros (A) foram obtidos por PS-MS convencional, sem preparo das amostras, e os espectros (B) foram obtidos por PS-MS após etapa de pré-concentração evaporativa em dispositivo de papel. O íon m/z 372 refere-se ao padrão interno, violeta de metila, o m/z 329 ao MG e o m/z 385 ao BG.

Figura 4-20: Espectros obtidos por (A) PS(-)-MS convencional (sem preparo de amostra) e (B) PS(-)-MS após concentração evaporativa de água canalizada dopada com $100 \mu\text{g L}^{-1}$ de MG e BG. O retângulo em verde destaca o sinal atribuído ao padrão interno, violeta de metila (m/z 372), e em vermelho os sinais atribuídos aos analitos MG (m/z 329) e BG (m/z 385).

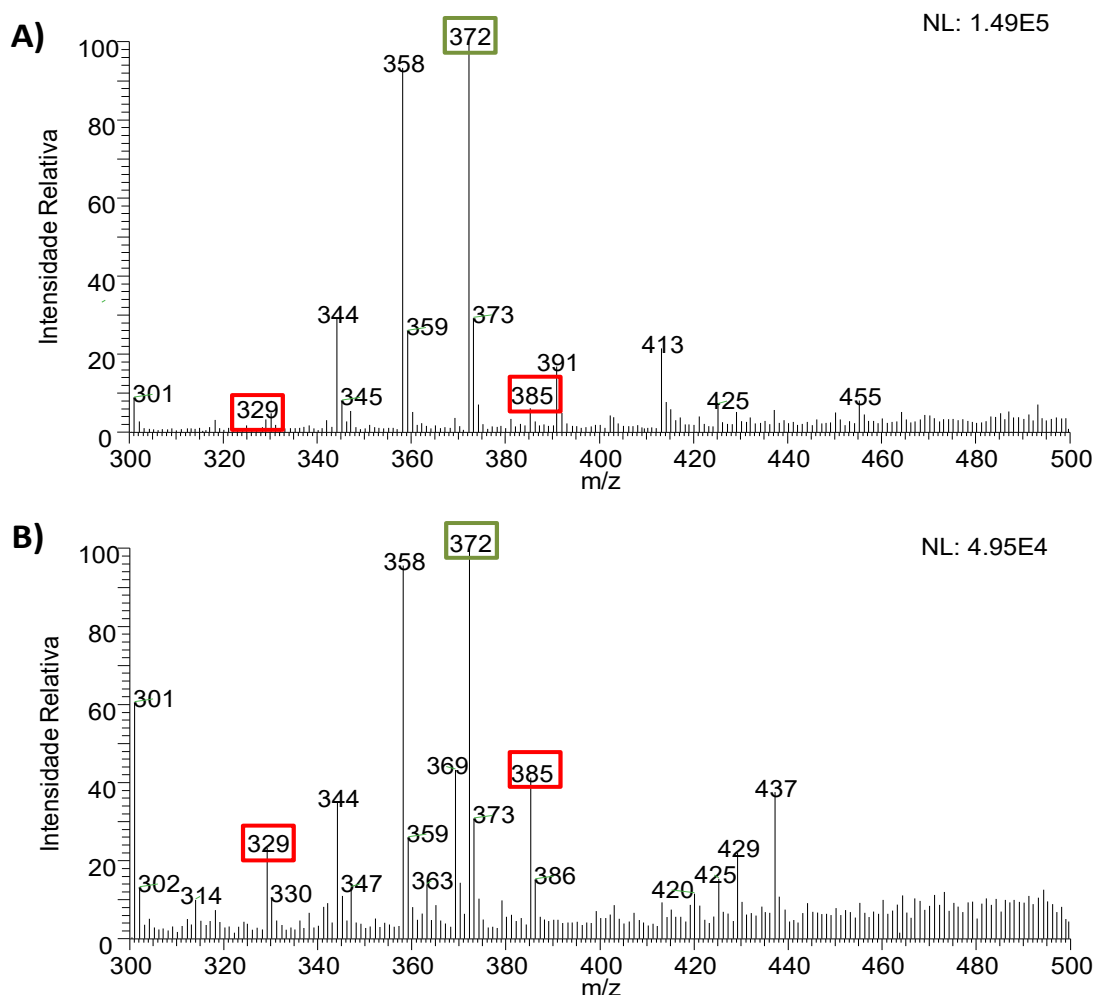
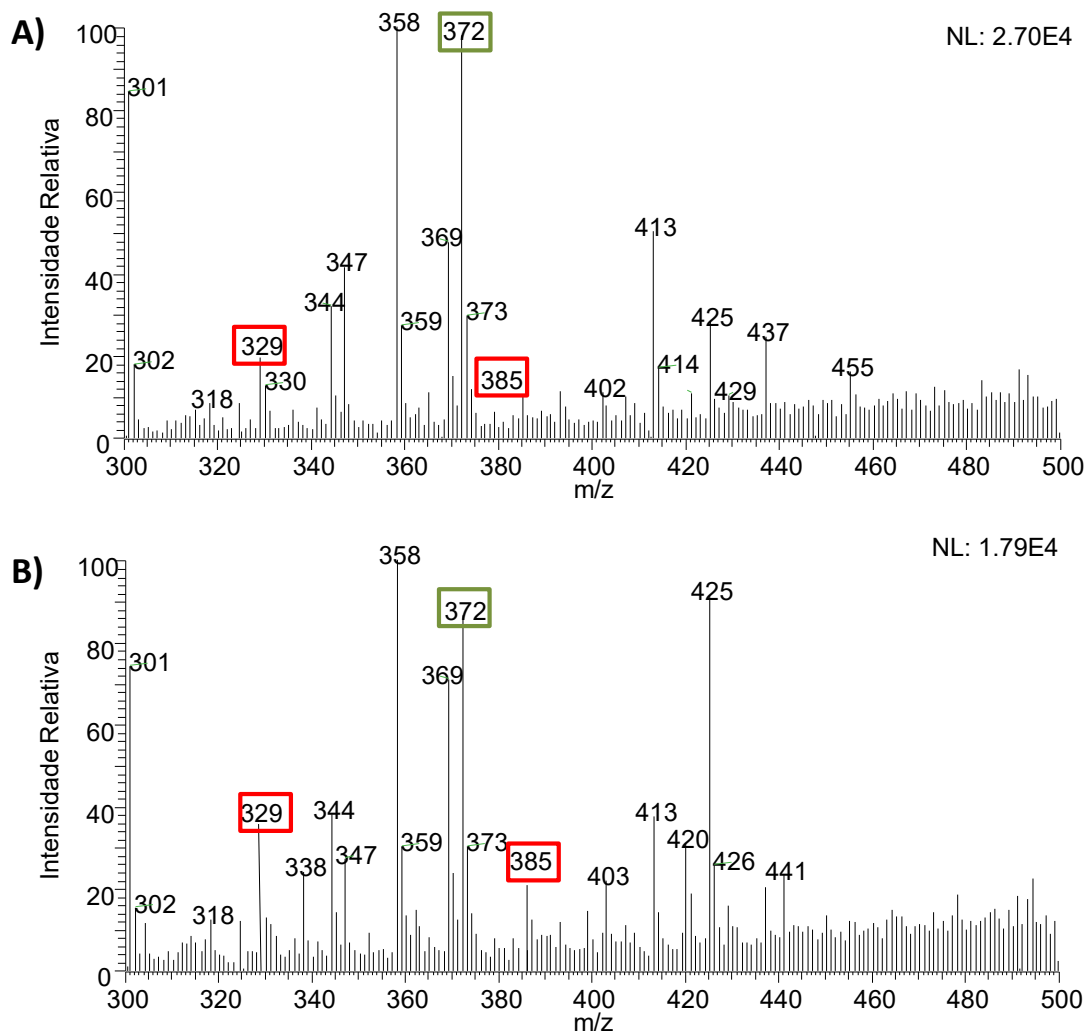


Figura 4-21: Espectros obtidos por (A) PS(+)-MS convencional (sem preparo de amostra) e (B) PS(+)-MS após concentração evaporativa de água canalizada dopada com $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ de MG e BG. O retângulo em verde destaca o sinal atribuído ao padrão interno, violeta de metila (m/z 372), e em vermelho os sinais atribuídos aos analitos MG (m/z 329) e BG (m/z 385).



Observa-se no espectro obtido por PS-MS convencional para a concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos (Figura 4-20 A) que os sinais atribuídos aos analitos, m/z 329 e 385, estão na mesma intensidade dos sinais de fundo. Em contraste, há aumento na intensidade desses íons no espectro PS-MS após realizar a extração pré concentrativa (Figura 4-20 B).

O espectro PS-MS obtido para a pré-concentração de $1000 \mu\text{g L}^{-1}$ dos analitos (Figura 4-21 B), quando comparado com o PS-MS convencional (Figura 4-21 A), indica aumentos nas intensidades dos sinais referentes aos analitos e também de íons da matriz da amostra. Como exemplo, pode-se destacar o íon de m/z 425, de composição não identificada, que teve sua intensidade relativa aumentada de 20% na Figura 4-22 A para 90% na Figura 4-22 B.

A pré-concentração evaporativa em μ PAD promoveu aumentos de 7,8 e 3,0 vezes na intensidade do sinal do MG no espectro de massas para as concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Sob as mesmas condições, foram obtidos aumentos de 12,0 e 4,2 vezes na intensidade do sinal do corante BG para as concentrações de 100 e 1000 $\mu\text{g L}^{-1}$, respectivamente. Os maiores valores de enriquecimentos foram obtidos para as concentrações de 100 $\mu\text{g L}^{-1}$, provavelmente, em virtude de que neste caso a concentração dos analitos encontra-se próxima ao limite de detecção do método PS-MS convencional.

4. CONCLUSÃO

O formato do dispositivo em estrela mostrou-se ideal para realizar a pré-concentração dos analitos diretamente no substrato da ionização por PS. Além disso, o dispositivo em papel proporcionou vantagens tais como facilidade de fabricação, manuseio e descarte, baixo custo e análises rápidas.

O preparo de amostra por concentração evaporativa em μ PAD promoveu significativo enriquecimento dos sinais dos corantes azo e dos triarilmetanos estudados. Quando comparado com espectros obtidos por PS-MS convencional (sem pré-concentração do analito), aumentos de 1,5 a 2,7 vezes foram obtidos para os sinais dos corantes azo. Ainda, enriquecimentos de 7,8 e 12,0 foram obtidos para os sinais dos corantes MG e BG ($100 \mu\text{g L}^{-1}$ em água canalizada), respectivamente. Entretanto, deve-se destacar que os resultados apresentados nesta abordagem são preliminares. Estudos mais aprofundados serão realizados a fim de avaliar os parâmetros analíticos: reprodutibilidade, faixa de trabalho e os limites de detecção e quantificação. Além disso, o desempenho do método proposto será avaliado para detecção de corantes azo em amostras de alimentos comerciais.

Capítulo 5 USO DO POLIDIMETILSILOXANO (PDMS) IMOBILIZADO EM PAPEL CROMATOGRÁFICO PARA PREPARO DE AMOSTRA POR HEADSPACE E ANÁLISE POR PS-MS APLICADO NA ANÁLISE DE BEBIDAS

1. MICROEXTRAÇÃO EM FASE SÓLIDA

Movidos pela busca por uma técnica de preparo de amostra rápida e com baixo consumo de solvente, Arthur e Pawliszyn propuseram, em 1990, a Microextração em Fase Sólida (SPME, do inglês *Solid Phase Micro Extraction*). A técnica, que extrai os analitos da amostra por meio de um filme polimérico sobre uma haste de sílica fundida, tem como principais vantagens: *clean-up* da matriz amostral e pré-concentração do analito em apenas uma etapa; extrações rápidas e redução significativa do uso de solventes orgânicos. Além disso, a SPME pode ser aplicada para concentrar analitos voláteis e não voláteis de amostras gasosas, líquidas e sólidas [179-182].

Na SPME, uma haste de sílica fundida recoberta com filme polimérico é colocada em contato com a amostra por tempo determinado. Quando o tempo de equilíbrio entre o analito e o revestimento da fibra é atingido não há maior acúmulo de analitos no polímero [182]. A extração pode ser realizada de forma direta ou por *headspace*. Na extração direta, a fibra é inserida diretamente na amostra e os analitos migram para o revestimento. No modo de *headspace*, os analitos são transferidos da amostra para a fase gasosa, e em seguida, para o recobrimento da fibra. Nesse último, a fibra é mais preservada que na extração direta, uma vez que não tem contato direto com a matriz da amostra. A localização da fibra no sistema *headspace* não interfere na eficiência da extração, pois o analito entra em equilíbrio com a fase gasosa do sistema. No entanto, a eficiência da extração é limitada pela taxa de transferência do analito da amostra para a fase gasosa [179-182].

O processo de extração é realizado em duas etapas: adsorção, quando a fibra é exposta na amostra ou no *headspace* para adsorver o analito; e dessorção, quando o analito é removido do adsorvente para posterior análise. O uso mais comum da SPME é como preparo de amostras para análise por cromatografia gasosa (GC), na qual a dessorção dos analitos ocorre de forma térmica no injetor do equipamento. Para aplicações em cromatografia líquida (LC) ou injeção direta no espectrômetro de massas, os analitos precisam ser dessorvidos por meio de um solvente, ou mistura de solventes, que tenham alta afinidade com o analito [179,180].

A eficiência do processo de extração é dependente da constante de distribuição. Quanto maior o volume do revestimento da fibra, maior a quantidade de analito extraída da amostra (Equação 5.1). Em contrapartida, quanto maior a espessura do revestimento, maior o tempo necessário para se atingir o equilíbrio (Equação 5.2) [179,182].

$$n = K_{fs}V_fC_o \quad \text{Equação 5.1}$$

$$t_e = t_{95\%} \frac{(b-a)^2}{2D_f} \quad \text{Equação 5.2}$$

Em que:

n : número de mols extraído

K_{fs} : constante de distribuição da amostra no recobrimento da fibra

V_f : volume do recobrimento da fibra

C_o : concentração inicial do analito na amostra

t_e : tempo de equilíbrio

$t_{95\%}$: tempo em que 95% do equilíbrio é atingido

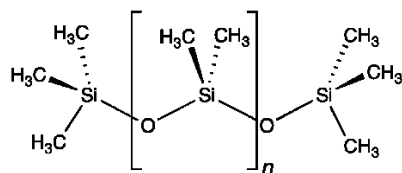
$a-b$: espessura do material sorvente

D_f : difusão do analito no sorvente

Os principais fatores que influenciam a eficiência da extração por *headspace* são: (i) temperatura, pois o processo é dependente da pressão de vapor dos analitos. Temperaturas altas reduzem significativamente o tempo de extração, no entanto, diminuem o coeficiente de partição da fibra e, conseqüentemente, diminuem a quantidade de analito extraído quando o equilíbrio é alcançado. (ii) Tempo, é necessário otimizá-lo para que o equilíbrio entre o revestimento e o analito seja atingido. Além disso, o controle do tempo é necessário para garantir a reprodutibilidade da extração. (iii) Tipo de recobrimento da fibra, pois os polímeros podem ser bastante seletivos a alguns analitos ou a uma polaridade específica [179,182,184,185].

O polidimetilsiloxano (PDMS), um polímero apolar (Figura 5-1) com alta eficiência para extrair analitos apolares, é um recobrimento comumente utilizado em SPME. Quando as condições de extração são otimizadas, tais como pH, concentração salina e temperatura, ele pode ser utilizado também para extrair analitos polares. Sua grande popularidade como polímero de recobrimento se dá por ser inerte e estável a altas temperaturas. Além disso, a síntese do PDMS é um processo bem consolidado, simples e reprodutível [179,183,184].

Figura 5-1: Estrutura do polidimetilsiloxano (PDMS).



Na aplicação apresentada neste capítulo, papel cromatográfico revestido com PDMS foi utilizado como adsorvente em um sistema *headspace* e, em seguida, analisado por PS-MS. O método foi chamado de HS-PDMS-PS-MS: análise por PS-MS associada à extração por *headspace*. Como critério de comparação, análise por PS-MS associada à extração por *headspace* com adsorção por papel cromatográfico livre também foi desenvolvida (HS-PS-MS).

2. BEBIDAS ALCOOLICAS

2.1. Cachaça

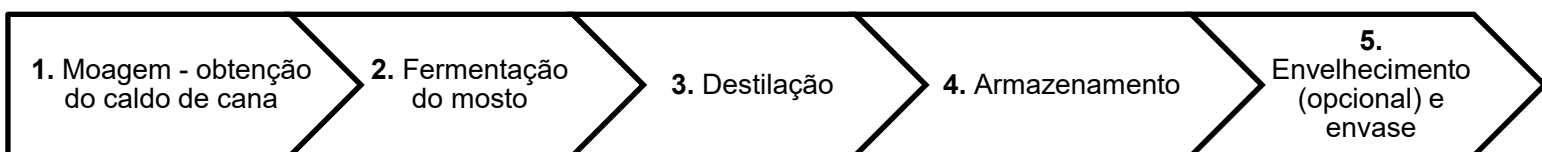
O DECRETO Nº 6.871, DE 4 DE JUNHO DE 2009 [186] classifica a cachaça como:

Denominação típica e exclusiva da aguardente de cana produzida no Brasil, com graduação alcoólica de trinta e oito a quarenta e oito por cento em volume, a vinte graus Celsius, obtida pela destilação do mosto fermentado do caldo de cana-de-açúcar com características sensoriais peculiares [186].

Estimativas realizadas no ano de 2019 apontam a cachaça como a segunda bebida alcoólica mais consumida no Brasil, atrás apenas da cerveja, com consumo aproximado de 11,5 litros por ano por habitante [187]. Estima-se que a cadeia produtiva da bebida movimentou em 2018 no país R\$ 7,5 bilhões, com US\$ 14 milhões em exportações e geração de 600 mil empregos formais [188]. Além disso, as projeções para 2017-2022 apontam expectativas de crescimento de 5% no mercado da bebida [189].

O processo de produção da cachaça pode ser dividido em cinco etapas, de acordo com o diagrama da Figura 5-2 [189]: moagem, fermentação, destilação, armazenamento e envelhecimento. A moagem é o processo em que o caldo da cana é extraído, o líquido obtido nessa etapa é chamado mosto. Na sequência, ocorre a fermentação do mosto por leveduras [189]. Nessa etapa, diversos metabólitos orgânicos voláteis com diferentes polaridades são formados, os quais influenciam diretamente o aroma, sabor e a qualidade da cachaça [190]. O produto obtido ao fim da etapa de fermentação, denominado vinho volante, é em seguida destilado. A cabeça, primeira fração da destilação, é composta majoritariamente por substâncias com baixo ponto de ebulição, algumas delas apresentam elevadas toxicidades e/ou podem comprometer o sabor da cachaça, como exemplo: acetaldeído, metanol e acetato de etila [189,191]. O coração, segunda fração da destilação, é a cachaça própria para o consumo. Água e alcoóis como etanol, propanol, butanol e isobutanol são as principais substâncias que compõem a fração [191]. Por fim, a terceira e última fração, denominada cauda, é composta por substâncias poucos voláteis de sabor forte e gosto amargo, algumas delas apresentam elevadas toxicidades [191]. A cabeça e a cauda são descartadas ou, em alguns casos, recicladas para outros fins [189].

Figura 5-2: Diagrama das etapas de produção da cachaça



Após a destilação, a cachaça pode ser diretamente envasa e disponibilizada para o consumo ou passar por processo de envelhecimento. No primeiro caso, o produto final apresenta coloração incolor e, por isso, é associada, de acordo com o MAPA, às expressões prata, clássica ou tradicional [189]. No segundo caso, a bebida é armazenada em recipiente de madeira apropriado por um período não inferior a um ano. O contato com a madeira leva a uma coloração amarelada, à qual é denominada cachaça envelhecida [189].

Na etapa de envelhecimento, o contato da cachaça com a madeira favorece a extração e a formação de uma grande variedade de compostos, os quais influenciam diretamente nas características sensoriais da bebida [192,193]. Como exemplo, flavonoides são extraídos diretamente da madeira, enquanto que a lignina da madeira em ambiente ácido, como a cachaça, leva a formação de aldeídos aromáticos e ácidos fenólicos. Ainda, diversos compostos aromáticos, como quinonas, aldeídos e metil cetonas são produzidos nessa fase. Com o tempo de envelhecimento, algumas moléculas evaporam, outras degradam e, dessa forma, a cachaça tende a adquirir sabor mais suave [194-196].

O perfil químico e as características organolépticas de cor, odor e gosto da cachaça envelhecida estão diretamente relacionados à espécie da madeira. Além do carvalho europeu, madeiras como amburana, jatobá, jequitibá e ipê também são comumente utilizadas em tonéis [197, 198].

A literatura aponta a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas como a principal técnica de análise para identificação de substâncias voláteis em bebidas fermentadas e/ou destiladas, tais como cachaça [199], conhaque [200], vinho [201,202], cerveja [190] e rum [203].

No que se refere à análise de bebidas fermentadas e/ou destiladas, a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* (PS-MS) foi utilizada principalmente em análises de cunho forense, para identificar falsificações em cervejas [204], whiskies [205,206] e identificação de pesticidas e fungicidas em vinhos [207]. Todos os trabalhos envolvem a injeção das bebidas no espectrômetro de massas sem etapas de preparo amostral. Como as matrizes dessas amostras contêm altas

concentrações de açúcares e sais, os espectros de massas obtidos apresentam sinais atribuídos majoritariamente a carboidratos na forma de adutos [204].

Com a finalidade de detectar os perfis de voláteis gerados durante as etapas de produção da cachaça, neste capítulo da tese a extração por *headspace* associada a PS-MS foi aplicada na análise do: mosto; vinho volante; os três produtos da destilação (cabeça, coração e calda); cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e por dois anos e meio.

2.2. Cerveja

A cerveja é a bebida alcoólica produzida a partir da fermentação de açúcares provenientes do malte de cevada com a adição de lúpulo [208]. Atrás apenas da água e do chá, é considerada a bebida mais popular do mundo [208]. Os países que se destacam como os maiores produtores de cerveja são China, Estados Unidos e Brasil [204].

Os ingredientes utilizados na produção são basicamente água, malte, lúpulo e fermento [208]. A qualidade dos ingredientes e o processo de produção utilizado afetam as características e o tipo da cerveja [204]. Durante a maltagem, os polissacarídeos provenientes dos cereais (malte, milho e até mesmo arroz podem ser utilizados) são hidrolisados em açúcares [204,208,209]. Quando a etapa de fermentação é realizada em baixas temperaturas (9°C a 13°C) são produzidas cervejas do tipo lager, o tipo mais comercializado no Brasil [204]. Quando a fermentação ocorre em altas temperaturas (18°C a 24°C) são produzidas cervejas tipo ale. Ao fim do processo de produção, o produto apresenta composição altamente complexa, contendo sais inorgânicos, açúcares e diversos compostos orgânicos. Estima-se a presença de mais de 800 substâncias distintas em sua formulação [209].

Em relação aos cereais utilizados na bebida, o MAPA regulamenta que as matérias-primas que substituem parcialmente o malte ou o extrato de malte na elaboração da cerveja (arroz e milho, por exemplo) não ultrapassem 45% do volume de malte [210].

Nos últimos anos tem-se observado no mercado brasileiro aumento na variedade de “Cerveja Puro Malte” ou “Cerveja 100% Malte”, denominações dadas a bebidas que tem o malte de cevada como fonte exclusiva de açúcares [210]. Um estudo da consultoria Kantar, especializada em painéis de consumo, indicou que no ano de 2018 as cervejas puro malte registraram crescimento de 81% em litros vendidos, enquanto cervejas que são produzidas com qualquer tipo de adjunto registraram 2% de aumento para o mesmo período [211].

A literatura apresenta o uso de diversas técnicas analíticas para caracterização de tipos e marcas de cervejas, tais como ESI-MS [209], GC-MS [212, 213], GC-FID [214], LC-MS [215], ICP-MS [216], RMN [217].

Pereira e colaboradores utilizaram a espectrometria de massas com ionização por *paper spray* para diferenciação das marcas de cervejas lager mais comercializadas no Brasil, visando à identificação de adulterações [204]. No referido trabalho, não foram utilizadas técnicas de preparos de amostras. Os espectros das amostras estudadas foram caracterizados predominantemente por sinais de

carboidratos na forma de adutos e classificados por tratamento quimiométrico [204]. A literatura não descreve trabalhos que utilizaram a PS-MS para caracterizar os componentes voláteis da bebida.

O crescimento do consumo de cervejas puro malte exigem novos métodos que discriminem esses tipos cervejas e que atestem ao consumidor a qualidade do produto. Neste trabalho, a extração por *headspace* associada a PS-MS foi utilizada para identificação de perfis de voláteis de cervejas tradicionais brasileiras do tipo lager, puro malte e também produzidas com adjuntos cervejeiros.

3. MATERIAIS E MÉTODO

3.1. Amostras e reagentes

Cachaças: volumes de 50 mL de mosto, vinho volante, cabeça, coração, calda, cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e cachaça envelhecida também em barril de carvalho por dois anos e meio foram obtidas na cachaçaria Dose Mineira, localizada na zona rural de São Domingos do Prata, Minas Gerais.

Cervejas do tipo lager das marcas Brahma (Ambev), Kaiser (Heineken), Krug 20 (Krug), Skol (Ambev) e Skol Puro Malte (Ambev) foram adquiridas em comércios locais da cidade de Belo Horizonte.

Metanol grau HPLC J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA), hexano para análise Synth (São Paulo, SP, BR) e cloreto de sódio Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) foram utilizados nos experimentos.

Silicone e agente de cura Kit Sylgard® 184 da Dow Inc. (Midland, MI, USA) foram utilizados para sintetizar o polímero PDMS.

3.2. Materiais

Papel cromatográfico Whatman modelo nº 1 (GE Healthcare UK Limited, Little Chalfont, Buckinghamshire, ENG) recortado em formato triangular, com base e altura de 1,0 cm, foi utilizado como substrato para a ionização por *paper spray*.

Carimbos em formatos triangular e circular foram utilizados para transferir o PDMS para o papel cromatográfico.

Espanja de poliuretano.

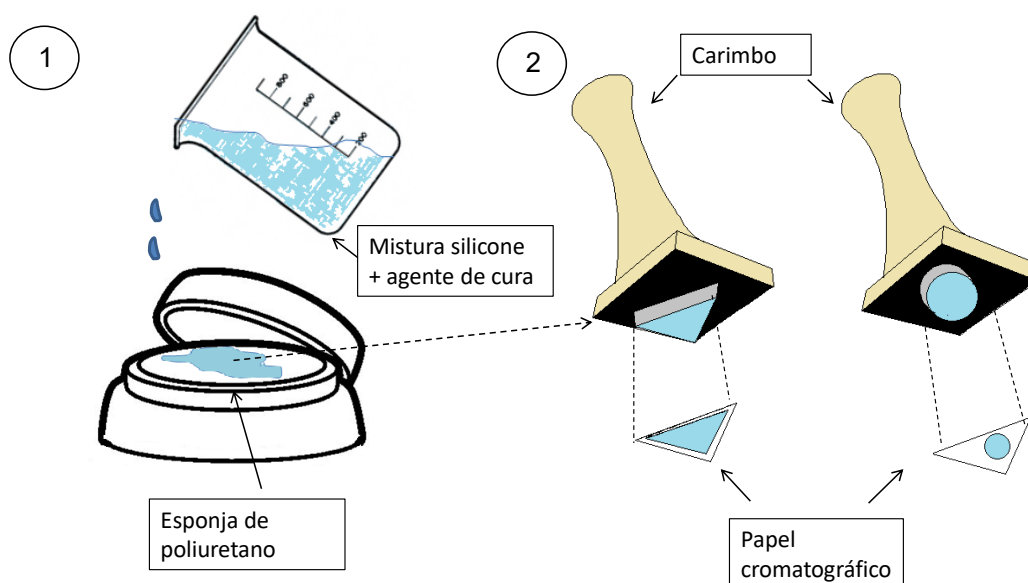
3.3. Instrumentação

Um espectrômetro de massas modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific, San Jose, CA, EUA) com fonte de ionização por *paper spray* e analisador do tipo armadilha de íons foi utilizado neste trabalho. O *software* Thermo Scientific Xcalibur foi utilizado no controle e aquisição de dados.

3.4. Extração por headspace

Silicone (pré-polímero) e agente de cura foram misturados em uma proporção de 10:1 m/m. Para facilitar a aplicação da mistura sobre o papel, adicionou-se hexano numa proporção de 1,5:10 m/m [218]. A solução foi então colocada em uma esponja de poliuretano (Figura 5-3). Carimbos convencionais foram utilizados para transferir uma camada do polímero da esponja para o triângulo de papel cromatográfico, de acordo com a representação na Figura 5-3. Após receber o polímero, o papel foi colocado em uma estufa por 35 minutos a 70 °C. A proporção da mistura de silicone e agente de cura, o tempo e a temperatura de cura do polímero seguiram as instruções de uso contidas no manual do produto.

Figura 5-3: Representação esquemática da imobilização do PDMS no papel cromatográfico.

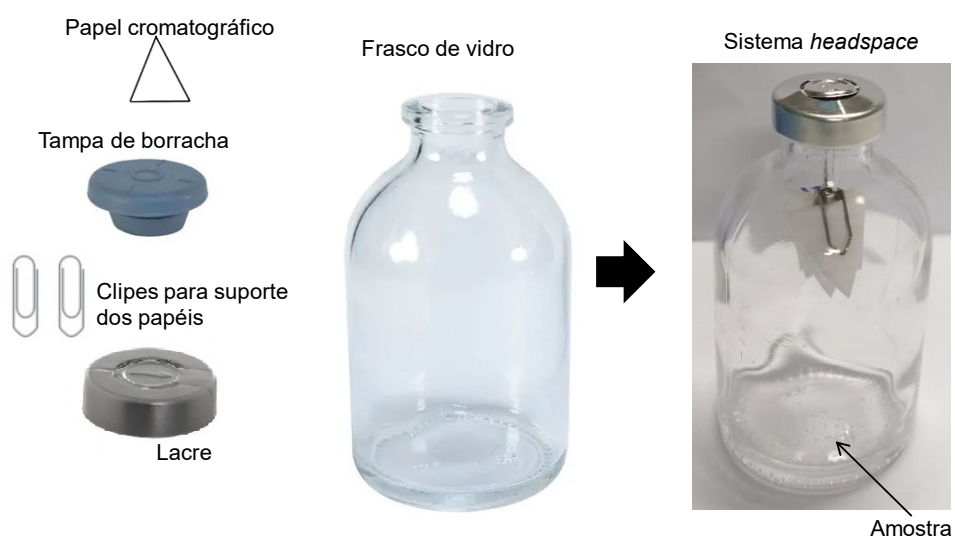


A aplicação do polímero sobre o papel foi avaliada em duas configurações: (i) triangular (base e altura de 0,7 cm), com o polímero cobrindo a maior parte do papel, e (ii) circular (diâmetro 0,4 cm), cobrindo o centro do papel (ilustração 2 da Figura 5-3). Além disso, diferentes posições de transferência do polímero sobre o triângulo de papel foram avaliadas: mais próximo e mais afastado do vértice no qual é formado o *spray* da ionização por PS.

Um volume de 1 mL da amostra foi adicionado em um frasco de vidro de 10 mL, seguido da adição de massa otimizada em 100 mg de NaCl. As massas de 100, 200 e 300 mg foram avaliadas. Um furo na tampa de borracha do frasco, feito utilizando uma seringa, serviu de suporte para um clipe metálico na parte interna do

frasco. Esse clipe foi responsável pela sustentação de seis triângulos de papéis cromatográficos: três recobertos com PDMS e três não recobertos (livres), cada um suportado por um pequeno clipe individual (Figura 5-4). Em seguida, o frasco foi lacrado com um lacre de alumínio rasgável e colocado em estufa por tempo e temperatura otimizados (10 minutos a 50°C). O aquecimento do sistema foi avaliado por 10, 20 e 30 minutos nas temperaturas de 50 e 60°C.

Figura 5-4: Materiais utilizados para montar o sistema de extração por headspace.



Os valores avaliados para os parâmetros tempo, temperatura de aquecimento do sistema e massa adicionada de NaCl foram estipulados de acordo com trabalhos descritos na literatura [190,219].

3.5. Análise instrumental por PS-MS

3.5.1. PS-MS com extração por *headspace*

Os triângulos de papel retirados do sistema *headspace* foram posicionados na plataforma *paper spray* de forma que o vértice mais próximo ao equipamento estivesse a 0,5 cm de distância da entrada do MS. Solventes, selecionados por otimização, em volumes de 10 µL de hexano seguidos de 30 µL de MeOH/H₂O 10:1 foram aplicados sobre o substrato e iniciou-se a análise com aplicação de 4,0 kV na base do papel para o modo positivo e 3,5 kV para o modo negativo. Os espectros foram registrados por 24 segundos.

Os espectros das amostras obtidas durante o processo de produção da cachaça foram adquiridos na faixa de *m/z* 50 – 400. Os espectros das amostras de cachaças envelhecidas foram registrados na faixa de *m/z* 50 – 250. Os espectros das cervejas foram registrados na faixa de *m/z* 100 – 300.

As condições instrumentais utilizadas para o modo positivo foram: temperatura do capilar de 275 °C, voltagem do capilar de 40 V e voltagem das lentes de 115 V. Para o modo negativo foram utilizadas: temperatura do capilar de 275 °C, voltagem do capilar de -12 V e voltagem das lentes de -86 V.

3.5.2. PS-MS convencional (sem extração)

Papel cromatográfico recortado em formato triangular foi posicionado na plataforma *paper spray* de forma que o vértice mais próximo ao equipamento estivesse a 0,5 cm de distância da entrada do MS. 5 µL da amostra foram adicionados ao centro do papel e, em seguida, 10 µL de hexano seguidos de 30 µL de MeOH/H₂O 10:1 v/v foram aplicados sobre a amostra. Os parâmetros instrumentais utilizados na análise foram os mesmos para as amostras submetidas ao preparo de amostra por *headspace*, descritos no item 3.5.1.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Otimização das condições experimentais

A cachaça prata foi a amostra utilizada para o estudo de otimização das condições experimentais.

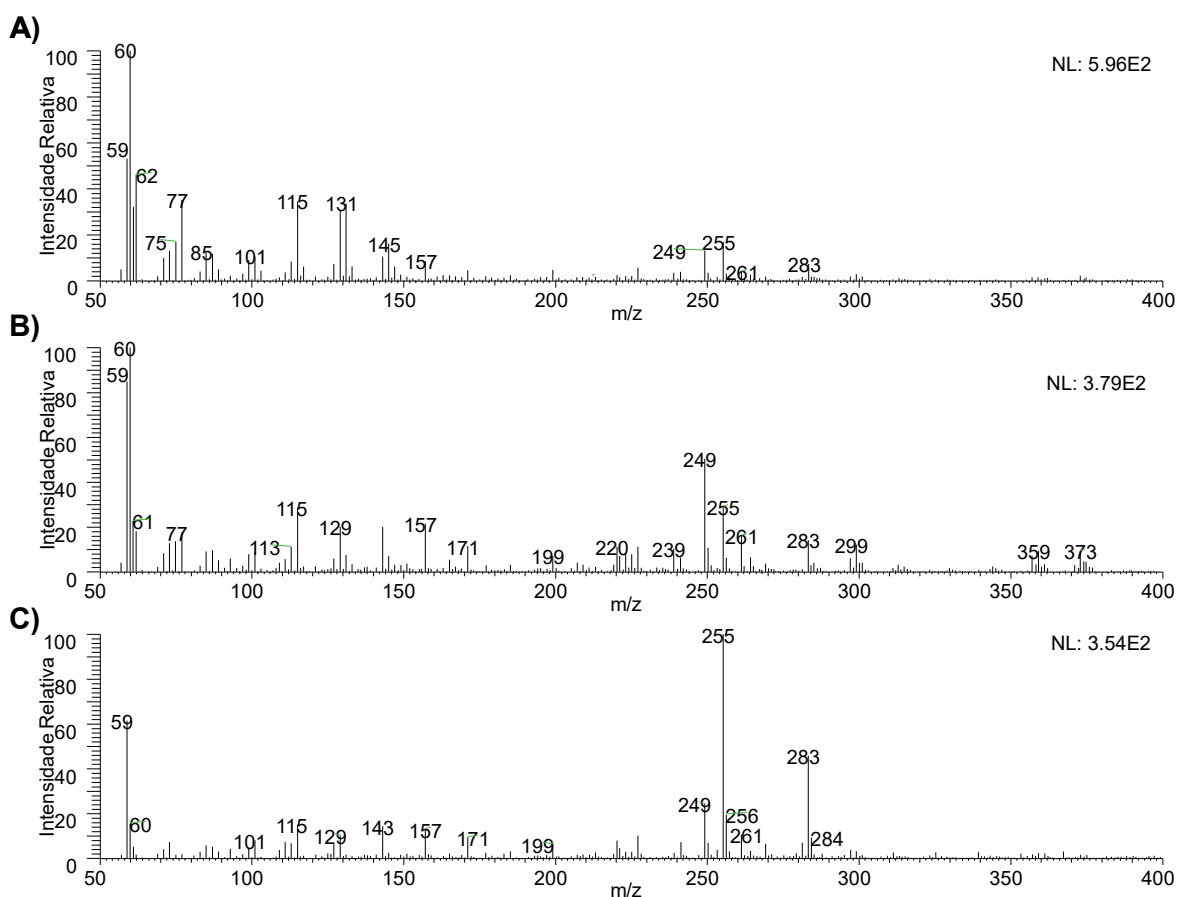
Os espectros obtidos por PS-MS dos compostos da cachaça sorvidos por PDMS imobilizado nos formatos circular e triangular indicaram maiores intensidades dos sinais para maior área do polímero. Por isso, o formato triangular foi utilizado nos experimentos posteriores. Em relação à posição do polímero no papel, a condição ideal foi aplicar o polímero próximo à base do triângulo, mantendo o vértice mais próximo ao espectrômetro de massas livre. O PDMS é um material pouco condutor e, por isso, quando foi aplicado no vértice mais próximo ao MS, impediu a formação do *spray*, inviabilizando a análise.

Na sequência, avaliou-se a composição do solvente utilizado para gerar o *spray* da ionização por PS. O metanol, comumente utilizado na ionização por PS, foi fortemente repelido pelo PDMS (material hidrofóbico), formando uma gota suspensa do solvente sobre o filme polimérico. Voltagens de 3,5; 4,0; e 4,5 kV aplicadas na base do papel não foram suficientes para promover o deslocamento da gota em direção à entrada do espectrômetro de massas. O mesmo foi observado quando se testou uma mistura MeOH/H₂O nas proporções 10:1 e 2:1 v/v e também acetonitrila. Para promover a eluição do solvente foi preciso, inicialmente, aplicar um solvente apolar (10 µL de hexano) sobre o filme polimérico. A interação entre o solvente apolar e o polímero favoreceu a dessorção e a eluição dos analitos. Na sequência, aplicou-se um solvente polar prótico (30 µL de MeOH/H₂O 10:1 % v/v) para promover a ionização.

A Figura 5-5 apresenta espectros obtidos por HS-PDMS-PS-MS (no modo de ionização negativo) da cachaça prata para o estudo da massa de NaCl adicionada à amostra. As condições utilizadas para a extração por *headspace* foram: aquecimento a 50°C por 10 minutos com adição de (A) 100, (B) 200 e (C) 300 mg de NaCl. Não há diferenças significativas nos perfis espectrais obtidos. Os íons de m/z 255 e m/z 283, com elevadas intensidades em (C), são visualizados em elevadas intensidades nos espectros do papel cromatográfico (branco), indicando que esses sinais provavelmente não são atribuídos a substâncias da amostra. O sinal de m/z 59, observado nos três espectros, é apresentado na literatura como sendo a molécula de ácido acético (fórmula CH₃COOH e massa molar de 60 g mol⁻¹) na forma desprotonada [220], um importante indicador do teor de acidez das cachaças. O espectro (A) apresenta sinais de moléculas da amostra mais intensos do que os sinais do branco. Além disso, durante o preparo das amostras observou-se que as massas

de 200 mg e 300 mg do sal não solubilizaram completamente na cachaça, gerando uma solução saturada com presença de precipitado. Diante disso, a massa de NaCl adicionada à amostra foi otimizada em 100 mg.

Figura 5-5: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS da cachaça prata com A) 100 mg, B) 200 mg e C) 300 mg de NaCl. Condições de extração por headspace: aquecimento a 50°C por 10 minutos.

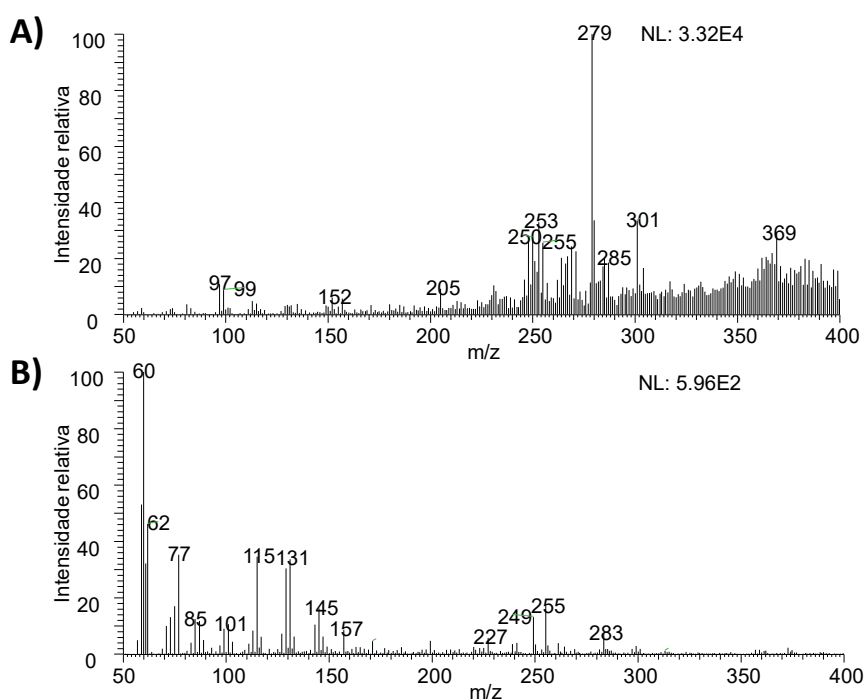


Em seguida, a temperatura de aquecimento do sistema de extração por *headspace* foi avaliada em 50 °C e 60 °C por 10, 20 e 30 minutos. Nos sistemas aquecidos por 30 minutos houve a formação de vapor de água em abundância. Nesta situação, a elevada umidade gerada dentro do frasco encharcou o papel (adsorvente) e inviabilizou a sorção dos analitos voláteis. Portanto, apenas os espectros obtidos após extrações por 10 e 20 minutos foram avaliados.

Os perfis espectrais obtidos para os tempos de 10 e 20 minutos a 50 °C e 60 °C não apresentaram diferenças significativas. Por conseguinte, as condições ótimas para a etapa de extração por *headspace* foram: adição de 100 mg de NaCl à amostra seguido de aquecimento do sistema a 50 °C por 10 minutos.

A Figura 5-6 apresenta espectros HS-PDMS-PS-MS da cachaça prata nos modos de ionização (A) positivo e (B) negativo. O espectro (A) é caracterizado por sinais de fundo em altas intensidades. Os sinais mais intensos, de m/z 279, 301 e 369, são atribuídos de acordo com o espectro do PDMS immobilizado em papel (utilizando 10 μL de hexano + 30 μL metanol como solvente da PS) a possíveis substâncias dos solventes e/ou do polímero. Em contraste, o espectro obtido em modo negativo apresenta perfil espectral limpo e sinais estáveis. Os sinais mais intensos do espectro, como discutido adiante, são atribuídos à amostra. Portanto, o modo de ionização negativo foi utilizado nas análises das cachaças e das amostras obtidas durante o seu processo de produção.

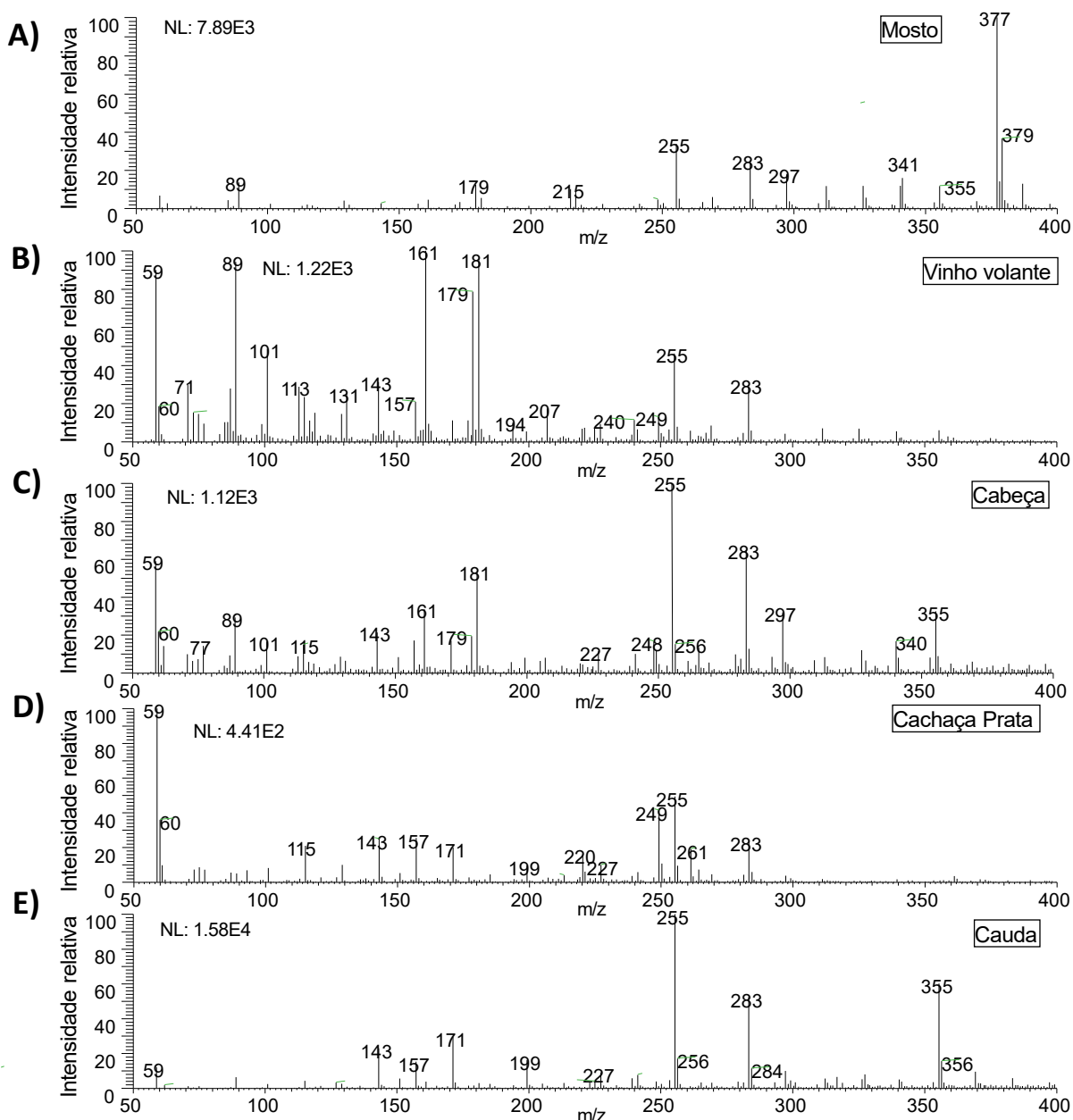
Figura 5-6: Espectros da cachaça prata obtidos por HS-PDMS-PS(+)-MS em modo de ionização A) positivo e B) negativo.



4.2. Caracterização das frações geradas pelo processo de produção da cachaça

A Figura 5-7 apresenta espectros obtidos por PS-MS convencional, ou seja, sem etapas de preparos de amostras, em modo negativo, das amostras (A) mosto, (B) vinho volante, (C) cabeça, (D) cachaça prata e (E) cauda.

Figura 5-7: Espectros PS(-)-MS obtidos em modo negativo para as diferentes frações da etapa de produção da cachaça: A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.



O espectro do mosto (Figura 5-7 A) é caracterizado predominantemente por sinais de carboidratos. O sinal de m/z 377, o mais intenso do espectro, sugere a

formação de aduto de cloro da maltose $[M + {}^{35}\text{Cl}]^-$ enquanto que o de m/z 379, com aproximadamente 1/3 de sua intensidade, refere-se ao isotópologo $[M + {}^{37}\text{Cl}]^-$. O íon de m/z 341 também é atribuído à molécula de maltose, porém, na forma desprotonada $[M - \text{H}]^-$. Os sinais de m/z 179 e m/z 215 sugerem a molécula de glicose sob a forma desprotonada e de aduto de cloro, respectivamente. Por outro lado, a ausência dos sinais atribuídos à molécula maltose no espectro do vinho volante (B) indica o completo consumo desses açúcares pelas leveduras durante a fermentação.

De maneira geral, os espectros apresentados na Figura 5-7 do vinho volante (B), cabeça (C) e cachaça (D) apresentam perfis espectrais similares, com maior densidade de sinais abaixo de m/z 300. Em contraste, o espectro da fração cauda, (E), apresenta aspecto “limpo”. Acredita-se que a presença de poucos sinais no espectro da cauda é consequência da alta viscosidade da amostra. Amostras com elevada tensão superficial tendem a gerar *sprays* com poucas gotículas e, conseqüentemente, apresentam espectros de massas com poucos ou, até mesmo, ausente de sinais.

O íon de m/z 255 presente em todos os espectros da Figura 5-7 é relacionado, de acordo com o espectro do papel cromatográfico (utilizando 10 μL de hexano + 30 μL metanol como solvente da PS), a alguma substância presente nos solventes ou no papel.

Os íons de m/z 59, observado em (B), (C) e (D), m/z 89 em (A) (B) e (C), m/z 115 em (C) e (D), m/z 143 em (B), (C), (D) e (E), m/z 171 em (D) e (E) e m/z 199 também em (D) e (E) são descritos na literatura como sendo os ácidos carboxílicos apresentados na Tabela 5-1.

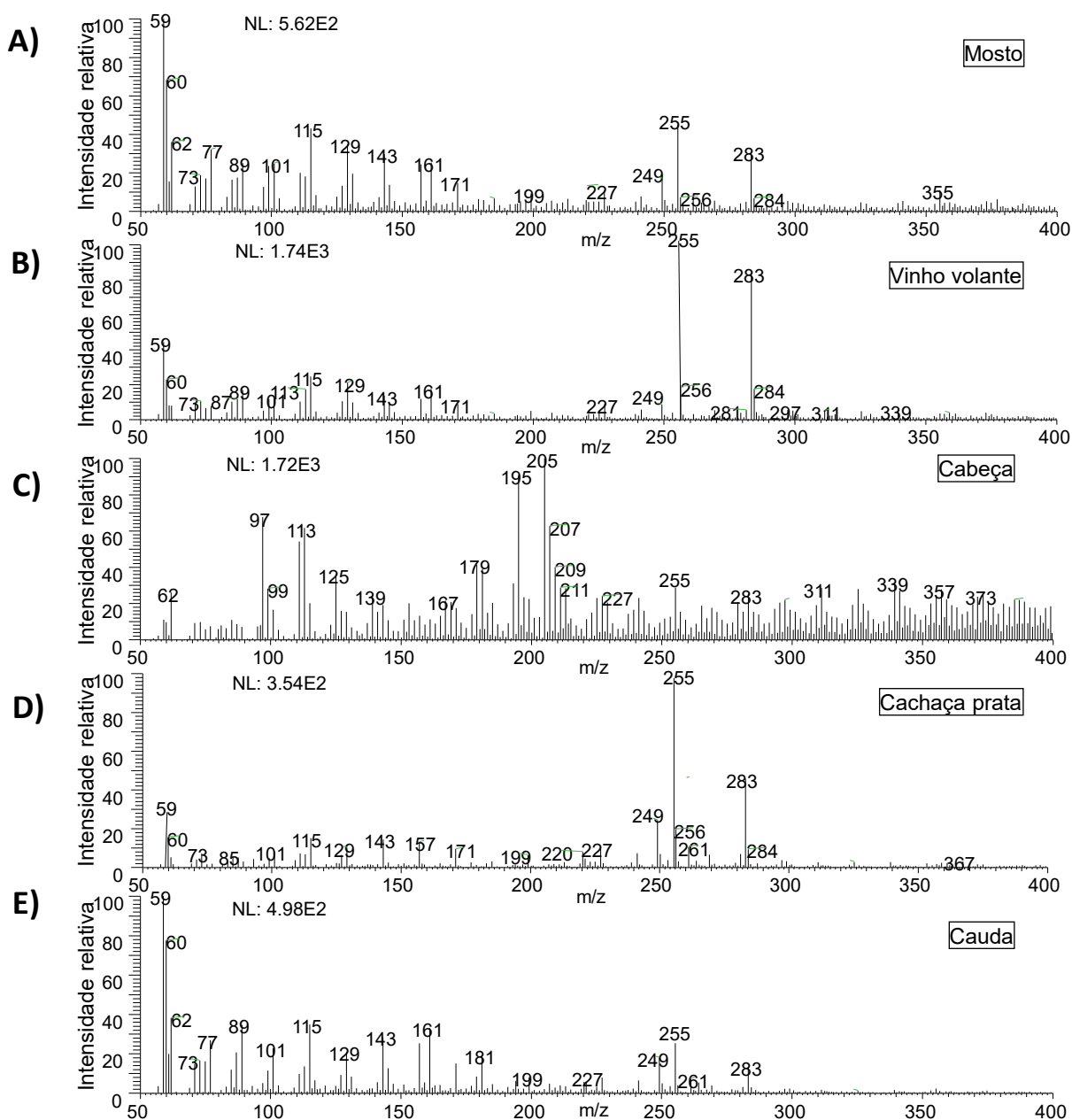
Tabela 5-1: Atribuições dos sinais m/z identificados nos espectros obtidos por PS(-)-MS.

<i>m/z</i>	<i>Atribuição</i>	<i>Referência</i>
59	Ácido acético	[220]
89	Ácido láctico Ácido oxálico	[221]
115	Ácido fumárico Ácido hexanóico Ácido maleico	[222]
143	Ácido octanóico	[191]
171	Ácido decanóico	[191]
199	Ácido dodecanóico	[191]

A Figura 5-8 apresenta espectros obtidos por HS-PS-MS (ou seja, após preparo de amostra por *headspace* com adsorção por papel cromatográfico livre) em

modo negativo das amostras de (A) mosto, (B) vinho volante, (C) cabeça, (D) cachaça prata e (E) cauda. Os sinais de açúcares observados no espectro PS-MS convencional do mosto, em altas intensidades, não são visualizados no espectro da amostra após extração por *headspace*, Figura 5-8 A.

Figura 5-8: Espectros obtidos por HS-PS(-)MS em modo negativo das amostras A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.

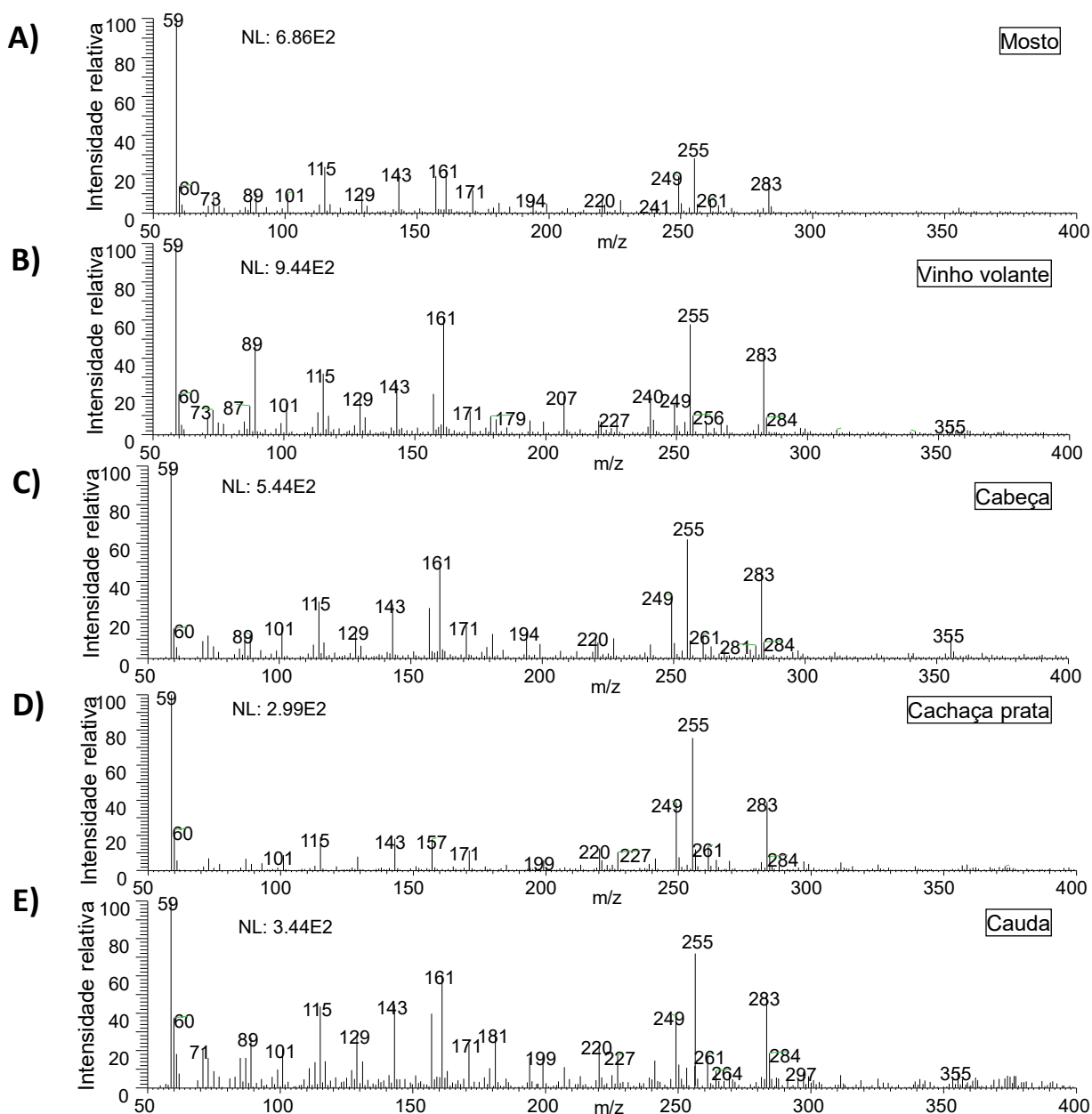


Observa-se alta similaridade entre os perfis espectrais do mosto (A), vinho volante (B), cachaça prata (D) e cauda (E). Os referidos espectros apresentam alta densidade de sinais na faixa de massas menor que m/z 200. Em contraste, o espectro da fração cabeça (C) apresenta perfil espectral distinto das demais amostras.

A extração por *headspace* promoveu significativo aumento na quantidade e intensidade dos sinais do espectro da cauda (E), quando comparado com o espectro obtido por PS-MS convencional da mesma amostra.

A Figura 5-9 apresenta espectros obtidos por HS-PDMS-PS-MS das amostras (A) mosto, (B) vinho volante, (C) cabeça, (D) cachaça prata e (E) cauda. Há similaridade entre os perfis espectrais das amostras. Destacam-se nos espectros os sinais de m/z 59 (o mais intenso dos espectros), 89, 115, 143, 161 e 199, os quais também foram observados nos espectros adquiridos após sorção dos analitos por papel cromatográfico livre (apresentados anteriormente). As atribuições dos íons descritos na literatura são apresentadas na Tabela 5-1.

Figura 5-9: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) mosto, B) vinho volante, C) cabeça, D) cachaça prata e E) cauda.



O preparo de amostras por *headspace* promoveu, de certa forma, a redução de efeitos de supressão iônica através de *clean-up* amostral e pré-concentração de substâncias voláteis. Além disso, possibilitou a análise por PS-MS de amostras de alta viscosidade, como a fração cauda. Sinais de altas intensidades observados nos espectros adquiridos após preparo de amostra por *headspace* foram atribuídos a analitos voláteis, principalmente ácidos carboxílicos. Contudo, provavelmente devido à seletividade dos adsorventes (papel cromatográfico livre e impregnado em PDMS), os espectros obtidos por PS-MS após extração por *headspace* não possibilitaram indicar os produtos do processo de produção da cachaça.

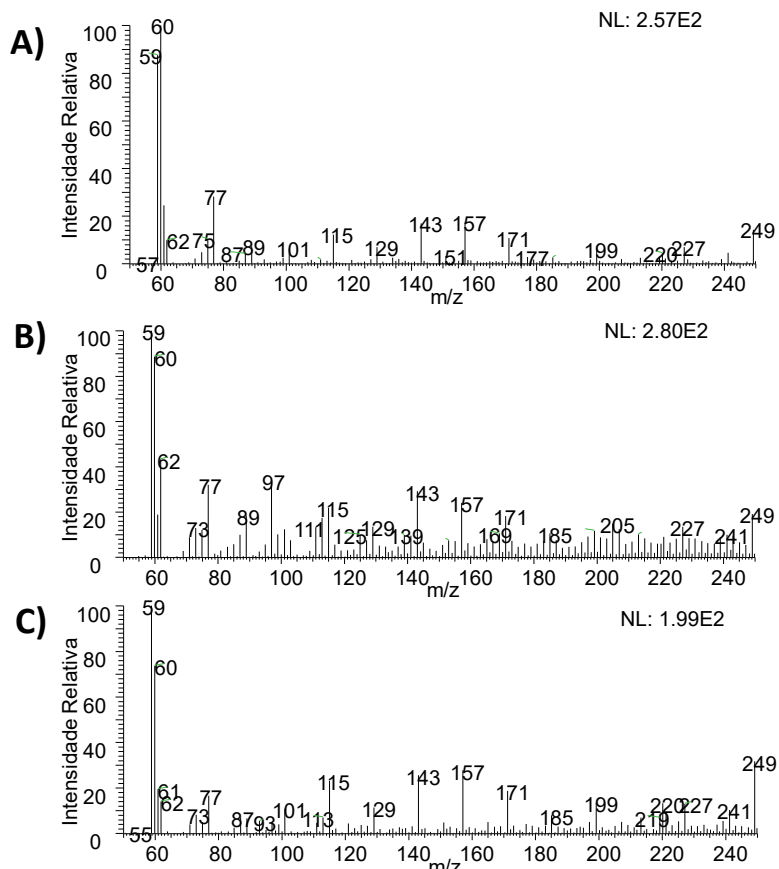
4.3. Caracterização do envelhecimento de cachaça em barril de carvalho

Nesta etapa do trabalho, os métodos PS-MS convencional, HS-PS-MS e HS-PDMS-PS-MS foram aplicados na caracterização do processo de envelhecimento de cachaças em barril de carvalho. Para tal, cachaças armazenadas em barril de carvalho por três meses e por dois anos e meio foram analisadas. Além disso, a cachaça prata foi utilizada como referência de amostra não envelhecida.

Preliminarmente aos estudos por *headspace*, realizou-se análises por PS-MS convencional, sem etapas de preparo das amostras. Nestes experimentos, a faixa de trabalho foi reduzida para m/z 50-250, visto que os espectros de massas obtidos não indicaram a presença de sinais significativos maiores que 250 m/z .

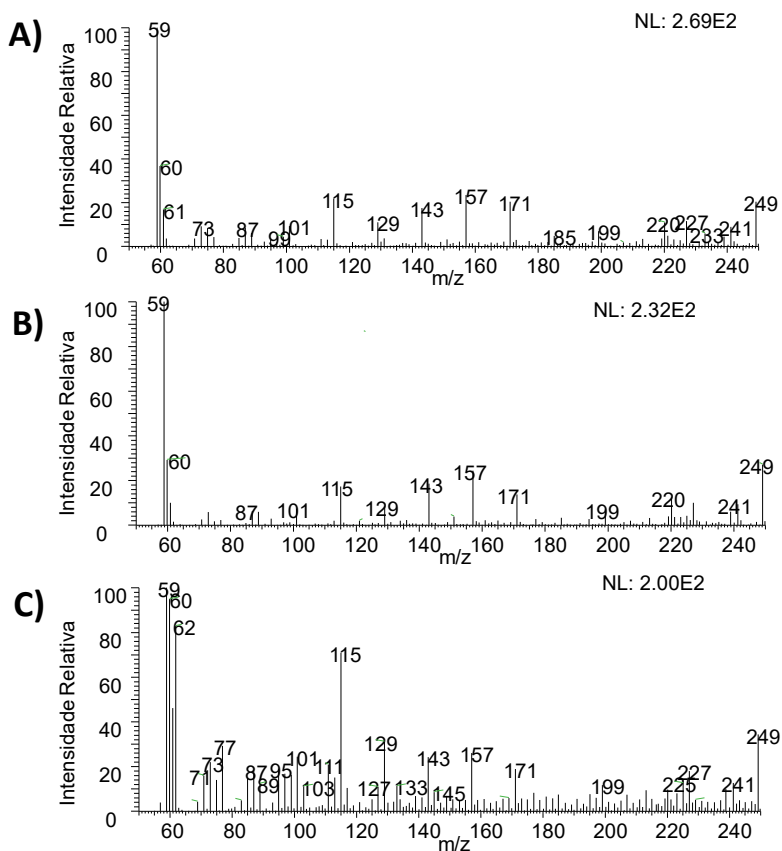
A Figura 5-10 apresenta os espectros das amostras (A) cachaça prata, (B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e (C) por dois anos e meio. Destacam-se os sinais de m/z 59, 60, 115, 143, 157 e 249, os quais também foram visualizados nos espectros dos estudos anteriores referentes a amostras obtidas durante a produção da cachaça. Porém, devido à similaridade entre os perfis espectrais das amostras, não é possível identificar nos espectros da Figura 5-10 marcadores do envelhecimento da cachaça em barril de madeira.

Figura 5-10: Espectros obtidos por PS(-)-MS convencional em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.



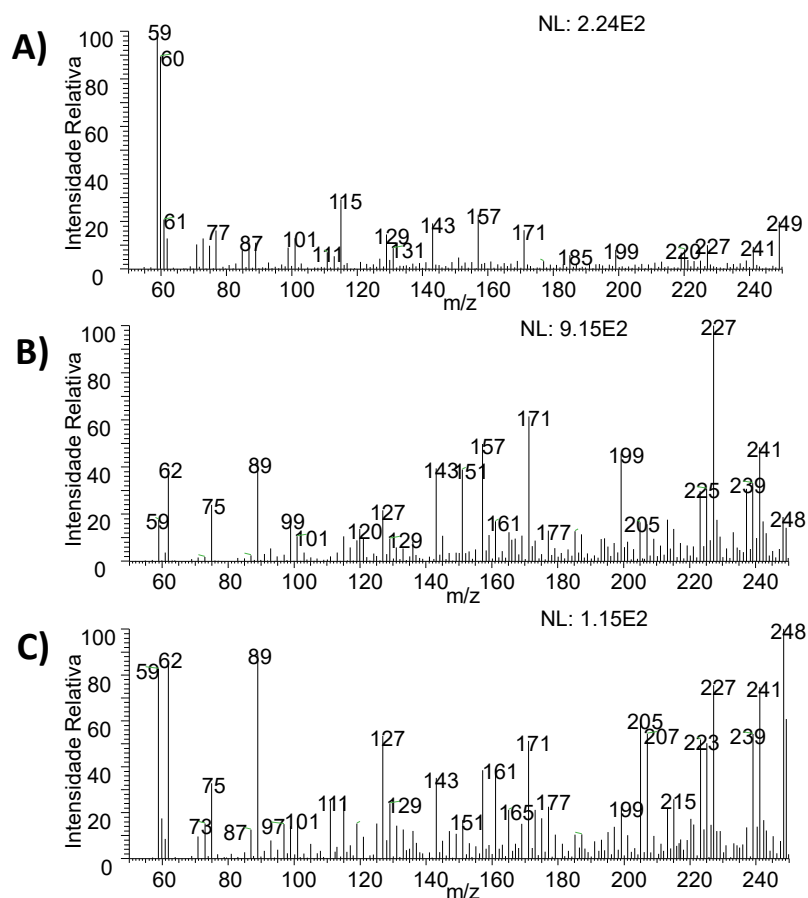
Em seguida, as amostras foram analisadas por HS-PS-MS. A Figura 5-11 apresenta os espectros da (A) cachaça prata, (B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e (C) por dois anos e meio. Observam-se similaridades entre os perfis espectrais de (A) e (B). Por outro lado, o espectro (C) pode ser diferenciado pela maior densidade de íon na faixa de m/z 70 – 150 e por apresentar sinais com maiores intensidades. Como exemplo, podem-se citar os íons de m/z 62 não observado em (A) e (B), mas com intensidade relativa de 80% em (C), e de m/z 115 com intensidade de cerca de 30% em (A) e (B) e 80% em (C).

Figura 5-11: Espectros obtidos por HS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.



Em sequência, as amostras foram analisadas por HS-PDMS-PS-MS. A Figura 5-12 apresenta os espectros da (A) cachaça prata, (B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e (C) por dois anos e meio. Observam-se perfis espectrais distintos para cada amostra estudada. Os espectros (B) e (C), referentes às amostras que tiveram contato com a madeira, apresentam sinais significativamente mais intensos do que o espectro da cachaça prata (A).

Figura 5-12: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS em modo negativo das amostras A) cachaça prata, B) cachaça armazenada em barril de carvalho por três meses e C) cachaça envelhecida em barril de carvalho por dois anos e meio.



O contato da bebida com a madeira por três meses (Figura 5-12 B) promoveu o aumento na intensidade dos sinais de m/z 62, 89, 143, 171, 199, 227 e 241 e redução do sinal de m/z 59. Após envelhecimento por dois anos e meio, observa-se através do espectro da Figura 5-12 (C) acentuado aumento dos sinais de m/z 62, 89, 127, 205, 207, 227, 241 e 248 e também pequena redução do m/z 59.

Além dos íons de composição já identificada na Tabela 5-1, a literatura descreve o de m/z 241 como sendo o ácido pentadecanóico [206] e o de m/z 227 como sendo o resveratrol [223] ou o ácido tetradecanóico.

Corroborando com os resultados obtidos neste capítulo, Souza e colaboradores [224], também apontaram o íon de m/z 241 como um marcador para o envelhecimento de cachaças em madeira carvalho. No referido trabalho, os autores utilizaram a técnica ESI-MS para avaliar a autenticidade de cachaças envelhecidas.

Enquanto os espectros obtidos por PS-MS convencional não permitiram diferenciar a cachaça prata da bebida envelhecida, os espectros obtidos por HS-PS-MS apontaram possíveis marcadores para o envelhecimento da cachaça em barril de

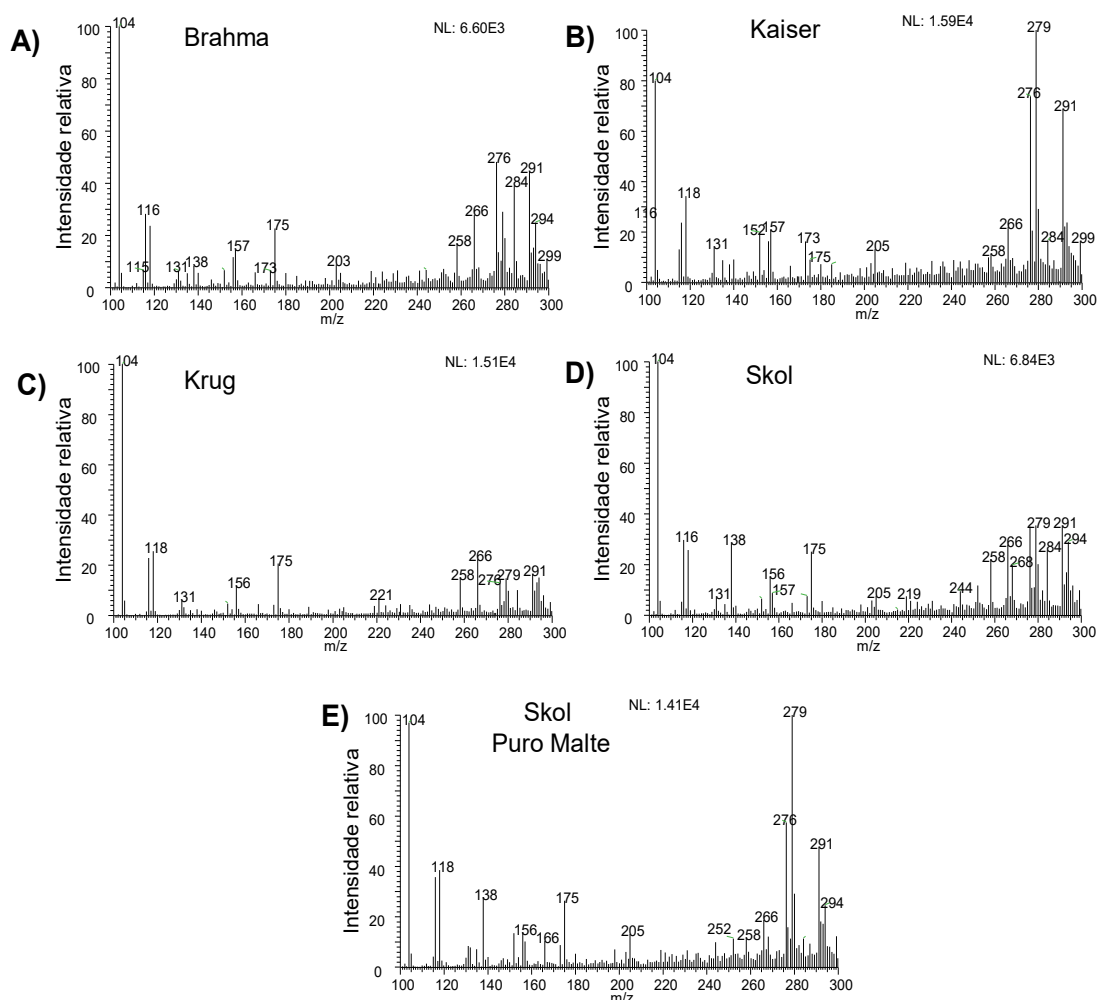
carvalho por dois anos e meio. Em contraste, a afinidade do PDMS a compostos distintos daqueles sorvidos pelo papel cromatográfico gerou espectros HS-PDMS-PS-MS com sinais que possibilitaram identificar possíveis marcadores para o envelhecimento da cachaça por três meses e por dois anos e meio.

4.4. Cervejas comerciais

Segundo informações descritas nos rótulos, dentre as cervejas selecionadas, a Kaiser, a Brahma e a Skol apresentam composição de água, malte, milho e lúpulo. Enquanto a Krug 20 e a Skol Puro Malte apresentam composição de água, malte e lúpulo.

Inicialmente as amostras foram analisadas por PS-MS convencional, ou seja, sem etapas de preparo das amostras. A Figura 5-13 apresenta os espectros obtidos em modo positivo das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte.

Figura 5-13: Espectros obtidos por PS(+)-MS das cervejas A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte

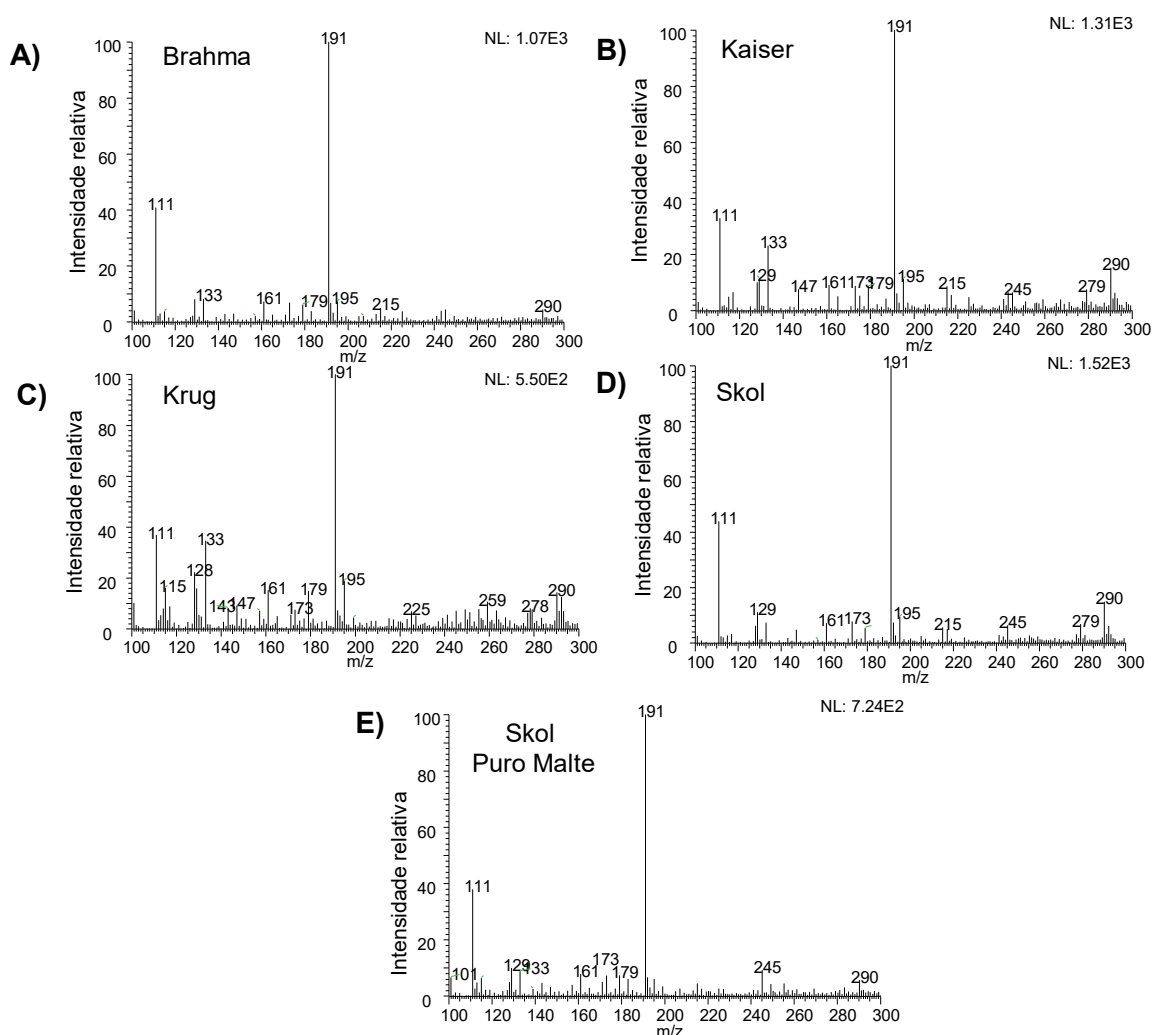


Uma inspeção visual dos espectros da Figura 5-13 indica grande similaridade entre os perfis das amostras. No que se refere à atribuição dos sinais dos espectros, a literatura descreve o íon de m/z 104, com alta intensidade nos espectros, como sendo

o aminoácido ácido gama-aminobutírico [221]. Os íons de m/z 116 e 118, observados nos espectros com intensidades de aproximadamente 40%, são associados aos aminoácidos prolina e valina [225], respectivamente, e o sinal de m/z 175 é atribuído à arginina [226]. É importante destacar que, o íon de m/z 279 presente nos espectros é associado, de acordo com o espectro do papel cromatográfico (utilizando 10 μ L de hexano + 30 μ L metanol como solvente da PS), a alguma substancia presente nos solventes ou no papel.

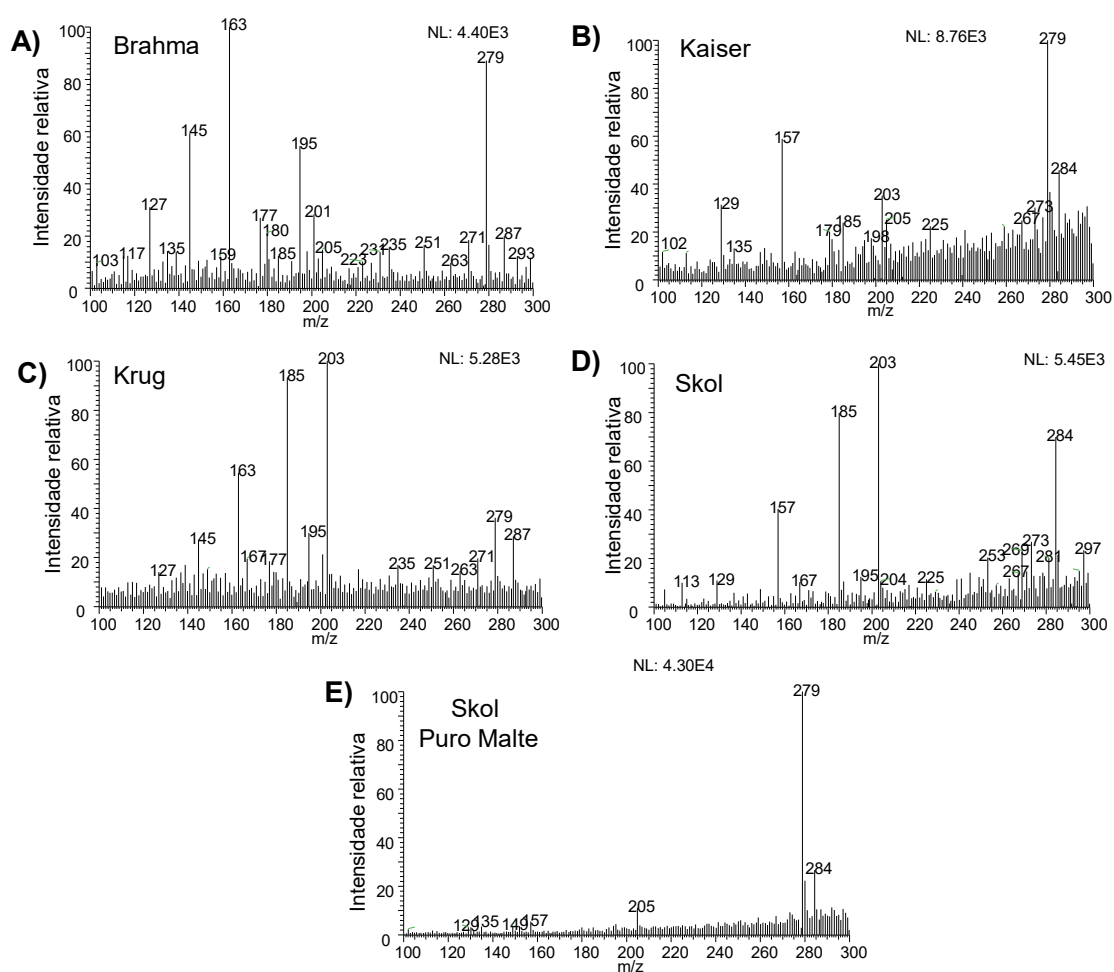
A Figura 5-14 apresenta os espectros obtidos por PS(-)-MS das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte. Assim como observado anteriormente para o modo positivo, os espectros das amostras obtidos no modo negativo também apresentam perfis similares. A literatura descreve os principais sinais visualizados nos espectros como sendo: m/z 111 o ácido sórbico [227], m/z 133 o ácido málico [228] e m/z 191 o ácido cítrico [228].

Figura 5-14: Espectros obtidos por PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.



Em seguida, as amostras foram submetidas a preparo de amostra por extração por *headspace* diretamente no papel cromatográfico. A Figura 5-15 apresenta espectros obtidos por HS-PS(+)-MS das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte. É possível observar diferenças significativas entre os espectros das amostras, o que não foi possível sem a etapa de extração. Além disso, os espectros indicam *clean up* amostral promovido pela extração por *headspace*. Isto pode ser comprovado através dos sinais de m/z 104, 116, e 175, os quais não são observados nos espectros abaixo, porém, estão presentes em altas intensidades nos espectros obtidos por PS-MS convencional, apresentados anteriormente.

Figura 5-15: Espectros obtidos por HS-PS(+)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.



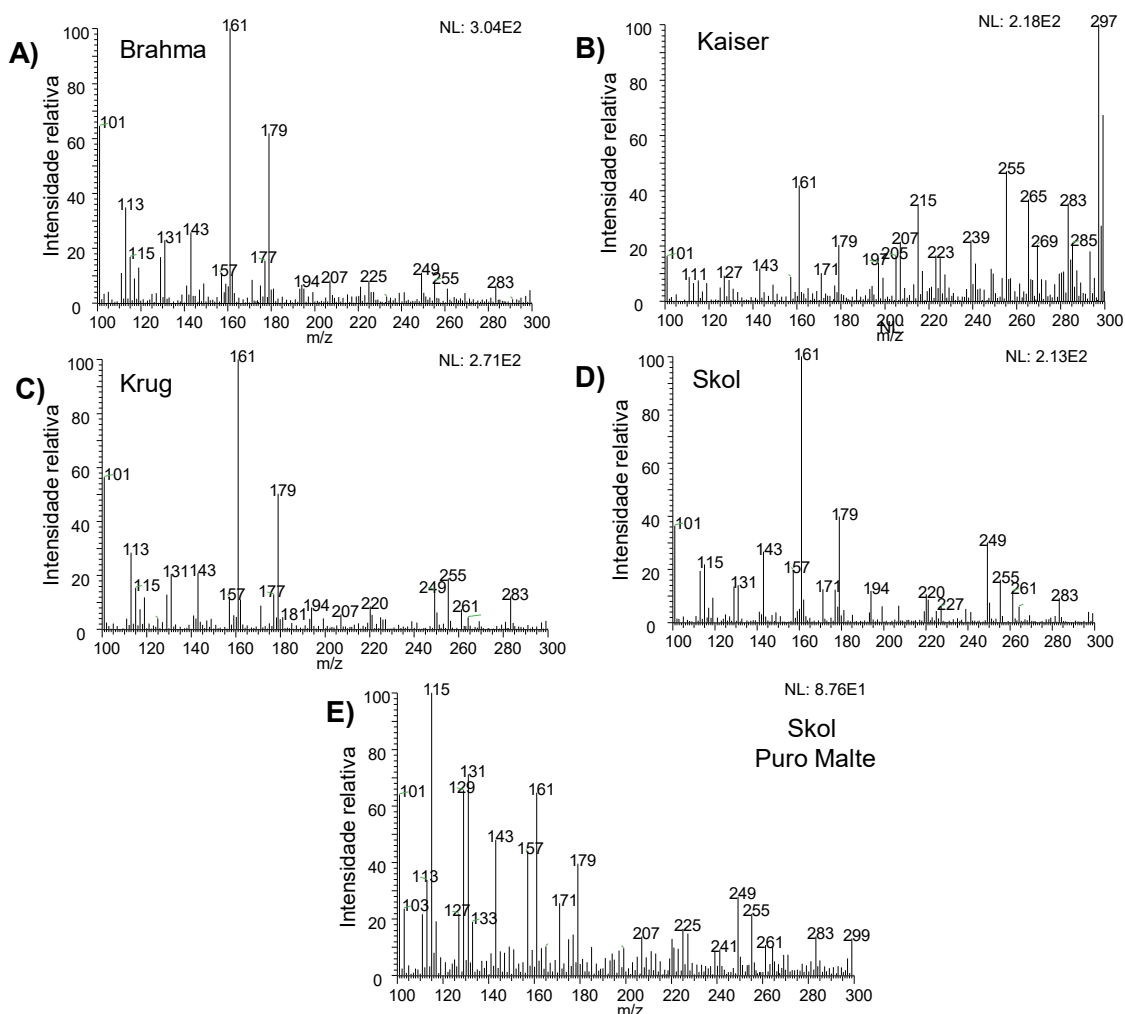
As amostras podem ser divididas em três classes de acordo com o perfis espectrais apresentados na Figura 5-15 (obtidos por HS-PS(+)-MS). A primeira classe engloba os espectros que contém os íons de m/z 127, 145, 163 e 195, e inclui as amostras Brahma (A) e Krug (C). Dentro dessa classe, os espectros podem ser diferenciados pelos íons de m/z 185 e 203, presentes em (C) e imperceptíveis em (A).

A segunda classe engloba os espectros que contém os íons de m/z 129, 157, 185 e 203, e inclui as amostras Kaiser (B) e Skol(D). Essas amostras apresentam perfis espectrais bastante similares.

A terceira classe é a da amostra Skol Puro Malte, espectro (E), caracterizado pelo íon de m/z 279 (do papel) e m/z 205.

A Figura 5-16 apresenta espectros obtidos por HS-PS(-)-MS das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte, os quais são caracterizados majoritariamente pela presença dos sinais de m/z 101, 161 e 179, não identificados. O íon de m/z 297, o mais intenso do espectro (B) e imperceptível nas demais amostras, diferencia o espectro da Kaiser dos demais. O espectro da Skol Puro Malte, (E), distingue-se dos demais pela grande quantidade de sinais intensos na região de m/z 100 – 200.

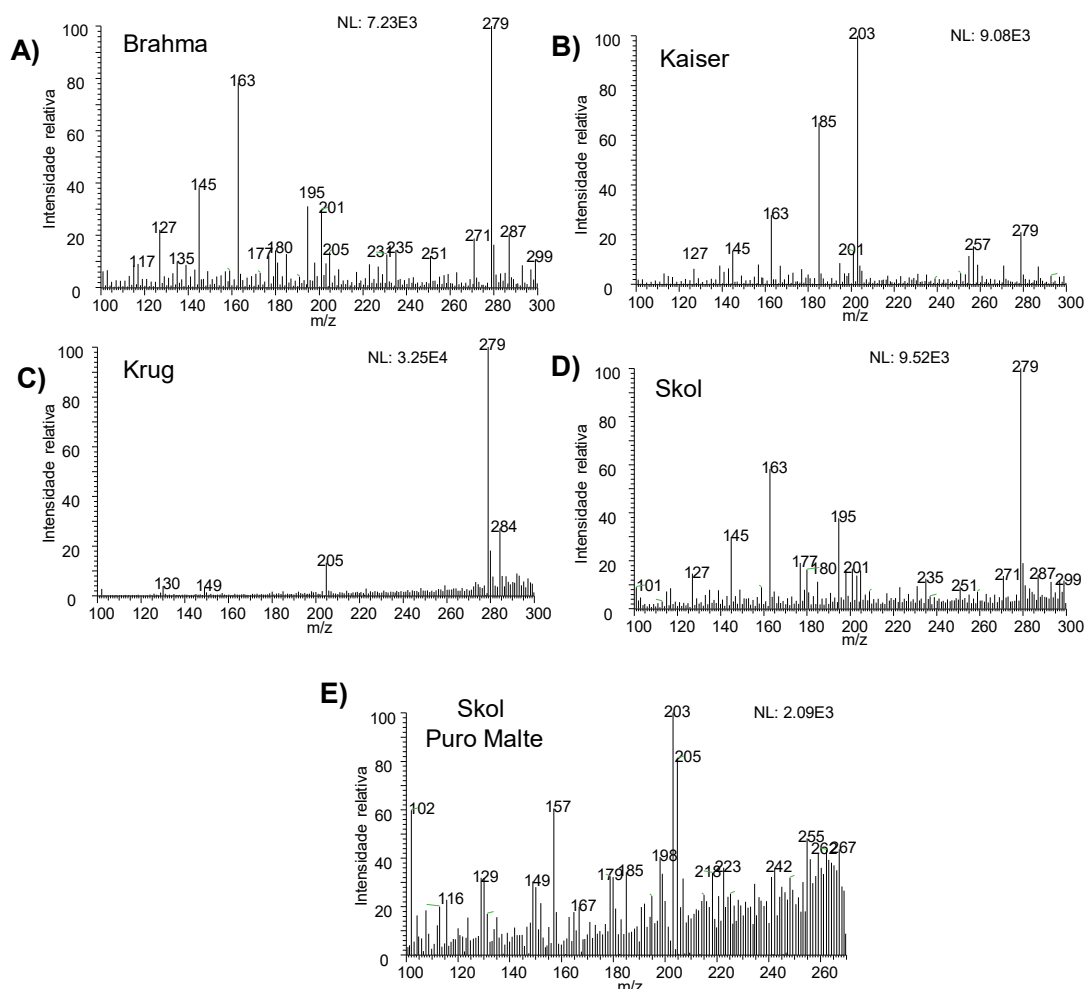
Figura 5-16: Espectros obtidos por HS-PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.



Os espectros da Figura 5-16 indicam, mais uma vez, o *clean up* amostral promovido pela extração por *headspace*. Este fenômeno pode ser comprovado pela ausência dos sinais de m/z 111 e 191, os quais estão presentes em altas intensidades nos espectros obtidos por PS-MS convencional, apresentados anteriormente.

Por ultimo, avaliou-se o PDMS como adsorvente na extração por *headspace* seguido de análise por PS-MS. A Figura 5-17 apresenta os espectros HS-PDMS-PS(+)-MS das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte. Embora não tenham sido identificados, os íons de m/z 127, 145 e 163 podem ser relacionados a possíveis marcadores das cervejas que contém adição de milho. Isto pode ser comprovado pela presença dos referidos sinais exclusivamente nos espectros das amostras Brahma (A), Kaiser (B) e Skol (D).

Figura 5-17: Espectros HS-PDMS-PS(+)-MS de diferentes marcas de cerveja comerciais: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.

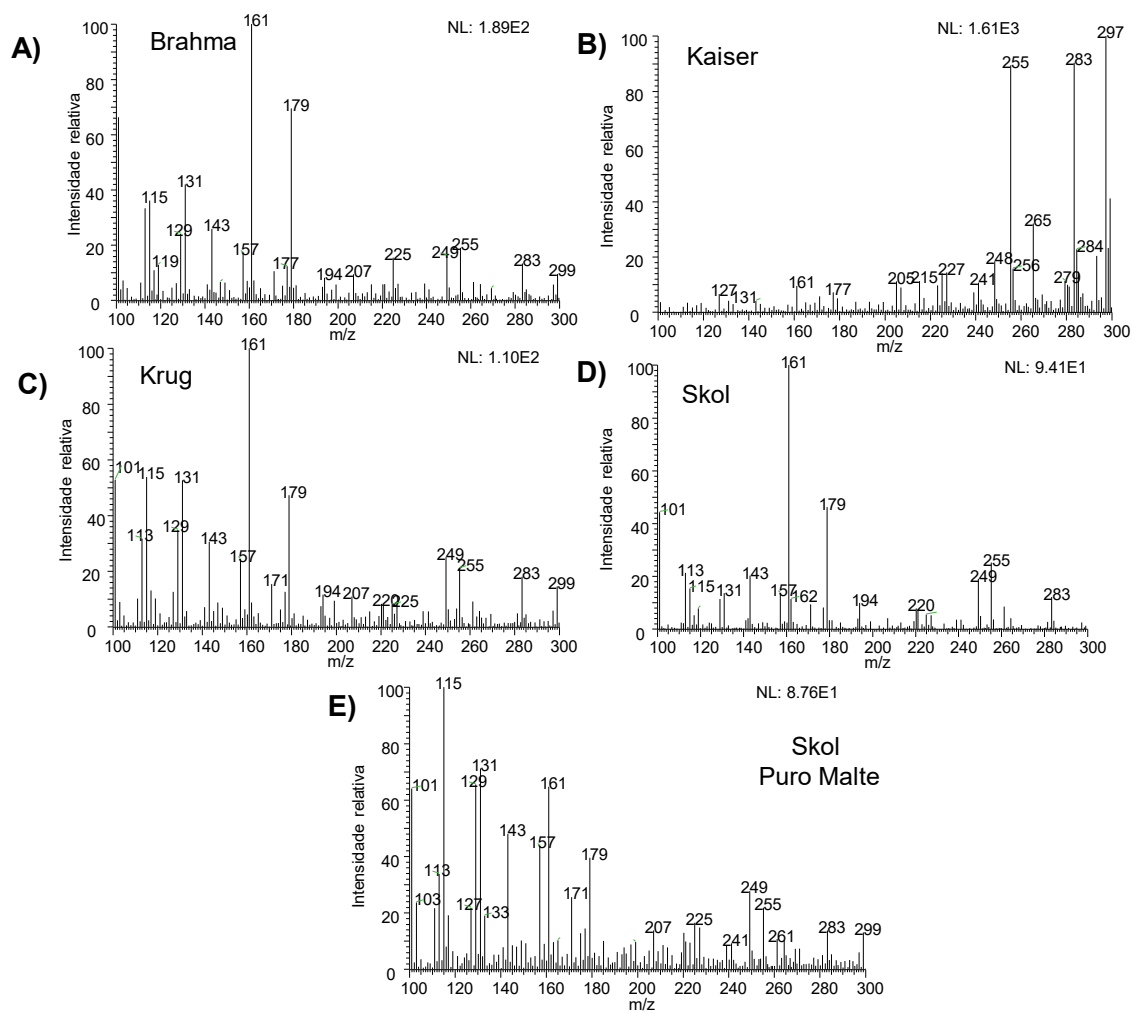


No espectro da cerveja Krug (Figura 5-17 C) a sorção por PDMS reduziu significativamente a quantidade de sinais quando comparado com a sorção dos analitos por papel cromatográfico livre. Em contraste, no espectro da Skol Puro Mate (E) o polímero promoveu significativo aumento na intensidade dos sinais. O íon de m/z 102, observado em (E), não é visualizado nos demais espectros, possibilitando diferenciar a marca Skol Puro Mate.

A Figura 5-18 apresenta os espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS das cervejas (A) Brahma, (B) Kaiser, (C) Krug, (D) Skol e (E) Skol Puro Malte. Com exceção do (B), os demais espectros apresentam perfis similares, nos quais os íons de m/z 101, 161 e 179 são visualizados em elevadas intensidades. De maneira similar ao observado nos espectros obtidos por HS-PS(-)-MS, o íon de m/z 297 foi responsável por diferenciar o espectro da cerveja Kaiser (B) dos demais. Entretanto,

nota-se que para essa amostra o papel cromatográfico apresentou melhor eficiência do que o PDMS em adsorver moléculas na faixa de m/z 100 – 240.

Figura 5-18: Espectros obtidos por HS-PDMS-PS(-)-MS das cervejas: A) Brahma, B) Kaiser C) Krug, D) Skol e E) Skol puro malte.



5. CONCLUSÃO

Neste capítulo uma metodologia associou a extração por *headspace* com a PS-MS para detecção de componentes voláteis do processo de produção da cachaça e de amostras comerciais de cervejas. Para tal, dois sistemas foram desenvolvidos: (i) HS com papel cromatográfico livre como adsorvente e (ii) HS com PDMS imobilizado em papel cromatográfico como adsorvente.

Os espectros obtidos por PS-MS com extração por *headspace* apresentaram vantagens em relação à PS-MS convencional tais como: *clean-up* amostral, pré-concentração dos analitos e obtenção de espectros de melhor interpretação. Ainda, a HS viabilizou análises por PS-MS com ênfase aos componentes voláteis das amostras.

A utilização do PDMS como adsorvente possibilitou associar sinais dos espectros obtidos por PS-MS a marcadores do envelhecimento de cachaça em barril de carvalho (m/z 62, 89, 227,241) e de cervejas que apresentam milho como adjunto cervejeiro (m/z 127, 145 e 163). Os respectivos marcadores não foram observados nos espectros obtidos por PS-MS convencional, sem a etapa de extração.

Capítulo 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A PS é uma técnica de ionização proposta na última década que tem se destacado, principalmente, na análise de amostras de matrizes complexas, tais como alimentos, amostras ambientais e fluídos biológicos. O papel utilizado como substrato para promover a ionização tem a capacidade de reter interferentes presentes na matriz e, por isso, técnicas de preparo de amostra são, por vezes, dispensadas. Entretanto, em alguns casos, etapas de preparo de amostras e/ou modificações na superfície do papel são necessários para garantir o sucesso da análise.

Neste trabalho, foi demonstrado que associar a técnica PS-MS a técnicas de preparo de amostras consolidadas permitiu o desenvolvimento de métodos mais seletivos e sensíveis do que a PS-MS convencional. Propostas utilizando as técnicas de extração por eletroextração, concentração evaporativa e por fase sólida em *headspace* foram desenvolvidas. Adaptações específicas foram realizadas nos dispositivos de extração a fim de combinar as técnicas de preparo de amostras diretamente com a PS-MS. O suporte da EE foi modificado para que o substrato da ionização fosse utilizado como fase aceptora. Adaptações no *vial* do sistema *headspace* foram realizadas para possibilitar o uso do substrato da ionização como adsorvente da extração em fase sólida. Além disso, a concentração evaporativa foi otimizada para pré-concentrar os analitos nas extremidades triangulares de um microdispositivo de papel.

A eletroextração associada a PS-MS promoveu enriquecimentos significativos dos analitos nas análises de cocaína e lidocaína em amostras de saliva sintética, corante verde malaquita em água canalizada e bisfenol A em vinho tinto. Quando associada à PS-MS, a concentração evaporativa em microdispositivo promoveu aumento na intensidade de sinais de corantes. Além disso, quando os dados analíticos foram extraídos de imagens digitais obtidas utilizando um *scanner*, a concentração evaporativa em microdispositivo possibilitou reduzir significativamente os limites de detecção de $\text{Cu}(\text{DDTC})_2$ para determinação de Cu^{2+} em cachaça. A extração por *headspace* associada à PS-MS possibilitou obter espectros caracterizados majoritariamente por compostos voláteis de amostras de cachaças e cervejas. Uma das principais vantagens do método é o significativo *clean-up* amostral. Ainda no que se refere à extração por *headspace*, impregnar o papel cromatográfico com PDMS promoveu, em alguns casos, a sorção de compostos distintos daqueles sorvidos pelo papel cromatográfico livre.

As propostas de associação das técnicas de preparo de amostras à PS-MS desenvolvidas neste trabalho são estudos inéditos de relevância científica, os quais contribuem para a ampliação das possibilidades de aplicações da PS-MS. Além disso, a proposta que associa técnica de preparo de amostra a colorimetria amplia ainda mais as possibilidades de aplicações de métodos de baixo custo.

Capítulo 7 REFERÊNCIAS

- [1] Jiangjiang Liu, He Wang, Nicholas E Manicke, Jin-Ming Lin, R Graham Cooks e Zheng Ouyang. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. *Analytical Chemistry* 82 (2010): 2463-2471.
- [2] Min-Zong Huang, Sy-Chi Cheng, Yi-Tzu Cho e Jentaie Shie. Ambient ionization mass spectrometry: A tutorial. *Analytica Chimica Acta* 702 (2011): 1-15.
- [3] Chengsen Zhang e Nicholas E. Manicke. Development of a Paper Spray Mass Spectrometry Cartridge with Integrated Solid Phase Extraction for Bioanalysis. *Anal. Chem.* 87 (2015): 6212–6219.
- [4] Shih-Chun Wei, Shen Fan, Chia-Wen Lien, Binesh Unnikrishnan, Yi-Sheng Wang, Han-Wei Chu, Chih-Ching Huang, Pang-Hung Hsu e Huan-Tsung Chang. Graphene oxide membrane as an efficient extraction and ionization substrate for spray-mass spectrometric analysis of malachite green and its metabolite in fish samples. *Analytica Chimica Acta* 1003 (2018): 42-48.
- [5] Edmond de Hoffmann e Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3ª Edição. England, 2007.
- [6] Daniel C. de Harris. *Análise Química Quantitativa*. 6ª Edição. São Paulo: LTC, 2005.
- [7] Daniel J. Weston. Ambient ionization mass spectrometry: current understanding of mechanistic theory; analytical performance and application areas. *Analyst* 135 (2010).
- [8] J. B. Fenn, M Mann, C. K. Meng, S. F. Wong, C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (1989): 64-71.
- [9] C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashita, J. B. Fenn. Electrospray interface for liquid chromatographs and mass spectrometers. *Anal. Chem.* 57 (1985): 675–679.
- [10] Web of Science mass spectrometry. análise de resultados 2020; Disponível em: <http://webofknowledge.com>
- [11] A Venter, M Nefliu, RG Cooks. Ambient desorption ionization mass spectrometry. *TrAC-Trends in Analytical Chemistry* 27 (2008): 284-290.
- [12] Demian R. Ifa, Chunping Wu, Zheng Ouyang e R. Graham Cooks. Desorption electrospray ionization and other ambient ionization methods: current progress and preview. *Analyst* 135 (2010): 669-681.
- [13] Z. Takats, J. M. Wiseman, B. Gologan e R. G. Cooks. Mass Spectrometry Sampling Under Ambient Conditions with Desorption Electrospray Ionization. *Science* 3 (2004): 471- 473.
- [14] Cody, R. B., Laramée, J. A., Dupont Durst, H. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Analytical Chemistry* 77 (2005): 2297- 2302.

- [15] Jiangjiang Liu, He Wang, Nicholas E Manicke, Jin-Ming Lin, R Graham Cooks e Zheng Ouyang. Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry. *Angewandte Chemie-International Edition* 49 (2010): 889-892.
- [16] Silva, L. C., Pereira, I., Carvalho, T. C., Filho, J. F. A., Romão W., Vaz, B. G. Paper spray ionization and portable mass spectrometers: a review. *Analytical Methods* 11 (2019): 999-1013
- [17] Taylor, G. Disintegration of Water Drops in an Electric Field. *Proceedings of the Royal Society A* 208 (1964): 383-397.
- [18] A. K. Meher, Y.-C. Chen. *Electrospray Modications for Advancing Mass Spectrometric Analysis*. *Mass spectrometry* (2017),
- [19] J. B. Fenn, M. Mann, C. K. Meng, S. F. Wong e C. M. Whitehouse. Electrospray ionization for mass-spectrometry of large biomolecules. *Science* 246 (1989): 64-71.
- [20] Masamichi Yamashita e John B. Fenn. Electrospray ion-source - another variation on the free-jet theme. *Journal of Physical Chemistry* 88 (1984): 4451-4459.
- [21] Priscila Da Silva Ferreira, Débora Fernandes De Abreu E Silva, Rodinei Augusti e Evandro Piccin. Forensic analysis of ballpoint pen inks using paper spray mass spectrometry. *Analyst* 140 (2015): 811-819.
- [22] Z. P. Zhang, X. N. Liu, and Y. J. Zheng. Ambient Ionization-Paper Spray Ionization and Its Application. *Chinese Journal of Analytical Chemistry* 42 (2014): 145-152.
- [23] Qian Yang, He Wang, Jeffrey D. Maas, William J. Chappell, Nicholas E. Manicke, R. Graham Cooks e Zheng Ouyang. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *International Journal of Mass Spectrometry* 312 (2012): 201-207.
- [24] R.D. Espy, A.R. Muliadi, Z. Ouyang e R.G. Cooks. Spray mechanism in paper spray ionization. *International Journal of Mass Spectrometry* 325–327 (2012): 167– 171.
- [25] Feifei Han, Yuhan Yang, Jin Ouyang e Na Na. Direct analysis of in-gel proteins by carbono nanotubes-modified paper spray ambiente mass spectrometry. *Analyst* 140 (2015): 710-715.
- [26] Zhiping Zhang, Wei Xu, Nicholas E. Manicke, R. Graham Cooks e Zheng Ouyang. Silica Coated Paper Substrate for Paper-Spray Analysis of Therapeutic Drugs in Dried Blood Spots. *Anal. Chem.* 84 (2012): 931–938.
- [27] Elizabeth S Dhummakupt, Phillip M Mach, Daniel Carmany, Paul S Demond, Theodore S Moran, Theresa Connell, Harold S Wylie, Nicholas E Manicke, J Michael Nilles e Trevor Glaros. Direct analysis of aerolized chemical warfare simulants captured on a modified glass-based substrate by PSI. *Anal. Chem.* 89 (2017): 10866–10872.
- [28] Elizabeth S. Dhummakupt, Daniel O. Carmany, Phillip M. Mach, Trenton M. Tovar, Ann M. Ploskonka, Paul S. Demond, Jared B. DeCoste e Trevor Glaros. Metal organic framework Modified glass substrate for analysis of

- highly volatile chemical warfare agents by PS-MS. *Appl. Mater. Interfaces* 10 (2018): 8359–8365.
- [29] Jingjing Liu, Yan He, Shuo Chen, Ming Ma, Shouzu Yao e Bo Chen. New urea modified paper substrate for enhanced analytical performance of negative ion mode paper spray mass spectrometry. *Talanta*, 2017 : 306-314.
- [30] Igor Pereira, Marcella Ferreira Rodrigues, Andréa Rodrigues Chaves e Boniek Gontijo Vaz. Molecularly imprinted polymer (MIP) membrane assisted direct spray ionization mass spectrometry for agrochemicals screening in foodstuffs. *Talanta* 178 (2018): 507–514
- [31] Ludmyla S. Tavares, Thays C. Carvalho, Wanderson Romão, Boniek G. Vaz e Andréa R. Chaves. Paper Spray Tandem Mass Spectrometry Based on Molecularly Imprinted Polymer Substrate for Cocaine Analysis in Oral Fluid. *J. Am. Soc. Mass Spectrom* 29 (2018): 566-572.
- [32] Tahereh Zargar, Mohammad T. Jafari e Taghi Khayamian. Molecularly imprinted graphite spray ionization-ion mobility spectrometry: application to trace analysis of the pesticide propoxur. *Microchimica Acta* 186 (2019) 396-404.
- [33] Marcella M. C. Borges, Heloíá Santos, Géssica A. Vasconcelos, Tienne A. Nascimento, Flavia V. A. Dutra, Bruna C. Pires, Joao Francisco Allochio Filho, Gloria M. F. V. Aquije, Warley S. Borges, Valdemar Lacerda, Jr, Boniek G. Vaz, Luis E. Arroyo-Mora, Wanderson Romao e Keyller B. Borges. The use of conductive polymers as a substrate for paper spray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods* 11 (2019): 3388-3400.
- [34] Rahul Narayanan, Xiaowei Song, Hao Chen e Richard N. Zare. Teflon Spray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry* 31 (2020):234-239.
- [35] Pallab BasuriPallab Basuri, Avijit Baidya e Thalappil Pradeep. Sub-Parts-per-Trillion Level Detection of Analytes by Superhydrophobic Preconcentration Paper Spray Ionization Mass Spectrometry (SHPPSI MS). *Analytical Chemistry* 91 (2019): 7118–7124.
- [36] Ling Fang, Jiewei Deng, Yuan Yu, Yunyun Yang, Xiaowei Wang, Hongtao Liu e Tiangang Luan. Coupling liquid-phase microextraction with paper spray for rapid analysis of malachite green, Crystal violet and their metabolites in complex sample using mass spectrometry. *Anal. Methods*, 8 (2016): 6651–6656.
- [37] Jiewei Deng, Wenwen Wang, Yunyun Yang, Xiaowei Wang, Baowei Chen, Zhong-Ping Yao e Tiangang Luan. Slug-flow microextraction coupled with paper spray mass spectrometry for rapid analysis of complex samples. *Analytica Chimica Acta* 940 (2016): 143-149.
- [38] Fernanda Midori de Oliveira, Guilherme Luiz Scheel, Rodinei Augusti, César Ricardo Teixeira Tarley e Clésia Cristina Nascentes. Supramolecular microextraction combined with paper spray ionization mass spectrometry for

- sensitive determination of tricyclic antidepressants in urine. *Analytica Chimica Acta* 1106 (2020): 52-60.
- [39] J. Stichelmaier, J. Schmidt e R. Proplesch. Electroextraction: A novel separation technique. *Chemical Engineering Science* 47 (1992): 3015-3022.
- [40] Camila D. M. Campos, Richard P. S. de Campos, José A. Fracassi da Silva, Dosil P. Jesus e Ricardo M. Orlando. PREPARO DE AMOSTRAS ASSISTIDO POR CAMPO ELÉTRICO: FUNDAMENTOS, AVANÇOS, APLICAÇÕES E TENDÊNCIAS. *Química Nova* 38 (2015).
- [41] Drouin, N., Kuba, P., Rudaz, S., Pedersen-Bjergaard, S., Schappler, J. Electromembrane extraction: Overview of the last decade, *Trends Anal. Chem.* 113 (2019): 357-363.
- [42] C. D. M. Campos, J. K. Park, P. Neužil, J. A. F. da Silvabc e A. Manz. Membrane-free electroextraction using an aqueous two-phase system. *RSC Adv.* 4 (2014): 49485-49490.
- [43] Petrus W. Lindenburg, Ubbo R. Tjaden, Jan van der Greef e Thomas Hankemeier. Feasibility of electroextraction as versatile sample preconcentration for fast and sensitive analysis of urine metabolites, demonstrated on acylcarnitines. *Electrophoresis* 33 (2012): 2987–2995.
- [44] Petrus W. Lindenburg, F.W. Alexander Tempels, Ubbo R. Tjaden, Jan van der Greef e Thomas Hankemeier. On-line large-volume electroextraction coupled to liquid chromatography–mass spectrometry to improve detection of peptides. *Journal of Chromatography A* 1249 (2012): 17– 24.
- [45] Evan der Vlis, M. Mazereeuw, U.R. Tjaden, H. Irth e J. van der Greef. Development of a needle device for on-line electroextraction—liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 741 (1996): 13-21.
- [46] E., Pedersen-Bjergaard S e Rasmussen K. Electrokinetic migration across artificial liquid membranes. New concept for rapid sample preparation of biological fluids. *Journal of Chromatography A* 1109 (2006): 183-190.
- [47] Balchen M, Halvorsen TG, Reubsæet L e Pedersen-Bjergaard S. Rapid isolation of angiotensin peptides from plasma by electromembrane extraction. *Journal of Chromatography A* (2009): 6900-6905 .
- [48] Robert-Jan Raterink, Peter W. Lindenburg, Rob J. Vreeken e Thomas Hankemeier. Three-Phase Electroextraction: A New (Online) Sample Purification and Enrichment Method for Bioanalysis. *Anal. Chem.* 85 (2013): 7762–7768.
- [49] Orlando R. M.; Nascentes C. C.; Botelho B. G.; Moreira J. S.; Costa K. A.; Boratto V. H. M. Development and Evaluation of a 66-Well Plate Using a Porous Sorbent in a Four-Phase Extraction Assisted by Electric Field Approach. *Analytical Chemistry* 91 (2019): 6471–6478.
- [50] Sousa D. V. M.; Pereira F. V.; Nascentes C. C.; Moreira J. S.; Boratto V. H. M.; Orlando R. M. Cellulose cone tip as a sorbent material for multiphase electrical field-assisted extraction of cocaine from saliva and determination by LC-MS/MS. *Talanta* 208 (2020): 120353.

- [51] Victoria Silva Amador, Juliane Soares Moreira, Rodinei Augusti, Ricardo Mathias Orlando e Evandro Piccin. Direct coupling of paper spray mass spectrometry and four-phase electroextraction sample preparation. *Analyst* 146 (2021): 1057-1064.
- [52] Lei nº 11.343 decreto de 23 de agosto de 2006.
- [53] Karch, Steven B. *Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Abused Drugs*. 2007.
- [54] Botelho, Élvio Dias. Desenvolvimento de uma nova metodologia analítica para identificação e quantificação de truxilinas em amostras de cocaína baseada em cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLAE-EM). Brasília, 2011.
- [55] Moreira, Juliane Soares. Determinação De Cocaína E Lidocaína Em Saliva Empregando Preparo De Amostra Assistido Por Campo Elétrico Associado À Cromatografia Líquida-Espectrometria De Massas Sequencial Belo Horizonte: UFMG, 2018.
- [56] Wolff K, Farrell M, Marsden J, Monteiro MG, Ali R, Welch S, Strang J. A review of biological indicators of illicit drug use, practical considerations and clinical usefulness. (*Addiction*) 1999: 1279-1298.
- [57] Nicolás M Morato, Valentina Pirro, Patrick W Fedick e R Graham Cooks. Quantitative Swab Touch Spray Mass Spectrometry for Oral Fluid Drug Testing. *Analytical Chemistry* 91 (2019):7450-7457.
- [58] Fiorentin T. R., D'Avila F. B., Comiran E., Zamboni A., Scherer J. N., Pechansky F., Borges P. E. M., Fröhlich P. E. e Limberger R. P. Simultaneous determination of cocaine/crack and its metabolites in oral fluid, urine and plasma by liquid chromatography-mass spectrometry and its application in drug users. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 86 (2017): 60-66.
- [59] Sara Malaca, Francesco Paolo Busardò, Massimo Gottardi, Simona Pichini e Emilia Marchei. Dilute and shoot ultra-high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (UHPLC–MS/MS) analysis of psychoactive drugs in oral fluid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 170 (2019): 63-67.
- [60] H. Santos, A. S. Lima, A. Mazega, E. Domingos, C. J. Thompson, A. O. Maldaner, P. R. Filgueiras, B. G. Vaze and W. Romão. Quantification of cocaine and its adulterants (lidocaine and levamisole) using the Dragendorff reagent allied to paper spray ionization mass spectrometry. *Analytical Methods* 9 (2017): 3662-3668.
- [61] Camila Cristina Almeida de Paula, Rogerio Araujo Lordeiro, Evandro Piccin, Rodinei Augusti. Paper spray mass spectrometry applied to the detection of cocaine in simulated samples. *Anal. Methods*, 2015: 9145–9149.
- [62] Thays C. De Carvalho, Flavia Tosato, Lindamara M. Souza, Heloia Santos, Bianca B. Merlo, Rafael S. Ortiz, Rayza R.T. Rodrigues, Paulo R. Filgueiras, Hildegardo S. França, Rodinei Augusti, Wanderson Romao, Boniek G. Vaz. Thin layer chromatography coupled to paper spray ionization mass

- spectrometry for cocaine and its adulterants analysis. *Forensic Science International* 262 (2016): 56–65.
- [63] Lei no 10.357, de 27 de dezembro de 2001.
- [64] Teatino, Barbaro, A. About an unusual case: GC-MS detection of lidocaine. *Forensic Sci. Int.* 146 (2004): 93–94.
- [65] Ryan D. Espy, Sebastiaan Frans Teunissen, Nicholas E. Manicke, Yue Ren, Zheng Ouyang, Arian van Asten, and R. Graham Cooks. Paper Spray and Extraction Spray Mass Spectrometry for the Direct and Simultaneous Quantification of Eight Drugs of Abuse in Whole Blood. *Analytical Chemistry*, 2014: 7712–7718.
- [66] Ming Li, Jingjing Zhang, Jie Jiang, Jing Zhang, Jing Gaoa and Xiaolin Qiao. Rapid, in situ detection of cocaine residues based on paper spray ionization coupled with ion mobility spectrometry. *Analyst* 139 (2014): 1687-1691.
- [67] Eloilson Domingos, Thays C. de Carvalho, Igor Pereira, Gessica A. Vasconcelos, Christopher J. Thompson, Rodinei Augusti, Rayza R. T. Rodrigues, Lilian V. Tose, Heloa Santos,ae Joyce R. Araujo, Boniek G. Vaz and Wanderson Romao. Paper spray ionization mass spectrometry applied to forensic chemistry – drugs of abuse, inks and questioned documents. *Analytical Methods* 9 (2017): 4400–4409.
- [68] Deidre E. Damon, Mengzhen Yin, Danyelle M. Allen, Yosef S. Maher, Christian J. Tanny. Dried Blood Spheroids for Dry-State Room Temperature Stabilization of Microliter Blood Samples. *Analytical Chemistry*, nº 90 (2018): 9353-9358.
- [69] Devin J. Swiner, Sierra Jackson, George R. Durisek, Bridget K. Walsh, Yaman Kouatli e Abraham K. Badu-Tawiah. Microsampling with cotton thread: Storage and ultra-sensitive analysis by thread spray mass Spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 1082 (2019): 98-105.
- [70] Manqing Kang, Wanru Zhang, Linpei Dong, Xinxin Ren, Yin Zhu, Zhenhua Wang, Lijun Liang, Jinfeng Xue, Yunfeng Zhang, Wenpeng Zhang, Zheng Ouyanga. On-site testing of multiple drugs of abuse in urine by a miniature dual-LIT mass spectrometer. *Analytica Chimica Acta* 1101 (2020): 74-80.
- [71] João Francisco Allochio Filho, Nayara A. dos Santos, Keyller Bastos Borges, Valdemar Lacerda Jr., Fabrício Souza Pelição e Wanderson Romão. Fiber spray ionization mass spectrometry in forensic chemistry:A screening of drugs of urine. *Rapid Communication of Mass Spectrometry* 34 (2020).
- [72] A.A.M. Stolker, T. Zuidema e M.W.F. Nielen. Residue analysis of veterinary drugs and growth-promoting agents. *Trends in Analytical Chemistry* 26 (2007): 967-979.
- [73] Xue Xiao, Chao Chen, Jiewei Deng, Junhui Wu, Kaili He, Zhangmin Xiang e Yunyun Yang. Analysis of trace malachite green, crystal violet, and their metabolites in zebrafish by surface-coated probe nanoelectrospray ionization mass spectrometry. *Talanta* 217 (2020): 121064.

- [74] Xinhui Zhou, Jiaran Zhang, Zhongli Pan e Daoliang Li. Review of Methods for the Detection and Determination of Malachite Green and Leuco-Malachite Green in Aquaculture 2019. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 49 (2019): 1–20.
- [75] Jaime dos Santos Viana, Marina Caneschi de Freitas, Bruno Gonçalves Botelho, e Ricardo M. Orlando. Large-volume electric field-assisted multiphase extraction of malachite green from water samples: A multisample device and method validation. *Talanta* 222 (2021): 121540.
- [76] Dongmei Chen, Jean-Michel Delmas, Dominique Hurtaud-Pessel e Eric Verdon. Development of a multi-class method to determine nitroimidazoles, nitrofurans, pharmacologically active dyes and chloramphenicol in aquaculture products by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Food Chemistry* 311 (2020): 125924.
- [77] Xinhui Zhou, Jiaran Zhang, Zhongli Pan e Daoliang Li. Review of Methods for the Detection and Determination of Malachite Green and Leuco-Malachite Green in Aquaculture. *Critical Reviews in Analytical Chemistry* 49(2018): 1-20.
- [78] Ruizhi Wen, Dong Zeng, Zihui Yang, Le Jiang, Ming Ma, Bo Chen e Teris A van Beek. Rapid Analysis of Illegal Cationic Dyes in Foods and Surface Waters Using High Temperature Direct Analysis in Real Time HighResolution Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 66 (2018): 7542-7549.
- [79] Juliana C Hashimoto, Jonas A R Paschoal, Sonia C N Queiroz, Vera L Ferracini, Márcia R Assalin e Felix G R Reyes. A simple method for the determination of malachite green and leucomalachite green residues in fish by a modified quechers extraction and LC/ MS/MS. *Journal of AOAC INTERNATIONAL* 95 (2012): 913-22.
- [80] Noelia López-Gutiérrez, Roberto Romero-González, José Luis Martínez Vidala e Antonia Garrido Frenich. Analysis of triphenylmethane dyes in seafood products: a review of extraction methods and determination by liquid chromatography coupled to mass spectrometry. *Analytical Methods* 5 (2013): 3434-3449.
- [81] I. Safarík e M. Safariková. Detection of low concentrations of malachite green and crystal violet in water. *Water Research* 36 (2002): 196-200.
- [82] N. López-Gutiérrez, R. Romero-González, P. Plaza-Bolaños, J. L. Martínez-Vidal e A. Garrido-Frenich. Simultaneous and Fast Determination of Malachite Green, Leucomalachite Green, Crystal Violet, and Brilliant Green in Seafood by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods* 6 (2013): 406-414.
- [83] Dong Zeng, Muqian Yu, Ruizhi Wen e Jiali Feng. Quantification and fast-screening of malachite green in aquaculture water using paper spray ionization mass spectrometry. *Wei Sheng Yan Jiu* 49 (2020): 107-111.

- [84] Vandenberg, L. N., Hauser, R., Marcus, M., Olea, N., Welshons, W. V. Human exposure to bisphenol A (BPA). *Reproductive Toxicology* 24 (2007): 139–177.
- [85] Bjornsdotter, M. K., Boer, J., Gomez, A. B. Bisphenol A and replacements in thermal paper: a review. *Chemosphere* 182 (2017): 691-706.
- [86] Sun, F., Kang, L., Xiang, X., Li, H., Luo, X., Luo, R., Lu, C., Peng, X. Recent advances and progress in the detection of bisphenol A. *Anal Bioanalytical Chemistry* 408 (2016): 6913–6927
- [87] Michałowicz, J. Bisphenol A – Sources, toxicity and biotransformation. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37 (2014): 738–758.
- [88] Vogel, S. A. The Politics of Plastics: The Making and Unmaking of Bisphenol A “Safety”. *American Journal of Public Health- Supplement* 3, 99 (2009).
- [89] Brasil. ANVISA. Resolução N° 105, de 19 de maio de 1999. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_105_1999_COMP.pdf/35bc8b0b-8efb-4a66-b852-0e2d60ccc455. Acesso em: 04 set. 2020.
- [90] Brasil. ANVISA. Resolução N° 17, de 17 de março de 2008. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/res0017_17_03_2008.pdf/5710c792-2d7d-4e74-91c5-b63b86edcdae. Acesso em: 04 set. 2020.
- [91] Brasil. Ministério da Saúde. Resolução - RDC n. 41/2011. Disponível em: http://bvsm.sau.gov.br/bvs/sau/legis/anvisa/2011/res0041_16_09_2011.html. Acesso em: 04 set. 2020.
- [92] Z. Brenn-Struckhoffova , M. Cichna-Markl. Determination of bisphenol A in wine by sol-gel immunoaffinity chromatography, HPLC and fluorescence detection. *Food Additives and Contaminants* 23 (2006): 1227–1235.
- [93] Maragou, N.C., Lampi, E.N., Thomaidis, N.S., Koupparis, M.A.. Determination of bisphenol A in milk by solid phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1129 (2006): 165 -173.
- [94] Basheer, C., Lee, H.K., Tan, K.S. Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Mar. Pollut. Bull.* 48 (2004): 1161-1167.
- [95] Kuo, H.W., Ding, W.H. Trace determination of bisphenol A and phytoestrogens in infant formula powders by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of chromatography A* 1027 (2004): 67-74.
- [96] Inoue, K., Murayama, S., Takeba, K., Yoshimura, Y., Nakazawa, H. Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey. *Journal of Food Composition and Analysis* 16 (2003): 497- 506.
- [97] Kang, J.H., Kondo, F., Katayama, Y. Importance of control of enzymatic degradation for determination of bisphenol A from fruits and vegetables. *Analytica Chimica Acta* 555 (2006): 114-117.

- [98] Chen, S., Chang, Q., Yin, K., He, Q., Deng, Y., Chen, B., Liu, C., Wang, Y., Wang, L. Rapid Analysis of Bisphenol A and Its Analogues in Food Packaging Products by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 65 (2017): 4859–4865.
- [99] Brasil. Ministério Da Agricultura. Pecuária e Abastecimento. Portaria N.º 229, de 25 de Outubro de 1988. Acesso em: 04 set. 2020.
- [100] Ballesteros-Gomez, A., Rubio, S., Perez-Bendito, D. Analytical methods for the determination of bisphenol A in food. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009): 449–469.
- [101] Y. Fan, Shuhui Liu e Qilong Xie. Rapid determination of phthalate esters in alcoholic beverages by conventional ionic liquid dispersive liquid–liquid microextraction coupled with high performance liquid chromatography. *Talanta* 119 (2014): 291–298.
- [102] S. S. Arain, T. G. Kazi, J. B. Arain, H. I. Afridi, K. D. Brahman e Naemullah. Preconcentration of toxic elements in artificial saliva extract of different smokeless tobacco products by dual-cloud point extraction. *Microchem. J.* 112 (2014): 42–49.
- [103] Ian M. Smallwood. *Handbook of Organic solvent properties* (1996).
- [104] Guia EURACHEM / CITAC. *Determinando a Incerteza na Medição Analítica*. 2ª Edição, (2002).
- [105] Thomas Bouvarel, Nathalie Delaunay e Valérie Pichon. Selective extraction of cocaine from biological samples with a miniaturized monolithic molecularly imprinted polymer and on-line analysis in nano-liquid chromatography. *Analytica Chimica Acta* 1096 (2020): 89-99.
- [106] Fengxia Sun, Lichao Kang, Xiaoli Xiang, Hongmin Li, Xiaoling Luo, Ruifeng Luo, Chunxia Lu, Xiayu Peng. Migration of phthalates, alkylphenols, bisphenol A and di(2-ethylhexyl)adipate from food packaging. *Food Control* 27 (2012): 132-138.
- [107] Laura Mateo-Vivaracho, Juan Cacho e Vicente Ferreira. Improved solid-phase extraction procedure for the isolation and in-sorbent pentafluorobenzyl alkylation of polyfunctional mercaptans. Optimized procedure and analytical applications. *J Chromatogr A* 1185 (2008): 9-18.
- [108] Guan Li Xie, Hong Yu, Mu Han Deng, Xue Liang Zhao e Peng Yu. A colorimetric microfluidic sensor made by a simple instrumental-free prototyping process for sensitive quantitation of copper. *Chemical Papers* 73 (2019): 1509–1517.
- [109] Chandra M. Pandey, Shine Augustine, Saurabh Kumar, Suveen Kumar, Sharda Nara, Saurabh Srivastava, e Bansi D. Malhotra. Microfluidics Based Point-of-Care Diagnostics. *Biotechnology Journal*, 13(2017): 1–11.
- [110] 135. George M. Whitesides. The origins and the future of microfluidics. *Nature* 442 (2006): 368–373.
- [111] R. Martinez-Duarte, G. Turon Teixidor, P. P. Mukherjee, Q. Kang e M. J. Madou. Perspectives of Micro and Nanofabrication of Carbon for

- Electrochemical and Microfluidic Applications. *Microfluidics and Microfabrication* (2010): 181-263.
- [112] Wendell Karlos Tomazelli Coltro. *Fabricação e Avaliação de Microdispositivos para Eletroforese com Detecção Eletroquímica*. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2004.
- [113] Fabrício Ribeiro de Souza, Guilherme Liberato Alves e Wendell Karlos Tomazelli Coltro. Capillary-Driven Toner-Based Microfluidic Devices for Clinical Diagnostics with Colorimetric Detection. *Anal. Chem.* 84 (2012): 9002–9007.
- [114] Gabriela R. M. Duarte, Carol W. Price, Janice L. Littlewood, Doris M. Haverstick, Jerome P. Ferrance, Emanuel Carrilhode e James P. Landers. Characterization of dynamic solid phase DNA extraction from blood with magnetically controlled silica beads. *Analyst* 135 (2010): 531-537.
- [115] Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Susan M Lunte e Emanuel Carrilho. Comparison of the analytical performance of electrophoresis microchannels fabricated in PDMS, glass, and polyester-toner. *Electrophoresis.* 24 (2008): 4928-4937.
- [116] Kyu-YounHwang, Joon-HoKim, Kahp-Yang Suh, Jong Soo Ko e NamHuh. Low-cost polymer microfluidic device for on-chip extraction of bacterial DNA. *Sensors and Actuators B: Chemical* 155 (2011): 422-429.
- [117] Emanuel Carrilho, Andres W Martinez, George M Whitesides. Understanding wax printing: a simple micropatterning process for paper-based microfluidics. *Anal Chem.* 16 (2009): 7091-7095.
- [118] Holger Becker e Claudia Gärtner. Polymer microfabrication technologies for microfluidic systems. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 390(2008): 89-111.
- [119] Karina Lopes Dornelas. *FABRICAÇÃO DE DISPOSITIVOS MICROFLUÍDICOS A BASE DE PAPEL UTILIZANDO MATERIAIS DE BAIXO CUSTO*. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2013.
- [120] Andres W Martinez , Scott T Phillips, Manish J Butte e George M Whitesides. Patterned paper as a platform for inexpensive, low-volume, portable bioassays. *Angew Chem Int Ed Engl.* 8 (2007): 1318-20.
- [121] Andres W. Martinez, Scott T. Phillips, Emanuel Carrilho, Samuel W. Thomas, Hayat Sindi e George M. Whitesides. Simple Telemedicine for Developing Regions: Camera Phones and Paper-Based Microfluidic Devices for Real-Time, Off-Site Diagnosis. *Anal. Chem.* 80 (2008): 3699–3707.
- [122] Wendell Karlos Tomazelli Coltro, Dosil Pereira de Jesus, José Alberto Fracassi da Silva, Claudimir Lucio do Lago e Emanuel Carrilho. Toner and paper-based fabrication techniques for microfluidic applications. *Electrophoresis* 15 (2010): 2487-2498.

- [123] Cristiane Margarete Daikuzono. Desenvolvimento de dispositivos microfluídicos para análise de sistemas líquidos complexos. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Carlos, 2017.
- [124] Yan Li, Willem Van Roy, Liesbet Lagae, e Philippe M. Vereecken. Analysis of fully on chip microfluidic electrochemical systems under laminar flow. *Electrochimica Acta* 231 (2017): 200–208.
- [125] Xuan Weng e Suresh Neethirajan. Aptamer-based fluorometric determination of norovirus using a paper-based microfluidic device. *Microchimica Acta* 184 (2017): 4545–4552.
- [126] R. Daniel Pedde, Huiyan Li, Christoph H. Borchers e Mohsen Akbari. Microfluidic-Mass spectrometry interfaces for translational proteomics. *Trends Biotechnol* 35 (2017): 954–970.
- [127] Ben Tucker, Matthias Hermann, Alexa Mainguy and Richard Oleschuk. Hydrophobic/hydrophilic patterned surfaces for directed evaporative preconcentration. *Analyst* 145 (2020): 643-650.
- [128] H. Zhai, J. Li, Z. Chen, Z. Su, Z. Liu, X. Yu, A glass/PDMS electrophoresis microchip embedded with molecular imprinting SPE monolith for contactless conductivity detection, *Microchem. J.* 114 (2014) 223–228.
- [129] H. Yang, J.M. Mudrik, M.J. Jebrail, A.R. Wheeler, A digital microfluidic method for in situ formation of porous polymer monoliths with application to solid-phase extraction, *Anal. Chem.* 83 (2011) 3824–3830.
- [130] J.M. Kokosa, Recent trends in using single-drop microextraction and related techniques in green analytical methods, *Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 194–204.
- [131] B.C. Giordano, D.S. Burgi, S.J. Hart, A. Terray, On-line sample pre-concentration in microfluidic devices: a review, *Anal. Chim. Acta* 718 (2012) 11–24.
- [132] E. Fornells, B. Barnett, M. Bailey, R.A. Shellie, E.F. Hilder, M.C. Breadmore. Membrane assisted and temperature controlled on-line evaporative concentration for microfluidics. *Journal of Chromatography A* 1486 (2017): 110–116.
- [133] Sharon Y. Wong, Mario Cabodi, Jason Rolland, and Catherine M. Klapperich. Evaporative Concentration on a Paper-Based Device to Concentrate Analytes in a Biological Fluid. *Analytical Chemistry* 86 (2014): 11981–11985.
- [134] Hainan Zhang, Roald M. Tiggelaar, Stefan Schlautmann, Jacob Bart, Han Gardeniers. In-line sample concentration by evaporation through porous hollow fibers and micromachined membranes embedded in microfluidic devices. *Electrophoresis* 37 (2016): 463–471.
- [135] Abdennour Abbas, Andrew Brimer, Joseph M. Slocik, Limei Tian, Rajesh R. Naik, and Srikanth Singamaneni. Multifunctional Analytical Platform on a Paper Strip: Separation, Preconcentration, and Subattomolar Detection. *Analytical Chemistry* 85 (2013): 3977–3983

- [136] Mariana S. Godinho, Anselmo E. Oliveira e Marcelo M.Sena. Determination of interfacial tension of insulating oils by using image analysis and multi-way calibration. *Microchemical Journal* 96 (2010): 42-45.
- [137] Poliana M. Santos, Peter D. Wentzell e Edenir R. Pereira-Filho. Scanner Digital Images Combined with Color Parameters: A Case Study to Detect Adulterations in Liquid Cow's Milk. *Food Analytical Methods* 5 (2012): 89–95.
- [138] Jesiane Queiroz. O que significa RGB? Tudo sobre esse Sistema de Cores! 2018. Disponível em: < <http://www.afixgraf.com.br/o-que-significa-rgb/>>. Acesso: dez 2020.
- [139] A. Fernando Ribeiro. Virtual Sensors for Autonomous Mobile Robots Through The Use of Image Processing Tools. *Robótica* (2005): 10-17.
- [140] Giorgia Foca, Francesca Masino, Andrea Antonelli e Alessandro Ulrici. Prediction of compositional and sensory characteristics using RGB digital images and multivariate calibration techniques. *Analytica Chimica Acta* 706 (2011): 238-245.
- [141] Paulo Roberto Oliveira, Alyne C. Lamy-Mendes, Edivaltrys Inayve Pissinati Rezende, Antonio Sálvio Mangrich, Luiz Humberto Marcolino Junior e Márcio F. Bergamini. Electrochemical determination of copper ions in spirit drinks using carbon paste electrode modified with biochar. *Food Chemistry* 171 (2015): 426–431.
- [142] Guan Li Xie, Hong Yu, Mu Han Deng, Xue Liang Zhao e Peng Yu. A colorimetric microfluidic sensor made by a simple instrumental-free prototyping process for sensitive quantitation of copper. *Chemical Papers* 73 (2019): 1509–1517.
- [143] Renata Adriana Labanca, Maria Beatriz Abreu Glória, Vitor José Pinto Gouveia, Robson José de Cássia Franco Afonso. Determination of copper and alcohol contents in sugar cane spirits produced in the state of Minas Gerais. *Quimica Nova* 29 (2006): 1110-1113.
- [144] Gabriel M. Fernandes, Júlia de Sousa, João Flávio da Silveira Petrucci, Alex D. Batista. Paper-based analytical device for colorimetric detection of Cu²⁺ in Brazilian sugarcane spirits by digital image treatment. *Microchemical Journal* 159 (2020): 105463.
- [145] Annete de J. Boari Lima, Maria das Graças Cardoso, Mário César Guerreiro, Flávio Araújo Pimentel. Using activated carbon to remove copper from sugar cane spirit, *Quimica Nova* 29 (2006): 247-250.
- [146] Brasil. Ministério Da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N° 13, De 29 De Junho De 2005.
- [147] Renata Garbin, Stanislaw Bogusz Junior, Marco Aurélio Montano. Níveis de cobre em amostras de cachaça produzidas na região noroeste do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural* 35 (2005): 1436-1440.
- [148] João Carlos de Souza. Determinação íons cobre(II) em aguardente de cana-de-açúcar utilizando a combinação spot test - espectroscopia de reflectância difusa. Dissertação São Paulo: UNESP, 2015.

- [149] Mexican Official Standard. Alcoholic Beverages, Health Specifications And Commercial Labeling. NOM-142-SSA1/SCFI-2014.
- [150] Manuel Mendez Garcia, Kazimierz Wrobel, Eunice Yanez Barrientos, Alma Rosa Corrales Escobosa, Oracio Serrano, Israel Enciso Donis e Katarzyna Wrobel. Determination of copper and lead in tequila by conventional MALDI-TOFMS and partial least square regression. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 32 (2018): 2174-2184.
- [151] Willian Toito Suarez, Wesley Lira Gabriel, Benedito Roberto de Alvarenga Junior, Mathews de Oliveira Krambeck Franco e Vagner Bezerra dos Santos. A Simplistic Portable LED-Based Photometer for In Situ Determination of Copper in Sugarcane Spirits. *Food Analytical Methods* 11 (2018):3324–3330.
- [152] M. Arvand, E. Bozorgzadeh, M. A. Zanjanchi e Sh. Shariati. Dispersive Liquid–Liquid Microextraction of Fe(II) and Cu(II) with Diethyldithiocarbamate and Their Simultaneous Spectrophotometric Determination Using Mean Centering of Ratio Spectra. *Journal of Analytical Chemistry* 69 (2014): 243–247.
- [153] Mohammad Nasir Uddin, Md. Abdus Salam e Mohammad Amzad Hossain. Spectrophotometric measurement of Cu(DDTC)₂ for the simultaneous determination of zinc and copper. *Chemosphere* 90 (2013): 366–373.
- [154] Hassan Sereshti, Sadjad Bakhtiari e Vahid Khojeh. Simultaneous determination of aluminum, copper, iron and zinc in *Oscillatoria*, *Juncus littoralis* tissues and wetland water samples by ultrasound-assisted emulsification-microextraction combined with ICP-OES. *Analytical Methods* 3 (2011): 2936-2942.
- [155] Lei Wang, Jia-Bin Zhou, Xia Wang, Zhen-Hua Wang e Ru-Song Zhao. Simultaneous determination of copper, cobalt, and mercury ions in water samples by solid-phase extraction using carbon nanotube sponges as adsorbent after chelating with sodium diethyldithiocarbamate prior to high performance liquid chromatography. *Anal Bioanal Chem* 408 (2016): 4445–4453.
- [156] Mathews de Oliveira Krambeck Franco, Willian Toito Suarez, Vagner Bezerrados Santos, Ian Santana Resque, Marcelo Henrique dos Santos e Luis Fermín Capitán-Vallvey. Microanalysis based on paper device functionalized with cuprizone to determine Cu²⁺ in sugar cane spirits using a smartphone. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 253 (2021).
- [157] Kenia Dias Pessoa, Willian Toito Suarez, Marina Ferreira dos Reis, Mathews de Oliveira Krambeck Franco, Renata Pereira Lopes Moreira, Vagner Bezerra dos Santos. A digital imagemethod of spot tests for determination of copper in sugar cane spirits. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy* 185 (2017) 310–316.

- [158] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária – Mapa. Garantia Manual de Garantia da Qualidade Analítica. Resíduos e Contaminantes em Alimentos (2011).
- [159] Aline Piasini, Simone Stulp, Simone Morelo Dal Bosco e Fernanda Scherer Adami. Análise da Concentração De Tartrazina em Alimentos Consumidos por Crianças e Adolescentes. *Revista UNINGÁ Review* 19 (2014): 14-18.
- [160] Marcella Cardoso Lemos de Oliveira. Descoloração de Corante Industrial Têxtil por *Pseudomonas oleovorans* CBMAI 0703. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco. Recife, 2010.
- [161] Maria V. Boldrin Zanoni e Hideko Yamanaka. Corantes Caracterização Química, Toxicológica, Métodos de Detecção e Tratamento. 1ª Edição São Paulo: Cultura Acadêmica (2016).
- [162] Chao, Y., Chen, Y., Lin, H., Huang, Y. Rapid screening of basic colorants in processed vegetables through mass spectrometry using an interchangeable thermal desorption electrospray ionization source. *Analytica Chimica Acta* 1010 (2018): 44-53.
- [163] Taverna, D., Donna, L. D., Mazzotti, F., Policicchio, B., e Sindona, G. High-Throughput determination of Sudan Azo-dyes within powdered chili pepper by paper spray mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* 48 (2013): 544–547
- [164] Guo, t., Zhang, z., Yannell, K. E., Dong, Y. e Cooks, R. G. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal beverage dyes. *Analytical Methods* 9 (2017): 6273-6279.
- [165] Botelho, B. G., Dantas, K. C. F., Sena, M. M. Determination of allura red dye in hard candies by using digital images obtained with a mobile phone and N-PLS. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 167 (2017): 44–49.
- [166] Botelho, B. G., Assis, L. P., Sena, M. M. Development and analytical validation of a simple multivariate calibration method using digital scanner images for sunset yellow determination in soft beverages. *Food Chemistry* 159 (2014): 175–180.
- [167] ANVISA. Informe Técnico n. 68, de 3 de setembro de 2015. Disponível em < https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/alimentos/informes/copy_of_68de2015>. Acesso jan 2021.
- [168] ANVISA. RESOLUÇÃO Nº 41, DE 10 DE AGOSTO DE 2009. Disponível em: <http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0041_10_08_2009.html> Acesso jan 2021.
- [169] Michalina Oplatowska-Stachowiak e Christopher T Elliott. Food colors: Existing and emerging food safety concerns. *Critical reviews in food science and nutrition* 57 (2015): 524-548.
- [170] Frédéric Martin, Jean-Marie Oberson, Marco Meschiari e Caroline Munari. Determination of 18 water-soluble artificial dyes by LC–MS in selected matrices. *Food Chemistry* 197 (2016): 1249–1255.

- [171] Michael J. Scotter. Emerging and persistent issues with artificial food colours: natural colour additives as alternatives to synthetic colours in food and drink. *Quality Assurance and Safety of Crops & Foods*, v. 3, p. 28-39, 2011.
- [172] Arthur Medeiros Câmara. *Corantes Azo: Características Gerais, Aplicações e Toxicidade*. TCC (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Natal, 2017.
- [173] IAL. *Métodos Físicos-Químicos para Análise de Alimentos*. 4ª ed. Instituto Adolfo Lutz: São Paulo (IAL), (2005):1020.
- [174] Marta Kucharska e Jan Grabka. A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes. *Talanta* 80 (2010): 1045–1051.
- [175] Ming Ma, Xubiao Luo, Bo Chen, Shengpei Su e Shouzhao Yao. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by highperformance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry. *Journal of Chromatography A* 1103 (2006): 170–176.
- [176] Eric Mejia, Yongsheng Ding, Maria F. Mora e Carlos D. Garcia. Determination of banned sudan dyes in chili powder by capillary electrophoresis. *Food Chemistry* 102 (2007): 1027–1033.
- [177] Xianshuang Meng, Yanbing Zhai, Wenfeng Yuan, Yueguang Lv, Qing Lv, Hua Bai, Zengyuan Niu, Wei Xu e Qiang Ma. Ambient ionization coupled with a miniature mass spectrometer for rapid identification of unauthorized adulterants in food. *Journal of Food Composition and Analysis* 85 (2020): 103333.
- [178] Tianyang Guo, Zezhen Zhang, Karen E. Yannell, Yiyang Dong e R. Graham Cooks. Paper spray ionization mass spectrometry for rapid quantification of illegal beverage dyes. *Analytical Methods* 9 (2017): 6273-6279.
- [179] Alpendurada, Maria de Fatima. SPME: a promising technique for sample preparation in environmental analysis. *Journal of Chromatography A* 889 (2000): 3–14.
- [180] Pawliszyn, Heather Lord e Janusz. Microextraction of drugs. *Journal of Chromatography A* 902 (2000): 17-63.
- [181] Hiroyuki Kataoka, Heather L. Lord e Janusz Pawliszyn. Applications of solid-phase microextraction in food analysis. *Journal of Chromatography A* 880 (2000): 35-62.
- [182] Pawliszyn, Heather Lord e Janusz. Evolution of solid-phase microextraction technology. *Journal of Chromatography A* 885 (2000): 153-193.
- [183] E. Baltussen, C. Cramers e P. Sandra. Sorptive sample preparation – a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 373 (2002): 3–22.
- [184] Alpendurada, Mariade Fátima. Solid-phase microextraction: a promising for sample preparation in environmental. *Journal of Chromatography A* 889 (2000): 3-14.
- [185] Pawliszyn, Zhouyao. Zhang e Janusz. Headspace solid phase microextraction. *Anal. Chem.* 65 (1993): 1843–1852.

- [186] Brasil. Decreto Nº 6.871, de 4 de junho de 2009. Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2007-2010/2009/decreto/d6871.htm. Acesso em: 04 jul. 2020.
- [187] Produção de cachaça: uma das atividades mais rentáveis do agronegócio brasileiro. Disponível em: <http://blogs.jornaldaparaiba.com.br/confrariadocopo/2019/10/19/producao-de-cachaca-um-dos-negocios-mais-rentaveis-do-agronegocio-brasileiro/>. Acesso em: 13 set. 2020.
- [188] Sebrae. A CACHAÇA DE ALAMBIQUE: um estudo sobre hábitos de consumo em Goiânia, 2019. Disponível em: <https://www.sebrae.com.br/Sebrae/Portal%20Sebrae/UFs/GO/Sebrae%20de%20A%20a%20Z/A%20Cacha%20C3%A7a%20de%20Alambique%20-%20Um%20estudo%20sobre%20o%20h%20C3%A1bito%20de%20Consumo%20em%20Goi%20C3%A2nia.pdf>
- [189] Brasil. ANVISA. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 13, DE 29 DE JUNHO DE 2005. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/instrucao-normativa-no-13-de-29-de-junho-de-2005.pdf/view>. Acesso em: 01 jul. 2020.
- [190] Vera Alves, João Gonçalves, José A. Figueira, Laura P. Ornelas, Ricardo N. Branco, José S. Câmara E Jorge A.M. Pereira. Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chemistry* 326 (2020): 126856.
- [191] Marcus H. Canuto, Carlos A. Rosa, Fabiana de Moura, Rodinei Augusti e Helmuth G. L. Siebal. Distillation of fermented sugarcane juice:fractions characterized by electrospray ionization mass spectrometry and multivariate data treatment. *Journal of Mass Spectrometry* 47 (2012): 901–904.
- [192] Patterson P. De Souza, Helmuth G. L. Siebald, Daniella V. Augusti, Waldomiro B. Neto, Vanessa M. Amorim, Rodrigo R. Catharino, Marcos N. Eberlin e Rodinei August. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Brazilian Artisan Cachacüa Aged in Different Wood Casks. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (2007): 2094-2102.
- [193] J. A. Pino, P. Winterhalter, R. Gök e J.C. González. Characterisation of Aroma-Active Compounds in Commercial Aged Rums. *Acta Alimentaria* 46 (2017): 69-75.
- [194] Roberto Rodriäguez Madrera, Domingo Blanco Gomis e Juan J. Mangas Alonso. Influence of Distillation System, Oak Wood Type, and Aging Time on Composition of Cider Brandy in Phenolic and Furanic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003): 7969-7973.
- [195] Domingo Blanco Gomis, Daysi Muro Tamayo e Juan J. Mangas Alonso. Evolution of Sugars in Cider Brandy Aged in Oak Barrels: A Contribution to Its Characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51 (2003): 923-926.

- [196] Teodora Emilia Coldea, Carmen Socaciu, Elena Mudura, Sonia Ancuța Socaci, Floricuța Ranga, Carmen Rodica Pop, Frank Vriesekoop e Antonella Pasqualone. Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips. *Food Chemistry* 320 (2020): 126643.
- [197] Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. A cachaça no Brasil: dados de registro de cachaças e aguardentes / Secretaria de Defesa Agropecuária. – Brasília: 2019.
- [198] David Douglas de Sousa Fernandes, Valber Elias de Almeida, Marcelo Marques Fontes, Mário César Ugulino de Araújo, Germano Vêras e Paulo Henrique Gonçalves Dias Diniz. Simultaneous identification of the wood types in aged cachaças and their adulterations with wood extracts using digital images and SPA-LDA. *Food Chemistry* 273 (2019): 77–84.
- [199] Patterson P. de Souza, Zenilda de L. Cardeal, Rodinei Augusti, Paul Morrison e Philip J. Marriott. Determination of volatile compounds in Brazilian distilled cachac, a by using comprehensive two-dimensional gas chromatography and effects of production pathways. *Journal of Chromatography A*, 1216 (2009): 2881–2890.
- [200] Teodora Emilia Coldea, Carmen Socaciu, Elena Mudura, Sonia Ancuța Socaci, Floricuța Ranga, Carmen Rodica Pop, Frank Vriesekoop e Antonella Pasqualone. Volatile and phenolic profiles of traditional Romanian apple brandy after rapid ageing with different wood chips. *Food Chemistry* 320 (2020): 126643.
- [201] Karen Hevia, Remedios Castro, Ramón Natera, Juan Alberto González-García, Carmelo G. Barroso e Enrique Durán-Guerrero. Optimization of Head Space Sorptive Extraction to Determine Volatile Compounds from Oak Wood in Fortified Wines. *Chromatographia* 79 (2016): 763–771.
- [202] Georgiana-Diana Dumitriu (Gabur), Rafael A. Peinado, Valeriu V. Cotea, Nieves López de Lerma. Volatilome fingerprint of red wines aged with chips or staves: Influence of the aging time and toasting degree. *Food Chemistry* 310 (2020): 125801.
- [203] José Raúl Belmonte-Sánchez, Simona Gherghel, Javier Arrebola-Liébanas, Roberto Romero González, José Luis Martínez Vidal, Ivan Parkinc e Antonia Garrido Frenich. Rum classification using fingerprinting analysis of volatile fraction by headspace solid phase microextraction coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 187 (2018): 348–356.
- [204] Hebert Vinicius Pereira, Victoria Silva Amador, Marcelo Martins Sena, Rodinei Augusti e Evandro Piccin. Paper spray mass spectrometry and PLS-DA improved by variable selection for the forensic discrimination of beers. *Analytica Chimica Acta* 940 (2016): 104-112.
- [205] Janaína Aparecida Reis Teodoro, Hebert Vinicius Pereira, Marcelo Martins Sena, Evandro Piccin, Jorge Jardim Zacca e Rodinei Augusti. Paper spray mass spectrometry and chemometric tools for a fast and reliable

- identification of counterfeit blended Scottish whiskies. *Food Chemistry* 237 (2017): 1058–1064.
- [206] Flávia Tosato, Radigya M. Correia, Bruno G. Oliveira, André M. Fontes, Hildegarde S. França, Wendell K. T. Coltro, Paulo R. Filgueiras e Wanderson Romão, Paper spray ionization mass spectrometry allied to chemometric tools for quantification of whisky adulteration with additions of sugarcane spirit. *Analytical Methods* 10 (2018): 1952-1960.
- [207] Tianyang Guo, Wei Yong e Yiyang Dong. Automatically High-Throughput Quantification by Paper Spray Ionization Mass Spectrometry for Multiple Pesticides in Wine. *Food Analytical Methods* 12 (2019):1208–1217.
- [208] Hans Michael Eblinger. *Handbook of Brewing: Processes, Technology, Markets*, Willey-VCH, Darmstadt, (2009).
- [209] Alexssander S. Araujo, Lilian L. da Rocha, Daniela M. Tomazela, Alexandra C. H. F. Sawaya, Reinaldo R. Almeida, Rodrigo R. Catharino e Marcos N. Eberlin. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of beer. *Analyst* 130 (2005): 884–889.
- [210] Brasil. MAPA, Instrução Normativa Nº 65, de 10 De Dezembro De 2019.
- [211] NewTrade. Cerveja puro malte cresce 81% em volume de consumo no Brasil. 2019. Disponível em: <https://newtrade.com.br/economia/cerveja-puro-malte-cresce-81-em-volume-de-consumo-no-brasil/#:~:text=Cerveja%20puro%20malte%20cresce%2081%25%20em%20volume%20de%20consumo%20no%20Brasil,-Economia&text=O%20segmento%20foi%20consumido%20por,pontos%20percentuais%20em%2012%20meses>. Acesso 12 dez.2020.
- [212] T. Cajka, K. Ridelova, M. Tomaniova, J. Hajslova, Recognition of beer brand based on multivariate analysis of volatile fingerprint, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010) 4195e4203
- [213] Serena Rossi , Valeria Sileoni, Giuseppe Perretti e Ombretta Marconi. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 94 (2014): 919-928.
- [214] Gilmare Antônia da Silva, Fabio Augusto e Ronei Jesus Poppi. Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food Chemistry* 111 (2008): 1057-1063.
- [215] Christine A. Hughey, Chelsey M. McMinn e Jenny Phung. Beeromics: from quality control to identification of differentially expressed compounds in beer. *Metabolomics* 12 (2016): 1-13.
- [216] Nazia Mahmood, Nicolas Petraco e Yi He. Elemental fingerprint profile of beer samples constructed using 14 elements determined by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS): multivariate analysis and potential application to forensic sample comparison. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 402 (2012): 861-869.
- [217] Dirk W. Lachenmeier, Willi Frank, Eberhard Humpfer, Hartmut Schäfer, Silke Keller, Monika Mörtter e Manfred Spraul. Quality control of beer using high-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy and multivariate analysis. *European Food Research and Technology* 220 (2005): 215-221.

- [218] Karina Lopes Dornelas, Nicolo Dossi e Evandro Piccin. A simple method for patterning poly(dimethylsiloxane) barriers in paper using contact-printing with low-cost rubber stamps. *Analytica Chimica Acta* 858 (2015): 82-90.
- [219] H. Yang, Songlei Wang, S. Yu, Xin-An Zeng e Da Wen Sun. Characterization and Semiquantitative Analysis of Volatile Compounds in Six Varieties of Sugarcane Juice. *International Journal of Food Engineering* 10 (2014): 821-828.
- [220] Satoshi Inomata e Jun Hirokawa. Non-radioactive Chemical Ionization Mass Spectrometry Using Acetic Acid-Acetate Cluster as a Reagent Ion for the Real-time Measurement of Acids and Hydroperoxides. *Chemistry Letters* 46 (2017): 38–41.
- [221] Ana Carolina L. Amorim, Ana Maria C. Hovell, Angelo C. Pinto, Marcos N. Eberlin, Neusa P. Arruda, Elenilda J. Pereira, Humberto R. Bizzo, Rodrigo R. Catharino, Zenildo B. Morais Filho e Claudia M. Rezende. Green and roasted arabica coffees differentiated by ripeness, process and cup quality via electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20 (2009).
- [222] Omar Al Kadhi, Antonietta Melchini, Richard Mithen e Shikha Saha. Development of a LC-MS/MS Method for the Simultaneous Detection of Tricarboxylic Acid Cycle Intermediates in a Range of Biological Matrices. *Journal of Analytical Methods in Chemistry* (2017): 1-12.
- [223] Laurian Vlase, Bela Kiss, Sorin E. Leucuta e Simion Gocan. A Rapid Method for Determination of Resveratrol in Wines by HPLC-MS. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* 32 (2009):2105-2121.
- [224] Patterson P. de Souza, Ana M. M. Resende, Daniella V. Augusti, Fernanda Badotti, Fátima de Cássia O. Gomes, Rodrigo R. Catharino, Marcos N. Eberlin e Rodinei Augusti. Artificially-aged cachaça samples characterised by direct infusion electrospray ionisation mass spectrometry. *Food Chemistry* 15 (2014): 77-81.
- [225] Yuanyuan Gao, Ahui Xue, Xiang Li, Xueyong Huang, Fangjian Ning, Xiaoping Zhang, Tao Liu, Huanwen Chen, Liping Luo. Analysis of chemical composition of nectars and honeys from Citrus by extractive electrospray ionization high resolution mass spectrometry. *LWT* 131 (2020).
- [226] Hiroshi Moriwaki, Ayaka Hagiwara, Midori Takasaki, Fuminori Izumi, Arata Watanabe, Ryo Shimizu, Natsuko Kuribayashi, Yui Totani e Yuka Suzuki. *Analytical Sciences* 26 (2010):379-82.
- [227] Hao Zhu, Xiaohong Chen, Yonggang Zhao, Xiaoping Li, Shengdong Pan, Micong Jin. Identification of benzoic acid, sorbic acid and dehydroacetic acid residues in alcoholic drinks and beverages. *Journal of hygiene research* 43 (2014): 116-20.
- [228] Hiroshi Moriwaki, Ayaka Hagiwara, Midori Takasaki, Fuminori Izumi, Arata Watanabe, Ryo Shimizu, Natsuko Kuribayashi, Yui Totani, Yuka Suzuki. Electrospray ionization–mass spectrometric measurement of sake, a traditional Japanese alcohol beverage, for Characterization. *Analytical Sciences* 26 (2010): 379-82.